

**T.C.
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI SÜRE VE KONSANTRASYONLARDA BAKIR
AĞIR METALİNE MARUZ BIRAKILAN NOHUT (*Cicer
arietinum* L.) YAPRAKLARINDA STRES-ALAKALI
GENLERİN İFADE DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ**

**Tezi Hazırlayan
Nuriye ÖZTÜRK**

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Musa KAR**

**Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Eylül 2019
NEVŞEHİR**

**T.C.
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI SÜRE VE KONSANTRASYONLARDA BAKIR
AĞIR METALİNE MARUZ BIRAKILAN NOHUT (*Cicer
arietinum* L.) YAPRAKLARINDA STRES-ALAKALI
GENLERİN İFADE DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ**

**Tezi Hazırlayan
Nuriye ÖZTÜRK**

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Musa KAR**

**Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Eylül 2019
NEVŞEHİR**

Dr. Öğr. Üye. Musa KAR danışmanlığında Nuriye ÖZTÜRK tarafından hazırlanan "**Farklı Süre ve Konsantrasyonlarda Bakır Ağır Metaline Maruz Bırakılan Nohut (*Cicer arietinum* L.) Yapraklarında Stres-Alakalı Genlerin İfade Düzeylerinin İncelenmesi**" başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

12/09/2019

JÜRİ

Başkan : Prof. Dr. Zeliha LEBLEBİCİ

Üye : Dr. Öğrt. Üye Fatih Doğan KOCA

Üye : Dr. Öğrt. Üye Musa KAR

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun. 20/09/2019...tarih ve...59.603.. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

20/09/2019
Prof. Dr. Şahin ÖZTÜRK
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİM SAYFASI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada yer alan bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu ve bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

(İmza)



Nuriye ÖZTÜRK

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince danışmanlığımı yürüten, tez çalışmasının her aşamasında yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Dr. Öğretim Üyesi Musa KAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması boyunca maddi ve manevi desteğinden ayrıca anlayışından dolayı kıymetli eşim Arif ÖZTÜRK'e ve bu süreçte sıkıntımızı alan, yüzümüzü güldüren kızımız Ebrar ÖZTÜRK'e en içten duygularla teşekkür ederim.

Hayatımın her anında olduğu gibi tez çalışması süresince de beni her türlü destekleyen değerli aile büyüklerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**FARKLI SÜRE VE KONSANTRASYONLARDA BAKIR AĞIR METALİNE
MARUZ BIRAKILAN NOHUT (*Cicer arietinum* L.) YAPRAKLARINDA
STRES-ALAKALI GENLERİN İFADE DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Nuriye ÖZTÜRK

NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Eylül 2019

ÖZET

Bu çalışmada, nohut (*Cicer arietinum* L.) bitkisi farklı süre (1, 3 ve 5 gün) ve konsantrasyonlarda (0, 50, 100 ve 200 µM) bakır (Cu) ağır metale maruz bırakılmıştır. Çalışma sonucunda, bitkinin yaprak dokularından örnekler alınarak reaktif oksijen türlerinden (ROT) biri olan hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hücrede oksidatif stresin göstergesi olan malondialdehit (MDA) miktarları tespit edilmiştir. Ayrıca hücrel antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (*Cu-Zn/SOD*) ve katalaz (*CAT*) enzimlerinin ve antioksidan özelliği taşıyan metallothionein (*MT2*) proteininin ekspresyon seviyelerindeki değişim, house-keeping gen olarak seçilmiş aktin (*ACT*) geninin ekspresyon seviyesine göre belirlenmiştir.

Çalışmamızda, artan süre ve konsantrasyona bağlı olarak MDA ve hücrel H₂O₂ konsantrasyonlarında oldukça kararlı bir artış olduğu tespit edilmiştir. *Cu-Zn/SOD*, *CAT* ve *MT2* ifade seviyelerinin ise tüm süre ve konsantrasyonlarda kontrolden yüksek düzeyde ifade edildiği tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak en yüksek *Cu-Zn/SOD*, *CAT* ve *MT2* ifade seviyelerine 5. gün 50 µM Cu uygulamasında rastlanmıştır. Buna ek olarak, belli bir konsantrasyona kadar artış gösteren ekspresyon seviyelerinin uzayan süre ve konsantrasyona bağlı olarak bir azalma trendine girdiği belirlenmiştir. 200 µM Cu uygulamasındaki ekspresyon seviyelerinin, 50 ve 100 µM Cu uygulamalarındaki ekspresyon seviyelerinden daha düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir. Çalışma

sonucunda, ekspresyon seviyelerindeki değişimden Cu maruziyetine bağlı olarak meydana gelen oksidatif stres sonucu üretilen hücresel H₂O₂'nin sorumlu olduğu düşünölmektedir. Hücresel H₂O₂ belli bir konsantrasyona kadar ekspresyon seviyesini yukarı yönlü düzenlerken artan konsantrasyonlarda ekspresyon seviyesini baskılamış olabilir.

Mevcut çalışma daha sonraki oksidatif sinyalizasyon çalışmalarına ışık tutacaktır.

Anahtar kelimeler: Stres alakalı genler, Nohut, Oksidatif stres, Gerçek zamanlı PCR, Oksidatif sinyalizasyon.

Tez Danışman: Dr. Öğr. Üye. Musa KAR

Sayfa Adeti: 69

**INVESTIGATION OF EXPRESSION LEVELS OF STRESS-RELATED GENES
IN CHICKPEA (*Cicer arietinum* L.) LEAVES EXPOSED TO COPPER HEAVY
METAL IN DIFFERENT DURATION AND CONCENTRATIONS**

(M. Sc. Thesis)

Nuriye ÖZTÜRK

NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE

September 2019

ABSTRACT

In this study, chickpea (*Cicer arietinum* L.) was exposed to copper (Cu) heavy metal at different time (1, 3 and 5 days) and concentrations (0, 50, 100 and 200 µM). At the end of the study, the samples were taken from the leaf tissues of the plant, hydrogen peroxide (H₂O₂), one of the reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA), which is an indicator of oxidative stress in the cell, were determined. In addition, the changes in the expression levels of superoxide dismutase (*Cu-Zn/SOD*) and catalase (*CAT*) enzymes and the antioxidant metallothionein (*MT2*) protein were determined according to the expression level of actin (*ACT*) gene selected as house-keeping gene.

In our study, it was determined that there was a quite stable increase in MDA and cellular H₂O₂ concentrations due to increasing time and concentration. Expression levels of *Cu-Zn / SOD*, *CAT* and *MT2* were found to be higher than control levels at all times and concentrations. Statistically, the highest *Cu-Zn / SOD*, *CAT* and *MT2* expression levels were observed at 50 µM Cu application on the 5th day. In addition, it was determined that expression levels that increased to a certain concentration and so entered a decreasing trend depending on prolonged time and concentration. It was determined that the expression levels at 200 µM Cu application were lower than the expression levels at 50 and 100 µM Cu applications. As a result of this study, it is thought that the cellular

H₂O₂ produced as a result of oxidative stress caused by Cu exposure is responsible for the change in expression levels. Cellular H₂O₂ may up-regulate the expression levels to a certain concentration while down-regulate the expression level at increasing concentrations.

The present study will shed light on further oxidative signaling studies.

Keywords: Stress related genes, Chickpea, Oxidative stress, Real time PCR, Oxidative signalization

Thesis Supervisor: Assit. Dr. Musa KAR

Page Number: 69

İÇİNDEKİLER

KABÜL VE ONAY SAYFASI	i
TEZ BİLDİRİM SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLOLAR LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	xiii
1. BÖLÜM	
GİRİŞ	1
2. BÖLÜM	
GENEL BİLGİLER	4
2.1. Nohut (<i>Cicer arietinum</i> L.)	4
2.1.1. Kökeni, tarihçesi ve coğrafi dağılışı.....	4
2.1.2. Sınıflandırılması	4
2.1.3. Ekonomik önemi, Dünya ve Türkiye’de üretimi	5
2.1.4. İklim ve toprak istekleri	6
2.2. Bitkilerde Stres	7
2.2.1. Ağır metal stresi	7
2.2.2. Bakır metali stresi.....	9
2.3. Bitkilerde Reaktif Oksijen Türleri.....	9
2.3.1. Singlet oksijen (1O_2).....	11
2.3.2. Süperoksit radikali (O_2^-).....	11

2.3.3.	Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂).....	11
2.3.4.	Hidroksil radikali (OH [•]).....	12
2.4.	Bitkilerde Lipit Peroksidasyonu.....	12
2.5.	Bitkilerde Antioksidan Sistem.....	13
2.5.1.	Enzimatik antioksidanlar.....	13
2.5.1.1.	Süperoksit dismutaz (SOD).....	13
2.5.1.2.	Katalaz (CAT).....	13
2.5.1.3.	Askorbat peroksidaz (APX).....	14
2.5.1.4.	Glutasyon peroksidaz (GPX).....	14
2.5.1.5.	Glutasyon redüktaz (GR).....	14
2.5.1.6.	Glutasyon S-transferaz (GST).....	14
2.5.2.	Enzimatik olmayan antioksidanlar.....	15
2.5.2.1.	Tokoferoller.....	15
2.5.2.2.	Askorbik asit.....	15
2.5.2.3.	Karotenoidler.....	15
2.5.2.4.	Glutasyon (GSH).....	15
2.5.2.5.	Fenolik bileşikler.....	15
2.6.	Metallothionein (MT).....	16
2.7.	Literatür Özeti.....	16

3. BÖLÜM

MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	21
3.1. Bitki Materyali ve Yetiştirme Koşulları.....	21
3.2. Malondialdehit (MDA) Analizi.....	22
3.3. Yaprakta Hidrojen Peroksit Miktar Tayini.....	23
3.4. RNA İzolasyonu.....	23

3.5.	cDNA (Komplementer DNA) Sentezi.....	25
3.6.	Gerçek Zamanlı PCR Reaksiyonu.....	25
3.7.	İstatistiksel Analiz.....	26
4. BÖLÜM		
BULGULAR		
4.1.	MDA Analizi Sonuçları	27
4.2.	H ₂ O ₂ Konsantrasyonu	27
4.3.	<i>SOD</i> Gen Ekspresyonu.....	28
4.4.	<i>CAT</i> Gen Ekspresyonu	29
4.5.	<i>MT2</i> Gen Ekspresyonu.....	30
5. BÖLÜM		
TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER.....		32
KAYNAKLAR		39
ÖZGEÇMİŞ		51

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1.	Nohutun sınıflandırılması.....	5
Tablo 2.2.	Dünya nohut üretimi (ton).....	5
Tablo 2.3.	Türkiye’de yıllara göre nohut üretimi.....	6
Tablo 2.4.	Önemli ağır metallerin ekolojik sınıflaması.....	8
Tablo 2.5.	ROT’un özellikleri ve reaktivitesi.....	10
Tablo 3.1.	1X Hoagland besin çözeltisi içeriği.....	21
Tablo 3.2.	Hoagland besin çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan Solüsyon III içeriği.....	22
Tablo 3.3.	Hoagland besin çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan Fe-EDTA içeriği.....	22
Tablo 3.4.	Real time PCR reaksiyonunda kullanılan primer sekansları, ürün boyları ve accession kodları.....	26

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	ROT'un çift yönlü etkisi.....	10
Şekil 4.1.	Nohut bitkisi yapraklarında bakır stresinin 1., 3. ve 5. günlerde tespit edilen MDA düzeyleri.....	27
Şekil 4.2.	Nohut bitkisi yapraklarında bakır stresinin 1., 3. ve 5. günlerde tespit edilen H ₂ O ₂ miktarları.....	28
Şekil 4.3.	Nohut bitkisi yapraklarında bakır stresinin 1., 3. ve 5. günlerde tespit edilen <i>Cu-Zn/SOD</i> geni ifade düzeyleri.....	29
Şekil 4.4.	Nohut bitkisi yapraklarında bakır stresinin 1., 3. ve 5. günlerde tespit edilen <i>CAT</i> geni ifade düzeyleri.....	30
Şekil 4.5.	Nohut bitkisi yapraklarında bakır stresinin 1., 3. ve 5. günlerde tespit edilen <i>MT2</i> geni ifade düzeyleri.....	31

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ABS	Absorbans
ACT	Aktin
APX	Askorbat peroksidaz
As	Arsenik
AsA	Askorbik asit
BHT	Butil Hidroksi Toluen
CAT	Katalaz
Cm	Santimetre
cm³	Santimetre küp
Ct	Cycle Treshold
CuSO₄	Bakır sülfat
Cys	Sistein
daa	Dekar
DHA	Dehidroaskorbat
DHAR	Dehidroaskorbat redüktaz
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
g	Gram
GPX	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz

GSH	Glutatyon
GST	Glutatyon S-transferaz
G6PD	Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz
His	Histidin
H₂O₂	Hidrojen peroksit
MDA	Malondialdehit
Met	Metiyonin
mg	Miligram
ml	Mililitre
μM	Mikromolar
μL	Mikrolitre
MT	Metallothionein
nm	Nanometre
¹O₂	Singlet oksijen
O₂^{·-}	Süperoksit anyonu
OH[·]	Hidroksil radikali
PER	Peroksidaz
PC	Fitoşelatin
PCS	Fitoşelatin sentaz
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu

PRX	Peroksiredoksin
ROT	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
TBA	Tiyobarbütirik asit
TCA	Triklorasetik asit
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
Trp	Triptofan
Tyr	Tirozin

1. BÖLÜM

GİRİŞ

Yemelik tane baklagiller içerisinde yer alan nohut, Türkiye dahil dünyanın pek çok ülkesinde insan beslenmesinde bitkisel proteinin ana kaynağı olarak tüketilen önemli bir tarım ürünüdür [1]. Nohut, diğer bitkisel ürünlere göre daha yüksek miktarda protein, vitamin, mineral ve daha düşük miktarda yağ içermektedir [2]. Kuraklık ve düşük sıcaklığa karşı dayanıklı olması, toprak bakımından fazla seçici olmaması, Rhizobium bakterileriyle havanın azotunu toprağa bağlaması, nohut'un tarımsal açıdan önemli özelliklerinden bazılarıdır [3].

Ülkemizde nohut bitkisinin anavatanı olarak Güneydoğu Anadolu bölgesi gösterilmekte olup, bu bölgede yaklaşık 7000-7500 yıl öncesinde nohut yetiştirildiği bilinmektedir. Günümüzde ise Türkiye de dahil pek çok ülkede nohut üretimi yapılmaktadır [4]. Dünya nohut üretiminde 2016 yılı itibarıyla Türkiye 5. sırada yer almakta olup %3.75'lik bir paya sahip olurken, toplam dünya nohut üretiminin % 65'ini ilk sırada yer alan Hindistan karşılamaktadır [2].

Tarım arazilerinde bitkiler çok çeşitli biyotik ve abiyotik stres faktörleri ile başa çıkmak zorundadır. Bu biyotik ve abiyotik stres sonucu tarım ürünlerinde beklenen verim ile elde edilen verim arasında oldukça büyük farklar meydana gelmekte ve ekonomik olarak ciddi kayıplara sebep olmaktadır. Biyotik stres grubunda patojenler, böcek saldırıları gibi etmenler yer alırken; abiyotik stres grubunda ise kuraklık, tuzluluk, soğuk ve sıcak değişimi, ağır metal toksisitesi gibi stres faktörleri yer almaktadır [5]. Abiyotik bir faktör olan ağır metallerin ise son yıllarda endüstriyel faaliyetlerin gelişmesine paralel olarak artan salınımı, çevre kirliliğinin artmasına sebep olmaktadır. Ağır metallerin topraktaki yüksek konsantrasyonları, bitkilerde bazı olumsuzlukların görülmesine neden olan ağır metal stresine yol açmaktadır [6].

Ağır metallerden biri olan bakır (Cu) metali, bitkiler için esansiyel bir elementtir. Bakırın fotosentez, solunum, karbonhidrat parçalanması, azot kullanımı ve depolanması, hücre duvarı metabolizması gibi fizyolojik olaylarda önemli bir rolü vardır. Ayrıca DNA ve RNA üretiminin kontrolünün sağlanmasında da bakır oldukça önemli bir metaldir. Bakır elementinin yüksek konsantrasyonları ise bitkiler için toksik etkiler oluşturabilmektedir. Ortamda bakır fazlalığı doku hasarı, köklerde bozulma ve

bitki renginde koyulaşma, membran geçirimsizliğinde bozulma sonucunda kök hücrelerinde iyon kaybı, DNA'nın hasar görmesi sonucu fotosentez işleminin bozulması gibi olumsuz etkilere sebep olmaktadır [7].

Stres faktörlerine bağlı olarak bitkilerde reaktif oksijen türleri (ROT) adı verilen ve bitki için oldukça toksik olan radikal ve radikal olmayan kimyasal bileşikler açığa çıkar. Bilinen başlıca ROT'lar; singlet oksijen (1O_2), süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^-) olup normal şartlarda hücredeki düzeyleri genellikle kontrol altında tutulmaya çalışılır [8]. Fakat ağır metal, kuraklık, aşırı sıcak ve soğuk gibi çeşitli stres faktörleri genel olarak bitki dokularında reaktif oksijen türlerinin oluşumunu hızlandırmakta ve böylece de dokularda protein denaturasyonu, lipid peroksidasyonu, DNA mutasyonlarını içine alan oksidatif hasarlar meydana gelmektedir [9]. Bitkiler bu negatif etkileri azaltma veya engelleme amacı taşıyan antioksidan savunma sistemi adı verilen oldukça kompleks ve etkili bir savunma mekanizmasına sahiptir [8].

Antioksidanlar, substratların oksidasyonunu önleyen veya geciktiren ve düşük konsantrasyonlarda bulunan maddeler olarak tanımlanmaktadır. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır [10]. Enzimatik olmayan antioksidanlar; askorbik asit, karotenoidler, tokoferoller, glutatyon ve fenolik bileşiklerdir. Enzimatik antioksidanlardan başlıcaları ise, katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S-transferaz (GST), askorbat peroksidaz (APX) ve glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) olarak bilinmektedir [11].

Ayrıca bitkilerin yapısında antioksidanlar gibi fonksiyon gören, metal bağlayıcı proteinler olarak bilinen metallothioneinler (MT'ler) bulunmaktadır. MT'ler düşük moleküler ağırlığa sahip, sistein aminoasidi bakımından zengin proteinlerdir [12]. MT'lerin metal detoksifikasyonu, reaktif oksijen türlerini yok etme ve bitki gelişimine katkıda bulunma gibi rollerinin olduğu tespit edilmiştir [13].

ROT'ların oksidatif hasara yol açmasının yanında, oluşacak hasarı engellemek için sinyal iletimi işlevi gördüğü de ifade edilmiştir [14,15]. ROT birikiminin hücrelere genellikle zarar vermesine karşın ROT'ların; abiyotik ve biyotik stres etmenleri karşısında tepki mekanizmaları olarak bilinen sistemik kazanılmış uyum (SAA) ve

sistemik kazanılmış direnç (SAR) gibi bitkilerde uyum ve savunma yanıtlarını düzenleyen sinyal molekülleri olarak düşünüldüğü belirtilmiştir [16]. ROT'lar arasında H_2O_2 molekülünün, nispeten daha uzun yarılanma ömrüne sahip olması ve hücre membranlarından rahatlıkla geçebilmesi gibi diğer ROT'lardan farklı özellikleri sayesinde sinyal iletiminde rol oynayan önemli bir ROT olduğu ifade edilmektedir [14]. Çevresel stresler esnasında, hücre içi ve hücreler arası H_2O_2 seviyeleri artmaktadır. Yüksek konsantrasyondaki H_2O_2 'nin, tiyol içeren proteinlerle etkileşime girdiği; gen ekspresyonu ve hücre döngüsü süreçlerini düzenleyen transkripsiyon faktörlerinin yanı sıra farklı sinyal yollarını aktive ettiği ifade edilmektedir [17].

Yapılmış olan bu çalışmada farklı süre ve konsantrasyonlarda Cu ağır metale maruz bırakılmış nohut bitkisinin yaprak hücrelerinde stres göstergesi olan MDA ve H_2O_2 konsantrasyonları tespit edilmiştir. Ayrıca stres alakalı enzimler olan SOD ve CAT enzimlerinin ve koruyucu bir protein yapısında olan metallothionein proteininin mRNA transkripsiyon düzeylerinde meydana gelen değişiklikler de belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda stres alakalı genlerin ekspresyonunun, sinyalizasyon mekanizmasında hücrenin oksidatif durumu ve H_2O_2 konsantrasyonu ile alakalı olabileceği, H_2O_2 'nin belli bir konsantrasyona kadar stres genlerinin ekspresyonunu yukarı yönlü (up-regule) düzenlerken (up-regule) daha yüksek H_2O_2 konsantrasyonunun gen ekspresyonlarını aşağı yönlü düzenleyebileceği (down-regule) bulunmuştur.

2. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

2.1. Nohut (*Cicer arietinum L.*)

2.1.1. Kökeni, tarihçesi ve coğrafi dağılışı

Nohut, Yakın Doğu'nun “Bereketli Hilal” denilen alanından köken alan eski dünya baklagillerinden biridir. Nohutun Avrupa ve Batı-Orta Asya'ya geçişi ise M.Ö. 5500 yıllarında olmuştur. Günümüzde nohut tarımının; Hindistan Yarımadası, Kuzey Afrika, Orta Doğu, Güney Avrupa, Amerika ve Avustralya'yı kapsayan kıtalarda yapıldığı bilinmektedir. Küresel olarak nohut, baklagiller içerisinde kuru fasulye ve bezelyeden sonra en önemli üçüncü baklagil bitkisi olarak yetiştirilmektedir. Önemli nohut üreten ülkeler arasında Hindistan, Pakistan, Türkiye, Avustralya, Myanmar, Etiyopya, İran, Meksika, Kanada ve ABD bulunmaktadır [18].

2.1.2. Sınıflandırılması

Nohut (*Cicer arietinum L.*); Fabales takımı, Fabaceae (baklagiller) familyası, Faboideae alt familyası ve *Cicer* cinsine ait bir baklagil bitkisidir. Nohut cinsi, 9'u tek yıllık ve 40'ı çok yıllık olan toplam 49 takson ile temsil edilmektedir [19-21]. Bitki ve dane özelliklerine göre küçük renkli daneli (microsperma ya da desi) ve koçbaşı krem daneli (macrosperma ya da kabuli) olmak üzere iki tipe ayrılmaktadır [22]. Desi tipler mor, mavi ve pembe çiçek rengine sahip pigmentli bitkilerden oluşurken kabuli tipler beyaz çiçekli ve pigmentsiz bitki yapısına sahip bitkilerden oluşmaktadır [23]. Nohut bitkisinin sistematik sınıflandırılması tablo 2.1.'de sunulmuştur [24].

Tablo 2.1. Nohutun sınıflandırılması

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Subkingdom	: <i>Tracheobionta</i>
Division	: <i>Magnoliophyta</i>
Class	: <i>Magnoliopsida</i>
Subclass	: <i>Rosidae</i>
Order	: <i>Fabales</i>
Family	: <i>Fabaceae</i>
Genus	: <i>Cicer</i>
Species	: <i>Cicer arietinum</i> L.

2.1.3. Ekonomik önemi, Dünya ve Türkiye’de üretimi

Nohut dünyada ekim alanı ve üretim miktarı açısından bakıldığında, fasulyeden sonra en fazla üretimi yapılan baklagiller arasında yer alır. Dünyada nohut üretiminde Asya, Afrika ve Amerika ülkeleri ön plandadır ve 2016 yılı itibarıyla Türkiye bu ülkeler arasında 5. sırada yer almakta olup 3.75’lik bir paya sahip olurken, toplam dünya nohut üretiminin % 65’ini ilk sırada yer alan Hindistan karşılamaktadır (Tablo 2.2.)[2].

Tablo 2.2. Dünya nohut üretimi (ton)

Ülkeler	2012	2013	2014	2015	2016
Hindistan	7.700.000	8.832.500	9.530.000	7.330.000	7.818.984
Avustralya	673.371	813.300	629.400	555.400	874.593
Myanmar	517.100	562.200	570.700	571.500	559.390
Pakistan	284.304	751.223	399.030	379.192	517.107
Türkiye	518.000	506.000	450.000	460.000	455.000
Etiyopya	409.733	409.733	458.682	520.965	441.146
Rusya	73.796	91.124	111.300	110.000	319.908
Toplam	11.534.016	13.298.172	13.409.970	11.049.229	12.107.287

Ülkemizde nohut üretim alanı, 1961 yılında 890 bin dekar olup, 1990 yılında 8.8 milyon dekara kadar ulaşmış, 2016 yılında ise 3.6 milyon dekara düşmüştür (Tablo 2.3.). TÜİK 2018 yılı verilerine göre 2007-2017 yılları arasında nohut ekim alanlarında % 21.51 oranında azalma görülürken üretimde ise % 7 oranında azalma görülmektedir[2].

Tablo 2.3. Türkiye’de yıllara göre nohut üretimi

Yıllar	Ekim Alanı (daa)	Üretim (ton)	Verim (kg/daa)
1961	890.000	90.000	101
1970	1.000.000	109.000	109
1980	2.400.000	275.000	115
1990	8.779.760	860.000	98
2000	6.222.140	548.000	88
2002	6.600.000	650.000	98
2003	6.300.000	600.000	95
2004	6.060.000	620.000	102
2005	5.578.000	600.000	108
2006	5.243.672	551.746	105
2007	5.036.745	505.366	100
2008	5.051.654	518.026	103
2009	4.559.344	562.564	123
2010	4.556.900	530.634	116
2011	4.464.129	487.477	109
2012	4.162.416	518.000	124
2013	4.235.570	506.000	119
2014	3.385.175	450.000	116
2015	3.593.042	460.000	128
2016	3.595.289	455.000	127
2017	3.953.099	470.000	119
2018	5.200.000	620.000	119

2.1.4. İklim ve toprak istekleri

Nohut, iklim isteği bakımından mercimekten sonra kuraklığa ve sıcağa en fazla dayanıklı baklagil bitkisidir. Nohut tanelerinin optimum çimlenmesi için ortalama 15°C sıcaklığa ihtiyaç duyulur. Sıcaklık 26°C'nin üzerine çıkarsa çimlenme üzerine olumsuz etkiler görülür. Nohut, -10°C'ye kadar soğukluğa tahammül edebilse de bunu aşan soğuklarda don olaylarından dolayı olumsuz etkilenir. Fazla nemden hoşlanmazlar. Yağışlı mevsimlerde de bazı hastalıklardan dolayı verimleri düşük olur [25].

Nohut toprak isteği yönünden son derece kanaatkar olup, her türlü toprakta yetişebilmektedir. Suyu geçiren, gübrelenmiş, yeteri kadar nem içeren topraklarda

sağlıklı bir şekilde yetişir. Fazla asitli topraklardan hoşlanmazlar. Toprak pH'sının 7.5 8.0 arasında olmasını isterler. Vejetatif gelişme süresince toprak şartlarına bağlı olarak sulama ya da hafif yağış isterler. Baklagiller içerisinde kirece ve tuza en fazla dayanıklı olan bitkidir. Toprak çeşidi olarak kumlu-tınlı topraklar nohutun yetişmesi için en ideal olanıdır. [25]

2.2. Bitkilerde Stres

Bitkilerde normal sistemin fonksiyonlarını inhibe etme eğiliminde olan olumsuz etkiler "stres" olarak adlandırılır [26]. Bir başka ifadeyle bitki üzerinde negatif etkileri olan dış faktörler stres olarak tanımlanır. Stres gelişme ile ilişkili olup bitkinin canlı kalabilmesi, ürün verebilmesi, biyomas birikimi ve özümleme ile ilişki kurarak açıklanması gereken bir kavramdır [8]. Stres faktörleri biyotik ve abiyotik olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Biyotik stres; diğer organizmaların zararlı etkileriyle oluşan stres olarak ifade edilir ve mikroorganizmaların (fungus, bakteri ve virüs) enfeksiyonu ve zararlı hayvanların saldırıları bu grupta incelenir. Abiyotik stres ise çevrenin fiziksel ve kimyasal etkileriyle ortaya çıkan stres olarak tanımlanır ve su, sıcaklık, radyasyon, kimyasallar, manyetik ve elektriksel alanlar gibi çevre faktörleri bu grupta incelenir. Tüm bu stres faktörleri bitkiler için birer tehdit oluşturur, bitkilerin genetik potansiyellerine ulaşmalarına engel teşkil eder ve ürün verimliliğini sınırlar [27]. Bitkiler, hayvanlardan farklı olarak stres faktöründen kaçınma gibi bir seçeneğe sahip olmadıkları için strese direkt maruz kalırlar. Bu direkt etki büyüme ve gelişmeyi negatif yönde etkiler ve bitki organlarının canlılığını yitirmesine neden olur [8].

2.2.1. Ağır metal stresi

Yoğunluğu 5 g/cm^3 'ten daha yüksek olan, yer kürede genellikle karbonat, silikat ve sülfür halinde stabil bileşik olarak veya silikatlar içinde bağlı olarak bulunan, düşük konsantrasyonlarda bile toksik etki gösteren metaller "ağır metaller" olarak tanımlanmaktadır [28]. Ağır metaller içerisinde de 20 element ekolojik açıdan önemli bulunmaktadır. Bunlar; demir (Fe), mangan (Mn), çinko (Zn), bakır (Cu), vanadyum (V), molibden (Mo), kobalt (Co), nikel (Ni), krom (Cr), kurşun (Pb), berilyum (Be), kadmiyum (Cd), talyum (Tl), antimon (Sb), selenyum (Se), kalay (Sn), gümüş (Ag), arsenik (As), civa (Hg), alüminyum (Al) metalleridir. Bunların bir kısmı, bitki ve

hayvanlar için mikrobesein (Fe, Cu, Zn, Mn, Mo, Ni) maddesi olabilmekte, belli bir sınırı aşmadığı sürece toksik etki oluşturmamaktadırlar (Tablo 2.4.) [7].

Tablo 2.4. Önemli ağır metallerin ekolojik sınıflaması

Element	g/cm ³ özgül ağırlık	Bitki ve hayvan için gereklilik	Kirletici olup olmadığı
Gümüş (Ag)	10.5	-	K
Kadmiyum (Cd)	8.5	-	K
Krom (Cr)	7.2	G	K
Kobalt (Co)	8.9	G	K
Bakır (Cu)	8.9	G	K
Demir (Fe)	7.9	G	K
Civa (Hg)	13.6	-	K
Mangan (Mn)	7.4	G	-
Kurşun (Pb)	11.3	-	K
Molibden (Mo)	10.2	G	K
Nikel (Ni)	8.9	G	K
Platin (Pt)	21.5	-	-
Talyum (Tl)	11.9	-	K
Kalay (Sn)	7.3	-	K
Uranyum (U)	19.1	G	K
Vanadyum (V)	6.1	G	K
Tungstem (W)	19.3	G	K
Çinko (Zn)	7.1	G	K
Zirkon (Zr)	6.5	-	-

(G: Gerekli) (K: Kirletici)

Son yıllarda ülkemizde sanayileşmenin hızlanması, nüfustaki hızlı artış ve her geçen gün artan trafik yoğunluğu gibi faktörler çevre kirliliği konusunun önemini son derece hissettirmiştir. Çevre kirliliğine neden olan faktörler arasında şüphesiz ki ağır metallerin de önemli bir yeri vardır ve bunların çevrede yaygın bir şekilde birikmesi; başta bitki, hayvan ve insan olmak üzere her çeşit organizmada boyutları giderek artan bir tehlike oluşturmaktadır. Hava, su ve toprakta farklı oranlarda bulunabilen ağır metallere bazılarının bitkiler için gerekli mikro besin elementlerinden olmasına rağmen, belirli konsantrasyonların üzerinde toksik etkilere sahiptir. Bitkilerde stres oluşumuna neden olan yüksek konsantrasyonlardaki bu ağır metaller bitki büyüme ve gelişimini önemli derecede engellemektedir [29]. Ağır metal toksisitesi, enzimlerin inaktif hale gelmesi,

önemli metabolik moleküllerin fonksiyonlarının durması, gerekli elementlerin yer değiştirmesi ve membran bütünlüğünün bozulması gibi bitkilerde hücresel/moleküler düzeyde birçok sürecin değişmesine neden olmaktadır [30].

2.2.2. Bakır metali stresi

Ağır metallere biri olan bakır, birkaç elektron taşıma enziminin bileşeni olan ve mitokondri ve kloroplastlarda redoks tepkimelerinin katalizlenmesinde rol oynayan, bitkiler için temel bir mikro besin maddesidir fakat bitkilerde optimum konsantrasyon seviyesinin biraz üzerine çıktığı zaman toksisiteye neden olur. Bitki yapraklarında yüksek konsantrasyondaki bakır; fotosentetik ve solunum süreçlerinde, enzim aktivitesinde, DNA'da ve membran bütünlüğünde birtakım değişikliklere neden olur ve bu değişiklikler de büyümenin engellenmesine yol açar [31].

Bakır toksisitesinin önemli bir özelliği de oksidatif strese neden olmasıdır. Bakırın yüksek konsantrasyonları, biyolojik moleküllere (DNA, RNA, proteinler) ve membranlara zarar verebilecek singlet oksijen (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH\cdot$) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu katalizleyebilir. Bitkiler, ROT'u temizlemek ve zararlı etkilerini hafifletmek için koruyucu enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalar geliştirmiştir. Katalaz (CAT), peroksidazlar (POX), süperoksit dismutaz (SOD) mekanizmaları enzimatik; glutatyon, askorbat ve karotenoidler ise enzimatik olmayan mekanizmalar olarak koruma sağlarlar [31].

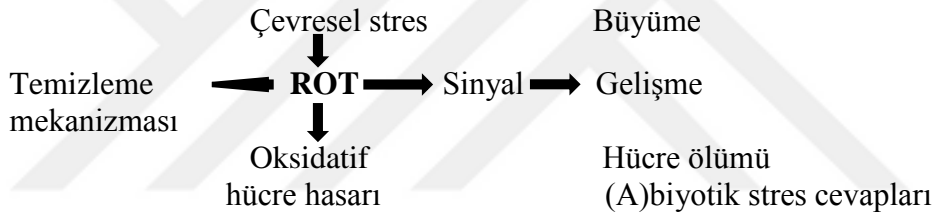
2.3. Bitkilerde Reaktif Oksijen Türleri

Stres faktörleri karşısında bitkiler, maruz kaldıkları olumsuz etkileri azaltan veya engelleyen, makromoleküllerin ve iyonların homeostazisi, koruyucu moleküllerin sentezi, reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve detoksifikasyon olmak üzere üç grupta toplanan moleküler savunma mekanizmalarına sahiptirler [8]. Bu grupta yer alan reaktif oksijen türleri de bitkilerde strese karşı oluşturulan moleküler cevaplar açısından önemli bir yer teşkil etmektedir.

Ortaklanmamış elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller “serbest radikal” olarak adlandırılmaktadır. Reaktif oksijen türleri (ROT) de, serbest radikallerin en yaygın formu olan serbest oksijen radikalleri olarak bilinmektedir ve bitki hücrelerinde

kloroplast, mitokondri, plazma membranı ve apoplastik alanlarda meydana gelmektedir (Tablo 2.5.).

Hücrelerde bilinen başlıca ROT'lar; singlet oksijen (1O_2), süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^-) ' dir ve hücredeki seviyeleri devamlı olarak kontrol altında tutulmaya çalışılır [8]. Fakat abiyotik ve biyotik kaynaklı stres faktörleri, hücredeki ROT üretiminin artmasına dolayısıyla da hücredeki bu denge halinin bozulmasına neden olmaktadır. ROT üretiminin stres koşullarında artış göstermesi, bitkilerde bitki büyümesi inhibisyonu ve hücre hasarı gibi olumsuz durumlara yol açmaktadır. Bu durum bitkilerde "oksidatif stres" olarak tanımlanmaktadır. Fazla miktarda ROT üretimi hücreler için bir tehdit olarak görülse de ROT'ların, strese karşı cevap oluşturmada ve savunma yollarının aktivasyonunda bir sinyal molekülü olarak işlev gördüğü düşünülmektedir (Şekil 2.1.) [31].



Şekil 2.1. ROT'un çift yönlü etkisi [32]

Tablo 2.5. ROT' un özellikleri ve reaktivitesi [33]

ROT	Reaksiyon	Üretim Yeri	Temizleme Sistemi
Süperoksit radikali (O_2^-)	Fe-S proteinleriyle reaksiyona girer. H_2O_2 ile değişmez.	Apoplast (RBOHs), kloroplast, mitokondri, peroksizomlar, elektron taşıma zincirleri.	SOD, flavonoidler, askorbat...
Hidroksil radikali (OH^-)	DNA, RNA, lipitler ve proteinler dahil tüm biyomoleküller ile son derece reaktif	Fe ve H_2O_2 [Fenton reaksiyonu]	Flavonoidler, şekerler, prolin, askorbat...
Hidrojen peroksit(H_2O_2)	Sistein ve metiyonin kalıntılarına saldıran proteinlerle, hem proteinleriyle, DNA ile reaksiyona girer.	Peroksizomlar, kloroplast, mitokondri, sitozol, apoplast.	APX, CAT, GPX, PER, PRX, Askorbat, Glutasyon...
Singlet oksijen (1O_2)	Okside lipitler, proteinler (Trp, His, Tyr, Met ve Cys kalıntıları) ve DNA'nın Guanin kalıntıları	Membranlar, kloroplast.	Karotenoidler ve α - tokoferol.

2.3.1. Singlet oksijen (1O_2)

Singlet oksijen; elektron taşıma sisteminde son elektron alıcı olarak görev yapan O_2 molekülünün, enerji alarak kendi dönüş yönünün tersi yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesi sonucu oluşmaktadır. Birçok biyolojik molekül ile benzer kuantum durumuna sahip olması onun kolaylıkla reaksiyona girmesini sağlar [8].

2.3.2. Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$)

O_2 molekülüne bir elektronun transfer edilmesiyle oksijenin indirgenmesi sonucu süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) oluşur ve indirgenmiş geçiş metallere otooksidasyonu da süperoksit radikalini oluşturabilir [34].



Süperoksit radikali oldukça reaktiftir ve lipitlerle birlikte diğer biyokimyasal bileşenlerin de oksidasyonuna neden olmaktadır. Bu radikalin; lipid peroksidasyonu, hücrel toksisite, membran hasarı ve DNA'daki tek zincir kırıklarıyla alakalı olduğu belirtilmektedir [35].

2.3.3. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit, süperoksit radikalinin çevresinde bulunan moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması neticesinde oluşan peroksitin iki proton (H^+) ile birleşmesi sonucu oluşmaktadır.

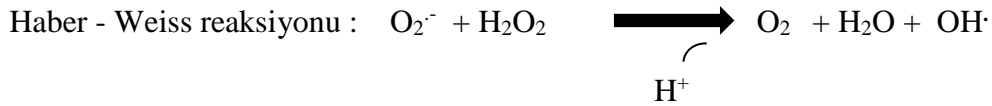
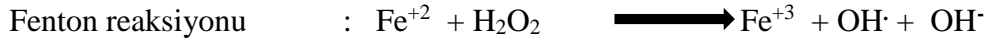


İki süperoksit molekülünün iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluşturduğu "süperoksitin dismutasyonu" olarak adlandırılan reaksiyon; biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin asıl üretimi reaksiyonu olarak belirtilmektedir [34].



Bu reaksiyonun dismutasyon reaksiyonu olarak bilinmesi; radikal olmayan ürünlerin meydana gelmesinden kaynaklanmaktadır. Bu reaksiyon ya kendiliğinden gerçekleşir ya da süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenir. Hidrojen peroksit serbest

radikal olmayan bir reaktif oksijen türüdür ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rolü vardır. Çünkü Fe^{+2} gibi geçiş metallerinin varlığında “Fenton reaksiyonu” sonucu, süperoksit radikalının ($O_2^{\cdot-}$) varlığında “Haber-Weiss reaksiyonu” sonucu hidroksil radikalini (OH^{\cdot}) oluşturur [34].



2.3.4. Hidroksil radikali (OH^{\cdot})

En reaktif serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali (OH^{\cdot}) ise, H_2O_2 ile metal katalizörlerin kullanıldığı Haber-Weiss veya Fenton reaksiyonları sonucu oluşmaktadır. OH^{\cdot} radikali, kolayca tüm biyolojik moleküller ile reaksiyona girebilir ve fazla miktarda üretildiğinde ise hücrelerin ölümüne sebep olur [36].

2.4. Bitkilerde Lipit Peroksidasyonu

ROT'un stres durumunda üretiminin artması sonucu meydana gelen hasarların en önemli sonuçlarından biri lipit peroksidasyonudur ve hücrelerdeki zar fosfolipidlerinin yükseltgenerek peroksit türevlerine dönüşmesi şeklinde tanımlanır. ROT, yağ asitleri başta olmak üzere karbonhidrat, protein ve nükleik asitler gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak karbon merkezli organik alkil radikallerinin (R^{\cdot}), ($RCOO^{\cdot}$), (RO_2^{\cdot}) ve (RO^{\cdot}) oluşmasına ve lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonlarının başlamasına yol açmaktadır ve bu reaksiyonlar sonucunda da hücre yapı ve işlevlerinde çeşitli bozukluklar meydana gelmektedir [29].

Lipit peroksidasyon zincirinin başlamasına fenton reaksiyonu sonucu oluşan hidroksil radikali (OH^{\cdot}) sebep olabilmektedir. Peroksidasyon sonucunda ise lipit peroksitleri ($LOOH$) oluşmaktadır ve lipit peroksitleri yıkıldığında da aldehytler oluşmaktadır. Aldehytler hücre düzeyinde metabolize edilebilirler veya hücrenin diğer kısımlarına hasarı yayabilirler. Malondialdehit (MDA) olarak adlandırılan aldehit türü bileşik ise üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşmaktadır ve lipit peroksidasyonunun derecesiyle uyum göstermektedir. Bu yüzden biyolojik materyallerde malondialdehit (MDA) ölçülmesi lipit peroksit seviyelerinin göstergesi olarak kullanılmaktadır [34].

2.5. Bitkilerde Antioksidan Sistem

Bitkilerin ağır metaller, yüksek sıcaklıklar, hava kirleticileri gibi olumsuz çevre koşullarına maruz kalması, bitkilerde ROT üretimini artırabilmektedir. Bitkileri bu toksik oksijen ara ürünlerinden (ROT) korumak için bitki hücreleri ve bitki hücrelerinin kloroplast, mitokondri, peroksizomlar gibi organellerinde antioksidan savunma sistemleri kullanılır [9]. Düşük konsantrasyonlarda bulunan ve substratların oksidasyonunu önleyen veya geciktiren maddeler “antioksidanlar” olarak adlandırılmakta; enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon S-transferaz (GST) enzimatik antioksidanlar grubunda yer alırken; tokoferoller (vitamin E), askorbik asit (AsA), karotenoidler, glutatyon (GSH) ve fenolik bileşikler ise enzimatik olmayan antioksidanlar grubunda yer almaktadır [37].

2.5.1. Enzimatik antioksidanlar

2.5.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz enzimi, süperoksit radikalının (O_2^-) hidrojen peroksit'e (H_2O_2) dönüştürülmesinde görev alan bir enzimdir ve bu enzimin aktif bölgelerinde yer alan metal iyonlarına göre; bakır ve çinko içeren Cu-Zn/SOD, mangan içeren Mn/SOD, demir içeren Fe/SOD olarak bilinen üç çeşidi vardır. Fe/SOD genelde bitkilerde belirlenememesine karşın tespit edildikleri zaman bitkilerin kloroplast kısımlarında, Mn/SOD mitokondri ve peroksizomlarda, Cu/Zn-SOD ise kloroplast, sitoplazma ve hücrelerarası boşlukta bulunmaktadır [38].

Yapılan birçok çalışmada, *SOD* gen ifade düzeylerindeki artışlara bakılarak, bu enzimin bitkilerin oksidatif stresle mücadelesinde ve hayatta kalmalarında önemli bir role sahip olduğu öne sürülmüştür.

2.5.1.2. Katalaz (CAT)

Katalaz (CAT), hidrojen peroksidi (H_2O_2) su (H_2O) ve moleküler oksijene (O_2) dönüştürmekte görevli olan önemli bir enzimdir. CAT, stres durumunda hücreleri H_2O_2 'nin zararlı etkisinden korumaktadır [39].



Katalaz, bitkilerde glioksizomlarda ve peroksizomlarda bulunur ancak peroksizomlarda daha etkilidir. Bitkilerde katalaz; fotorespirasyon, çimlenen tohumlarda yağ asitlerinin β -oksidasyonu, tuzluluk ve diğer abiyotik stres koşulları durumunda H_2O_2 'nin ortamdan uzaklaştırılmasında görev almaktadır. H_2O_2 , CAT tarafından parçalanmadığında hidroksil radikalinin oluşumu sağlanmış olur ve bu radikal de hücrede kalıcı zararlara neden olabilmektedir [40].

2.5.1.3. Askorbat peroksidaz (APX)

APX enzimi, bitki kloroplastlarındaki askorbat-glutasyon döngüsünde, H_2O_2 'yi H_2O 'ya dönüştürmede görevli olan anahtar bir enzimdir. Ayrıca APX enzimi sitozol, mitokondri ve peroksizomlarda ROT temizleme işleminde görev almaktadır [41].

2.5.1.4. Glutasyon peroksidaz (GPX)

GPX, hidrojen peroksidin, organik hidroperoksidlerin ve lipit peroksidlerin glutasyon tarafından indirgenmesini katalizleyen ve hücrelerin oksidatif hasara karşı korunmasına yardımcı olan bir enzimdir [42].

2.5.1.5. Glutasyon redüktaz (GR)

GR, bitkilerde birçok metabolik düzenleyici ve antioksidan süreçlere katılan GSH'ın indirgenmesini katalizleyen önemli bir enzimdir. GR, çoğunlukla kloroplastlarda bulunsa da GR'nin küçük bir miktarı mitokondri ve sitozolde yer almaktadır [9].

2.5.1.6. Glutasyon S-transferaz (GST)

GST'ler, elektrofilik xenobiyotik substratların tripeptit glutasyon ile konjugasyonunu katalize eden geniş ve çeşitli bir enzim grubudur. Bitki GST'lerinin, herbisit detoksifikasyonunda, hormon homeostazında, antosiyaninin vakuoler sekestrasyonunda, tirozin metabolizmasında, hidroksiperoksid detoksifikasyonunda, apoptozun düzenlenmesinde ve bitkilerin biyotik ve abiyotik streslere verdiği tepkilerde görev yaptığı bilinmektedir [9].

2.5.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

2.5.2.1. Tokoferoller

Tokoferoller, sadece bitkiler ve diğer fotosentetik mikroorganizmalar tarafından sentezlenen, antioksidan aktiviteleri olan lipitte çözünen bileşiklerin önemli bir sınıfıdır. Tokoferollerin dört doğal türevi (α , β , γ , δ) bulunmaktadır ve bu türevler arasında α -tokoferol, fotosentetik dokularda baskın olan formdur ve esas olarak plastidlerde yer almaktadır. α -Tokoferol, reaktif oksijen türlerini ve lipit peroksit radikallerini temizleme yeteneğine sahiptir; böylece fotosentetik materyal oksijen toksisitesinden ve lipit peroksidasyonundan korunmuş olur [43].

2.5.2.2. Askorbik asit

Askorbik asit (AsA), bitkilerde bol miktarda bulunan bir metabolittir ve bitki stres fizyolojisinin yanı sıra büyüme ve gelişmede de önemli bir role sahiptir. Ayrıca ROT'un detoksifikasyonunda anahtar bir antioksidandır [44]. Bitkilerde stres durumunda yüksek konsantrasyona sahip askorbik asit, O_2^- ve OH^- radikallerinin ortamdan uzaklaştırılmasını sağlar [8].

2.5.2.3. Karotenoidler

Karotenoidler bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunan pigmentlerdir. Yüksek konsantrasyondaki karotenoidler lipitleri peroksidatif hasardan koruyabilmektedir [45].

2.5.2.4. Glutatyon (GSH)

Glutatyon; sitozol, kloroplastlar, endoplazmik retikulum, vakuoller ve mitokondri gibi hemen hemen hücrenin tüm bölümlerinde meydana gelen bir tripeptittir. GSH, çoğunlukla indirgenmiş halde oluşur ve en yüksek konsantrasyonu kloroplastlardadır. GSH'nin, ROT'u kontrol altında tutan önemli bir antioksidan olduğu belirtilmiştir. Askorbat-glutatyon döngüsünde dehidroaskorbat'ın (DHA) indirgenmesi için GSH kullanılır [45].

2.5.2.5. Fenolik bileşikler

Fenolik bileşikler; yenilebilir ve yenilebilir olmayan bitkilerin her ikisinde de yaygın olarak bulunan, antioksidan aktivite dahil birçok biyolojik etkilere sahip olan sekonder

metabolitlerdir. Flavonoidler ve diğer bitki fenoliklerinden olan fenolik asitler, stilbenler, tanenler, lignanlar ve ligninler bitkilerin genellikle yapraklarında, çiçekli dokularında ve odunsu kısımlarında yaygın olarak bulunmaktadır [46].

2.6. Metallothionein (MT)

Bitkiler yapılarında artış gösteren metal konsantrasyonlarına uyum sağlamak için birtakım mekanizmalar geliştirmiştir. Bu mekanizmalardan biri olan metallothioneinler de; metal toleransı sağlamada ve esansiyel olmayan metallerin ve fazla miktardaki esansiyel metallerin detoksifikasyonunda etkili olan metal bağlayıcı proteinlerdir [13]. MT'ler, bitkilerdeki ağır metallerle kompleks oluşturarak, ağır metalleri hücre duvarları ve vakuol gibi metabolik yollardan uzak bölgelerde biriktirmektedir [47].

MT'ler sistein bakımından zengin proteinlerdir ve sistein kalıntılarının düzenlenişine göre üç sınıfa ayrılmaktadır. Sınıf I MT'ler, 20 adet sistein kalıntısı içermekte ve omurgalılarda yaygın olarak bulunmaktadır. Sınıf II MT'leri Sınıf I MT'lerden ayıran özellik ise peptit boyunca sistein dağılımlarındaki farktan kaynaklanmaktadır ve Sınıf II MT'ler omurgasız hayvanların yanı sıra bitki ve mantarlarda bulunmaktadır. Sınıf III MT'ler de, metal bağlayıcı peptitler olarak bilinen ve enzimatik olarak sentezlenen fitoşelatinlerdir (PC). PC'ler birçok ağır metal tarafından etkinleştirilen fitoşelatin sentaz (PCS) enzimi ile indirgenmiş glutatyondan (GSH) sentezlenmektedir. Yapılan birçok çalışmada, PC'lerin bitkilerdeki metal ve metalloid toleransında önemli rol oynadığı saptanmıştır [48].

Bitki MT'lerinin çoğu sınıf II MT'ler kapsamındadır ve sistein kalıntılarının pozisyonuna göre dört tipe ayrılmaktadır. Cu homeostazisi ve toleransında tip 1, tip 2 ve tip 3 MT'lerin, Zn homeostazisinde ise tip 4 MT'lerin işlev gördüğü belirtilmektedir. Ayrıca tip 1 MT genlerinin genellikle köklerde, tip 2 MT genlerinin çoğunlukla yapraklarda, tip 3 MT genlerinin olgunlaşan etli meyve ve yapraklarda, tip 4 MT genlerinin ise gelişen tohumlarda ifade olduğu belirtilmektedir [48].

2.7. Literatür Özeti

Cicer arietinum L. (nohut) bitki köklerinin farklı süre ve konsantrasyonlarda kadmiyum ağır metale maruz bırakıldığı bir çalışmada; stres alakalı gen ifade düzeyleri ve bunların H₂O₂ konsantrasyonlarıyla ilişkisi incelenmiştir. Bu inceleme

sonucunda, *MT2* gen ifadesinin düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında artarken yüksek H_2O_2 konsantrasyonlarında azaldığı; *GRI* ve *SOD* gen ifade düzeylerinin, orta H_2O_2 konsantrasyonlarında artarken yüksek H_2O_2 konsantrasyonlarında azaldığı; *CAT* gen ifade düzeyinin ise orta ve yüksek H_2O_2 konsantrasyonlarında arttığı tespit edilmiştir [49].

Azevedo ve arkadaşları, iki sucul mantar olan *Varicosporium elodeae* ve *Heliscus submersus* türlerinde Cu ve Zn stresine karşı antioksidan cevaplar üzerine çalışmışlardır. Sonuçlar, *V. elodeae*'nin *H. submersus*'a göre Cu ve Zn'nin toksik etkilerine karşı daha duyarlı olduğunu göstermiştir. Zn ve Cu'nun neden olduğu stresi hafifletmede, *CAT*'ın *SOD*'a göre daha büyük bir role sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca kronik metal stresinin, glikoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesini artırarak pentoz fosfat yoluyla NADPH üretimini uyardığı tespit edilmiştir [50].

Pirinç fidelerinde Cu toksisitesi üzerine çalışan Chen ve arkadaşları, köklere Cu muamelesinin MDA içeriğini ve SOD, APX, GR, POD enzim aktivitelerini arttırdığını fakat *CAT* enzimi aktivitesinde bir değişikliğe neden olmadığını gözlemlemiştir. Ayrıca Cu metalinin, H_2O_2 seviyesinde ve hücre duvarı peroksidaz aktivitesinde bir artışa neden olduğunu saptamışlardır [51].

Karimi ve Mohsenzadeh, *Triticum aestivum* (buğday) bitkisinde Cd stresine karşı *MAPK* (Mitojen-aktif protein kinaz), *Thioredoxin* ve *MnSOD* (Manganez Süperoksit dismutaz) genlerinin ifade düzeylerini incelemiştir. Sonuçta, *Thioredoxin* ve *MnSOD* gen ekspresyonlarının kontrol örneği ile karşılaştırıldığında büyük bir artış gösterdiğini fakat *MAPK* gen ekspresyonunda önemli bir değişikliğin olmadığını tespit etmişlerdir [52].

Souguir ve arkadaşları, *Vicia faba* (bakla) bitkisinde Cd maruziyeti sonucu *Hsp 70.1*, *MT2*, *GRI*, *Cu-Zn/SOD* genlerinin ifade düzeylerini ve H_2O_2 birikimini incelemiştir. Gen ifade düzeylerinde 12 saatlik maruziyet süresi sonunda artış, maruziyet süresi uzadığında ise azalış gözlemlemiştir. 12 saatlik maruziyet süresi sonunda H_2O_2 birikiminin ve 24 saatlik maruziyet süresi sonunda da lipid peroksidasyonunun meydana geldiği tespit edilmiştir. Katalaz transkriptlerinin ise bitki köklerinde 24 saatte biriktiği ve uygulama bitimine kadar yüksek seviyede sentezlendiği saptanmıştır [53].

Brassica juncea (Hint hardalı) bitkisinde Zn toksisitesi altında antioksidan enzimler ve büyüme üzerine çalışan Prasad ve arkadaşları; çinkonun düşük konsantrasyonlarında, fidelerin büyümesinin arttığını fakat yüksek konsantrasyonlarında fidelerin büyümesinde önemli bir azalma olmadığını tespit etmişlerdir. Yüksek Zn konsantrasyonunun; MDA içeriğinde ve SOD, CAT, G-POD, APX, MDHAR, DHAR, GR aktivitelerinde artışa neden olduğunu gözlemlemişlerdir [54].

Khatun ve arkadaşları, Cu toksisitesi altında yetiştirilen *Withania somnifera* (Hint ginsengi) bitkisinde antioksidan enzimler üzerine çalışmışlardır. Bitki yapraklarında, APX, MDHAR, DHAR, GST ve G-POD aktivitelerinde artış; SOD, CAT, GR ve GPX aktivitelerinde ise belirgin bir azalma gözlemlemişlerdir [55].

Cu toksisitesinde *Prunus cerasifera* (süs eriği) bitkisinde antioksidan enzimler üzerine çalışan Lombardi ve Sebastiani; CAT ve SOD aktivitesi düzeylerinde meydana gelen değişimleri incelemişlerdir. Bakır toksisitesine bağlı stresin; toplam CAT ve SOD aktivitesinde artışa neden olduğunu tespit etmişlerdir [56].

Lagriffoul ve arkadaşları, Cd toksisitesi altında *Zea mays L.* (mısır) bitkisinde stres alakalı enzim aktiviteleri üzerine çalışmışlardır. Çalışma sonucunda; POD aktivitesinin bazı yapraklarda arttığı ancak köklerde artmadığı tespit edilmiştir. Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz, izositrat dehidrojenaz ve malik enzim aktivitelerinin ise bazı yapraklarda azaldığı belirtilmiştir [57].

Goupil ve arkadaşları, As ve Cr maruziyeti altındaki domates bitkilerinde *Hsp90-1*, *MT2* ve *GRI* protein genlerinin ifade düzeyleri üzerine çalışmışlardır. Metal uygulaması sonucunda, domates bitkilerinde *Hsp90-1* transkript birikimi gerçekleştiği tespit edilmiştir. *MT2* ve *GRI* transkriptlerinin, As uygulanmış domates köklerinde biriktiği fakat Cr uygulamasından çok az etkilendiği ifade edilmiştir [58].

Duman ve Öztürk, su teresi (*Nasturtium officinale*) bitkisinin kök ve yapraklarında Ni birikiminin bitkide SOD, CAT ve APX enzim aktiviteleri üzerine etkisini incelemişlerdir. Hem köklerde hem de yapraklarda, orta maruziyet koşullarında, enzim aktivitelerinde bir artış ve ardından bir düşüş gözlemlendiği belirtilmiştir [59].

Rout ve Sahoo, Cu stresi sırasında antioksidan enzimlerin fonksiyonlarını incelemek için, *Withania somnifera L.* bitkisinin yaprak ve kök örneklerinde; *CAT* (*RsCat*,

Catalase1, Cat1), *SOD (SodCp, TaSOD1.2, MnSOD)* ve *POX (Peroksidaz, spa15, Apx4)* genlerinin ifade düzeylerini araştırmışlardır. *CAT (RsCat)* ve *SOD (MnSOD)* 'dan sadece birer genin Cu fazlalığı altında yüksek düzeyde gen ifadesi gösterdiğini fakat *POX*'tan hiçbir genin yeterli düzeyde ifade göstermediğini belirtmişlerdir [60].

Soydam-Aydın ve arkadaşları, patlıcan (*Solanum melongena L.*) bitkisinin Cu ve Zn ağır metal streslerine karşı *CAT* ve *APX* enzim genlerinin rolleri üzerine çalışmışlardır. Sonuçta, Cu ve Zn streslerinin patlıcanlardaki *CAT* ve *APX* genlerinin mRNA seviyelerini değiştirdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca her bir metal türüne maruz bırakılan patlıcan örneklerinde, *CAT* geninin *APX* genine göre daha yüksek seviyede eksprese edildiğini ifade etmişlerdir [61].

Domates bitkisinin Cu toksisitesine karşı toleransında H_2O_2 , MT, nitrik oksit (NO) ve antioksidan enzimlerin rolleri üzerine bir araştırma yapan Wang ve arkadaşları; Cu stresinin H_2O_2 birikimini arttırdığını tespit etmişlerdir. Sodyum nitroprussid (SNP) uygulamasının ise *CAT*, *POX*, *SOD* ve *APX* antioksidan enzim aktivitelerinde artışa ve yapraklarda H_2O_2 birikiminin azalmasına yol açtığı saptanmıştır. NO uygulamasının, yapraklarda metalotiyonin transkripsiyonuna ve birikimine sebep olduğu belirtilmiştir [62].

Schützendübel ve arkadaşları, boz kavak ağacı (*Populus canescens*) köklerinin Cd maruziyeti sonucunda enzim aktivelerinde meydana gelen değişiklikleri araştırmışlardır. Cd maruziyeti, *SOD*, *CAT*, *APX*, *MDAR*, *GR* aktivitelerinin engellenmesine neden olmuştur fakat dehidroaskorbat (*DAR*) aktivitesi üzerinde daha az etki oluşturmuştur. Glutasyon konsantrasyonları azalmasına rağmen askorbat Cd'den etkilenmemiştir. H_2O_2 'ye maruz kalma antioksidan enzimler üzerinde, Cd'nin etkisi altında kalmaya benzer bir etki oluşturmuştur fakat *GSH* birikimine ve askorbat kaybına neden olmuştur. Çalışma sonuçları, hücrel redoks kontrolünün bozulmasında Cd ve H_2O_2 'nin etkili olduğunu göstermiştir [63].

Romero-Puertas ve arkadaşları, bezelye bitkisinin yapraklarında Cd metalinin H_2O_2 ve O_2^- üretimine etkisi üzerine çalışmışlardır. 50 mM $CdCl_2$ ile yetiştirilen bezelye bitkilerinin yapraklarında H_2O_2 birikimi temel olarak; transfer plazma hücrelerinde, mezofil ve epidermal hücrelerde ve ayrıca demet kılıf hücrelerinin tonoplastında gözlenmiştir. Mitokondri ve peroksizomlarda, mezofil hücrelerinde küçük bir H_2O_2

birikimi gözlenmiştir. O_2^- üretiminin hücre içi lokalizasyonu, demet kılıf hücrelerinin tonoplastında ve mezofil hücrelerinin plazma zarında tespit edilmiştir [64].

Hsu ve Kao, $CdCl_2$ stresine maruz bırakılan pirinç (*Oryza sativa L.*) fidelerinde ısı şoku kaynaklı H_2O_2 birikimi ve Cd toksisitesine karşı bitkinin korunması üzerine çalışmışlardır. Cd stresi sonucu pirinç fidelerinin H_2O_2 ve malondialdehit içeriklerinde artış görülmüştür. Isı şokuna maruz kalan yapraklarda, maruziyetten bir saat sonra H_2O_2 içeriği artmıştır. İki saatlik ısı şoku uygulamasından sonra, yapraklarda APX ve GR aktiviteleri ısı şoku uygulanmayanlara göre daha yüksek seviyede gözlenmiştir. Isı şoku olmayan koşullar altında pirinç fidelerinin H_2O_2 ile ön işleminden geçirilmesi; APX, GR ve CAT aktivitelerinde bir artışla sonuçlanmıştır ve sonraki Cd stresinden pirinç fidelerini koruduğu tespit edilmiştir [65].

Kumar-Tewari ve arkadaşları, Cu stresine maruz bırakılan dut bitkilerinde, O_2^- ve H_2O_2 'ye karşı antioksidan tepkiler üzerine çalışmışlardır. Cu eksikliği olan bitkilerde, H_2O_2 ve O_2^- 'nin biriktiğini gözlemlemişlerdir. H_2O_2 'nin, Cu eksikliği olan yapraklar üzerindeki tüylerin orta kısmında yüksek oranda biriktiği tespit edilmiştir. Hem Cu eksikliği hem de Cu fazlalığı olan bitkilerde SOD, CAT, POD, APX ve GR aktivitelerinin arttığı belirtilmiştir [66].

3. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Bitki Materyali ve Yetiştirme Koşulları

Nohut tohumları 25°C sıcaklıkta çimlendirme işlemine tabi tutulmuştur. Çimlenen tohumlar, içerisinde 40 ml Hoagland çözeltisi bulunan 400 ml'lik beherler içerisinde alınarak, iklim ve geliştirme dolabında hidroponik ortamda köklerin uzaması sağlanmıştır. 14 günlük bir süre sonunda, kök uzunlukları 10-15 cm kadar olduktan sonra bitkilere stres uygulanmaya başlanmıştır. Stres uygulaması yapılacak bitkilerin bulunduğu beherlere sırasıyla 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarda CuSO₄ eklenmiştir ve 1, 3 ve 5 günlük süreler ile Cu metaline maruz bırakılmıştır. Bütün uygulamalar 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Işık/karanlık fotoperiyodu 16:8 olarak ayarlanmıştır. Maruziyet işlemlerinin sonunda örneklerin yaprakları, sıvı azot içerisinde, havan ve havan kolu yardımıyla öğütülerek toz haline getirilmiş, eppendorf tüplere konularak etiketleme işlemi yapılmıştır. Daha sonraki analizler için -80 derece buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Hoagland çözeltisinin hazırlanması: Çözeltinin hazırlanması için makroelement (Tablo 3.1.) ve mikroelementler (Tablo 3.2.) suda çözülerek, 20 litrelik karışım 10X olacak şekilde Tablo 3.2.'de verilen miktarlara göre hazırlanmıştır. Ayrıca çözelti için kullanılan Fe-EDTA içeriği Tablo 3.3.'te gösterilmiştir. Hoagland besin çözeltisini hazırlamak için gerekli stok makro ve mikro besin element çözeltileri otoklavlanarak +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.1. 1X Hoagland besin çözeltisi içeriği

Elementler	1X için hacim
1 M NH ₄ NO ₃ (Amonyum nitrat)	5 ml/L
1 M KNO ₃ (Potasyum Nitrat)	5 ml/L
1 M KH ₂ PO ₄ (MKP- Mono potasyum fosfat)	1 ml/L
1 M CaCl ₂ .2H ₂ O (Kalsiyum Klorür)	4 ml/L
1 M MgSO ₄ .7H ₂ O (Magnezyum Sülfat)	2 ml/L
Solüsyon III	1 ml/L
Fe-EDTA	0.2 ml/L
Ph	5.5

Tablo 3.2. Hoagland besin çözeltilisinin hazırlanmasında kullanılan Solüsyon III içeriği

Mikroelementler	1 Litre için gerekli miktar
HBO ₃ (Borik Asit)	2.86 g
MnSO ₄ .H ₂ O (Mangan Sülfat)	1.54 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O (Çinko Sülfat)	0.23 g
CuSO ₄ .5H ₂ O (Bakır Sülfat)	0.09 g
MoNaO ₄ .2H ₂ O (Sodyum Molibdat)	0.025 g

Tablo 3.3. Hoagland besin çözeltilisinin hazırlanmasında kullanılan Fe-EDTA içeriği

İçerik	1 Litre için gerekli miktar
Na ₂ EDTA.2H ₂ O (Sodyum Etilendiamin)	37.3 g
Tetraasetik Asit)	
FeCl ₃ .6H ₂ O (Demir Klorür)	26.74 g

3.2. Malondialdehit (MDA) Analizi

Bitkide stres oluşumunu göstermek amacıyla malondialdehit (MDA) analizi ile lipid peroksidasyonu belirlenmiştir [67].

MDA analizi basamakları:

1. 100 mg yaprak örneği % 80'lik 1 ml alkol ile homojenize edilmiştir. 3000 g'de +4°C'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
2. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant ikiye bölünmüştür;
 - a. 1 hacim alınmış + 1 hacim % 20'lik TCA (trichloroaceticacid) + 1 hacim % 0.01'lik BHT (butylated hydroxytoluene) eklenmiştir. (-TBA)
 - b. 1 hacim alınmış + 1 hacim % 0.65 TBA (2-thiobarbituric acid) içeren % 20'lik TCA + 1 hacim % 0.01'lik BHT eklenmiştir. (+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 alınmıştır.
4. Soğuyan örnek 3000 g'de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatantı alınmıştır.

5. Birinci aşamada 532-600 nm’de, ikinci aşamada ise 532-600-440 nm’de ölçülmüştür.

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- nmolMDA/ml= (A-B/157000)x106

3.3. Yaprakta Hidrojen Peroksit Miktar Tayini

Hücreler arası H₂O₂ tayini için Junglee ve ark. ‘nın kullandıkları yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır [68].

H₂O₂ tayini basamakları:

1. 100 mg yaprak örnekleri, 4°C’de 5 ml % 0.1’lik trikloroasetik asit (TCA) içerisinde homojenize edilmiştir.
2. Homojenat 12.000 g’de 15 dk santrifüj yapılarak çöktürülmüştür.
3. Ayrı bir tüpe süpernatant kısımdan 0.5 ml alınmış, üzerine 0.5 ml 10 mM K-fosfat tamponu (pH 7.0) eklenmiş daha sonra 1 ml 1 M KI ilave edilerek karıştırılmıştır.
4. Absorbans değerleri 280 nm’de quartz küvet ile ölçülmüş ve Juglee ve ark.’nın gradual H₂O₂ konsantrasyonları kullanarak hesapladıkları standart eğriye göre hücredeki H₂O₂ konsantrasyonu tespit edilmiştir.

3.4. RNA İzolasyonu

Stres uygulamaları sonrasında alınan tüm bitki örnekleri, RNA izolasyonu işlemine kadar -80°C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Çalışmada her bir stres koşulu için 3 biyolojik tekrar ele alınmıştır. Genlerin ifade analizleri için kontrol ve stres uygulamalarından elde edilen yapraklardan, ilk olarak RNA izolasyonu yapılmıştır.

Total RNA izolasyonu, 'Thermo Scientific GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit' kullanılarak üreticinin kullanım kılavuzundaki yönergelere göre yapılmıştır.

RNA izolasyonu basamakları:

1. Buzdolabından çıkarılan içinde yaprak örneklerinin bulunduğu eppendorf tüplerin her birine (100 mg), 500 µL Plant RNA Lysis Solution ve 10 µL Dithiothreitol (DDT) eklenmiş ve her bir tüp yaklaşık 10 sn vortekslenmiştir.
2. Tüpler 56° C'de 3 dk inkübe edilmiştir ve 20.000 g'de (14.000 rpm) 5 dk santrifüj edilmiştir.
3. Tüplerdeki 450-550 µL'lik süpernatant kısım, temiz tüplere aktarılmıştır ve 250 µL etanol de ilave edilerek pipet yardımıyla karışım sağlanmıştır. Sonrasında karışımlar, saflaştırma kolonu takılı toplama tüplerine aktarılmıştır.
4. Tüpler 12.000 g'de (11.000 rpm) 2.5 dk santrifüj edilmiştir.
5. Santrifüjden sonra toplama tüplerindeki süzüntü dökülmüş ve saflaştırma kolonları yeniden takılmıştır.
6. Saflaştırma kolonlarına 700 µL WB 1 yıkama tamponu ilave edilmiş, 12.000 g'de 2.5 dk santrifüj edilmiştir.
7. Santrifüj sonunda saflaştırma kolonlarının takılı olduğu toplama tüpleri atılmış, saflaştırma kolonları yeni toplama tüplerine yerleştirilmiştir.
8. Saflaştırma kolonlarına 500 µL WB 2 yıkama tamponu ilave edilmiş, 12.000 g'de 2.5 dk santrifüj edilmiştir. Toplama tüplerindeki süzüntü dökülüp kolonlar tekrar takılmıştır.
9. Saflaştırma kolonlarına tekrar 500 µL WB 2 yıkama tamponu eklenmiş, 12.000 g'de 2.5 dk santrifüj edilerek kolonların son yıkaması gerçekleştirilmiştir. Toplama tüpleri atılmıştır.
10. Son basamakta RNA eldesi için saflaştırma kolonları RNaz içermeyen 1.5 ml'lik eppendorflara yerleştirilmiştir ve saflaştırma kolon membranlarının merkezine 50 µL nükleaz içermeyen saf su eklenip 12.000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.

11. Örnekler -20 °C de saklanmıştır.

3.5. cDNA (Komplementer DNA) Sentezi

cDNA sentezine geçmeden önce, izole edilmiş olan RNA'ların, kalitesi ve miktarını belirlemek için Donovix Marka nanodrop absorbands cihazında 260/280 nanometre dalga boyunda ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümün temel amacı, bir sonraki basamak olan cDNA sentezinde eşit konsantrasyonlarda DNA elde etmektir.

RNA örneklerinden cDNA sentezi, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

cDNA sentezi basamakları:

1. Steril tüplere; total RNA (0.1 ng – 5 µg), 1 µL Oligo (dT)₁₈ primer ve toplam hacim 12 µL olacak şekilde su ilave edilmiştir.
2. Sonrasında tüplere sırasıyla; 4 µL 5X Reaction Buffer, 1 µL RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL), 2 µL 10 mM dNTP Mix, 1 µL RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL) bileşenleri eklenerek toplam hacim 20 µL'ye tamamlanmıştır.
3. Yavaşça karıştırılıp kısa bir süre santrifüjlenmiştir.
4. Ters transkripsiyon reaksiyonu, ısı döngü cihazında 42°C'de 60 dk'lık bir sürede gerçekleştirilmiştir.

3.6. Gerçek Zamanlı PCR Reaksiyonu

Real time PCR reaksiyonu için üniversitemiz Bilimsel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde bulunan Bioneer Exicycler Tm 96 marka cihaz kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı için 1 µL forward, 1 µL reverse ve 2.5 µL cDNA örneği 12.5 µL apliqoon syber green master mix ile karıştırılmıştır. Nükleaz-free su ile son konsantrasyon 20 µL'ye tamamlanarak reaksiyon başlatılmıştır. Kontrol primer (house-keeping gen) olarak aktin (*ACT*) kullanılmıştır. Real Time PCR işlemi sonrasında *ACT*, *CAT*, *SOD* ve *MT2* genleri için Cu stresi (50,100 ve 200 µM) uygulamalarında farklı zamanlarda alınmış örneklerde polimeraz zincir reaksiyonu eş zamanlı olarak izlenmiş ve pik profili olarak kaydedilmiştir. Çalışmada kullanılan primer sekansları, ürün miktarı ve NCBI accession kodları Tablo 3.4.'de verilmiştir. Cycle Treshold (Ct) değeri polimeraz zincir reaksiyonuna ait pik profilinde logaritmik artışa geçilen ilk noktayı belirtmektedir. Real

time PCR reaksiyonları sonrasında elde edilen pik profillerinden her bir örneğe ait Ct değerleri belirlenmiştir. Elde edilen Ct değerleri ve her bir gen için oluşturulan standart eğri grafikleri ile mRNA ifade seviyeleri kantitatif olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.4. Real time PCR reaksiyonunda kullanılan primer sekansları, ürün boyları ve accession kodları

Gen	Primer adı	Sekans (5' – 3')	PCR Ürün boyu(BÇ)	Gene Bank kodu
Metallothionein	<i>MT2</i> F <i>MT2</i> R	ATGTCTTGCTGTGGTGGTAAC TCATTTGCAGGTGCAAGGGTTG	240	GQ900702
Süperoksit dismutaz	<i>Cu-Zn SOD</i> F <i>Cu-Zn SOD</i> R	TAACCTTCAGTCAGGAGGGAG GGAGTTTGGTCCAGTGAGA	276	AJ012739.1
Katalaz	<i>Cat</i> F <i>Cat</i> R	TGCCCCGAGATGGATAGA GGTTGGCGAGGACCTTAACT	161	AJ131046.1
Aktin	<i>ACT</i> F <i>ACT</i> R	TGTCTTGAGTGGTGGTTCTAC CTTGCCGCCAGATATTGTA	202	XM_004493535.1

(F: Forward/İleri, R: Reverse/Geri)

(BÇ: Baz Çifti)

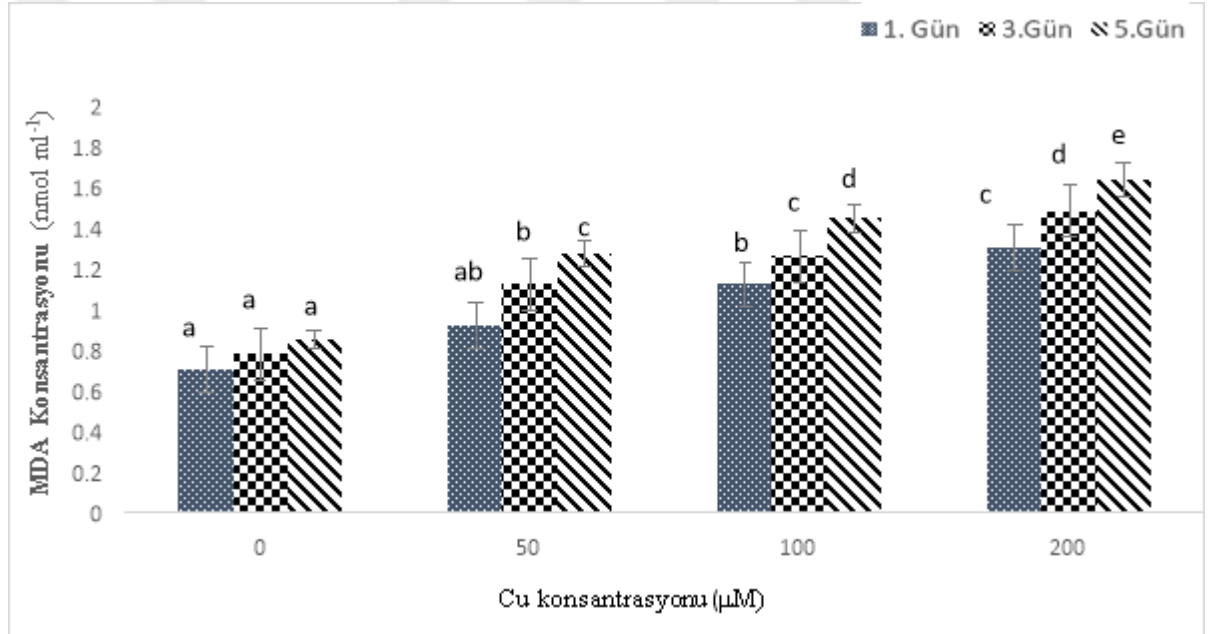
3.7. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirmesi Livak and Schmittgen'in ortaya koymuş olduğu $2^{\Delta\Delta Ct}$ metoduna ve tek yönlü varyans analizi (Dunnett) yöntemine göre yapılmıştır. Konsantrasyon ve Ct değeri olarak belirlenen gen ekspresyonu sonuçları house-keeping gen olarak çalışmada kullanılan aktin ve kontrol şartları dikkate alınarak normalize edilmiştir [69]. Bu verilerin ortalama, standart sapma, standart hata ve istatistiksel olarak anlamlılık dereceleri istatistik programı SPSS 15.0 ile hesaplanmıştır. Anlamlılık derecesi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir. Bu şekilde Cu stresi altında örneklerde *SOD*, *CAT*, *MT2* genlerinin mRNA ifade seviyeleri tespit edilmeye çalışılmıştır.

4. BÖLÜM BULGULAR

4.1. MDA Analizi Sonuçları

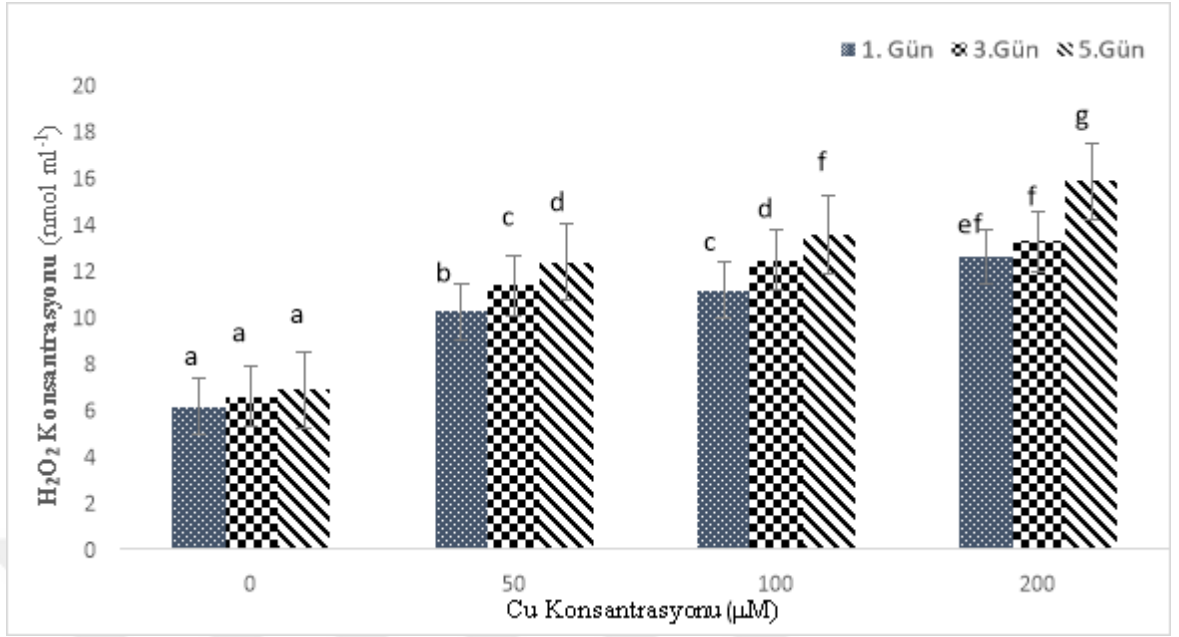
MDA miktarı, uygulama periyodu ve Cu konsantrasyonuna bağlı olarak oldukça kararlı bir artış göstermiştir. İstatistiksel olarak en yüksek MDA akümüasyonu 5. gün 200 μM konsantrasyonda tespit edilmiştir. 1. gün 100 μM ile 3. gün 50 μM konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır. 1. gün 200 μM , 3. gün 100 μM ve 5. gün 50 μM konsantrasyonları arasında da istatistiksel açıdan bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.1) ($P < 0.05$).



Şekil 4.1. Nohut bitkisi yapraklarında bakır stresinin 1., 3., ve 5. günlerde tespit edilen MDA düzeyleri.

4.2. H_2O_2 Konsantrasyonu

Farklı süre ve konsantrasyonlarda bakır maruziyeti sonucu nohut yapraklarında H_2O_2 miktarına bakıldığında; maruziyet süresi ve konsantrasyon arttıkça H_2O_2 miktarında da bir artış olduğu tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak en yüksek H_2O_2 konsantrasyonuna 5.gün 200 μM konsantrasyonda rastlanmıştır (Şekil 4.2) ($p < 0.05$). Yapılan Post Hoc analizi bakır konsantrasyonu ve maruziyet süresi açısından incelendiğinde, bütün grupların birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir.

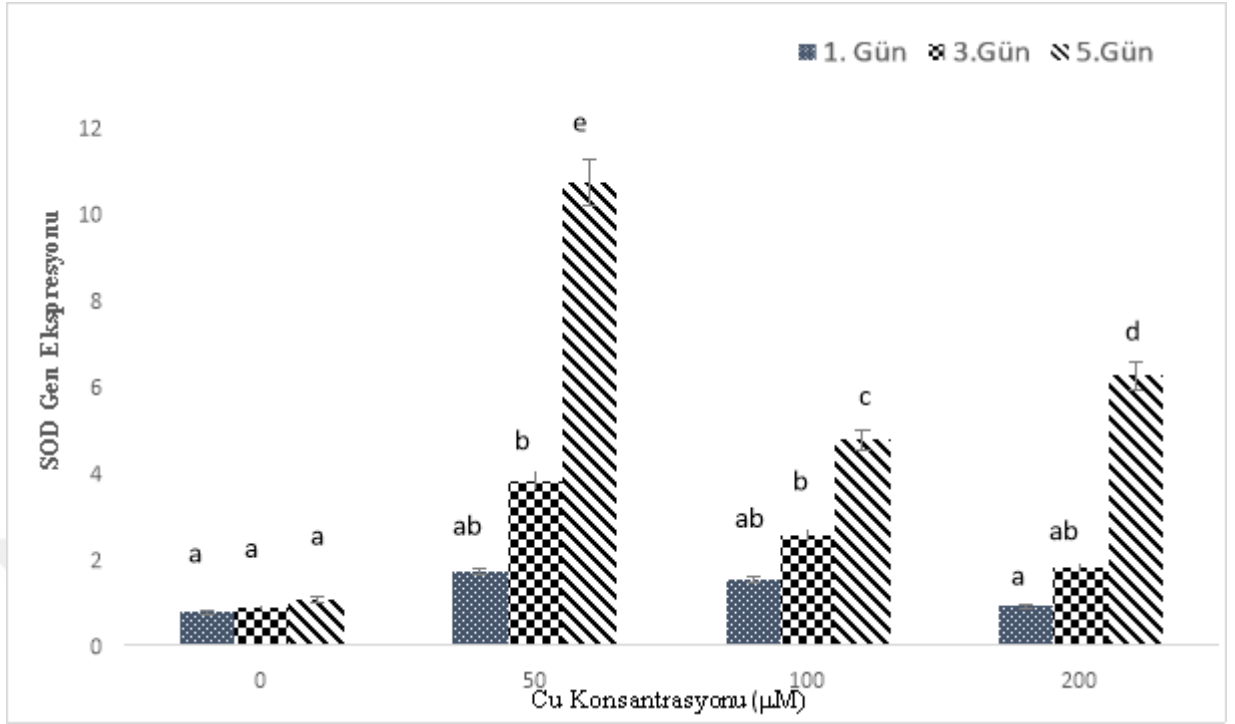


Şekil 4.2. Nohut bitkisi yapraklarında bakır stresinin 1., 3., ve 5. günlerde tespit edilen H₂O₂ miktarları.

4.3. SOD Gen Ekspresyonu

Nohut yapraklarındaki stres alakalı gen ifade düzeylerinde meydana gelen değişim, house-keeping gen olan aktin geninin ifade seviyesinde meydana gelen değişime göre göreceli olarak tespit edilmiştir.

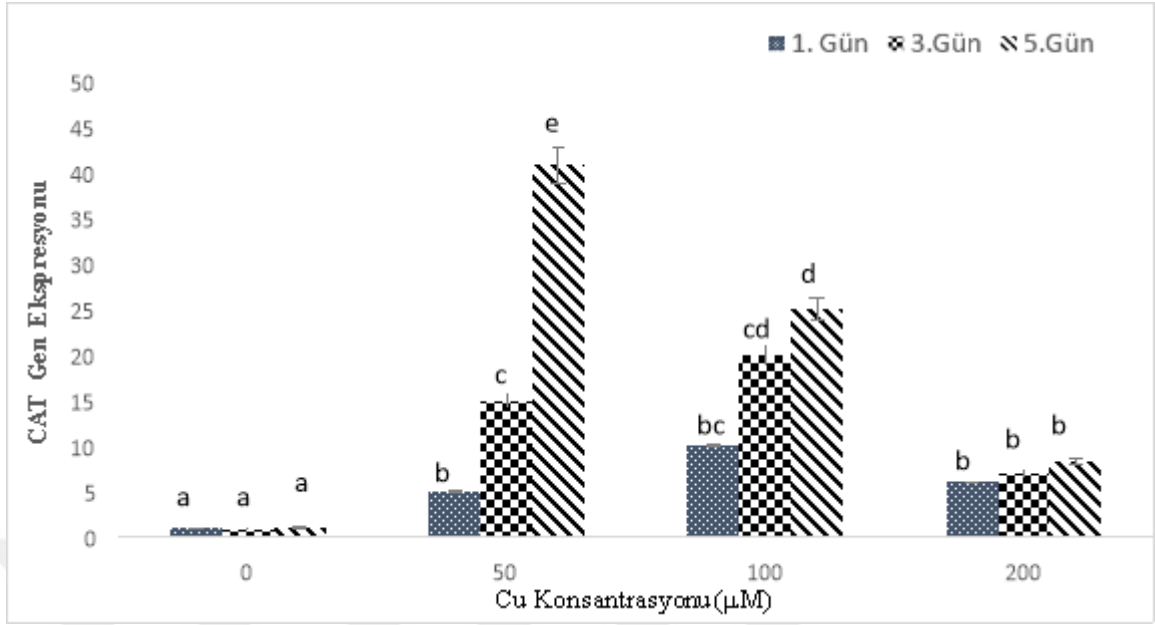
Süperoksit dismutaz (*Cu-Zn/SOD*) gen ifadesine bakıldığında; 1., 3., ve 5. günlerde 50, 100, 200 µM Cu uygulamaları sonucu gen ifade düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış gerçekleştiği görülmüştür. En yüksek *Cu-Zn/SOD* gen ifade düzeyine 5. gün 50 µM Cu uygulamasında rastlanmıştır ve 5. gün; 200 µM Cu uygulamasındaki gen ifadesi 100 µM Cu uygulamasındaki gen ifadesine göre yüksek seviyede tespit edilmiştir. 1. gün; 50 ve 100 µM Cu uygulamalarındaki gen ifadeleri, 200 µM Cu uygulamasındaki gen ifadesine göre yüksek düzeyde tespit edilmiştir. Ayrıca 1. gün 200 µM Cu uygulamasındaki gen ifade seviyesi kontrol grubu ile aynı seviyeye geldiğinden aralarında istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır. 3. gün ise artan konsantrasyona bağlı olarak gen ifade düzeylerinde azalma meydana geldiği görülmüştür (Şekil 4.3) ($p < 0.05$).



Şekil 4.3. Nohut bitkisi yapraklarında bakır stresinin 1., 3., ve 5. günlerde tespit edilen *Cu-Zn/SOD* geni ifade düzeyleri.

4.4. *CAT* Gen Ekspresyonu

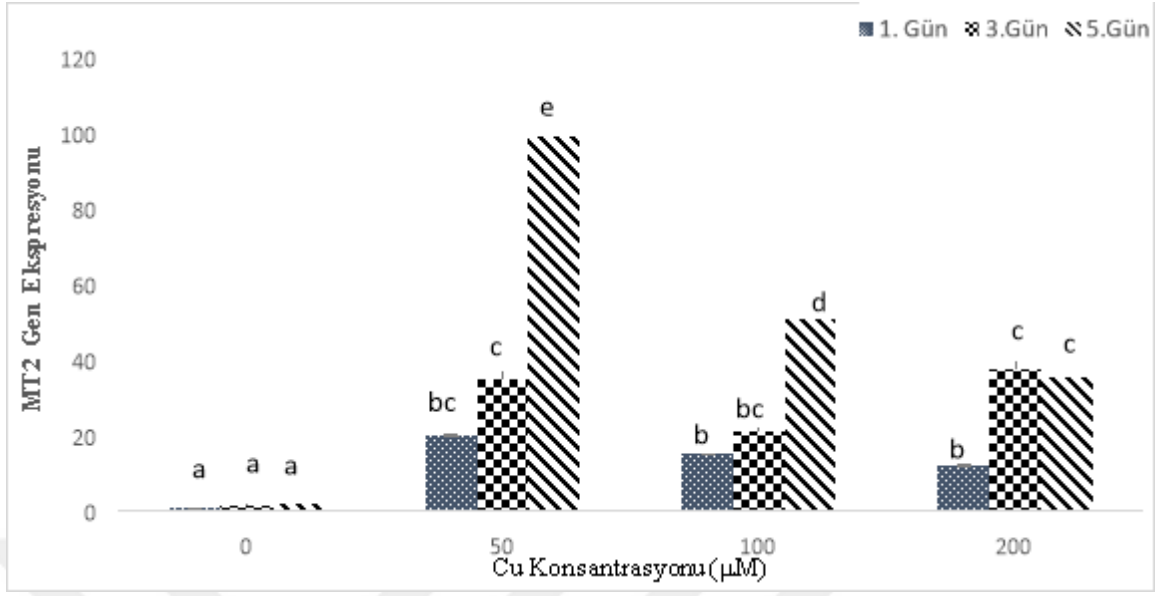
CAT gen ifadesine bakıldığında; tüm maruziyet sürelerinde ve konsantrasyonlarda gen ifade düzeylerinin kontrol grubuna göre artış gösterdiği saptanmıştır. İstatistiksel olarak en yüksek gen ifade düzeyine 5. gün 50 µM Cu uygulamasında rastlanmıştır ve 5. gün artan konsantrasyona bağlı olarak gen ifade düzeylerinde azalma tespit edilmiştir. 1. ve 3. gün; 100 µM Cu uygulamalarındaki gen ifade düzeyleri, 50 ve 200 µM Cu uygulamalarındaki gen ifade düzeylerinden yüksek olarak tespit edilmiştir. 1., 3. ve 5. gün 200 µM konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.4) ($p < 0.05$).



Şekil 4.4. Nohut bitkisi yapraklarında bakır stresinin 1., 3., ve 5. günlerde tespit edilen *CAT* geni ifade düzeyleri.

4.5. *MT2* Gen Ekspresyonu

MT2 gen ifadesine bakıldığında; tüm maruziyet sürelerinde ve konsantrasyonlarda gen ifade düzeylerinin kontrol grubuna göre artış gösterdiği saptanmıştır. İstatistiksel olarak 5. gün 50 µM Cu uygulamasında, gen ifadesinin en yüksek düzeye ulaştığı tespit edilmiştir ve bu düzeyin aktin geni ifade düzeyinden yaklaşık 100 kat fazla olduğu görülmüştür. Bununla birlikte 5. gün artan konsantrasyona bağlı olarak gen ifade seviyelerinde azalma tespit edilmiştir. 1. gün gen ifade seviyelerinde, 5. günde olduğu gibi artan konsantrasyona bağlı olarak azalma meydana geldiği görülmüştür. 3. gün; 50 ve 200 µM Cu uygulamalarındaki gen ifadeleri, 100 µM Cu uygulamasındaki gen ifadesinden yüksek seviyede tespit edilmiştir. Ayrıca 3. ve 5. gün 200 µM konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.5) ($p < 0.05$).



Şekil 4.5. Nohut bitkisi yapraklarında bakır stresinin 1., 3., ve 5. günlerde tespit edilen *MT2* geni ifade düzeyleri.

5. BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada; nohut bitkisi (*Cicer arietinum L.*) farklı süre ve konsantrasyonlarda Cu ağır metale maruz bırakılmıştır. Çalışma sonucunda; bitki yaprağında oksidatif stresin göstergesi olan MDA ve H₂O₂ konsantrasyonları tespit edilmiştir. Ayrıca stres savunmasında görevli olan *Cu-Zn/SOD*, *CAT* ve *MT2* genlerinin ifade seviyelerinde meydana gelen değişiklikler house-keeping gen olarak seçilen aktin (*ACT*) geninin ifadesine göre belirlenmiştir. Bunlara ek olarak, ifade düzeyinde meydana gelen değişim ile hücrel H₂O₂ arasındaki ilişki ortaya konulmaya çalışılmış ve hücrel H₂O₂'nin ekspresyon seviyeleri üzerine sinyalizasyon etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Oksidatif stres durumunda üretimi artan reaktif oksijen türleri; lipitler, proteinler, nükleik asitler gibi biyomoleküllerde oksidatif hasara neden olmaktadır. Lipitlerde meydana gelen hasar, lipitlerin peroksidasyonu sonucu oluşmaktadır. Lipit peroksidasyonu sırasında meydana gelen bir dizi reaksiyon sonucu ortaya çıkan metabolik ürünlerden bir tanesi de malondialdehit (MDA)'tir [70]. Yapılmış birçok çalışmada da araştırmacılar, bitkilerde çeşitli stres faktörlerinin lipit peroksidasyonu üzerine etkilerini araştırmışlardır. Rasool ve arkadaşları tarafından 8 nohut çeşidinde tuz stresinin lipit peroksidasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonucunda, tuza toleranslı nohut çeşitleri dışındaki diğer nohut çeşitlerinde tuz konsantrasyonu arttıkça MDA içeriğinin de artış gösterdiği tespit edilmiştir [71]. Chaoui ve arkadaşları, fasulye bitkisinde kadmiyum ve çinko ağır metallerinin lipit peroksidasyonuna etkisi üzerine çalışmışlardır. Çalışma sonucunda, kadmiyum ve çinko maruziyetindeki bitkilerin MDA içeriklerinde kontrol grubuna kıyasla artış olduğu tespit edilmiştir [72]. Kumar ve arkadaşları, artan kadmiyum konsantrasyonu ve uzayan uygulama periyoduna bağlı olarak yer fıstığı bitkisinin kök, gövde ve yaprak kısımlarında MDA içeriğinin de artış gösterdiğini tespit etmişlerdir [73]. Razinger ve arkadaşlarının su mercimeği (*Lemna minor L.*) bitkisinde kadmiyum etkisi üzerine yapmış oldukları çalışmada; 1 µM Cd konsantrasyonuna kadar MDA içeriği kontrol grubuyla benzerlik gösterirken 1 µM Cd konsantrasyonundan sonra artan konsantrasyona paralel olarak MDA içeriğinde artış tespit edilmiştir [74]. Yapılmış olan bu çalışmada da tespit edilen MDA miktarı

literatürdeki çalışmalara benzer şekilde süre ve konsantrasyona bağlı olarak artış göstermiştir.

Bitkiler artan metal iyon konsantrasyonlarına uyum sağlamak için bir takım mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalar metal toleransı sağlamada, esansiyel olmayan metalleri ve yüksek konsantrasyondaki esansiyel metalleri detoksifiye etmede etkilidir. Bu mekanizmalardan biri olan metalotiyoninler (MT'ler) hücrelerdeki ana geçiş metal iyonu bağlayıcı proteinlerdir [13]. Ayrıca, MT'lerin hem metal şaperonlama hem de ROS süpürme görevinde işlev gördüğü öne sürülmüştür [62]. Tamas ve arkadaşlarının arpa bitkisi köklerinde Cd etkisini araştırdıkları çalışmasında; bitki köklerinde Cd konsantrasyonu arttıkça *MT* ifade seviyesinin de arttığı tespit edilmiştir [75]. Jain ve arkadaşları, şeker kamışı bitkisinde artan Cr konsantrasyonuna paralel olarak *MT* gen ifade seviyesinin de arttığını tespit etmişlerdir [76]. Murphy ve Taiz'in yaptığı çalışmada *MT2* ifade seviyesinin farklı stres koşullarında kontrol grubuna göre yüksek seviyede eksprese edildiği tespit edilmiştir [77]. As ve Cr metallerinin domates bitkisinde stres alakalı genlerin ekspresyonuna etkilerini araştırmış olan Goupil ve arkadaşları; kök ve sürgünlerde *MT2* gen ifadesini incelemişlerdir. Sonuç olarak, artan metal konsantrasyonlarına bağlı olarak köklerde *MT2* gen ifadesi sürgünlere göre daha yüksek seviyede gözlenmiştir. Ayrıca As uygulanan bitkilerde Cr uygulanan bitkilere göre *MT2* gen ifadesi daha yüksek seviyede tespit edilmiştir [58]. Yeşilirmak ve arkadaşları, makarnalık buğday (*Triticum durum*) bitkisinde artan Cd konsantrasyonuna paralel olarak tip 1 metallothionein (*dMT*) gen ifade seviyesinin de arttığını ifade etmişlerdir [78]. Jain ve arkadaşları, selenyum maruziyetindeki şeker kamışı bitkisi ile yaptıkları çalışmada, *MT* geninin tüm konsantrasyonlarda kontrole göre yüksek seviyede eksprese edildiğini tespit etmişlerdir. Ancak *MT* ekspresyon seviyesinin belli bir konsantrasyona kadar arttığını, belli bir konsantrasyondan sonra ise azaldığını tespit etmişlerdir [79]. Tombuloğlu ve arkadaşlarının domates bitkisinde bor elementinin etkisi üzerine yaptıkları çalışmada, bitkinin kök ve sürgün kısımlarında *MT2* gen ifade seviyesinin belli bir konsantrasyona kadar arttığını, belli bir konsantrasyondan sonra ise azaldığını tespit etmişlerdir [80]. Souguir ve arkadaşları, bakla (*Vicia faba*) bitkisinde farklı süre (12, 24 ve 48 saat) ve konsantrasyonlarda (0, 50, 100 ve 200 µM) Cd maruziyeti sonucu stres alakalı bazı genlerin mRNA birikimi üzerine çalışmışlardır.

Sonuçta, 12 saatlik süre sonunda *MT2* gen ifadesinde artış fakat süre uzadığında ise azalış tespit etmişlerdir [53].

Bizim çalışmamızda da; *MT2* ifadesi tüm uygulama süre ve konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre daha yüksek seviyede tespit edilmiştir. Fakat, *MT2* ifade seviyesi 50 µM Cu uygulamasına kadar artmış, 50 µM Cu uygulamasından sonra 100 ve 200 µM Cu uygulamalarında ise azalmıştır. Yapmış olduğumuz çalışmanın sonuçları da, *MT* geni ile ilgili yapılmış olan çalışmaların sonuçlarıyla uyumludur.

Cu-Zn/SOD enzimi hücrede çekirdek ve sitoplazmada bulunmaktadır ve hücreyi ROT'un zararlı etkilerinden korumada, savunmanın ilk basamağında yer almaktadır. *SOD* ifade düzeyi, daha önce yapılan çalışmalarda belirtildiği gibi abiyotik stres koşulları altında artmaktadır [49]. *SOD* ifade düzeyinin artması, hücrede O₂⁻ radikalinin biriktiğinin ve H₂O₂ miktarının da arttığının bir kanıtı sayılmaktadır [81]. Bu durum *SOD* enziminin fazla miktardaki O₂⁻ radikalini uzaklaştırarak stres durumunda bitkinin direncini arttırdığını göstermektedir [29]. Faralli ve arkadaşlarının ısı şoku ve tuzluluk stresinin arpa bitkisinin gelişimi üzerine yaptıkları bir çalışmada, *Cu/Zn-SOD* ifade düzeyinin stres etmenlerine bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir [82]. Yapmış olduğumuz çalışmada, *SOD* ifade düzeyi tüm uygulama süre ve konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla yüksek seviyede eksprese edilmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda (Kontrol, 50, 100, 250, 500, 1000 ve 1500 µM) Cu uygulanmış mısır fidelerindeki antioksidan enzim aktiviteleri ile ilgili bir çalışma yapan Eryılmaz, bitkinin yaprak kısımlarındaki *SOD* aktivite seviyesinin belli bir konsantrasyona kadar (250 µM) arttığını fakat belli bir konsantrasyondan sonra ise azaldığını tespit etmiştir [29]. Souguir ve arkadaşları, bakla bitkisine Cd uygulamışlardır. Çalışma sonucunda, *SOD* ekspresyonunun 12 saatlik süre sonunda tüm konsantrasyonlarda arttığını, 12 saatten sonra devam eden periyotta ise azaldığını tespit etmişlerdir [53]. Dixit ve arkadaşlarının bezelye bitkisine Cd uyguladığı bir çalışmada; bitki yapraklarındaki *SOD* ifade düzeyinin tüm Cd uygulamalarında belli bir süreye kadar arttığını, belli bir süreden sonra ise azaldığını saptamışlardır [83]. Dai ve arkadaşları, kanola bitkisine farklı konsantrasyonlarda tuz stresi uygulamışlardır. Çalışma sonucunda *SOD* ifade seviyesinin 200 mmol L⁻¹ konsantrasyona kadar arttığını, 250 ve 300 mmol L⁻¹ konsantrasyonlarda ise azaldığını tespit etmişlerdir [84]. Tuz stresi

altında pirinç bitkileri ile çalışmış olan Rossatto ve arkadaşları; *SOD* ekspresyonunun 15 günlük maruziyete kadar kontrole göre arttığını fakat 20 günlük maruziyetten sonra azaldığını tespit etmişlerdir [85]. Kumar-Tewari ve arkadaşlarının dut bitkisine artan konsantrasyonlarda (0.0, 0.1, 1.0 ve 100 μM) Cu uyguladığı çalışmasında ise, 25 ve 50 günlük maruziyetler sonunda, *SOD* ekspresyon seviyesinin belli bir konsantrasyona kadar azaldığı, 100 μM konsantrasyonda artış gösterdiği tespit edilmiştir [66]. Soydam-Aydın, domates bitkisinde tuz, kuraklık ve soğuk stresi durumunda *SOD* gen ifadesi üzerine çalışmıştır. Araştırma sonucunda, süre ve konsantrasyona bağlı olarak ifade düzeyinin önce azaldığını sonra arttığını, ardından yeniden azalma gösterdiğini tespit etmiştir [86]. Literatürdeki çalışmalara benzer olarak çalışmamızda da, *SOD* ifade düzeyi 50 μM Cu uygulamasına kadar artmış ve bununla birlikte 5. gün 50 μM Cu uygulamasında en yüksek seviyeye ulaşmış fakat konsantrasyon miktarı arttıkça tüm uygulama sürelerinde *SOD* ifade düzeyinde azalma gerçekleşmiştir. Bu durum bitkinin stres ile karşılaştığı ilk zamanlarda savunma mekanizmasının devreye girişi ile ifadede dereceli bir artış olduğunu, bitkinin stresi tolere edemediği seviyeye gelindiğinde ise ifadede azalış olduğunu göstermektedir.

CAT, tüm aerobik organizmaların antioksidan savunma sisteminde H_2O_2 'nin H_2O ve O_2 'ye dönüştürülmesinde önemli rolü olan bir enzimdir [87]. *CAT* enzimi buğday, domates, su sümbülü gibi farklı bitkilerde çalışılmıştır ve elde edilen veriler, bitkilerde farklı stres koşullarında enzimin ifade düzeyinin arttığını göstermiştir [88-90].

Rout ve Sahoo, *Withania somnifera* bitkisine değişik oranlarda Cu stresi uygulamışlardır. Çalışma sonucunda, bitkinin yaprak dokularında belirlenen *CAT* ekspresyonunun 50 μM Cu uygulamasına kadar arttığını fakat 100 ve 200 μM Cu uygulamalarında azaldığını tespit etmişlerdir [60]. Cantarello ve arkadaşları, salatalık bitkisine 7, 24, 31, 48, 56 ve 72 saatlik sürelerde ultra viyole (UV-B) stresi uygulamışlardır. Çalışma sonucunda *CAT* ifade seviyesinin 48 saatlik süre sonuna kadar arttığını, 56 ve 72 saatlik sürelerde ise azaldığını tespit etmişlerdir [91]. Dai ve arkadaşları, kanola bitkisini tuz stresine maruz bırakmışlardır. Çalışma sonucunda *CAT* ifade seviyesinin 150 mmol L^{-1} konsantrasyona kadar arttığını; 200, 250 ve 300 mmol L^{-1} konsantrasyonlarda ise azaldığını tespit etmişlerdir [84]. Soydam-Aydın ve arkadaşları Patlıcan bitkisine farklı konsantrasyonlarda (0, 80, 160, 320, 640, 1280 μM) Cu uygulamışlardır. Çalışma sonucunda *CAT* ifadesinin 160 μM Cu uygulamasına

kadar kontrolle aynı seviyede olduğunu, 320 µM Cu uygulamasında en yüksek seviyeye ulaştığını ve bu uygulamadan sonra ifade seviyesinde azalma gerçekleştiğini tespit etmişlerdir [61]. Kar, nohut bitkisine değişen süre ve konsantrasyonlarda Cd uygulamıştır. Çalışma sonucunda, CAT geninin 24 saatlik uygulama sonucunda yüksek seviyede eksprese edildiğini, 48 saatlik uygulama sonucunda ise ekspresyon seviyesinde azalma gerçekleştiğini tespit etmiştir [49]. Literatürdeki çalışmalarla uyumlu olarak çalışmamızda da, CAT ifade seviyesi belli bir konsantrasyona kadar artmış belli bir konsantrasyondan sonra ise azalmıştır.

Bizim bulgularımızın tersine, Rossatto ve arkadaşlarının, pirinç bitkilerine tuz stresi uyguladığı çalışmada, CAT ekspresyonu tüm uygulama sürelerinde kontrole göre yüksek seviyede tespit edilmiş ve uygulama süresi uzadıkça ekspresyon seviyesinin de artış gösterdiği belirtilmiştir [85]. Souguir ve arkadaşlarının çalışmasında da, Cu uygulanan pirinç fidelerinde, artan konsantrasyona ve uzayan süreye bağlı olarak CAT ifade seviyesinin arttığı tespit edilmiştir [53].

Bitkilerde biyotik ve abiyotik streslere verilen cevaplarda H₂O₂'nin önemli rol oynadığı kanıtlanmıştır. Bu molekül, çeşitli stres yanıtları ve fizyolojik düzenlemeleri ve hücredeki ROT homeostazisini kontrol eden bir “ana hormon” gibi görünmektedir [17]. Birçok çalışma bitkilerde stres maruziyeti sonrasında H₂O₂ konsantrasyonunda artış olduğunu ifade etmiştir [63, 65]. Chen ve arkadaşları, pirinç bitkisine Cu uygulamışlar; çalışma sonucunda H₂O₂ içeriğinin artan Cu konsantrasyonuna paralel olarak arttığını gözlemlemişlerdir [51]. Cho ve Seo, *Arabidopsis thaliana* bitkisine Cd uygulamışlardır. Çalışma sonucunda Cd konsantrasyonu arttıkça H₂O₂ birikiminin de arttığını tespit etmişlerdir [92]. Khatun ve arkadaşları, *Withania somnifera* bitkisine Cu uygulamışlardır. Çalışma sonucunda, artan Cu konsantrasyonuna bağlı olarak H₂O₂ içeriğinin de arttığını tespit etmişlerdir [55]. Wu ve arkadaşları, Cu maruziyeti altında *Plagiomnium cuspidatum* bitkisinde yaptıkları bir çalışma sonucunda, H₂O₂ içeriğinde artış tespit etmişlerdir [93]. Imtiaz ve arkadaşları nohut bitkisinde vanadyum (V) toksisitesini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, V konsantrasyonu arttıkça H₂O₂ birikiminin de arttığını tespit etmişlerdir [94]. Chaparzadeh ve arkadaşları, tuzluluk stresi altında aynısefa (*Calendula officinalis*) bitkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, kök ve yapraklardaki H₂O₂ seviyesini, 50 mM NaCl konsantrasyonunda kontrolün seviyesine benzer olarak, 100 mM NaCl konsantrasyonunda ise kontrolden daha yüksek

seviyede tespit etmişlerdir [95]. 2 mısır bitkisi çeşidinde Cd toksisitesini araştıran Anjum ve arkadaşları, artan Cd konsantrasyonuna paralel olarak H₂O₂ içeriğinin arttığını tespit etmişlerdir [96]. Çalışmamızda da artan süre ve Cu konsantrasyonuna bağlı olarak H₂O₂ içeriğinin kararlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Mevcut çalışmamız ile literatürdeki çalışmalar paralellik göstermektedir.

Uzun yıllar boyunca, reaktif oksijen türleri üzerine araştırmalar yapılmıştır. Baxter ve arkadaşları, erken dönemlerde ROT metabolizması üzerine yapılan araştırmaların, ROT'un potansiyel toksisitesine ve farklı ROT temizleme mekanizmalarına odaklanırken daha yeni çalışmaların ROT'un sinyal molekülleri olarak oynadığı role odaklandığını belirtmişlerdir [97]. Son yıllarda yapılan araştırmalarda, reaktif oksijen türlerinin tahmin edilenden daha az zararlı olduğu vurgulanmıştır [98-100]. Choudhury ve arkadaşları, ROT'un bazı genlerin ekspresyonunu etkilediğini ve ROT'un streslerin düzenlenmesinde bir biyolojik sinyal olarak hareket ettiğini ifade etmişlerdir. Bitkilerde birincil ROT olarak kabul edilen O₂^{•-} and H₂O₂'nin bitkinin büyüme ve gelişmesinde çeşitli fonksiyonları düzenleyen ikincil haberciler olarak görev gördüklerini vurgulamışlardır [101]. Apel ve Hirt, sinyal iletiminin, ROT sensörlerinin aktif hale gelerek; sinyal yolları bileşenlerinin doğrudan ROT tarafından oksitlenerek; ROT'un, transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini değiştirerek 3 farklı şekilde gen ekspresyonunu etkileyebileceğini belirtmişlerdir [102]. Gill ve Tuteja yapmış oldukları çalışmalarında, H₂O₂'lerin uzun ömürlü olması ve membranlar arası geçirgenliğinin yüksek olması nedeniyle, ROT aracılığıyla üretilen sinyaller için, ROT'un ikincil bir haberci olarak kabul edilmeye başlandığını belirtmişlerdir. Ayrıca, ROT'un çok çeşitli fizyolojik işlemlerde kilit bir düzenleyici olarak görev gördüğünü ifade etmişlerdir [9]. Slesak ve arkadaşları, bitki hücrelerindeki H₂O₂'nin yüksek konsantrasyonlarının, H₂O₂'nin bir sinyal iletim faktörü olarak kilit bir rol oynadığına işaret edebileceğini vurgulamışlardır. Ayrıca H₂O₂'nin, antioksidan enzimlerin ve H₂O₂ üretiminin modülatörlerini kodlayanlar dahil çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenlediğini de ifade etmişlerdir [17]. Del-Rio, makalesinde aslında zararlı ve tehlikeli bir süreç olarak bilinen ROT üretiminin, aynı zamanda bitkilerin gelişimi ve çevresel streslere tepkileri için kullandıkları sinyal ağının önemli bir bileşeni olduğunu belirtmiştir. Ayrıca H₂O₂'lerin ikincil haberci görevleri ve önemine vurgu yapmıştır [98]. Sharma ve arkadaşları, H₂O₂'nin yanı sıra diğer ROT'ların, sadece hücreler için toksik olmakla kalmayıp aynı

zamanda düşük konsantrasyonlarda yararlı ve yüksek konsantrasyonlarda toksik olduğu için bir sinyal molekülü olarak da işlev gördüğünü belirtmişlerdir [103]. Saxena ve arkadaşları, H₂O₂'nin normal koşullar altında önemli bir sinyal görevi gördüğünü, stres koşulları altında ise oksidatif hasara yol açtığını belirtmişlerdir. Ayrıca H₂O₂'nin sinyal molekülü olarak biyotik ve abiyotik strese karşı toleransta rol oynadığını ifade etmişlerdir [104]. Rossatto ve arkadaşları, pirinç bitkisinde meydana gelen stres sonucu üretilen H₂O₂ seviyelerinin düşük olduğunu ve zarara yol açmadığını, aksine stres genlerinin ekspresyonunu arttırdığını vurgulamışlardır [85]. Laloï ve arkadaşları, biyotik ve abiyotik stresler tarafından tetiklenen H₂O₂ konsantrasyonundaki artışların genellikle farklı mekanizmalara dayandırıldığını ve H₂O₂'nin bir sinyal görevi gördüğünü vurgulamışlardır [105]. Kar, nohut bitki köklerini Cd'ye maruz bırakmış, antioksidan gen ekspresyonlarının H₂O₂ ile ilişkili olduğunu belirtmiştir. Belli bir düzeyde H₂O₂ miktarının, genlerin yüksek seviyede eksprese edilmesini sağlarken artan H₂O₂ konsantrasyonuna bağlı olarak gen ekspresyon seviyelerinde ciddi bir düşüş olduğunu vurgulamıştır [49].

Mevcut çalışmamızda da, ekspresyon seviyeleri belirlenen bütün stres enzimleri, H₂O₂ konsantrasyonu belli bir seviyede en yüksek ekspresyonu gerçekleştirirken H₂O₂ konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak ekspresyon seviyelerinde azalma meydana gelmiştir. En yüksek *Cu-Zn/SOD*, *CAT* ve *MT2* gen ekspresyon seviyelerine 5. gün 50 µM Cu uygulamasında rastlanmıştır ve en yüksek ekspresyondan sonra artan konsantrasyona bağlı olarak gen ekspresyon seviyelerinde bir azalma meydana gelmiştir.

Sonuç ve öneriler:

- ❖ Cu uygulanmış nohut bitkisinde stres alakalı genlerin ekspresyon seviyelerinde değişiklikler tespit edilmiş ve hücrel H₂O₂'nin, gen ekspresyon seviyeleri üzerine etkileri gözlemlenmiştir.
- ❖ H₂O₂'nin stres enzimlerinin ekspresyonunu arttırdığı düşünüldüğünde, tarım arazilerinde stres faktörlerine daha dayanıklı bitkilerin yetiştirilebilmesi için H₂O₂ molekülünün biyoteknolojik kullanımı da daha sonraki çalışmalarda araştırılabilir.
- ❖ Tarım arazilerinin bazı stres etmenlerine maruz kalacağı önceden tahmin edildiği durumlarda; tarım arazilerine H₂O₂ uygulamasıyla bitkilerdeki stres

enzimlerinin ekspresyon seviyelerinin artabileceđi ve bitkilerin bu stres durumundan etkilenmeyeceđi düşünölmektedir.

- ❖ Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular daha sonar yapılacak olan oksidatif sinyalizasyon çalışmalarına ışık tutacaktır.



KAYNAKLAR

1. Gülümser, A., “Dünyada ve Türkiye’de Yemelik Dane Baklagillerin Durumu”, *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 25 (Özel sayı-1):292-298, 2016. <https://doi.org/10.21566/tarbitderg.280511>
2. İnternet: TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, “Nohut Raporu 2018”. http://www.zmo.org.tr/genel/bizden_detay.php?kod=29998&tipi=17&sube=0
3. Düzdemir, O., “Kışlık ve Yazlık Yetiştirilen Nohut (*Cicer arietinum* L.)’ta Ekim Zamanlarına Göre Bitkide Tane Verimi ile Bazı Bitkisel Özellikler Arasındaki İlişkilerin İncelenmesi”, *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 25 (Özel sayı-1):206-212, 2016.
4. Babaoğlu, M., “Nohut ve Tarımı (*Cicer arietinum* L.)”, *Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü*, Edirne, 2003.
5. Akın, F., “In vitro Koşullarda Siyah ve Beyaz Nohut (*Cicer arietinum* L.) Genotiplerinde Tuz Stresinin Çimlenme ve Büyüme Üzerine Etkileri”, *Necmettin Erbakan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 2018.
6. Ünalın, Ş., “Ağır Metal Stresi Altındaki Mısır Bitkisinde Antioksidant Enzim Savunma Sisteminin Davranışı ve Mısırın Ağır Metal Kirliliğinin Giderilmesinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması”, *Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı*.
7. Okcu, M., Tozlu, E., Kumlay, A.M., Pehlivan, M., “Ağır Metallerin Bitkiler Üzerine Etkileri”, *Alinteri*, 17 (B), 14-26, 2009.
8. Büyük, İ., Soydam-Aydın, S., Aras, S., “Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar”, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69(2): 97 – 110, 2012.
9. Gill, S. S., Tuteja, N., “Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 12, 909-930, 2010.
10. Becker, E.M., Nissen, L.R., Skibsted, L.H., “Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects”, *European Food Research and Technology*, 219(6): p. 561-571, 2004.
11. Schafer, F.Q., et al., “Comparing f-carotene, vitamin E and nitric oxide as membrane antioxidants”, *Biological chemistry*, 383(3-4): p. 671-681, 2002.

12. Yıldız, M., Terzi, H., Uruşak, B., “Bitkilerde Krom Toksisitesi ve Hücrel Cevaplar”, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 27(2): 163-176, 2011.
13. Hassinen, V.H., Tervahauta, A.I., Schat, H., Karenlampi, S.O. “Review Article: Plant metallothioneins – metal chelators with ROS scavenging activity?”, *Plant Biology*, 13, 225–232, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2010.00398.x>
14. Moller, I.M., Sweetlove, L.J., “ROS signalling – specificity is required”, *Trends in Plant Science*. Vol.15, No.7, 2010.
15. Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Breusegem, F.V., “Reactive oxygen gene network of plants”, *Trends in Plant Science*, Vol.9, No.10, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.009>
16. Czarnocka, W., Karpinski, S., “Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses”, *Free Radical Biology and Medicine* xxx (xxxx) xxx–xxx, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.011>
17. Slesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S., Miszalski, Z., “The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses”, *Acta Biochimica Polonica*, Vol. 54, No. 1, 39–50, 2007.
18. Jukanti, A.K., Gaur, P.M., Gowda, C.L.L., Chibbar, R.N., “Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review”, *British Journal of Nutrition*, Vol. 108, S1, Pages S11-S26, 2012. <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114512000797>
19. Donmez, A.A., “*Cicer uludereensis* Dönmez: a new species of *Cicer* (Chickpea) (Fabaceae) from around the Fertile Crescent, SE Turkey”, *Turkish Journal of Botany*, 35:71-76, 2011.
20. Öztürk, M., Duran, A., Hakkı, E.E., “*Cicer floribundum* var. *amanicola* (Fabaceae), a new variety from south Anatolia, Turkey”, *Biodicon*, 3: 44-51, 2011.
21. Van der Maesen, L.J.G., Maxted, N., Javadi, F., Coles, S., Davies, A.M.R., “Taxonomy of the genus *Cicer* revisited”, In: Yadav, S.S., Redden, B., Chen, W., Sharma, B. (eds), “Chickpea breeding and management”, CAB International, Wallingford, pp. 14-16, 2007.

22. Auckland, A.K., and Van der Maesen, L.J.G., “Chickpea”, In: “Hybridization of crop plants”, (Eds Fehr WR, Hadley HH), *American Society of Agronomy: Crop Science Society of America*, pp. 249-259, 1980.
23. Toker, C., Sari, D., Chrigui, N., “Organik Nohut Yetiştiriciliği Bakımından Yanıklık Hastalığı [*Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.] : Mücadele Yöntemleri, Dayanıklılık Kaynakları ve Islahı”, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Antalya, *Doğu Karadeniz II. Organik Tarım Kongresi*, Rize, 2015.
24. Adınır, Sezin., “Ülkemizde Yetiştirilen Nohut (*Cicer arietinum* L.) Varyetelerinde Genetik Çeşitliliğin Araştırılması”, *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 2017.
25. İnternet: Özçelik, H., “Nohut Tarımı”, *Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Samsun*.
<https://arastirma.tarimorman.gov.tr/ktae/Belgeler/brosurler/Nohut%20Tar%C4%B1m%C4%B1.pdf>
26. Kadioğlu, A., “Bitki Fizyolojisi”, ISBN: 978-605-4361-06-9, Beşinci baskı, Gündüz Ofset Matbaacılık, Trabzon, 2011.
27. Bray, E., Bailey-Serres, J. and Weretilnyk, E., “Responses to abiotic stresses”, chapter 22. In: “Biochemistry and molecular biology of plants”, B.B. Buchanan, W.Gruissem and R.L. Jones,(ed.) *American Society Plant Physiology*, Rockrille MD., 2000.
28. Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., “Metallerin Çevresel Etkileri-I”, 2007. http://www.metalurji.org.tr/dergi/dergi136/d136_4753.pdf
29. Eryılmaz, F., “Bakır (Cu) Uygulanmış Mısır (*Zea mays* L.) Fidelerindeki Antioksidan Aktivitelerin Fizyolojik ve Anatomik Yönden İncelenmesi”, *İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, 2007.
30. Akcan-Daş, Z., “Ağır Metal Stresi ile Gamma-Amino Bütirik Asit (GABA) Etkileşiminin İncelenmesi”, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 2014.
31. Lombardi, L., Sebastiani, L., “Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of *in vitro* grown plants”, *Plant Sci.*, 168, 797-802, 2005.

32. Vanderauwera, S., Hoyerichts, F.A., Breusegem, F. Van, “Hydrogen Peroxide-Responsive Genes in Stress Acclimation and Cell Death”, in: “Reactive Oxygen Species in Plant Signaling”, *Springer*, pp. 149–164, 2009. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00390-5_9
33. Mittler, R., “ROS Are Good”, *Trends in Plant Science*, Vol. 22, No. 1, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>
34. Altınışik, M., “Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar”. <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01b.pdf>
35. Yetişsin, F., “Bakır Stresine Maruz Bırakılan Hassas ve Dayanıklı Mısır Çeşitlerinde Glutasyon, Hidrojen Peroksit ve Salisilik Asit Uygulamalarının Fotosentetik Verim Üzerine Etkilerinin Araştırılması”, *Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, 2015.
36. Çaylak, E., “Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar”, *Tıp Araştırmaları Dergisi*: 9 (1) : 73-83, 2011.
37. Arıkan, Ş., İpek, M., Pırlak, L. “Antioksidan Sistemler”, *1st International Turkish World Engineering and Science Congress in Antalya*, December 7-10, Turkey, 2017. <https://www.researchgate.net/publication/321905927>
38. Kireççi, O., “Bitkilerde Enzimatik ve Enzimatik Olmayan Antioksidanlar”, *BEÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 7 (2), 473-483, 2018.
39. Mates, J.M., “Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology”, *Toxicology*, 153, 83–104, 2000.
40. Gündüzer, E.G., “Tuz ve Kuraklık Stresi Altında Geliştirilmiş Domates (*Solanum lycopersicum* L.) Bitkisinde Katalaz Geni mRNA İfade Seviyesinin Real Time PCR ile Belirlenmesi”, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bütünleştirilmiş Doktora Tezi*, 2015.
41. Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S.B., Ribeiro, C.W., Lazzarotto, F., Margis-Pinheiro, M., “Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection”, *Genetics and Molecular Biology*, 35, 4 (suppl), 1011-1019, 2012.
42. Beeor-Tzahar, T., Ben-Hayyim, G., Holland, D., Faltin, Z., Eshdat, Y., “A stress-associated citrus protein is a distinct plant phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase”, *FEBS Letters*, 366, 151 -155, 1995. [https://doi.org/0014-5793\(95\)00521-8](https://doi.org/0014-5793(95)00521-8)

43. Hofius, D., Sonnewald, U., “Vitamin E Biosynthesis: Biochemistry Meets Cell Biology”, *TRENDS in Plant Science*, Vol.8, No.1, January 2003.
44. Conklin, P.L., “Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants”, *Plant, Cell and Environment*, 24, 383–394, 2001.
45. Ahmad, P., Jaleel, C.A., Salem, M.A., Nabi, G., Sharma, S., “Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress”, *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(3): 161–175, 2010. <https://doi.org/10.3109/07388550903524243>
46. Kahkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M., “Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds”, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3954–3962, 1999. <https://doi.org/10.1021/jf990146l>
47. Yalçın, V., “Bazı Ağır Metallerin (Pb, Cd, Ni) Sucul Bitkiler (*Salvinia natans* (L.) All., *Lemna minor* L.) Üzerinde Yaptığı Stres ve Biyolojik Yanıtlar”, *Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 2014.
48. Yıldız, M., Cenkci, S., Terzi, H., “Fitoşelatinler ve Metalloitiyoneinler: Moleküler Yaklaşımlar”, *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 12, 011001 (1-16), 2012.
49. Kar, M., “Determination of the expression level of stress-related genes in *Cicer arietinum* root cell under Cd stress and the relationship to H₂O₂ concentrations”, *Ecotoxicology*, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1961-1>
50. Azevedo, M.-M., Carvalho, A., Pascoal, C., Rorigues, F. and Cassio, F., “Responses of antioxidant defenses to Cu and Zn stress in two aquatic fungi”, *Science of the Total Environment*, 377, 233-243, 2007.
51. Chen, L.-M., Lin, C.C., Kao, C.H., “Copper toxicity in rice seedlings: changes in antioxidative enzyme activities, H₂O₂ level, and cell wall peroxidase activity in roots”, *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, Vol. 41, 99-103, 2000.
52. Karimi, J., Mohsenzadeh, S., “Expression of some Genes in Response to Cadmium Stress in *Triticum aestivum*”, *International Letters of Natural Sciences*.ISSN: 2300-9675, Vol. 63, pp 10-17, 2017. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ILNS.63.10>

53. Souguir, D., El Ferjani, E., Ledoigt, G., Goupil, P., “Transcript accumulation of stress-related genes in *Vicia faba* roots under a short exposure to cadmium”, *Plant Biosyst. Int. J. Deal. Asp. Plant Biol.*, 3504:1–9, 2013. <https://doi.org/10.1080/11263504.2013.822432>
54. Prasad, K.V.S.K., Saradhi, P., Paradha., Sharmila, P., “Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*”, *Environmental and Experimental Botany*, 42, 1–10, 1999. <https://www.researchgate.net/publication/223433634>
55. Khatun, S., Ali, M.B., Hahna, E-J., Paek, K-Y., “Copper toxicity in *Withania somnifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants”, *Environmental and Experimental Botany*, 64, 279–285, 2008. <https://www.researchgate.net/publication/5990022>
56. Lombardi, L., Sebastiani, L., “Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants”, *Plant Science*, 168, 797–802, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.10.012>
57. Lagriffoul, A., Mocquot, B., Mench, M., Vangronsveld, J., “Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.)”, *Plant and Soil*, 200: 241–250, 1998. <https://www.researchgate.net/publication/226857980>
58. Goupil, P., Souguir, D., Ferjani, E. et al., “Expression of stress related genes in tomato plants exposed to arsenic and chromium in nutrient solution”, *J Plant Physiol*, 166:1446–1452, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.01.015>
59. Duman, F., Öztürk, F., “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, 2010. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60137-6](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60137-6)
60. Rout, J.R., Sahoo, S.L., “Antioxidant enzyme gene expression in response to copper stress in *Withania somnifera* L.”, *Plant Growth Regul*, 71:95–99, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10725-013-9806-7>
61. Soydam-Aydın, S., Büyük, I., Cansaran-Duman, D., Aras, S., “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, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4939-y>
62. Wang, L., Yang, L., Yang, F. et al., “Involvements of H₂O₂ and metallothionein in NO-mediated tomato tolerance to copper toxicity”, *J Plant Physiol*, 167:1298–1306, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.04.007>
 63. Schützendübel, A., Nikolova, P., Rudolf, C. and Polle, A., “Cadmium and H₂O₂-induced oxidative stress in *Populus × canescens* roots”, *Plant Physiol. Biochem*, 40, 577–584, 2002.
 64. Romero-Puertas, M.C., Rodriguez-Serrano, M., Corpas, F.J., Gomez, M., Del Rio, L.A. and Sandalio, L.M., “Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂^{·-} and H₂O₂ in pea leaves”, *Plant, Cell and Environment*, 27, 1122–1134, 2004.
 65. Hsu, Y.T., and Kao, C.H., “Heat shock-mediated H₂O₂ accumulation and protection against Cd toxicity in rice seedlings”, *Plant Soil*, 300:137–147, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9396-0>
 66. Kumar-Tewari, R., Kumar-Parma, P. and Sharma., “Antioxidant responses to enhanced generation of superoxide anion radical and hydrogen peroxide in the copper-stressed mulberry plants”, *Planta*, 223: 1145–1153, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0160-5>
 67. Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F. and Prange, R.K., “Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds”, *Planta*, 207, 604–611, 1999.
 68. Junglee, S., Urban, L., Sallanon, H., Lopez-lauri, F., “Optimized Assay for Hydrogen Peroxide Determination in Plant Tissue Using Potassium Iodide”, *Am. J. Anal. Chem.*, 5, 730–736, 2014. <https://doi.org/10.4236/ajac.2014.511081>
 69. Livak, K.J., Schmittgen, T.D., “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method”, *Methods*, 25, 402–8, 2001. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
 70. Gawel, S., Wardas, M., Niedworok, E., Wardas, P., “Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker”, *Wiadomości Lek.* (Warsaw, Pol. 1960) 57, 453–455, 2004.

71. Rasool, S., Ahmad, A., Siddiqi, T.O., Ahmad, P., “Changes in growth, lipid peroxidation and some key antioxidant enzymes in chickpea genotypes under salt stress”, *Acta Physiol Plant*, 35:1039–1050, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1142-4>.
72. Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M.H., E.Ferjani, E., “Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.)”, *Plant Science*, 127, 139–147, 1997.
73. Kumar, S., J. Mehta, U., Hazra, S., “Accumulation of cadmium in growing peanut (*Arachis hypogaea* L.) seedlings—Its effect on lipid peroxidation and on the antioxidative enzymes catalase and guaiacol peroxidase”, *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 171, 440–447, 2008. <https://doi.org/10.1002/jpln.200700083>
74. Razinger, J., Dermastia, M., Dolenc-Koce, J., Zrimec, A., “Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) caused by short-term cadmium exposure”, *Environmental Pollution*, 153, 687-694, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.08.018>
75. Tamas, L., Dudikova, J., Durcekova, K., Haluskova, L., Huttova, J., Mistrik, I., Olle, M., “Alterations of the gene expression, lipid peroxidation, proline and thiol content along the barley root exposed to cadmium”, *Journal of Plant Physiology*, 165, 1193—1203, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.08.013>
76. Jain, R., Singh, S.P., Singh, A., Singh, S., Tripathi, P., Chandra, A., Solomon, S., “Study on physio-biochemical attributes and metallothionein gene expression affected by chromium (VI) in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid)”, *Journal of Environmental Biology*, Vol. 375-382, May, 2016.
77. Murphy, A., Taiz, L., “Comparison of Metallothionein Gene Expression and Nonprotein Thiols in Ten Arabidopsis Ecotypes”, *Plant Physiol*, 109: 945-954, 1995.
78. Yeşilirmak, F., Öztürk-Gökçe, Z.N., Metin, B., Sayers, Z., “Functional analysis of Triticum durum type 1 metallothionein gene (dMT) in response to varying levels of cadmium”, *Ind J Plant Physiol.*, 23(1):140–147, 2018. <https://doi.org/10.1007/s40502-017-0318-8>
79. Jain, R., Verma, R., Singh, A., Chandra, A., Solomon, S., “Influence of selenium on metallothionein gene expression and physiological characteristics

- of sugarcane plants”, *Plant Growth Regul*, 77:109–115, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0042-1>
80. Tombuloğlu, H., Semizoğlu, N., Sakcalı, S., Kekeç, G., “Boron induced expression of some stress-related genes in tomato”, *Chemosphere*, 86, 433–438, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.09.035>
81. Liochev, S.I., Fridovich, I., “The effects of superoxide dismutase on H₂O₂ formation”, *Free Radical Biology and Medicine*, 42, 1465-1469, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.015>
82. Faralli, M., Lektemur, C., Rosellini, D., Gürel, F., “Effects of heat shock and salinity on barley growth band stress-related gene transcription”, *Biologia Plantarum*, 59 (3): 537-546, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10535-015-0518-x>
83. Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R., “Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad)”, *Journal of Experimental Botany*, Vol. 52, No. 358, pp. 1101-1109, May 2001.
84. Dai, Q., Chen, C., Feng, B., Liu, T., Tian, X., Gong, Y., Sun, Y., Wang, J. and Du, S., “Effecets of different NaCl concentration on the antioxidant enzymes in oilseed rape (*Brassica napus* L.) seedlings”, *Plant Growth Regulation*, 59(3), 273-278, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10725-009-9402-z>
85. Rossatto, T., do Amaral, M.N., Benitez, L.C., Vighi, I.L., Braga, E.J.B., de Magalhaes Junior, A.M., Maia, M.A.C., da Silva Pinto, L., “Gene expression and activity of antioxidant enzymes in rice plants, cv. BRS AG, under saline stress”, *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 23, 865–875, 2017. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0467-2>
86. Soydam-Aydın, S., “Soğuk, Kuraklık ve Tuz Gibi Abiyotik Stres Koşulları Altındaki Domates Bitkisinde (*Lycopersicum esculentum* L.) Süperoksid Dismutaz (SOD) Gen Ekpresyon Profilinin Real Time PCR Aracılığı ile Araştırılması”, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bütünleştirilmiş Yüksek Lisans/Doktora Tezi*, 2011.
87. Scandalios, J.G., Acevedo, A., Ruzsa, S., “Catalase gene expression in response to chronic high temperature stress in maize”, *Plant Science*, 156, 103–110, 2000. [https://doi.org/S0168-9452\(00\)00235-1](https://doi.org/S0168-9452(00)00235-1)
88. Matsumura T, Tabayashi N, Kamagata Y, Souma C, Saruyama H., “Wheat catalase expressed in transgenic rice can improve tolerance against low

- temperature stress”, *Physiol Plant*, 116(3): 317-327, 2002. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1160306.x>
89. Mittova V, Tal M, Volokita M, Guy M., “Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*”, *Plant, Cell and Environment*, 26, 845–856, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.01016.x>
90. Malar, S., Vikram, S.S., JC-Favas, P., Perumal, V., “Lead heavy metal toxicity induced changes on growth and antioxidative enzymes level in water hyacinths [*Eichhornia crassipes* (Mart.)]”, *Botanical Studies*, 55:54, 2014. <http://www.as-botanicalstudies.com/content/55/1/54>
91. Cantarello, C., Volpe, V., Azzolin, C., Bertea, C., “Modulation of enzyme activities and expression of genes related to primary and secondary metabolism in response to UV-B stress in cucumber (*Cucumis sativus* L.)”, *Journal of Plant Interactions*, 1(3): 151-161, 2005. <https://doi.org/10.1080/17429140600831581>
92. Cho, U-H., Seo, N-H., “Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation”, *Plant Science*, 168, 113–120, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.07.021>
93. Wu, Y., Chen, Y., Yi, Y., Shen, Z., “Responses to copper by the moss *Plagiomnium cuspidatum*: Hydrogen peroxide accumulation and the antioxidant defense system”, *Chemosphere*, 74, 1260–1265, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.10.059>
94. Imtiaz, M., Ashraf, M., Rizwan, M.S., Nawaz, M.A., Rizwan, M., Mehmood, S., Yousaf, B., Yuan, Y., Ditta, A., Mumtaz, M.A., Ali, M., Mahmood, S., Tu, S., “Vanadium toxicity in chickpea (*Cicer arietinum* L.) grown in red soil: Effects on cell death, ROS and antioxidative systems”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 158, 139–144, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.022>
95. Chaparzadeh, N., D’Amico, M.L., Khavari-Nejad, R.A., Izzo, R., Navari-Izzo, F., “Antioxidative responses of *Calendula officinalis* under salinity conditions”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 695–701, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.07.001>

96. Anjum, S.A., Tanveer, M., Hussain, S., Bao, M., Wang, L., Khan, I., Ullah, E., Tung, S.A., Samad, R.A., Shahzad, B., “Cadmium toxicity in Maize (*Zea mays* L.): consequences on antioxidative systems, reactive oxygen species and cadmium accumulation”, *Environ Sci Pollut Res*, 22:17022–17030, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4882-z>
97. Baxter, A., Mittler, R., Suzuki, N., “ROS as key players in plant stress signalling”, *Journal of Experimental Botany*, Vol. 65, No. 5, pp. 1229–1240, 2014. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert375>
98. Del Río, L.A., “ROS and RNS in plant physiology: An overview”, *J. Exp. Bot.* 66, 2827–2837, 2015. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv099>
99. Farnese, F.S., Menezes-Silva, P.E., Gusman, G.S., Oliveira, J.A., “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, 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00471>
100. Gupta, K., Sengupta, A., Chakraborty, M., Gupta, B., “Hydrogen Peroxide and Polyamines Act as Double Edged Swords in Plant Abiotic Stress Responses”, *Front. Plant Sci.* 7, 1343, 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01343>
101. Choudhury, S., Panda, P., Sahoo, L., Kumar-Panda, S., “Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress”, *Plant Signaling & Behavior*, 8:4, 2013. <http://dx.doi.org/10.4161/psb.23681>
102. Apel, K., Hirt, H., “REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction”, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55:373–99, 2004. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
103. Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M., “Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions”, *J. Bot.*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
104. Saxena, I., Srikanth, S., Chen, Z., “Cross Talk Between H₂O₂ and Interacting Signal Molecules under Plant Stress Response”, *Frontiers in Plant Science*, 7:570, 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00570>
105. Laloi, C., Apel, K., Danon, A., “Reactive oxygen signalling: the latest news”, *Current Opinion in Plant Biology*, 7:323–328, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.03.005>

ÖZGEÇMİŞ

Nuriye ÖZTÜRK 1989 yılında Ankara’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Ankara’da tamamladı. 2007 yılında Ankara Kanuni Lisesi’nden mezun oldu. 2007’de kazandığı Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2011 yılında mezun oldu. Aynı zamanda 2010-2011 eğitim döneminde Ondokuz Mayıs Üniversitesi Eğitim Fakültesi’nde pedagojik formasyon eğitimini tamamladı. 2017 yılında Nevşehir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalında yüksek lisans eğitimine başlamış olup, öğrenimi halen devam etmektedir. Evli olup bir çocuk annesidir.

