T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

BAZI AĞIR METAL UYGULAMALARININ SORGUM (*Sorghum bicolor* L.) BİTKİSİNİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Hazırlayan
Hava Şeyma YILMAZ

Danışman
Doç. Dr. Mahmut KAPLAN

Yüksek Lisans Tezi

Aralık 2015
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

BAZI AĞIR METAL UYGULAMALARININ SORGUM (*Sorghum bicolor* L.) BİTKİSİNİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan
Hava Şeyma YILMAZ

Danışman
Doç. Dr. Mahmut KAPLAN

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından FYL-2013-4820 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Aralık 2015
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Hava Şeyma YILMAZ

İmza: 

YÖNERGEYE UYGUNLUK

Bazı Ağır Metal Uygulamalarının Sorgum (*Sorghum bicolor* L.) Bitkisinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Hava Şeyma YILMAZ

Danışman

Doç. Dr. Mahmut KAPLAN

Tarla Bitkileri ABD Başkanı

Doç. Dr. Sancar BULUT

Doç. Dr. Mahmut KAPLAN danışmanlığında **Hava Şeyma YILMAZ** tarafından hazırlanan "**Bazı Ağır Metal Uygulamalarının Sorgum (*Sorghum bicolor* L.) Bitkisinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi**" adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

27/11/2015

JÜRİ:

Danışman	: Doç. Dr. Mahmut KAPLAN
Üye	: Doç. Dr. Kağan KÖKTEN
Üye	: Doç. Dr. Satı UZUN

ONAY:
Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 15/12/2015 tarih ve 2015/51-04 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

15 / 12 / 2015

Prof. Dr. Kâzım KEŞLİOĞLU

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ / TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca farklı bakış açıları ve bilimsel katkılarıyla yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Mahmut KAPLAN'a, Doç. Dr. Semih YILMAZ'a ve Uzman Dr. Rıdvan TEMİZGÜL'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasına maddi destek veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: FYL-2013-4820) teşekkür ederim.

Ayrıca; çalışmalarım süresince sabır göstererek beni daima destekleyen aileme ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Hava Şeyma YILMAZ

Kayseri, Aralık 2015

BAZI AĞIR METAL UYGULAMALARININ SORGUM (*Sorghum bicolor* L.) BİTKİSİNİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Hava Şeyma YILMAZ

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Aralık 2015
Danışman: Doç. Dr. Mahmut KAPLAN

ÖZET

Çalışmanın amacı; farklı ağır metalllerin (Al, Cr ve Pb) dozlarının (0, 2, 4, 8, 16, 32 ve 64 pmm) sorgum bitkisinin enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırmaktır. Bu amaçla Sugar Grazer II sorgum çeşidi kullanılmıştır. Tohumlar özel hazırlanmış kaplar kullanılarak hoagland içersine 50 adet tohum konularak üç tekrarlamalı 25 °C'de 10 gün stressiz 10 gün stres koşullarında iklim odasında yetiştirilmiştir. Yetiştirme süresi sonunda bitkilerin kök ve yaprakları ayrılarak analizler yapılmıştır.

Ağır metaller ve bunların toksik düzeyleri reaktif oksijen türlerinin (ROS) ortaya çıkmasına neden olup fizyolojik ve biyokimyasal süreçleri etkileyebilmektedir. Bu çalışmada büyütme kabininde su kültüründe hougland solüsyonu içinde sorgum (*Sorghum bicolor* L.) tohumlarına farklı konsantrasyonlarda (2, 4, 8, 16, 32, and 64 ppm) alüminyum (Al), krom (Cr) ve kurşun (Pb) uygulamak suretiyle ağır metallerin kök ve yapraklarda bazı fizyolojik ve biyokimyasal özellikler üzerine etkileri incelenmiştir. *Sorghum bicolor* ağır metallere dayanımı açısından oldukça ilgi çekmektedir. Bu çalışmada farklı Al, Cr ve Pb dozlarında membran lipid peroksidasyonu (MDA), prolinedüzeyleri, katalaz(CAT, EC 1.11.1.6), süperoksitdismutaz (SOD, EC 1.15.1.1), askorbatperoksidaz (APX, EC 1.11.1.11), glutatyonredüktaz(GR, EC 1.6.4.2) ve glutatyon S-transferaz (GST, EC 2.5.1.18) aktiviteleri incelenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre Al dozları 4 ppm ve üzeri dozlarda Chl a miktarını, 32 ppm ve 64 ppm dozlarında ise toplam Chl miktarını önemli düzeyde düşürmüş fakat 2 ppm dozundaki keskin artış dışında Chl b düzeylerinde herhangi bir değişime neden olmamıştır. Al, Cr ve Pb nin 64 ppm dozu toplam Chl içeriğini önemli düzeyde azaltmasına rağmen (sırasıyla yaklaşık %32, 4 ve 34), yaprak proline düzeyini arttırmıştır (kontrol uygulamasına kıyasla sırasıyla hemen hemen 5, 21 ve 40 kat). Al ve Cr uygulamalarında köklerde prolin, MDA, APX ve GST arasında ve tüm elementler

için kök GST aktiviteleri arasında pozitif korelasyonlar söz konudur. Aynı şekilde, yapraklarda ise Al ve Cr için proline ve MDA arasında pozitif korelasyonlar gözlenmiştir. Buna rağmen, antioksidan enzimlerin devreye girmesi sorgum hücrelerini ağır metal toksisitesinden korumak için yeterli olmayabilir, bu nedenle söz konusu bulguların geçerliliğini ispat etmek daha ileri düzeyde çalışmalara gerek vardır.

Anahtar Kelimeler: *Sorghum bicolor*, antioksidan enzimler, prolin, klorofil, ağır metaller, MDA

THE EFFECTS OF SOME HEAVY METALS ON ENZYME ACTIVITY IN SORGHUM (*Sorghum bicolor* L.)

Hava Şeyma YILMAZ

Erciyes University Institute of Natural and Applied Sciences
Graduate Thesis, December 2015
Supervisor: Doç. Dr. Mahmut KAPLAN

ABSTRACT

Heavy metals and their toxic levels generate reactive oxygen species (ROS) and effect physiological and biochemical processes. Experiments were carried out by cultivating the seeds in hydroponic hoagland solution in a growth chamber for investigating the effect of Aluminum (Al), Chrome (Cr) and Lead (Pb) concentrations (2, 4, 8, 16, 32, and 64 ppm) on some physiological and biochemical characteristics of *Sorghum bicolor* in root and leaf. *Sorghum bicolor* has received great interest in terms of resistance to heavy metals. Therefore we investigated membrane lipid peroxidation (MDA), proline level, catalase (CAT, EC 1.11.1.6), superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) and glutathione S-transferase (GST, EC 2.5.1.18) activities upon exposure to Al, Cr, and Pb concentrations. Al doses significantly decreased the amount of Chl a at 4 ppm and subsequent doses, and total Chl at 32 and 64 ppm doses, however, it didn't cause any change at the level of Chl b except at 2 ppm with a sharp increase. Although 64 ppm applications of Al, Cr, and Pb significantly decreased the total Chl content (about 32, 4, and 34%, respectively), it caused increase in proline level (nearly 5, 21, and 40 times higher compared to control, respectively) in leaf. A common observation is that a positive correlation was apparent between proline, MDA, APX and GST activity for Al and Cr treatments and GST activity for all three element treatments in root. Also, the only positive correlation was evident between proline and MDA for Al and Cr applications in leaf. Despite these, induction of antioxidant enzymes may not be enough to protect sorghum cells from heavy metal toxicity; however, further studies are required to verify this.

Keywords: *Sorghum bicolor*, antioxidant enzymes, prolin, chlorophyll, heavy metals, MDA

İÇİNDEKİLER

BAZI AĞIR METAL UYGULAMALARININ SORGUM (*Sorghum bicolor* L.) BİTKİSİNİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ii
ÖNSÖZ / TEŞEKKÜR iv
ÖZET v
ABSTRACT vii
İÇİNDEKİLER viii
KISALTMALAR VE SİMGELER xi
TABLOLAR LİSTESİ xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ xv

GİRİŞ 1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Ağır Metaller 4
1.1.1. Ağır Metallerin Genel Özellikleri 4
1.1.2. Ağır Metallerin Biyokimyasal Özellikleri 4
1.1.3. Ağır Metallerin Bitkiler Tarafından Alınması 4
1.1.4. Bitkilerin Ağır Metal Toksisitesine Tolerans Mekanizmaları 5
1.1.5. Stres 7
1.1.6. Oksidatif Stres ve Oksijenin Aktivasyonu 7
1.1.7. Reaktif Oksijen Türlerinin Tanımı 8
1.1.8. Reaktif Oksijen Türleri 8
1.1.9. Hücredeki Serbest Radikal Kaynakları (ROS Kaynakları) 8

1.1.10. Oksijen Radikallerinin Meydana Getirdiği Hasarlar 9

1.1.11. Antioksidan Savunma Sistemi 10

1.1.12. Enzimatik Olmayan Savunma Sistemi 11

1.1.13. Enzimatik Savunma Sistemi 11

1.1.13.1. Süperoksit Dismütaz 11

1.1.13.2. Katalaz 12

1.1.13.3. Askorbat Peroksidaz 12

1.1.13.4. Glutatyon Redüktaz 13

1.1.13.5. Glutatyon S-Transferaz 13

1.1.14. Biyomoleküllerin Oksidasyonu 14

1.2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 15

1.2.1. Kurşunun Bitkiler Üzerine Toksik Etkileri 15

1.2.2. Aluminyumun Bitkiler Üzerine Etkileri 16

1.2.3. Krom' un Bitkiler Üzerine Etkileri 17

2. BÖLÜM

MATERYAL VE METOD

2.1. Çalışmada Kullanılan Bitki Materyali 18

2.2. Yöntem 19

2.3. Sonuçların İstatistiksel Değerlendirilmesi 28

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Sugar Grazer Çeşidinin MDA İçeriği 29

3.2. Sugar Grazer Çeşidinin Prolin İçeriği 32

3.3. Cr, Al, Pb Uygulamasının Klorofil Miktarına Etkisi 35

3.4. Cr, Al, Pb Stresinin Antioksidan Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi 38

3.4.1. Katalaz'a Ait Bulgular 38

3.4.2. Askorbat Peroksidaz' a Ait Bulgular 41

3.4.3. Glutatyon Redüktaz'a Ait Bulgular 44

3.4.4. Glutatyon S-Transferaz'a Ait Bulgular 48

3.4.5. Süperoksit Dismutaz'a Ait Bulgular..... 50

3.4.6. Ağır Metal Uygulanmış Sorgum Bitkisinin Kök ve Yapraklarında İncelenen Özelliklere Ait Korelasyonlar 53

4. BÖLÜM

TARTIŞMA- SONUÇ VE ÖNERİLER

KAYNAKLAR 63

ÖZGEÇMİŞ..... 74

KISALTMALAR VE SİMGELER

Sembol

APX **:** Askorbat peroksidaz

CAT **:** Katalaz

Cd **:** Kadmiyum

Cr **:** Krom

Cu **:** Bakır

EDTA **:** Etilen diamin tetra asetikasit

GPX **:** Guaiacol peroksidaz

GR **:** Glutatyon redüktaz

GSH **:** İndirgenmiş glutatyon

GSH-Px **:** Glutatyon peroksidaz

GSSG **:** Okside glutatyon

GST **:** Gulutatyon S-transferaz

H_2O_2 **:** Hidrojen peroksit

HCI **:** Hidroklorik asit

Hg **:** Civa

M **:** Molar

MDA **:** Malondialdehit

mM **:** Milimolar

NADPH **:** Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen

NBT **:** p- Nitro Blue Tetrazolium

Ni **:** Nikel

nm **:** Nanometre

OD **:** Optik dansite

$OH^{\cdot}$ **:** Hidroksil radikali

OOH **:** Perhidroksil radikali

Pb **:** Kurşun

Pmol **:** Pikomol

ppb **:** 10^{-9}

ppm **:** 10^{-6}

PVP **:** Polivinylpolypyrrolidone

ROS **:** Reaktif Oksijen Türleri

SA **:** Sığır serum albümini

SA **:** Spesifik aktivite

Se **:** Selenyum

SOD **:** Süperoksit dismütaz

SOR **:** Serbest Oksijen Radikalleri

TBA **:** Thiobarbutirik asit

TCA **:** Trikloroasetik asit

Zn **:** Çinko

µl **:** Mikrolitre

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Al dozlarının uygulandığı sorgum bitkisine ait MDA içerikleri 29
Tablo 3.2. Cr dozlarının uygulandığı sorgum bitkisine ait MDA içerikleri 30
Tablo 3.3. Pb dozlarının uygulandığı sorgum bitkisine ait MDA içerikleri 31
Tablo 3.4. Al dozlarının uygulandığı sorgum bitkisine ait prolin içerikleri 33
Tablo 3.5. Cr dozlarının uygulandığı sorgum bitkisine ait prolin içerikleri 33
Tablo 3.6. Pb dozlarının uygulandığı sorgum bitkisine ait prolin içerikleri 34
Tablo 3.7. Al dozlarının uygulandığı sorgum bitkisine ait klorofil içerikleri 36
Tablo 3.8. Cr dozlarının uygulandığı sorgum bitkisine ait klorofil içerikleri 37
Tablo 3.9. Pb dozlarının uygulandığı sorgum bitkisine ait klorofil içerikleri 38
Tablo 3.10. Al dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki katalaz içerikleri 39
Tablo 3.11. Cr dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki katalaz içerikleri 40
Tablo 3.12. Pb dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki katalaz içerikleri 40
Tablo 3.13. Al dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki AP içerikleri 42
Tablo 3.14. Cr dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki AP içerikleri 43
Tablo 3.15. Pb dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki AP içerikleri 43
Tablo 3.16. Al dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki GR içerikleri 45
Tablo 3. 17. Cr dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki GR içerikleri 46
Tablo 3.18. Pb dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki GR içerikleri 46
Tablo 3. 19. Al dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki GST içerikleri 48
Tablo 3.20. Cr dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki GST içerikleri 49

Tablo 3.21. Pb dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki GST içerikleri 49
Tablo 3.22. Al dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki SOD içerikleri 51
Tablo 3.23. Cr dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki SOD içerikleri 52
Tablo 3.24. Pb dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki SOD içerikleri 52
Tablo 3.25. Al uygulaması yapılmış Sorgum bitkisinin yapraklarında incelenen özelliklere ait korelasyon tablosu 54
Tablo 3.26. Cr uygulaması yapılmış Sorgum bitkisinin yapraklarında incelenen özelliklere ait korelasyon tablosu 54
Tablo 3.27. Pb uygulaması yapılmış Sorgum bitkisinin yapraklarında incelenen özelliklere ait korelasyon tablosu 55
Tablo 3.28. Al uygulaması yapılmış Sorgum bitkisinin köklerinde incelenen özelliklere ait korelasyon tablosu 55
Tablo 3.29. Cr uygulaması yapılmış Sorgum bitkisinin köklerinde incelenen özelliklere ait korelasyon tablosu 56
Tablo 3.30. Pb uygulaması yapılmış Sorgum bitkisinin köklerinde incelenen özelliklere ait korelasyon tablosu 56

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Sorgum bitkisinin yetiştirme kaplarının hazırlanması 19
Şekil 2.2. Sorgum bitkisinin tohumlarının yetiştirme kaplarına yerleştirilmesi 20
Şekil 2.3. Sorgum bitkisinin iklim odasında çimlenmesi 20
Şekil 2.4. Sorgum bitkisinde ilk çıkışların gerçekleşmesi 20
Şekil 2.5. Sorgum bitkisine bitki besin elementlerinin verilmesi 21
Şekil 2.6. Sorgum bitkisinin stres uygulanmadan geçirdiği ilk on günlük durumu 21
Şekil 2.7. Sorgum bitkisinde stres uygulaması yapılmadan gelişen sağlıklı kök yapısı 21
Şekil 2.8. Sorgum bitkisinde stres uygulaması yapıldığında gözlemlenen sağlıksız kök yapısı 22
Şekil 2.9. Sorgum bitkisinin analizler için kök ve yaprak ayrılırak hasadı 22
Şekil 2.10. Sorgum bitkisine ağır metal uygulanmamış kontrol uygulaması 22
Şekil 2.11. Sorgum bitkisinin yapraklarındaki MDA seviyeleri 31
Şekil 2.12. Sorgum bitkisinin köklerindeki MDA seviyeleri 32
Şekil 2.13. Sorgum bitkisinin yapraklarındaki prolin seviyeleri 34
Şekil 2.14. Sorgum bitkisinin köklerindeki prolin seviyeleri 35
Şekil 2.15. Sorgum bitkisinin Al içeriğine bağlı klorofil seviyeleri 36
Şekil 2.16. Sorgum bitkisinin Cr içeriğine bağlı klorofil seviyeleri 37
Şekil 2. 17. Sorgum bitkisinin Pb içeriğine bağlı klorofil seviyeleri 38
Şekil 2.18. Sorgum bitkisinin yapraklarındaki katalaz seviyeleri 41
Şekil 2. 19. Sorgum bitkisinin köklerindeki katalaz seviyeleri 41
Şekil 2. 20. Sorgum bitkisinin yapraklarındaki AP seviyeleri 44
Şekil 2. 21. Sorgum bitkisinin köklerindeki AP seviyeleri 44
Şekil 2. 22. Sorgum bitkisinin yapraklarındaki GR seviyeleri 47
Şekil 2. 23. Sorgum bitkisinin köklerindeki GR seviyeleri 47
Şekil 2.24. Sorgum bitkisinin yapraklarındaki GST seviyeleri 50
Şekil 2.25. Sorgum bitkisinin köklerindeki GST seviyeleri 50
Şekil 2.26. Sorgum bitkisinin yapraklarındaki SOD seviyeleri 53
Şekil 2.27. Sorgum bitkisinin köklerindeki SOD seviyeleri 53

GİRİŞ

Sorgum dünyanın az yağışlı tropik, subtropik ve ılıman bölgelerinde yetişen, geniş bir genetik varyasyona sahip önemli bir gıda, yem ve endüstri bitkisidir. Ayrıca abiotik ve biotik faktörlerin üretim için sınırlayıcı olduğu bölgelerde sorgum tarımı yapılablir [1]. Sorgum bir C_4 bitkisidir ve C_3 bitkilerine (buğday, arpa, yulaf gibi) oranla 2 kat veya daha fazla fotosentez randımanına sahiptir. Ayrıca diğer bitkilerin yetiştirilmesinin zor olduğu aşırı derecede sulu olan arazilerde fotosentetik etkinliği ve mineral maddeleri en üst düzeyde kullanır [2]. Dünya'da sorgum tarımının yapıldığı alanlar 45^o kuzey ve 40^o güney paralelleri arasında yayılmış olup, 3000 m yüksekliğe kadar gelişöesini sürdürür [3]. Sorgum bitkisi (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), dünyada yaygın olarak yetiştirilen önemli bir tahıl bitkisidir. FAO istatistiklerine göre (2013) toplam dünya dane sorgum üretimi yaklaşık 61 384 559 ton olup, bu miktar yaklaşık 42 120 446 hektarlık alandan elde edilmiştir [4]. Bu verilere göre dünya ortalama verimi 145 kg/da olarak belirlenmiştir. Dünya genelinde ortalama dane sorgum verimi düşüktür fakat ortalama dane sorgum verimi ülkeler arasında farklılıklar gösterir. FAO istatistiklerine göre (2013) tespit edilen en yüksek dane sorgum verimi ise 8 437 kg/da olarak belirlenmiştir [4].

Dünyada sorgum üretimi yüksek olan bölgeler Orta ve Güney Afrika, Çin, Hindistan, Orta ve Kuzey Amerika, Avustralya ve Güney Amerika (Arjantin ve Brezilya) olarak sıralanabilir [4].

Sorgum tarımı kurak ve sıcak bölgelerde de, az su ve gübreye ihtiyaç duymasından dolayı yetiştirilebilir. Bu yüzden üretimi dünyada geniş bir alana yayılmıştır [5]. Sorgum tarımının yapıldığı bölgeler, dane ve saplarının kullanım şeklini ve hangi tip sorgumun yetiştirileceğini belirlemektedir [6]. Örneğin küçük çiftçiler özel besin ve kalite kriterlerine sahip, uzun boylu, stres altında istikrarlı verim verebilen saf ıslah hatlarını tercih etmektedir. Modern sorgum tarımı yapılan yerlerde ise kanatlı ve

ruminantların beslenmesinde kullanılan yüksek verim potansiyeline sahip, kısa boylu, yatmaya dayanıklı, sitoplazmik-genetik erkek kısır anaçlardan üretilmiş hibrit sorgum çeşitleri yetiştirilmektedir [7].

Birçok araştırma sonucunda sorgumun mısıra ve diğer tahıl bitkilerine göre suyu çok daha etkin kullanabildiğini, kurak şartlarda beklenen miktarda verim elde edildiği kabul edilmiştir [8]. Sorgum mısıra göre fosfor ve potasyuma daha az ihtiyaç gösterir [9]. Suyun sınırlı olduğu şartlarda, sorgumun gövdesi uzun süre yeşil kalabilir [10].

Sorgumun sap uzunluğu 0.5–6 m ve sap kalınlığı 1–5 cm ve kök derinliği 1.5–2.5 m arasında değişim göstermiştir [11]. Sorgum, yüksek ve alçak pH' lı (5–8.5), tuzlu, su birikimi çok olan ve fakir topraklara da toleranslı bir bitkidir [12].

Çevre kirliliği ve Doğal birikim

Hızlı nüfus artışı, enerji ve besin eksikliği, düzensiz kentleşme ve teknolojik gelişmeler, çevre kirliliği sorununun önemini vurgulamaktadır. Ağır metaller, yerkabuğunda doğal olarak bulunur ve yok edilemez bileşiklerdir. Mikro elementler (çinko, bakır, demir, manganez ve nikel) gibi gerekli olan bazen de çevresel kirletici (alüminyum, kurşun, civa, kadmiyum vs.) olan ağır metallerin çevrede birikmesi, tüm canlılar için tehdit unusuru haline gelmektedir [13].

Endüstriyel faaliyetler, motorlu taşıtların eksoz gazları, maden yatakları ve işletmeleri, volkanik faaliyetler, tarımda gübreleme ve ilaçlama gibi bir çok etken ağır metal kirliliğine neden olur [14].

Bitkinin alacağı ağır metal oranını, pH, toprak yapısı, toprağın organik madde içeriği ve katyon değişim kapasitesi değiştirir [15]. Farklı bitki gruplarının ağır metalleri alma oranları da birbirinden farklıdır ve bazı türler doku ve organlarında belirli elementleri yüksek miktarda biriktirirler [16].

Bitkilerde ağır metal birikimi fazla olduğunda mineral besin alımı, transpirasyon, fotosentez, enzim aktivitesi, nükleik asit yapısı, klorofil biyosentezi ve çimlenme gibi çok sayıda olay olumsuz yönde etkilenir [17, 18, 19, 20, 21, 22, 23]. Bu fizyoljik ve

biyokimyasal olaylara, membranlarda hasar, hormon dengesinin bozulması, su ilişkisinin değişmesi gibi fizyolojik olaylar da eklenebilir [24].

Sorgum dünyanın en önemli beşinci tahılı olup, insan beslenmesi, hayvan yemi, gıda ve mobilya endüstrisi, bazı hastalıklara karşı destek ürün olarak kullanılmaktadır. Bir çok stres faktörüne dayanıklı olan sorgum bitkisinin ağır matallere karşı tepkisi ile ilgili çok az literatür bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı; sorgum bitkisine değişik ağır metallerin (Al, Cr ve Pb) farklı dozlarının (0, 2, 4, 8, 16, 32 ve 64 ppm) antioksidan enzim aktivitelerine etkisini belirlemektir.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Ağır Metaller

1.1.1. Ağır Metallerin Genel Özellikleri

Ağır metaller atomik yoğunluğu 6 g/cm^3'ten büyük olan metal ve metaloitlere verilen bir isimdir. Çoğunlukla kirlilik ve toksiteye sebep olan Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb ve Zn gibi elementlerin ifadesinde kullanılır.

Bazı ağır metaller bitki beslenmesinde önemlidirler fakat yüksek dozlarda fitotoksiktirler. Cd, Cr, Hg ve Pb gibi ağır metaller de çeşitli yollardan tarımsal ekosistemde yer alırlar. Bunların bitki bünyesinde mevcut olmaları yoğunluklarına ve çözünebilirliliklerine göre değişir [25].

1.1.2. Ağır Metallerin Biyokimyasal Özellikleri

Ağır metallerin aşırı konsantrasyonları bitkilerde ATP ve ADP'nin fosfat gruplarıyla olan reaksiyonları, hücre membranlarının zarar görmesi, SH (sülfhidril) gruplarıyla olan reaksiyonlar, esas iyonların yerine geçmesi ve esas metabolitlerle rekabet etmesi gibi biyokimyasal düzeyde olumsuz etkilere sebep olur dir. Organizmalar sahip oldukları onarıcı mekanizmalarıyla birçok elementin alınmasında meydana bu olumsuzlukarı tolere edebilirler [26].

1.1.3. Ağır Metallerin Bitkiler Tarafından Alınması

Bitkilerde ağır metal alınımı üç şekilde olmaktadır.

1. Köklerle alınım, 2. Ağır metallerin köklere taşınması ve 3. Ağır metale dayanıklılık

Köklerle Alınım

Toprakdaki metallerin bir kısmını bitkiler alır, bir kısmı da toprakta kalır. Bitkiler öncelikle metalleri toprakta harekete geçirir ve ilk olarak metal şelatlandırıcı moleküller (fitosideroforez) rizosfere salınır [27]. Bu fitosideroforezler Cu, Zn ve Mn'ın toprakta hareketini sağlarlar [28]. Bitki kökleri saldıkları protonlar ile toprak ortamını asitleştirip ağır metalleri çözebilirler. Kök içine intraselüler veya ekstraselüler yollarla giren metal iyonları kanallarla bitki hücrelerine girerler [29]. Bitki için gerekli olmayan ağır metaller de aynı transmembran taşıyıcılarını kullaırlar [30].

Ağır Metallerin Köklerle Taşınması

Metal iyonları köke girdiğinde ya birikirler yada sürgünlere taşınırlar. Sürgünlere metal taşınımı ksilem içinde de olabilir ya da kök içindeki floem yoluyla da bitkide ilerleyebilirler [31]. Ksilem gelen metal iyonları endodermis ve epidermisi bölen kaspari şeridine girerler [30].

Ağır Metale Dayanıklılık

Ağır metallere dayanıklı olan bir bitki, hücresine gelen ağır metalleri ya detoksifiye eder ya da hücreye alınımını sınırlı tutar[32]. Ağır metallerle kirlenmiş alanlardaki bazı bitkilerin asit fosfatazlar gibi ağır metale dayanıklı enzimler ürettiği görülmüştür [33]. Bitkide ağır metaller hücre içinde biriktiğinde, şelatlanma, alınımın sınırlanması ve çöktürme şeklinde detoksifiye edilmelidir [34].

1.1.4. Bitkilerin Ağır Metal Toksisitesine Tolerans Mekanizmaları

Önemli miktarda metal biriktiren hiperakümülatör bitkilerinin ağır metal içerikleri ve gereksinimleri biriktirici olmayan türlere göre daha fazladır. Bu bitkiler, 1 000 ppm Co, Cr, Cu ve Pb, ve 10 000 ppm Ni ve Zn içerebilirler. Günümüzde yaklaşık 400 ağır metal biriktirici bitki bulunmaktadır [35]. En tanınanı *Thlaspi caerulescens* (alpine pennycress)'dir. Ayrıca polisiklik aromatik hidrokarbonlarla (PAH) kirlenmiş alanların remediasyonunda *Sorghum bicolor* bitkileri de etkilidir [36]. Bu bitkilerin tolerans mekanizmaları,

a) Hücre duvarlarına metal bağlanması: Pb-karbonat olarak tutulur.

b) Hücre membranlarına doğru taşınımın azalması: Ağır metallerin bitki köklerinde tutulur, gövde ve sürgünlere taşınım engellenir ve taşınm azalır.

c) Vakuollerde depolama: Zn gibi bazı elementler vakuollerde depolanır.

d) Şelatlama: Pb glutathione ve aminoasitlere bağlanarak fitoşelatlar oluşturur [37].

Aluminyum

Aluminyum (Al) yeryüzündeki en çok bulunan üçüncü elementtir [38]. Aluminyum (Al) düşük konsantrasyonlarda bitki büyümesini olumlu etkiler ve diğer istenen etkileri hızlandırabir [39]. Toprağın asitlik derecesi arttıkça, Al bileşiklerininin çözünürlük oranıda artar ve topraktan alkali metal iyonlarının (Na^{+}, K^{+}, Ca^{+2}, Mg^{+2}) uzaklaşmasına ve toprağın pH'sının azalmasına neden olur. Ayrıca Al toksisitesi, asitli topraklarda tahıl tarımını sınırlandıran bir etkendir [40].

Krom

Krom toprakta değişmekle birlikte 5-100 mg/kg oranlarında bulunur. Birçok bitkide kuru madde de 100 mg/kg bulunması toksik kabul edilir [41].

Krom kök hücrelerinin bölünme ve uzamasına engel olarak kök gelişimini zarara uğratır. Böylece topraktan alınan bitki besin maddesi ve su alımı sınırlanır, bitki büyüme ve gelişmesini geriler ve önemli düzeyde verim ve kalite kayıpları meydana gelir [42].

Kurşun

Kurşun bir çok sanayide kullanılmasının yanı sıra pestisidlerin kullanılmasıyla da topraklara bulaşabilir. Kurşun genellikle toprakta 15-40 ppm dozunda bulunur ve topraktaki kurşun konsantrasyonu 150 ppm'i aşmadığı sürece insan ve bitki sağlığı açısından tehlikeli değildir [43]. Kurşun, hücre turgorunu ve hücre duvarı stabilitesini bozar, stoma hareketlerini ve yaprak alanını azaltır, bitki su rejimini etkiler. Kökler

tarafından tutulduğunda kök gelişimini azaltmasından dolayı bitkilerin katyon ve anyon alımını etkilerve besin alımı zorlaşır [44].

1.1.5. Stres

Çevreye zarar veren tüm etmenler bitkilerde strese neden olur. Stres bitkilerin fizyolojilerini bozar, genetik potansiyellerini değiştirir, verimsizliğe yol açar ve ölümüne neden olarak ürün kayıpları meydana getirir [24].

Metal toksisitesinin en etin olayı; bir yabancı metalin organik molekülde yer alan özel bağlanma bölgesindeki bir başka metalin yerine gidip yerleşmesidir [46].

Bitki yüksek ağır metal düzeylerine maruz kaldığında, reaktif oksijen türlerinin oluşturarak, ağır metal toksisitesine cevap verir [47]. Aktif oksijen türleri süperoksit anyonu (O_2,-), hidroksil radikali (OH^-), ve hidrojen peroksiti (H_2O_2) içerir. Çevresel stres faktörleri arttığında bu tür reaktif oksijen türleride artmakta ve hücrelere zarar vermektedir. Bitkiler bu tür stres ve zararlarla, süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz, glutathion redüktaz, katalaz gibi antioksidatif enzimleri ve askorbik asit glutathion antioksidanları kullanarak savaşabilirler [48].

Pb, Zn, Cr, Ni gibi ağır metallerin meydana getirdiği stres nedeniyle antioksidatif enzim aktivitesinin değişmektedir [49]. Ağır metaller ayrıca prolin birikimi ve malondialdehid oluşumu gibi diğer bazı hücresel değişikliklere de neden olurlar [50].

1.1.6. Oksidatif Stres ve Oksijenin Aktivasyonu

Oksijen normalde molekül şeklindeyken zararlı bir madde değilidir ancak çeşitli çevre şartlarında ve kirleticilerin bulunduğu ortamlarda (radyasyon, ağır metal, kuraklık, hava kirliliği, sıcaklık stresi, herbisitler v.s.) yüksek derecede toksikti [51]. Serbest radikaller enzimlerin aktif bölgelerinden geçip moleküler oksijenle etkileşime girerek serbest oksijen radikallerini oluşturur [52].

Hücrede oluşan reaktif oksijen türleri (ROS), antioksidan savunma sistemleri elemine edilir. Fakat bazen ortadan kaldırılandan daha fazla reaktif oksijen türleri oluşur ve bu duruma “oksidatif stres” denir [51].

Stres faktörleri, bitki dokularında reaktif oksijen türlerinin üretilmesini arttırmaktadırlar. Reaktif oksijen türleri normalde de bitki hücrelerinde meydana gelebilirler [53].

1.1.7. Reaktif Oksijen Türlerinin Tanımı

Atomlardaki elektronlar orbitallerde çiftler halinde bulunurlar. Atomlar arasında bağlar meydana gelir ve moleküler yapı oluşur. Serbest radikal, atomik ya da moleküler yapılarda çiftlenmemiş tek elektron bölümlerine denilir. Bu moleküller başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine girebilirler ve "reaktif oksijen türleri" olarak tanımlanırlar [45].

Bitkide pek çok türde reaktif oksijen türü oluşturulmaktadır. Fakat en fazla lipid yapılarla oluşur. Doymamış yağ asitlerinin açil grubundan bir hidrojen ayrılırsa lipid radikali meydana gelir. Bu radikal oksijen ile reaksiyona girer ve lipid peroksi radikalini oluşturur. Lipid radikaller yüksek derecede sitotoksik ürünleride oluşturabilir. Bunlar arasında en çok bilinen aldehid grubundan malondialdehid'dir (MDA) [54].

1.1.8. Reaktif Oksijen Türleri

En önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metal iyonları, nitrik oksit ve hidroksil serbest oksijen radikali anahtar rol oynayan ana maddelerdir.

Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin üretimi, süperoksidin (O_2,-) dismutasyonu ile gerçekleşir. İki süperoksit molekülü, süperoksidin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni meydana getirir. Bu reaksiyon, dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenir [55].

1.1.9. Hücredeki Serbest Radikal Kaynakları (ROS Kaynakları)

Bitkilerdeki reaktif oksijen türleri ya normal metabolizmanın fotosentez ve solunum reaksiyonları kapsamında ya da abiyotik stresler süresince fotorespirasyon (ışıklı ortamdaki solunum) ve peroksizomlardaki glikolat oksidaz gibi yollarla gerçekleşir [56].

Normal şartlarda hücrelerdeki reaktif oksijen ara ürünlerinin üretimi yüksek değildir (240 μM s -1O2 .- ve 0.5 μM H_2O_2 değerleri kloroplastlardaki değişmez düzeylerdir). Kuraklık, tuzluluk, donma, sıcaklık şoku, ağır metaller, ultraviyole yayılımı, ozon ve SO_2 gibi hava kirleticileri, besin eksikliği gibi stresler mitokondrial solunumda, kloroplastlarda ve fotorespirasyonda reaktif oksijen ara ürünlerini meydana getirir [57].

Kloroplastlarda oksijenin aktifleşmesini sağlayan en az dört bölge vardır. Birinci bölgede PSI (fotosistem I)'de ve NADP'nin sınırlı olduğu koşullarda, oksijenin indirgenmesi sağlanır. İkinci bölgede, klorofilin kazandığı enerjinin **singlet** oksijen oluşumuna neden neden olur. Üçüncü bölgede, PSII'nin oksitleyici kısmından moleküler oksijene doğru elektron geçişi olduğunda, aktif oksijen oluşumunun gerçekleşmesidir. Ayrıca, fotorespirasyondan dolayı da meydana gelir.

Süperoksit radikalleri solunum zincirinde indirgenen bileşiklerin oto-oksidasyonu sonucu oluşur [58].

Süperoksit peroksizomlarda ve plazma membranlarında üretilir. Bitki peroksizomlarında peroksizomal süperoksit üretimi yaşlanma süresince artmış ve oluşan reaktif oksijen türleri hücre bileşenlerini çürütmüştür [59].

1.1.10. Oksijen Radikallerinin Meydana Getirdiği Hasarlar

Oksidatif hasarlar daima hücre ölümlerine neden olmamakta ayrıca membran lipitlerine, proteinlere ve nükleik asitlere ciddi zararlar vermektedir [60].

Oksidatif saldırılar proteinlerde, spesifik amino asitlerin modifikasyonlarına, peptit zincirlerinin parçalanmasına, çapraz bağ kurmuş ürünlerin kümeleşmesine, elektriksel yük değişimlerine neden olur. Proteinlerin oksidatif olarak zarar görmesi Fe gibi metal kofaktörlerin varlığında artar. Bu durumda metal, proteinin iki değerlikli katyonları bağlayan bölgesine bağlanır ve hidrojen peroksit ile reaksiyona girer. Reaksiyon sonra hidroksil radikali oluşur ve bu radikal de amino asit dizilerini oksitler [58].

DNA diğer moleküllere göre oksidatif hasarlara karşı daha duyarlıdır. Aktif oksijen türleri DNA'da mutasyona neden olur [60].

Serbest oksijen radikalleri, lipit peroksidasyonuna sebep olur ve hücresel membranlara zarar verir. Lipid peroksidasyonu çoğunlukla yağ asitlerindeki çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının uzaklaştırılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlar, kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve çok zararlıdır.

Serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonuna "enzimatik olmayan lipid peroksidasyonu" denir. Lipid radikalleri (L•) ve moleküler oksijenin (O_2) etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri (LOO•) oluşur

Lipid peroksitleri (LOOH) yıkıldığında aktif olan aldehitler oluşur ve bunlar ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) oluşur. Biyolojik materyalde malondialdehit (MDA) belirlenmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır [58].

Lipid peroksidasyonu enzimatik olmayan, çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Doğrudan membran yapısına, dolaylı olarakta ürettiği reaktif aldehitlerle, hücre bileşenlerine zarar verir. Ve sonucunda doku hasarına sebep olur [61].

1.1.11. Antioksidan Savunma Sistemi

Bütün aerobik canlıların oksidatif bileşiklerin vereceği hasarlara karşı bir savunma sistemleri vardır. Savunma mekanizmalrı, enzim yapısında olan veya olmayan olarak ayrılabilir. Enzimatik olmayanlardan glutatyon, sistein, hidrokinonlar, mannitol, vitamin C ve E, flavonoidler, bazı alkoloidler ve β- karoten sayılabilir [62]. Enzimatik olanlar içerisinde askorbat peroksidaz (AP), glutatyon redüktaz (GR), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) yer alır. Enzimatik savunma sistemleri oksijen ara ürünlerini ve serbest radikalleri toplama, nötralize etme ve ortamdan uzaklaştırabilme özelliğine sahiptir [63].

Katalazlar hidrojen peroksiti etkili bir şekilde ortamdan uzaklaştırırken, süperokistdimütazlar, süperoksit anyonunu toplar. SOD ve CAT en etkili antioksidan enzimlerdendir. İki enzim uyumlu çalışırsa, süperoksit ve hidrojen peroksit, su (H_2O) ve

moleküler oksijene (O_2) dönüşür. SOD ve CAT'ın uyum içinde çalışması hidroksil oluşumunu azaltır. Böylece hücresel hasarlar önlenir [63].

1.1.12. Enzimatik Olmayan Savunma Sistemi

Enzimatik olmayan savunma, antioksidan olarak bilinen glutatyon, askorbat (vitamin C), tokoferol (vitamin E) ve flavonoitler, lignin, tanin gibi bileşiklerle sağlanır [60].

Askorbik asit (vitamin C) hayvan ve bitki dokularında yer alan önemli antioksidan bileşiklerdendir. Askorbat oksidatif hasara karşı koruma sağlar.

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki eder.

1) Toplayıcı etki: Serbest oksijen radikallerini tutar ya da daha zayıf yeni moleküle dönüştürür.

2) Bastırıcı etki: Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip aktivitelerini azaltır veya aktif olmayan şekle dönüştürür.

3) Zincir kırıcı etki: Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırar ve fonksiyonlarını engeller.

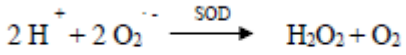
4) Onarıcı etki: Serbest radikallerin oluşturdukları hasarı onarırlar [64].

1.1.13. Enzimatik Savunma Sistemi

Süperoksid anyonu ve hidrojen peroksit, hücresel moleküller ile etkileşime girerek hasara neden olur ve bu zararlı ürünler bazı enzim sistemleri ile ortadan kaldırılır.

1.1.13.1. Süperoksit Dismütaz

Süperoksit dismütaz antioksidatif stres savunma mekanizmasının en önemli enzimidir. SOD aktif oksijen türlerinden süperoksit anyon radikallerini (O_2,-) katalizleyerek organizmaların oksijen varlığında canlı kalmasını sağlar. Bu reaksiyon sonucunda moleküler oksijen (O_2) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşur [65].

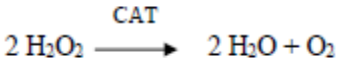


Aktif oksijen türleri reaktif özelliğe sahip olduğu için herhangi bir koruma mekanizması olmadığında hücre duvarının yapısına ve fonksiyonlarına zarar verir. [66].

SOD izozimlerinin miktarı her organizmada farklıdır. Kontrollü gelişim ve çevresel streslerin (UV, ozon, atmosfer kirleticileri, düşük sıcaklık, tuz stresi, kuraklık, sıcak şoku, ağır metal gibi) aktif oksijen türlerini meydana getirerek bitkinin SOD aktivitesini değiştirdiği gözlenmiştir [66].

1.1.13.2. Katalaz

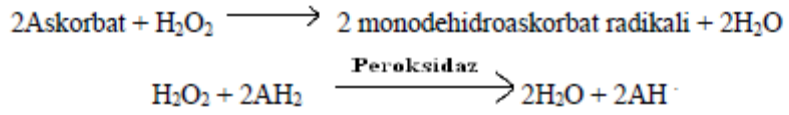
Hidroperoksidaz olarak da adlandırılan katalaz H_2O_2'in suya ve oksijene parçalanmasını sağlayan bir enzimdir [67].



Yüksek oranlardaki H_2O_2 hücrelere zarar vermekte ve hücrelerde biriktiği zaman protein, lipit ve DNA gibi hücresel hedeflerin oksidasyonuna neden olur. Böylece mutasyonların oluşur ve hücre ölür. Bu enzim peroksizomlarda meydana getirilen H_2O_2'in uzaklaştırılmasında görevli özel bir proteindir. Hidrojen peroksitin (H_2O_2) bu şekilde uzaklaştırılması sayesinde SOD tarafından, hidrojenperoksit molekülünün çok zararlı olan hidroksil radikallerine dönüştürülmesi önlenir. Bu reaktif oksijen türlerinin uzaklaşmasıyla aerobik ortamda yaşama kolaylaşır. Protein sentezini engelleyen stres faktörleri CAT'ın aktivitesinide engeller [68]. Bu olumsuz etki AA, GSH ve AP'da meydana gelen artışlarla düzeltilebildiği gibi PS II' nin H_2O_2'in üretimini azaltarak da telafi edilebilir [69].

1.1.13.3. Askorbat Peroksidaz

Askorbat peroksidazlar bitkilerin sitosol ve kloroplastlarındaki, H_2O_2'i askorbat-glutatyon döngüsü yoluyla yıkarlar.

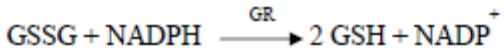


Askorbat peroksidaz hidrojen perokside bağlı olarak farklı substratları katalizler. Ama enzimin fizyolojik substratı askorbattır (vitamin C) [70].

Askorbat peroksidaz sitozolde, kloroplastlarda, peroksizomlarda bulunur. Bütün askorbat peroksidaz enzimleri elektron vericisi olarak askorbata yüksek özgüllük gösterir. Fakat enzim fizyolojik koşullarda bulunmayan substuratları da okside etme yeteneğine sahiptir [71].

1.1.13.4. Glutatyon Redüktaz

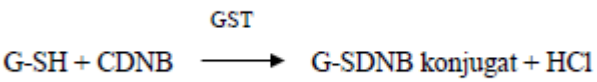
Glutatyon redüktaz, okside glutatyonun (GSSG) glutatyona (GSH) indirgenmesini katalizler.



GSH bir antioksidandır ve serbest radikal ve organik peroksitlerle reaksiyona girer, ayrıca amino asit taşınımında görev alır, glutatyon peroksidaz ve glutatyon S-transferaz enzimlerinin de substratıdır [51]. Okside glutatyonun indirgenmesi olayı çok aşamalı bir reaksiyondur. İlk olarak olarak enzim NADPH tarafından indirgenir daha sonra glutatyon redüktaz GSSG molekülü ile reaksiyona girer ve disülfit değişimi gerçekleşir. Sonuç olarak GSH molekülü ve GR_{red} – SG kompleksi meydana gelir. GR_{red} – SG kompleksinde ikinci bir disülfit değişimi gerçekleşir. İkinci GSH molekülünün enzimden ayrılması ile enzim tekrar okside forma dönüşmüş olur [72].

1.1.13.5. Glutatyon S-Transferaz

Glutatyon S-transferaz ve glutatyon arasındaki konjugasyon sonunda aktif olmayan, suda çözünebilen, daha az zararlı ürünler meydana gelir [57].



GST aerobik organizmaları oksidatif hasarlardan ve elektrofilik saldırılardan korur. GST toksik maddelerin etkisizleştirilmesinde de görevlidir. GST aktivitesinin bitkilerde, böceklerde, mayalarda, bakterilerde bulunduğu ve detoksifikasyonda anahtar rol oynadığı bilinmektedir [73].

GST'ler çevresel stres faktörlerince oluşan reaktif oksijen türlerine karşı hücre membranını, DNA ve proteinleri korurlar [74].

1.1.14. Biyomoleküllerin Oksidasyonu

Lipit peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu biyolojik ortamların, iyi bilinen ve en çok çalışılan radikal reaksiyon zinciridir. Serbest radikaller, doymamış yağ asidi zincirinin alfa metilen gruplarından bir hidrojen atomunu uzaklaştırıp lipit peroksidasyonunu başlatırlar. Serbest radikallerin, süperoksit anyonu ve hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Ama lipit peroksidasyonunun uyarılmasındaki asıl etkenin hidroksil grubu olduğu bilinmektedir. Süperoksit, pH 7,2'de H_2O_2'ye dönüşür.

Serbest radikal etkisi ile yağ asidi zincirinden hidrojen atomu uzaklaştığında, bu yağ asidi zinciri radikal niteliği kazanır. Oluşan lipit radikali dayanıksız bir bileşiktir. Malondialdehit (MDA), enzimatik olmayan oksidatif lipid peroksitlerinin parçalanması sonucu oluşan toksik etkili son ürünlerden birisidir.

Lipid peroksit düzeylerinin saptanmasında, MDA miktarının ölçümü, sıklıkla kullanılmaktadır. Lipid hücre hasarına neden olur [75].

Prolin Birikimi

Prolin, bir aminoasitttir. Prolin birikimi reaktif oksijen türevlerinin hücre zarına zarar vermesinden oluşan osmotik dengesizliği önlemekte olduğu bildirilmiştir. Bitkide ki prolin birikimi zararın göstergesi olarak da değerlendirilebilir.

1.2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bütün bitkiler büyüme ve gelişmeleri için gerekli olan ağır metalleri topraktan ve sudan alıp biriktirebilme yeteneğindedirler. Bu metaller içerisinde Fe, Mn, Zn, Cu, Mg, Mo ve Ni'sayılabilir. Bazı bitkilerin de Cd, Cr, Pb, Cu, As, Se ve Hg gibi metalleri biriktirdikleri belirtilmektedir [76].

Vasküler sucul bitkilerin dokularında yapılan metal birikimi çalışmalarında bu bitkilerin yakınlarındaki su ortamından 10 ve 10^6 kat daha fazla metal biktirdiği belirtilmiştir [77]. Bu yüzden makrofitler bir şekilde akuatik ekosistemlerdeki ağır metal döngüsünde önemli rol oynamaktadırlar [78].

1.2.1. Kurşunun Bitkiler Üzerine Toksik Etkileri

Pb dünyanın her yerindeki doğal kaynaklarda birçok formda bulunan en çok yaygın iz elementlerden birisidir [79]. Pb toprak ve bitkilere sanayi atıklarından ve araba eksozlarından çevreye yayılarak bulaşabilir [80]. Maden atıklarının bulunduğu yerlerde toprağın besin içeriği ve organik madde miktarı yeterli değilse Pb toksisitesi oluşmaktadır [81].

Kurşun toksisitesine toleransı olmayan bitkilerde, Pb toksisitesi mitozda hasarlar, çekirdekte zararlar, kök büyümesinin engellenmesi, klorozisin oluşması, enzim aktivitelerinin bozulması ve fotosentezin azalması gibi problemlerin ortaya çıktığı belirtilmiştir [82, 83, 84, 85, 86, 87].

Toksisite başlangıcı için bitkideki 20-35 mg/kg kuru madde kurşun miktarının kritik değer olduğunu bildirilmiştir [88].

Lipit Peroksidasyonu

Bitkilerde metallerin birikimi bazı hücresel değişiklikleri de doğurur. *P. crispus*'da civa akümülasyonunda lipit peroksidasyonu oluşmuş ve MDA düzeyinde artma belirlenmiştir [89]. Somashekaraiah ve arkadaşlarının (1992) yaptığı çalışmada *Phaseolus vulgaris*'in kadmiyum uygulanmış çimlenme denemesinde MDA düzeyinde artış olmuştur [22].

Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest oksijen radikalleri oksijenin (O_2^-) formuna dönüşmesi sırasında ya da bir, iki veya üç elektronun oksijene taşınımı sırasında oluşan $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 veya $OH^{\cdot}$'dir. Normal oksijenin aksine, reaktif oksijen türleri çeşitli hücresel bileşenleri yüksek derecede oksitleme gücüne sahiptirler ve hücrenin oksidatif hasarına sebep olurlar [90].

Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Savunma Mekanizmaları

Bitkiler, oksijen türleri tarafından oluşan zararı tamir etmek ve azaltmak için kompleks antioksidant (hem enzim hem de enzim olmayan) sistemler geliştirmişlerdir. Cu, Mn ve Fe gibi ağır metallerin toksik düzeylerine maruz bırakılan bitkilerde de SOD aktivitesi artmıştır [91].

Yapılan bir çalışmada bezelye kök hücrelerinin 1mM Pb $(NO_3)_2$ 96 saat maruz bırakılması sonucu antioksidant sistemin iki bileşeni olan SOD ve CAT aktivitesindeki değişiklikler eşzamanlı olarak belirlenmiştir. 24 saatin sonunda SOD aktivitesinde kontrolün 3 katı kadar bir artış gözlenmiş ve artış devam etmiştir. 96 saatin sonunda ise %17 oranında bir azalma olmuştur. Aynı süre içinde CAT aktivitesinde de sürekli bir artış gözlenmiş, 72 saat sonra yapılan ölçümde artışın kontrolün 6 katı kadar olduğu belirtilmiştir. Son 24 saat içinde ise CAT aktivitesi %33 oranında düşmüştür [92].

1.2.2. Aluminyumun Bitkiler Üzerine Etkileri

Aluminyum (Al) yeryüzündeki en yaygın üçüncü elementtir [38]. Aluminyum (Al) bitkiler için elzem olmasa da, düşük konsantrasyonlarda bitki büyümesini olumlu yönde etkiler [39]. Topraklar daha asidik olmaya başladığında Al'un fitotoksik formları (Al^{+3}) alumino-silika komplekslerinden toprak çözeltisi içine geçer ve toprağın asitlik derecesi ile ilişki halinde olan Al bileşiklerininin çözünürlüğündeki yoğunluk topraktan alkali metal iyonlarının (Na^+, K^+, Ca^{+2}, Mg^{+2}) yıkanarak uzaklaşmasına ve toprağın asitliğinin artmasına sebep olmaktadır. Böylece ortaya çıkan Al toksisitesi, asitli topraklarda tahıl tarımını sınırlayan önemli bir faktör olmuştur [40].

pH değerleri 5.5' un altında olan asidik topraklarda, Al'un çözünürlüğü hızla artmakta ve katyon değişim bölgelerinin büyük bir bölümü Al tarafından işgal edilmektedir [93].

Al bitkiler tarafından kolaylıkla alınabilir. Bu durum birçok asidik toprakta büyümeyi sınırlayıcı bir etken olan Al toksisitesine neden olur. Al çoğu zararını köke verir, köklerde birikerek, kök zararlarına ve yetersiz kök büyümesine neden olur [94].

Al^{+3}'un kök uzamasını engellediği ve bununla birlikte lipid peroksidasyonun arttığına dair bir ilişki bulunduğu belirtilmektedir [95].

1.2.3. Krom' un Bitkiler Üzerine Etkileri

Crustacea'larda yapılan bir çalışmada farklı zaman ve konsantrasyona bağlı olarak 3 mg/mL 48 saat Ni uygulamasının herhangi bir toksik etkisinin olmadığını, 5 mg/mL 48 saat Ni uygulamasının populasyon üzerinde %20 oranında öldürücü olduğu, 0.3 mg/mL ve daha düşük dozlarda Cr uygulamasının herhangi bir zararlı etkisinin olmadığı, 0.4 mg/mL ve daha yüksek dozlarda Cr uygulamalarının toksik etki gösterdiği belirtilmşitir [96].

2. BÖLÜM

MATERYAL VE METOD

2.1. Çalışmada Kullanılan Bitki Materyali

Çalışmada materyal olarak ülkemizde tescil edilmiş sugar grazer II, sorgum çeşidi kullanılmıştır.

Sugar grazer II

- Tek yıllık yaşam süresine sahip olup yazlık ve erkencidir.
- Ortalama çiçeklenme gün sayısı 53 gündür.
- Ekimden sonra ilk hasat 45-50 gün sonra yapılmaktadır.
- Sap uzunluğu 250-270 cm kadar ulaşabilir.
- Sap durumu dik ve gevrektir.
- Çok sayıda kardeş yapmaktadır.
- Uygun bakım şartlarında 4-6 biçim yapılabilmektedir.
- İdeal biçim boyu 100-120 cm'dir.
- Bitki boyu min. 60-70 cm. olduğundan otlama yapılabilir.
- Zor arazi şartlarına adaptasyonu güçlüdür.
- 60 cm bitki boyu altında yeşil otlatmaya uygun değildir. (Prussic asit)
- Geniş yapraklı ve silaja uygundur.

2.2. Yöntem

Araştırma Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünde bulunan iklimlendirme ünitesinde yürütülmüştür. Deneme sorgum bitkisinin optimum yetişme koşulları olan 25 ºC'de ve %70 nem koşullarında yürütülmüştür. Tohumlar özel olarak hazırlanmış olan plastik kaplar içerisine 50 adet konulmuştur. Bitkilere günlük hazırlanan Hoagland çözeltisi verielrek büyümleri sağlanmıştır. Bitkiler belli bir büyüklüğe geldiklerinde (10-15 cm) stres faktörleri uygulanmıştır. Stres uygulaması 10 gün süre devam etmiş ve her gün yenilenmiştir. Bu amaçla Al, Cr ve Pb stresi için 0, 2, 4, 8, 16, 32 ve 64 ppm dozları uygulanmıştır. 10 gün sonunda hasat edilen bitki örnekleri tartılarak -20 ºC'de saklanarak analizler yapılmıştır. Deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekrarlamalı olarak kurulmuş ve analiz edilmiştir. Çalışma kapsamında aşağıdaki analizler yapılmıştır.

Tablo 2.1. Hoagland çözeltisi içeriği

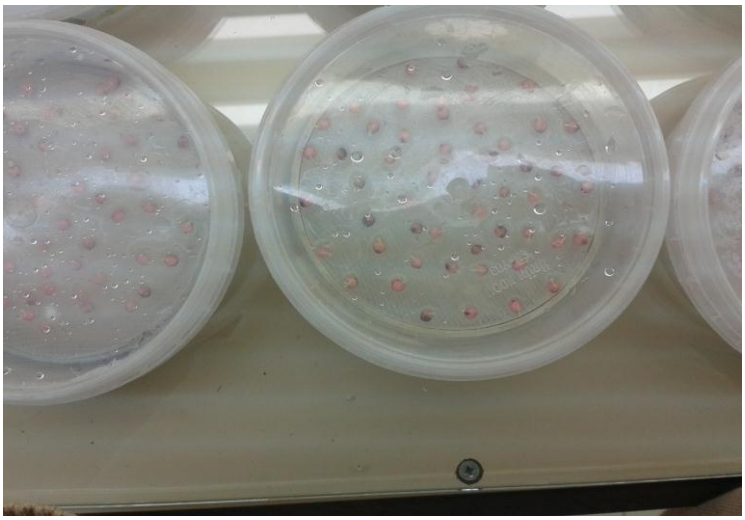
MADDELER	**STOK SOLÜSYON**	**KUL. MİKTAR(mL/L)**
$MgSO_4 7H_2O$	24.6 g/100ml	1.0 ml
KH_2PO_4	13.6 g/100ml	0.5 ml
KNO_3	10.1 g/100ml	2.5 ml
$Ca(NO_3)_2 4H_2O$	23.6 g/100ml	2.3 ml



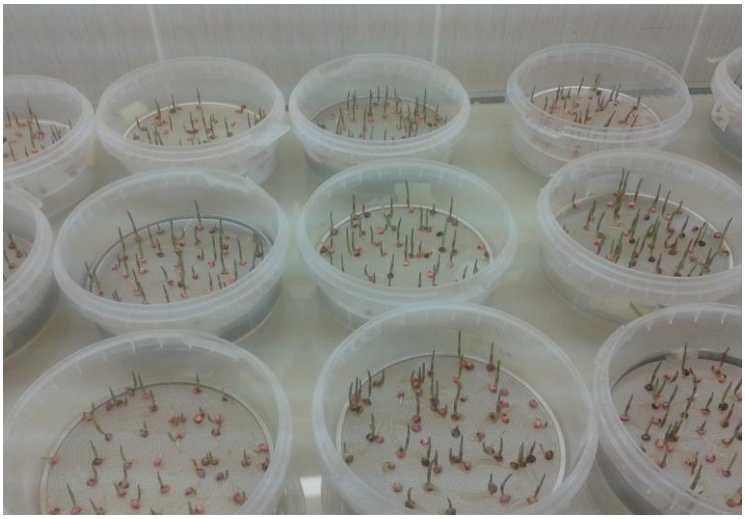
Şekil 2.1. Sorgum bitkisinin yetiştirme kaplarının hazırlanması



Şekil 2.2. Sorgum bitkisinin tohumlarının yetiştirme kaplarına yerleştirilmesi



Şekil 2.3. Sorgum bitkisinin iklim odasında çimlenmesi



Şekil 2.4. Sorgum bitkisinde ilk çıkışların gerçekleşmesi



Şekil 2.5. Sorgum bitkisine bitki besin elementlerinin verilmesi



Şekil 2.6. Sorgum bitkisinin stres uygulanmadan geçirdiği ilk on günlük durumu



Şekil 2.7. Sorgum bitkisinde stres uygulaması yapılmadan gelişen sağlıklı kök yapısı



Şekil 2.8. Sorgum bitkisinde stres uygulaması yapıldığında gözlemlenen sağlıksız kök yapısı



Şekil 2.9. Sorgum bitkisinin analizler için kök ve yaprak ayrılırak hasadı



Şekil 2.10. Sorgum bitkisine ağır metal uygulanmamış kontrol uygulaması

Protein Ekstraksiyonu

Doku örneklerinden de 0.5 gr doku örneği havan ve tokmak kullanarak sıvı azot içinde ezilmiştir. Parçalanan hücreler 0.1 M Tris- HCl tamponu (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, %1 PVP solüsyonu içinde homojenize edilmiş ve 15000 g de 20 dk. santrifüj edilmiştir. [97].

Protein Miktarının Belirlenmesi

Alınan bitki dokularındaki protein miktarı Bradford (1976) yöntemine göre belirlenmiştir. Bradford ayıracı, 500 mg Coomassie Brilliant Blue G250, 250 ml % 96' lık etanol içinde çözülüp üzerine 500 ml % 85 lik orto fosforik asit ilave edilerek distile su ile son hacim 1 lt' ye tamamlanmıştır. Protein miktarlarının belirlenmesi için buz üzerinde tutulan örneklerden 5'er µl alarak cam tüplere ilave edilmiş ve son hacim 500 µl olacak şekilde distile su ilave edilmiştir. Bundan sonra 1x Bradford ayıracından 5 ml cam tüplere ilave edilerek oda sıcaklığında yaklaşık 15 dakika bekletildikten sonra 595 nm de cam küvet kullanılarak absorbansları ölçülmüştür.

Protein konsantrasyonunun belirlenmesi için sığır serum albumini (BSA) fraksiyon V kullanılarak standart serisi oluşturulmuştur. 1 mg\ml BSA stoğundan 5, 10, 15, 20, 25 µl alınarak cam tüplere aktarılmış ve distile su ile 500 µl ye tamamlanmıştır. Tüplerin üzerine son hacim 5 ml olacak şekilde Bradford ayıracı eklenmiştir. Standartlara uygun absorbans değerlerinden standart eğri elde edilmiştir. Elde edilen eğrinin denkleminden yola çıkarak örneklerin konsantrasyonları hesaplanmıştır.

Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalaz aktivitesinin belirlenmesi için literatürde verilen yöntem kullanılmıştır. [97] 20 mM sodyum fosfat tamponuna (pH 7.5), 6 mM hidrojenperoksit ve 3 µg\ml olacak şekilde örnek protein ekstraktı eklenmiştir. Aktivite ölçümleri için küvet hacmi 1 ml olarak ayarlanmıştır. Tampon ve örnek protein ekstraktı iyice vortekslendikten sonra hidrojenperoksit ilave edilerek reaksiyon başlatılmış ve 240 nm dalga boyunda quartz küvet kullanılarak absorbansdaki düşüş 3 dakika boyunca ölçülmüştür. Kör olarak distile su ve ekstraksiyon tamponu kullanılmıştır. Reaksiyonun başlatılmasından itibaren spektrofotometrede okunan ilk ve son değerler kaydedilerek aktivite hesabında

kullanılmıştır. Hesaplamada formül olarak ΔAbs\dk = ε.C.L kullanılacaktır [97]. (Hidrojenperoksidin molar soğurma değeri 240 nm de 40 mM^{-1} cm^{-1})

Spesifik aktivite aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$SA = \frac{\Delta Abs\backslash dk}{\varepsilon \times 1} \times 1000\mu g / 3\ \mu g/ml$$

Askorbat Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Askorbat peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi için literatürde verilen yöntem kullanılmıştır [58]. 0.5 gr bitki örnekleri 50 mM Tris-HCl tamponu içinde (1mM EDTA, 2 mM Askorbat, %2 PVP, pH 7.2) ekstrakt edilmiştir. 15000 g de 20 dakika santrifüj edildikten sonra alınan süpernatantın protein konsantrasyonları Bradford (1976) yöntemi ile belirlenmiştir [58].

Askorbat peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi için 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 6.0) içinde 0.15 mM askorbat, 6 mM hidrojenperoksit ve 3 μg\ml olacak şekilde örnek protein eksraktı kullanılmıştır. Aktivite ölçümleri için küvet hacmi 1 ml olarak ayarlanmıştır. Tampon ve örnek protein ekstraktı iyice vortekslendikten sonra hidrojenperoksit ilave edilerek reaksiyon başlatılmış ve 290 nm dalga boyunda, quartz küvet kullanılarak absorbansdaki düşüş 2 dakika boyunca ölçülmüştür. Kör olarak distile su ve ekstraksiyon tamponu kullanılmıştır. Reaksiyonun başlatılmasından itibaren spektrofotometrede okunan ilk ve son değerler kaydedilerek aktivite hesabında kullanılmıştır. Hesaplamada formül olarak ΔAbs\dk = ε.C.L kullanılmıştır. (Askorbatın molar soğurma değeri 2.8 mM^{-1} cm^{-1}).

Spesifik aktivite aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$SA = \frac{\Delta Abs\backslash dk}{\varepsilon \times 1} \times 1000\mu g / 3\ \mu g/ml$$

Glutatyon Redüktaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Glutatyon redüktaz aktivitesinin belirlenmesi için literatürde verilen yöntem gerekli modifikasyonlarla kullanımıştır [97]. 100 mM, pH 7.5 sodyum fosfat tamponu, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM NADPH, 1mM GSSG ve 0.01 M sodyum fosfat tamponunda hazırlanmış 0.75 mM DTNB reaksiyon karışımı kullanılmış ve 5 µg/ml protein ilave edilerek reaksiyon başlatımıştır. Aktivite ölçümleri için küvet hacmi 1 ml olarak ayarlanmıştır. Tampon ve örnek protein ekstraktı iyice vortekslendikten sonra quartz küvet kullanılarak 5 dakika boyunca 412 nm' de okunmuştur [97].

Kör olarak distile su ve ekstraksiyon tamponu kullanılmıştır. Reaksiyonun başlatılmasından itibaren spektrofotometrede okunan ilk ve son değerler kaydedilerek aktivite hesabında kullanılmıştır. Hesaplamada formül olarak ΔAbs\dk = ε.C.L kullanılmıştır (NADPH molar soğurma değeri 6,2 mM^{-1} cm^{-1}). Spesifik aktivite aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$SA = \frac{\Delta Abs\backslash dk}{\varepsilon \times 1} \times 1000\mu g / 5\ \mu g/ml$$

Glutatyon S Transferaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Glutatyon S transferaz aktivitesinin belirlenmesi için literatürde verilen yöntem gerekli modifikasyonlarla kullanılmıştır [98]. Enzim aktivitesinin belirlenmesi için 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 6.5) kullanılmıştır. 1 mM EDTA, 2 mM GSH, 1 mM CDNB ve tamponla referans alındıktan sonra 50 µg/ml protein içeren örnek ilave edilmiştir. Aktivite ölçümleri için küvet hacmi 1 ml olarak ayarlanmıştır. Nonenzimatik reaksiyon için küvet enzim eklenmeden 5 dakika bekletilip tampon ve örnek protein ekstraktı iyice vortekslendikten sonra 340 nm' de quartz küvet kullanılarak 5 dakika boyunca okunmuştur [97].

Kör olarak distile su ve ekstraksiyon tamponu kullanılmıştır. Reaksiyonun başlatılmasından itibaren spektrofotometrede okunan ilk ve son değerler kaydedilerek aktivite hesabında kullanılmıştır. Hesaplamada formül olarak ΔAbs\dk = ε.C.L

kullanılmıştır (CDNB nin absorbsiyon katsayısı 9.6 mM^{-1} cm^{-1}). Spesifik aktivite aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$SA = \frac{\Delta Abs\backslash dk}{\varepsilon \times 1} \times 1000\mu g / 50\ \mu g/ml$$

SOD Aktivitesinin Belirlenmesi

SOD aktivitesinin belirlenmesi için 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.5), 0.1 mM EDTA, 10 mM metionin 0.1 mM NBT 0.005 mM riboflavin kullanılmıştır. Çalışma ikili tekrarlarla yapılmıştır. Öncelikle tüplere 50 µg/ml protein ilave edilmiş daha sonra hazırladığımız solüsyondan 3' er ml ilave edilmiştir. Spektrofotometre için referans olarak karanlıkta tutulan ve içinde protein örneği bulunmayan solüsyon kullanılmıştır. Reaksiyonun referansı olarak içinde protein örneği bulunmayan ancak diğer örneklerle eşit sürede ışıkta bekletilen solüsyon kullanılmıştır. 20 dakika ışıkta bekletilen örnekler 560 nm dalga boyunda okunmuştur [97].

Örneklerdeki SOD konsantrasyonunun belirlenmesi için SOD standartları hazırlanmıştır. Standartların hazırlanmasında sığır eritrositlerinden elde edilen SOD kullanılmıştır. SOD aktivite hesabı için % inhibisyon değeri kullanılmıştır. % inhibisyon =(ışık kont.Abs.-örneğin absorbansı) x 100/ ışık kont absorbansı. % inhibisyona karşılık enzim konsantrasyonlarından logaritmik bir grafik elde edilmiştir. Grafikte kullanılan standart SOD enzim konsantrasyonlarının logaritmaları alınarak ve % inhibisyon değerleri aynen kullanılarak yeni bir grafik elde edimiştir. Grafikte elde edilen doğrunun denklemi kullanılarak SOD konsantrasyonları bilinmeyen uygulamaların konsatrasyonları belirlenmiştir [99].

MDA Miktarının Belirlenmesi

MDA tayini için literatürde verilen yöntem kullanılmştır [98]. 0.3 gr yaş doku 3 ml %5 TCA solüsyonu ile homojenize edilmiştir. Ekstrakt santrifüj tüplerinde 12000 g' de 15 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Süpernatanttan her tüpte 1 ml olacak şekilde ikili tüplerle çalışılmıştır. Tüplerin üzerine % 20 TCA ve % 0.5 TBA solüsyonundan 4 ml eklenmiştir. Tüpler yarım saat kaynar suda tutulup bu sürenin sonunda ani soğutma

yapılmıştır. Solüsyonlar tekrar santrifüj tüplerine alınıp 10000xg' de 10 dakika santrifüj edilmiştir. 532 ve 600 nm' de spektrofotometrede okunmuştur. Abs = ε.C.L formulünden MDA konsantrasyonu bulunup daha sonra 1 gr dokudaki MDA konsantrasyonu tespit edilmiştir. MDA içeriklerinin tespiti için kullanılan molar soğurma değeri 155 mM^{-1} cm^{-1}' dir.

Prolin Miktarının Belirlenmesi

Prolin miktarının belirlenmesi için literatürde verilen yöntem kullanılmıştır [98]. 0.3 gr bitki dokusu %3' lük 5 ml sülfosalisilik asit çözeltisi ile havan yardımıyla ezilmiştir. Ekstrakt 15000xg' de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatanttan her tüpe 2 ml olacak şekilde ikişerli tekrarlar halinde ilave edilmiştir. Daha sonra tüplere 2 ml glasiyal asetik asit ve 2 ml asetik asit, fosforik asit, ninhidrin çözeltisi eklenerek karıştırılmıştır. Tüpler 1 saat boyunca kaynatılıp bu sürenin sonunda ani soğutma yapılmış ve örneklerin üzerine 4 ml toluen eklenip karıştırılmıştır. Toluenli kısım cam küvete alınarak OD 520' de okunmuştur. Prolin konsantrasyonunun tespit edilmesi için standart solüsyonlar hazırlanmıştır. Standart solüsyonu için 10 mM % 3'lük stok sülfosalisilik asit çözeltisi kullanılmıştır. Stoktan seyreltilen solüsyonların absorbansları spektrofotometrede okunmuştur. Elde edilen değerler ile oluşturulan grafik referans kabul edilmiştir. Bu doğrunun denkleminden faydalanılarak konsantrasyon hesaplanmıştır. y=ax+b doğru denkleminde y=absorbans, a=eğim, x=konsantrasyon, b=düzeltme faktörüdür.

Klorofil Miktarının Tayini

Klorofil miktarının belirlenmesi için modifiye edilen yöntem kullanılmıştır. Taze doku örneklerinden alınan 0.25 g örnek 50 ml hacimdeki falkon tüplerine konularak üzerine 10 ml DMSO eklenmiş ve 65 °C'de bir gece beklenmiştir. Falkon tüleri 30 ml ye %50DMSO+%50 safsu ile tamamlanarak karıştırılmış ve süzülmüştür. Alınan süzük spektrofotometrede okunarak aşağıdaki formüllerle hesaplanmıştır. Kör olarak %50DMSO+%50 safsu kullanılmıştır.

Klorofil a = 12,25*E663-2.79*E647

Klorofil b = 21.50*E647-5.10*E643

Klorofil a+b = 7.15*E663+18.71*E647

2.3. Sonuçların İstatistiksel Değerlendirilmesi

İncelenen karakterlere ait verilerin istatistiksel analizleri, tesadüf parselleri deneme desenine uygun olarak SAS istatistik paket programı kullanılarak yapılmıştır. Ortalama değerler arasındaki karşılaştırmalarda Duncan testi kullanılmıştır.

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Sugar Grazer Çeşidinin MDA İçeriği

Sorgum bitkisine uygulanan Al dozları hem yapraktaki hem de kökteki MDA içeriğine etkisi istatistiksel olarak çok önemli çıkmıştır (Tablo 3. 1.).

Sorgum bitkisine uygulanan Cr dozları hem yapraktaki hem de kökteki MDA içeriğine etkisi etkisi %1 seviyesinde önemli ($p \leq 0.01$) çıkmıştır (Tablo 3. 2.).

Sorgum bitkisine uygulanan Pb dozları hem yapraktaki hem de kökteki MDA içeriğine etkisi etkisi %1 seviyesinde önemli ($p \leq 0.01$) çıkmıştır (Tablo 3. 3.).

Al uygulanan sorgum bitkisinin yaprak ve köklerinde bulunan MDA içerikleri Tablo 3. 1.' de verilmiştir. Tablo 3. 1. incelendiğinde yaprakta Al dozu artışı ile birlikte MDA içeriği artmış, kökte ise artmış daha sonra azalmıştır. En yüksek MDA içeriği yaprakta 67.563 nmol/g taze ağırlık ile 64 ppm den elde edilirken, kökte 39.847 nmol/g taze ağırlık ile 8 ppm Al uygulamasından elde edilmiştir. En düşük MDA içerikleri ise yaprak ve kökte sırasıyla 32.998 ve 17.486 nmol/g taze ağırlık ile kontrol uygulamasından elde edilmiştir.

Tablo 3.1. Al dozlarının uygulandığı sorgum bitkisine ait MDA içerikleri (nmol/g taze ağırlık)

Al Dozları	Yaprak	Kök
Kontrol	32.998 e	17.486 d
2 ppm	42.963 d	35.355 b
4 ppm	46.004 c	36.789 ab
8 ppm	49.347 c	39.847 a
16 ppm	57.014 b	37.601 ab
32 ppm	61.380 b	36.086 b
64 ppm	67.563 a	28.599 c
Önem derecesi	**	**

*$p \leq 0.05$; **$p \leq 0.01$

Cr uygulanan sorgum bitkisinin yaprak ve köklerinde bulunan MDA içerikleri Tablo 3. 2. ' de verilmiştir. Tablo 3. 2. incelendiğinde yaprakta Cr dozu artışı ile birlikte MDA içeriği artmış, kökte ise artmış daha sonra azalmıştır. En yüksek MDA içeriği yaprakta 52.514 nmol/g taze ağırlık ile 64 ppm den elde edilirken, kökte 23.180 nmol/g taze ağırlık ile 8 ppm Cr uygulamasından elde edilmiştir. En düşük MDA içerikleri ise yaprak ve kökte sırasıyla 24.685 ve 16.819 nmol/g/taze ağırlık ile kontrol uygulamasından elde edilmiştir.

Tablo 3.2. Cr dozlarının uygulandığı sorgum bitkisine ait MDA içerikleri (nmol/g taze ağırlık)

Cr Dozları	**Yaprak**	**Kök**
Kontrol	24.685 d	16.819 c
2 ppm	31.998 c	19.581 abc
4 ppm	32.127 c	21.454 ab
8 ppm	32.992 c	23.180 a
16 ppm	41.923 b	22.504 ab
32 ppm	45.208 b	18.679 bc
64 ppm	52.514 a	18.987 bc
Önem derecesi	**	**

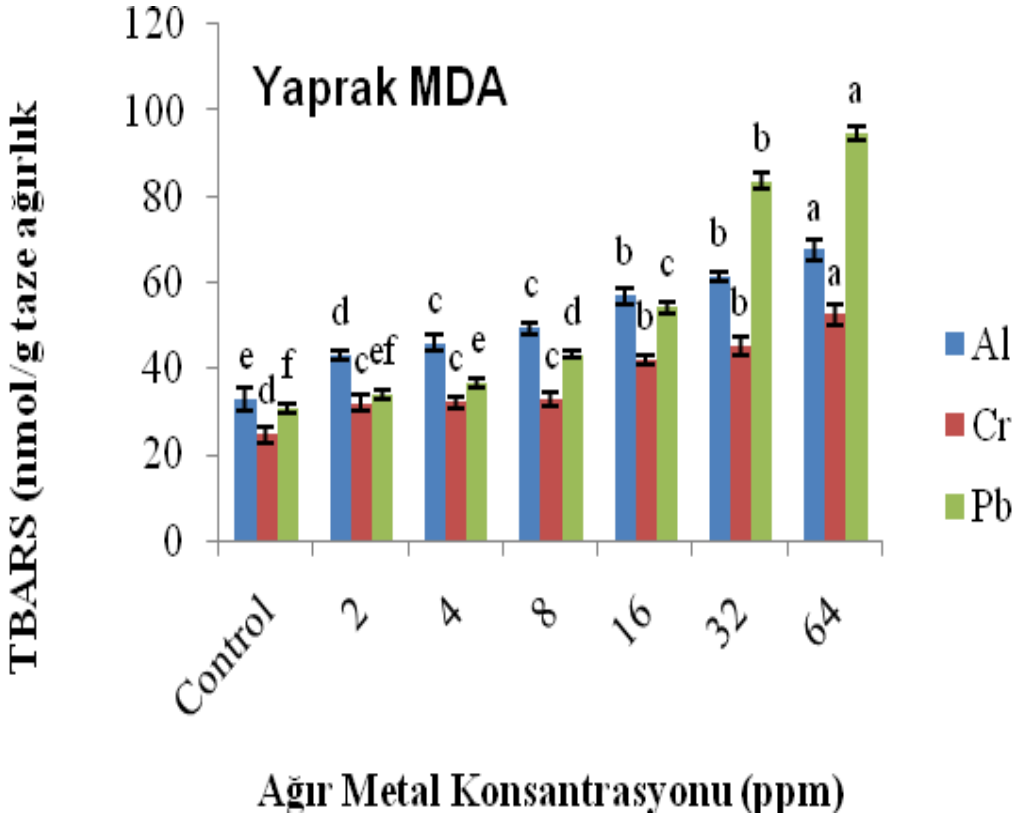
*p≤0.05; **p≤0.01

Pb uygulanan sorgum bitkisinin yaprak ve köklerinde bulunan MDA içerikleri Tablo 3. 3. ' de verilmiştir. Tablo 3. 3. incelendiğinde yaprakta Pb dozu artışı ile birlikte MDA içeriği artmış, kökte ise artmış daha sonra azalmıştır. En yüksek MDA içeriği yaprakta 94.673 nmol/g taze ağırlık ile 64 ppm den elde edilirken, kökte 39.456 nmol/g taze ağırlık ile 4 ppm Pb uygulamasından elde edilmiştir. En düşük MDA içerikleri ise yaprak ve kökte sırasıyla 30.663 ve 17.486 nmol/g taze ağırlık ile kontrol uygulamasından elde edilmiştir

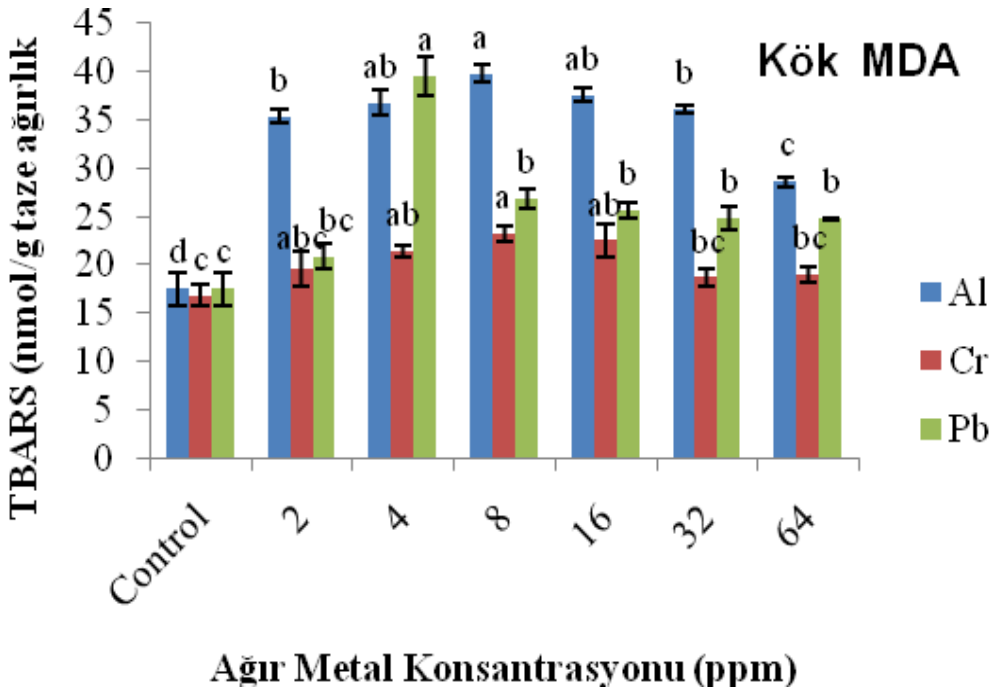
Tablo 3.3. Pb dozlarının uygulandığı sorgum bitkisine ait MDA içerikleri (nmol/g taze ağırlık)

Pb Dozları	Yaprak	Kök
Kontrol	30.663 f	17.486 c
2 ppm	33.953 ef	20.859 bc
4 ppm	36.553 e	39.456 a
8 ppm	43.310 d	26.827 b
16 ppm	54.173 c	25.656 b
32 ppm	83.603 b	24.818 b
64 ppm	94.673 a	24.763 b
Önem derecesi	**	**

*p≤0.05; **p≤0.01



Şekil 2.11. Sorgum bitkisinin yapraklarındaki MDA seviyeleri



Şekil 2.12. Sorgum bitkisinin köklerindeki MDA seviyeleri

3.2. Sugar Grazer Çeşidinin Prolin İçeriği

Sorgum bitkisine uygulanan Al dozları hem yapraktaki hem de kökteki prolin içeriğine etkisi etkisi %1 seviyesinde önemli ($p \leq 0.01$) çıkmıştır (Tablo 3. 4.).

Sorgum bitkisine uygulanan Cr dozları hem yapraktaki hem de kökteki prolin içeriğine etkisi etkisi %1 seviyesinde önemli ($p \leq 0.01$) çıkmıştır (Tablo 3. 5.).

Sorgum bitkisine uygulanan Pb dozları hem yapraktaki hem de kökteki prolin içeriğine etkisi etkisi %1 seviyesinde önemli ($p \leq 0.01$) çıkmıştır (Tablo 3. 6.).

Al uygulanan sorgum bitkisinin yaprak ve köklerinde bulunan prolin içerikleri Tablo 3. 4'te verilmiştir. Tablo 3. 4. incelendiğinde yaprakta Al dozu artışı ile birlikte prolin içeriği artmış, kökte ise artmış daha sonra azalmıştır. En yüksek prolin içeriği yaprakta 248.758 nmol/g taze ağırlık ile 64 ppm den elde edilirken, kökte 91.239 nmol/g taze ağırlık ile 4 ppm Al uygulamasından elde edilmiştir. En düşük prolin içerikleri ise yaprak ve kökte sırasıyla 54.827 ve 35.715 nmol/g taze ağırlık ile kontrol uygulamasından elde edilmiştir.

Tablo 3.4. Al dozlarının uygulandığı sorgum bitkisine ait prolin içerikleri (nmol/g taze ağırlık)

Al Dozları	Yaprak	Kök
Kontrol	54.827 d	35.715 d
2 ppm	59.666 d	59.269 c
4 ppm	58.757 d	91.239 a
8 ppm	75.008 cd	75.148 b
16 ppm	94.206 bc	72.241 bc
32 ppm	98.960 b	67.188 bc
64 ppm	248.758 a	63.120 bc
Önem derecesi	**	**

*p≤0.05; **p≤0.01

Cr uygulanan sorgum bitkisinin yaprak ve köklerinde bulunan prolin içerikleri Tablo 3. 5. ’te verilmiştir. Tablo 3. 5. incelendiğinde yaprakta Cr dozu artışı ile birlikte prolin içeriği artmış, kökte ise artmış daha sonra azalmıştır. En yüksek prolin içeriği yaprakta 1137.36 nmol/g taze ağırlık ile 64 ppm den elde edilirken, kökte 163.069 nmol/g taze ağırlık ile 16 ppm Cr uygulamasından elde edilmiştir. En düşük prolin içerikleri ise yaprak ve kökte sırasıyla 54.830 ve 35.715 nmol/g taze ağırlık ile kontrol uygulamasından elde edilmiştir.

Tablo 3.5. Cr dozlarının uygulandığı sorgum bitkisine ait prolin içerikleri (nmol/g taze ağırlık)

Cr Dozları	Yaprak	Kök
Kontrol	54.830 c	35.715 d
2 ppm	79.210 c	86.460 c
4 ppm	80.590 c	109.698 b
8 ppm	83.540 c	118.149 b
16 ppm	86.970 c	163.069 a
32 ppm	361.240 b	112.893 b
64 ppm	1137.36 a	72.524 c
Önem derecesi	**	**

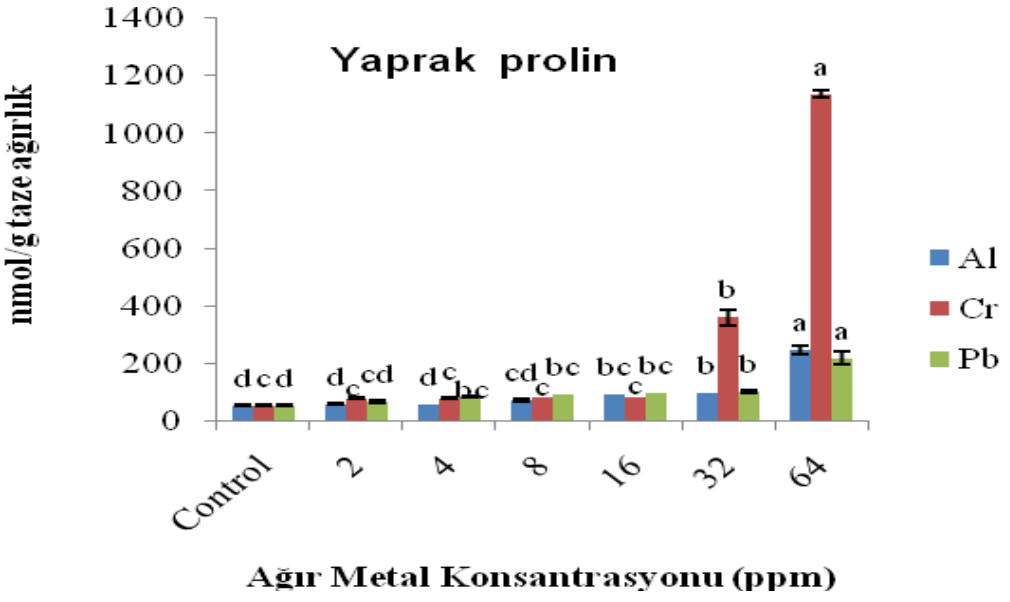
*p≤0.05; **p≤0.01

Pb uygulanan sorgum bitkisinin yaprak ve köklerinde bulunan prolin içerikleri Tablo 3. 6.' da verilmiştir. Tablo 3. 6. incelendiğinde yaprak ve kökte Pb dozu artışı ile birlikte prolin içeriği artış göstermiştir. En yüksek prolin içeriği yaprakta ve kökte sırasıyla 2190.900 ve 98.344 nmol/g taze ağırlık ile 64 ppm Pb uygulamasından elde edilmiştir. En düşük prolin içerikleri ise yaprak ve kökte sırasıyla 54.830 ve 35.715 nmol/g taze ağırlık ile kontrol uygulamasından elde edilmiştir.

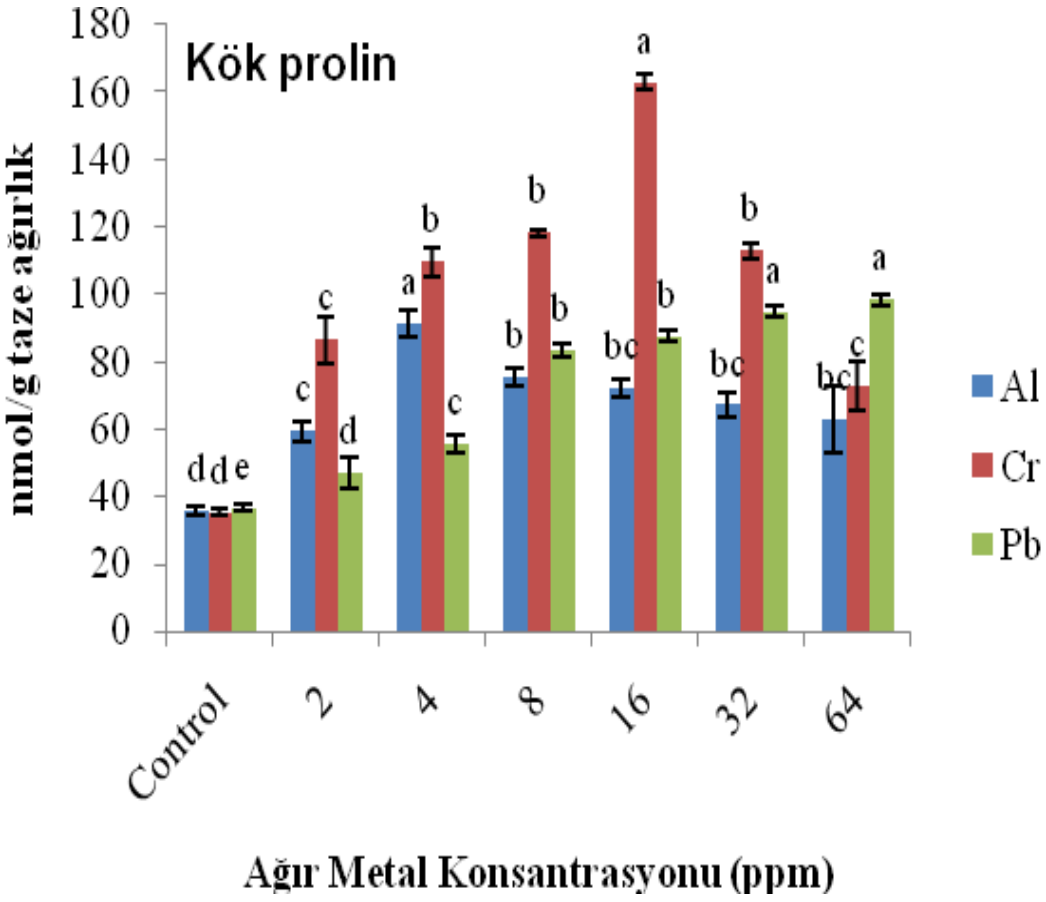
Tablo 3.6. Pb dozlarının uygulandığı sorgum bitkisine ait prolin içerikleri (nmol/g taze ağırlık)

Pb Dozları	**Yaprak**	**Kök**
Kontrol	54.830 d	35.715 e
2 ppm	70.460 cd	47.092 d
4 ppm	87.130 bc	55.450 c
8 ppm	92.710 bc	83.241 b
16 ppm	98.610 bc	87.570 b
32 ppm	104.900 b	94.960 a
64 ppm	2190.900 a	98.344 a
Önem derecesi	**	**

*p≤0.05; **p≤0.01



Şekil 2.13. Sorgum bitkisinin yapraklarındaki prolin seviyeleri



Şekil 2.14. Sorgum bitkisinin köklerindeki prolin seviyeleri

3.3. Cr, Al, Pb Uygulamasının Klorofil Miktarına Etkisi

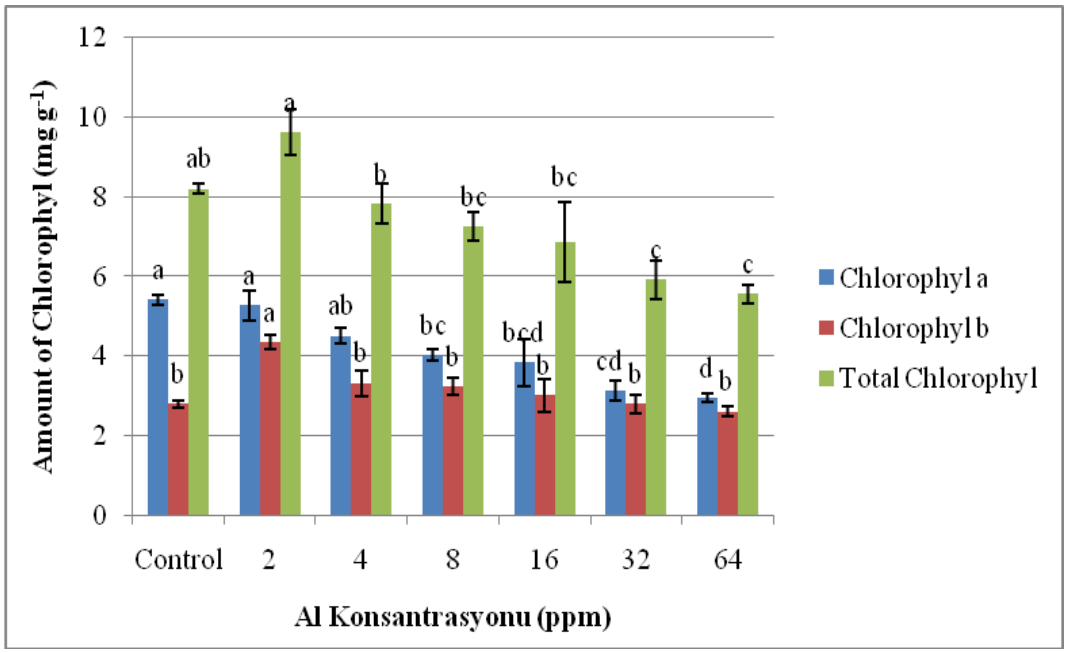
Sorgum bitkisine uygulanan Al ve Cr dozu uygulamalarının klorofil içeriğine etkisi %1 seviyesinde önemli ($p \leq 0.01$) olurken Pb dozu uygulamalarının klorofil a içeriğine etkisi %1, toplam klorofil içeriğine %5 seviyesinde önemli ($p \leq 0.05$) olmuş, klorofil b içeriğine etkisi istatistiksel olarak önemsiz çıkmıştır.

Sorgum bitkisine ait klorofil içerikleri Tablo 3. 7. 'de verilmiştir. Tablo 3. 7. incelendiğinde Al doz artışı ile hem klorofil a, hem klorofil b, hem de toplam klorofil içeriğinde azalmalar olduğu görülmektedir. Bununla birlikte en yüksek kolorofil b ve toplam klorofil içerikleri 2 ppm Al uygulamasından elde edilmiştir. Klorofil a içeriği 2.951-5.418 mg/g taze ağırlık klorofil b içeriği 2.601-4.352 mg/g taze ağırlık ve toplam klorofil içeriği 5.551-9.625 mg/g taze ağırlık arasında değişmiştir.

Tablo 3.7. Al dozlarının uygulandığı sorgum bitkisine ait klorofil içerikleri (mg/g taze ağırlık)

Al Dozları	Klorofil a	Klorofil b	Toplam Klorofil
Kontrol	5.418 a	2.787 b	8.205 ab
2 ppm	5.272 a	4.352 a	9.625 a
4 ppm	4.505 ab	3.322 b	7.827 b
8 ppm	4.024 bc	3.235 b	7.259 bc
16 ppm	3.840 bc	3.015 b	6.855 bc
32 ppm	3.123 cd	2.793 b	5.915 c
64 ppm	2.951 d	2.601 b	5.551 c
Önem derecesi	**	**	**

*p≤0.05; **p≤0.01



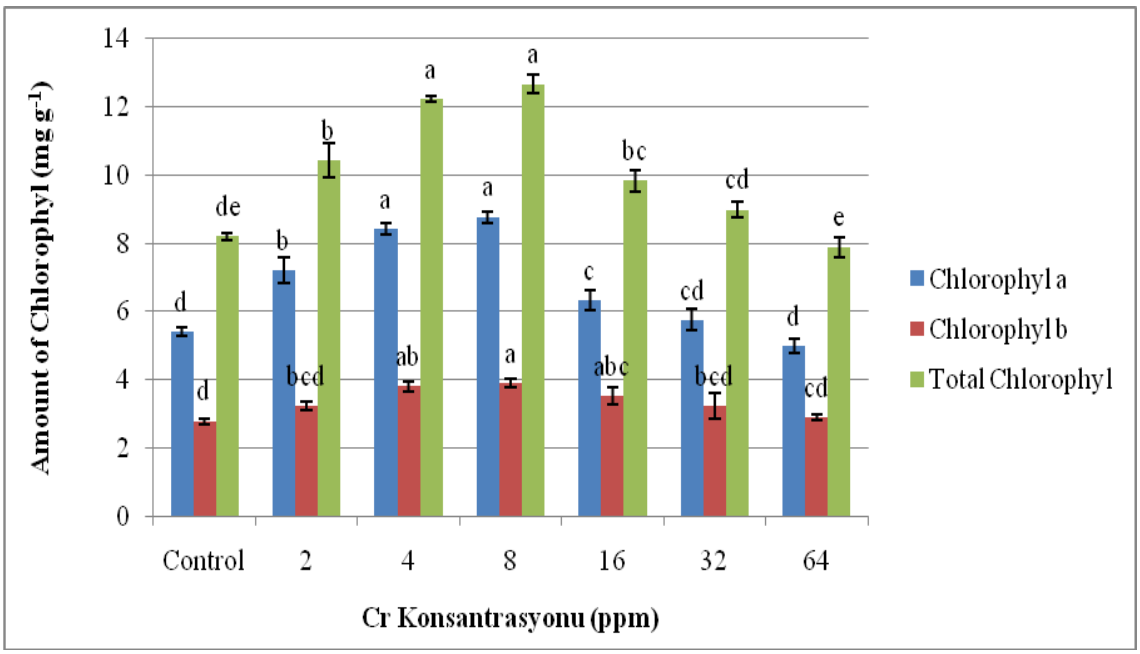
Şekil 2.15. Sorgum bitkisinin Al içeriğine bağlı klorofil seviyeleri

Sorgum bitkisine ait klorofil içerikleri Tablo 3. 8. ' de verilmiştir. Tablo 3. 8. incelendiğinde Cr doz artışı ile hem klorofil a, hem klorofil b, hem de toplam klorofil içeriğinde önce artışlar olduğu sonra azalmalar olduğu görülmektedir. Bununla birlikte en yüksek kolorofil a, klorofil b ve toplam klorofil içerikleri 8 ppm Cr uygulamasından elde edilmiştir. Klorofil a içeriği 4.988 -8.781 mg/g taze ağırlık klorofil b içeriği 2.787 - 3.895 mg/g taze ağırlık ve toplam klorofil içeriği 7.889 -12.676 mg/g taze ağırlık arasında değişmiştir.

Tablo 3.8. Cr dozlarının uygulandığı sorgum bitkisine ait klorofil içerikleri (mg/g taze ağırlık)

Cr Dozları	Klorofil a	Klorofil b	Toplam Klorofil
Kontrol	5.418 d	2.787 d	8.205 de
2 ppm	7.216 b	3.220 bcd	10.435 b
4 ppm	8.433 a	3.796 ab	12.229 a
8 ppm	8.781 a	3.895 a	12.676 a
16 ppm	6.324 c	3.513 abc	9.837 bc
32 ppm	5.749 cd	3.230 bcd	8.979 cd
64 ppm	4.988 d	2.901 cd	7.889 e
Önem derecesi	**	**	**

*p≤0.05; **p≤0.01



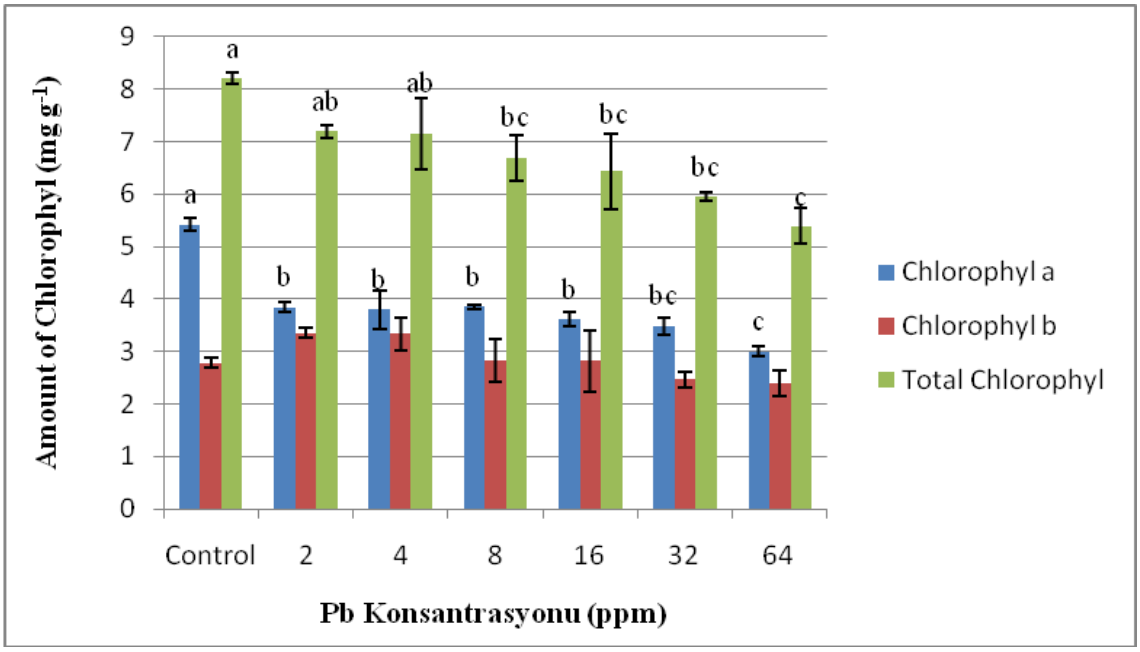
Şekil 2.16. Sorgum bitkisinin Cr içeriğine bağlı klorofil seviyeleri

Sorgum bitkisine ait klorofil içerikleri Tablo 3. 9. ' da verilmiştir. Tablo 3. 9. incelendiğinde Pb doz artışı ile klorofil a ve toplam klorofil içeriğinde azalmalar olduğu görülmektedir. Bununla birlikte en yüksek kolorofil a ve toplam klorofil içerikleri kontrol uygulamasından elde edilmiştir. Klorofil b içeriği istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Klorofil a içeriği 3.000 -5.418 mg/g taze ağırlık klorofil b içeriği 2.385 - 3.358 mg/g taze ağırlık ve toplam klorofil içeriği 5.386 -8.205 mg/g taze ağırlık arasında değişmiştir.

Tablo 3.9. Pb dozlarının uygulandığı sorgum bitkisine ait klorofil içerikleri (mg/g taze ağırlık)

Cr Dozları	Klorofil a	Klorofil b	Toplam Klorofil
Control	5.418 a	2.787	8.205 a
2 ppm	3.842 b	3.358	7.199 ab
4 ppm	3.799 b	3.339	7.139 ab
8 ppm	3.851 b	2.828	6.679 bc
16 ppm	3.621 b	2.815	6.436 bc
32 ppm	3.486 bc	2.462	5.948 bc
64 ppm	3.000 c	2.385	5.386 c
Önem derecesi	**	***NS***	*

*p≤0.05; **p≤0.01



Şekil 2. 17. Sorgum bitkisinin Pb içeriğine bağlı klorofil seviyeleri

3.4. Cr, Al, Pb Stresinin Antioksidan Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

3.4.1. Katalaz'a Ait Bulgular

Sorgum bitkisine uygulanan Al dozları hem yapraktaki hem de kökteki katalaz içeriğine etkisi istatistiksel olarak çok önemli çıkmıştır (Tablo 3.10.).

Sorgum bitkisine uygulanan Cr dozları hem yapraktaki hem de kökteki katalaz içeriğine etkisi etkisi %1 seviyesinde önemli ($p \leq 0.01$) çıkmıştır (Tablo 3. 11.).

Sorgum bitkisine uygulanan Pb dozları hem yapraktaki hem de kökteki katalaz içeriğine etkisi etkisi %1 seviyesinde önemli ($p \leq 0.01$) çıkmıştır (Tablo 3. 12.).

Al uygulanan sorgum bitkisinin yaprak ve köklerinde bulunan katalaz içerikleri Tablo 3. 10. ' da verilmiştir. Tablo 3. 10. incelendiğinde Al dozu artışı ile birlikte katalaz içeriği artmış daha sonra azalmaya başlamıştır. En yüksek katalaz içeriği yaprak 0.040 ünite/mg protein ile 16 ppm Al uygulamasından elde edilirken, kökte 0.045 ünite/mg protein ile 8 ppm Al uygulamasından elde edilmiştir. En düşük katalaz içerikleri ise yaprak ve kökte sırasıyla 0.008 ve 0.023 ünite/mg protein ile kontrol uygulamasından elde edilmiştir.

Tablo 3.10. Al dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki katalaz içerikleri (ünite/mg protein)

Al Dozları	**Yaprak**	**Kök**
Kontrol	0.008 f	0.023 d
2 ppm	0.015 e	0.024 d
4 ppm	0.019 d	0.039 b
8 ppm	0.033 b	0.045 a
16 ppm	0.040 a	0.033 c
32 ppm	0.024 c	0.027 d
64 ppm	0.020 d	0.025 d
Önem derecesi	**	**

*$p \leq 0.05$; **$p \leq 0.01$

Cr uygulanan sorgum bitkisinin yaprak ve köklerinde bulunan katalaz içerikleri Tablo 3. 11. ' de verilmiştir. Tablo 3. 11. incelendiğinde Cr dozu artışı ile birlikte katalaz içeriği artmış daha sonra azalmıştır. En yüksek katalaz içeriği yaprakta 0.215 ünite/mg protein ve kökte 0.319 ünite/mg protein ile 16 ppm Cr uygulamasından elde edilmiştir. En düşük katalaz içerikleri ise yaprak ve kökte sırasıyla 0.019 ve 0.023 ünite/mg protein ile kontrol uygulamasından elde edilmiştir.

Tablo 3.11. Cr dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki katalaz içerikleri (ünite/mg protein)

Cr Dozları	Yaprak	Kök
Kontrol	0.019 d	0.023 e
2 ppm	0.052 cd	0.062 d
4 ppm	0.084 c	0.138 bc
8 ppm	0.084 c	0.151 b
16 ppm	0.215 a	0.319 a
32 ppm	0.148 b	0.135 c
64 ppm	0.033 d	0.028 e
Önem derecesi	**	**

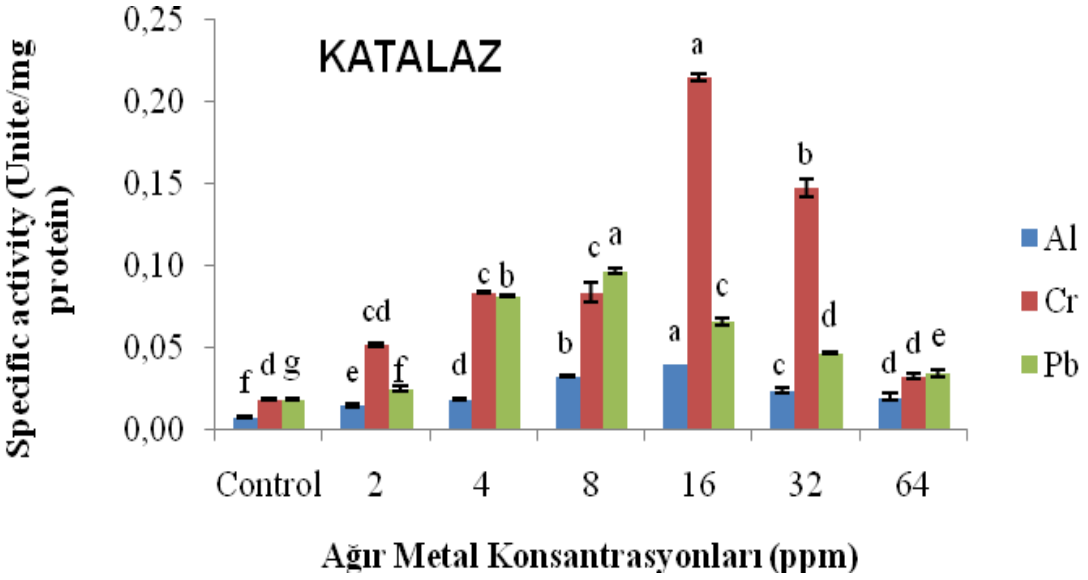
*p≤0.05; **p≤0.01

Pb uygulanan sorgum bitkisinin yaprak ve köklerinde bulunan katalaz içerikleri Tablo 3. 12. ' de verilmiştir. Tablo 3. 12. incelendiğinde yaprakta, Pb dozu artışı ile birlikte katalaz içeriği artmış daha sonra azalmış, kökte ise artmaya başlamıştır. En yüksek katalaz içeriği yaprakta 0.097 ünite/mg protein ile 8 ppm Pb uygulamasından ve kökte 0.114 ünite/mg protein ile 64 ppm Pb uygulamasından elde edilmiştir. En düşük katalaz içerikleri ise yaprak ve kökte sırasıyla 0.019 ve 0.0233 ünite/mg protein ile kontrol uygulamasından elde edilmiştir.

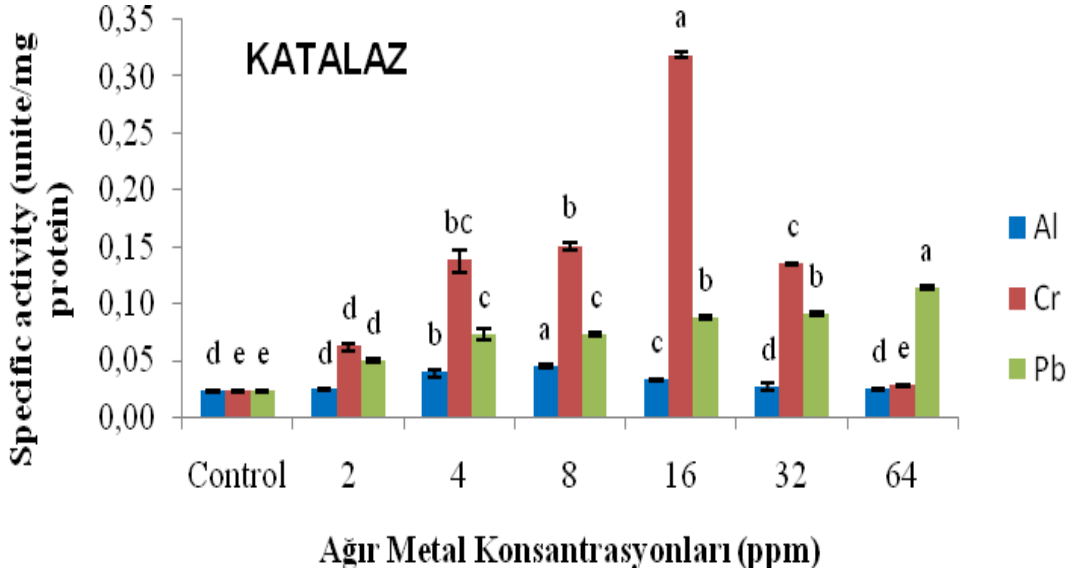
Tablo 3.12. Pb dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki katalaz içerikleri (ünite/mg protein)

Pb Dozları	Yaprak	Kök
Control	0.019 g	0.0233 e
2 ppm	0.025 f	0.050 d
4 ppm	0.082 b	0.0733 c
8 ppm	0.097 a	0.0733 c
16 ppm	0.066 c	0.088 b
32 ppm	0.047 d	0.091 b
64 ppm	0.035 e	0.114 a
Önem derecesi	**	**

*p≤0.05; **p≤0.01



Şekil 2.18. Sorgum bitkisinin yapraklarındaki katalaz seviyeleri



Şekil 2. 19. Sorgum bitkisinin köklerindeki katalaz seviyeleri

3.4.2. Askorbat Peroksidaz' a Ait Bulgular

Sorgum bitkisine uygulanan Al dozları hem yapraktaki hem de kökteki AP içeriğine etkisi etkisi %1 seviyesinde önemli ($p \leq 0.01$) çıkmıştır (Tablo 3. 13.).

Sorgum bitkisine uygulanan Cr dozları hem yapraktaki hem de kökteki AP içeriğine etkisi etkisi %1 seviyesinde önemli ($p \leq 0.01$) çıkmıştır (Tablo 3. 14.).

Sorgum bitkisine uygulanan Pb dozları hem yapraktaki hem de kökteki AP içeriğine etkisi etkisi %1 seviyesinde önemli ($p \leq 0.01$) çıkmıştır (Tablo 3. 15.).

Al uygulanan sorgum bitkisinin yaprak ve köklerinde bulunan AP içerikleri Tablo 3. 13. ' te verilmiştir. Tablo 3. 13. incelendiğinde Al dozu artışı ile birlikte yaprakta AP içeriği artış ve azalışlarında dalgalanmalar olmuş, kökte ise önce artmış daha sonra azalmaya başlamıştır. En yüksek AP içeriği yaprakta ve kökte sırasıyla 0.437 ve 0.244 ünite/mg protein ile 16 ppm Al uygulamasından elde edilmiştir. En düşük AP içerikleri ise yaprak ve kökte sırasıyla 0.027 ve 0.057 ünite/mg protein ile kontrol uygulamasından elde edilmiştir.

Tablo 3.13. Al dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki AP içerikleri (ünite/mg protein)

Al Dozları	**Yaprak**	**Kök**
Kontrol	0.027 f	0.057 d
2 ppm	0.093 d	0.114 c
4 ppm	0.241 c	0.224 a
8 ppm	0.034 b	0.233 a
16 ppm	0.437 a	0.244 a
32 ppm	0.064 e	0.147 b
64 ppm	0.042 f	0.117 c
Önem derecesi	**	**

*$p \leq 0.05$; **$p \leq 0.01$

Cr uygulanan sorgum bitkisinin yaprak ve köklerinde bulunan AP içerikleri Tablo 3. 1 4' te verilmiştir. Tablo 3. 14. incelendiğinde Cr dozu artışı ile birlikte yaprakta ve kökte AP içeriği önce artmış daha sonra azalmaya başlamıştır. En yüksek AP içeriği yaprakta 0.440 ünite/mg protein ile 8 ppm Cr uygulamasından elde edilmiş ve kökte 1.278 ünite/mg protein ile 16 ppm Cr uygulamasından elde edilmiştir. En düşük AP içerikleri ise yaprak ve kökte sırasıyla 0.026 ve 0.057 ünite/mg protein ile kontrol uygulamasından elde edilmiştir.

Tablo 3.14. Cr dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki AP içerikleri (ünite/mg protein)

Cr Dozları	Yaprak	Kök
Kontrol	0.026 f	0.057 g
2 ppm	0.183 d	0.369 e
4 ppm	0.315 b	0.732 d
8 ppm	0.440 a	1.242 b
16 ppm	0.266 c	1.278 a
32 ppm	0.233 c	0.926 c
64 ppm	0.103 e	0.233 f
Önem derecesi	**	**

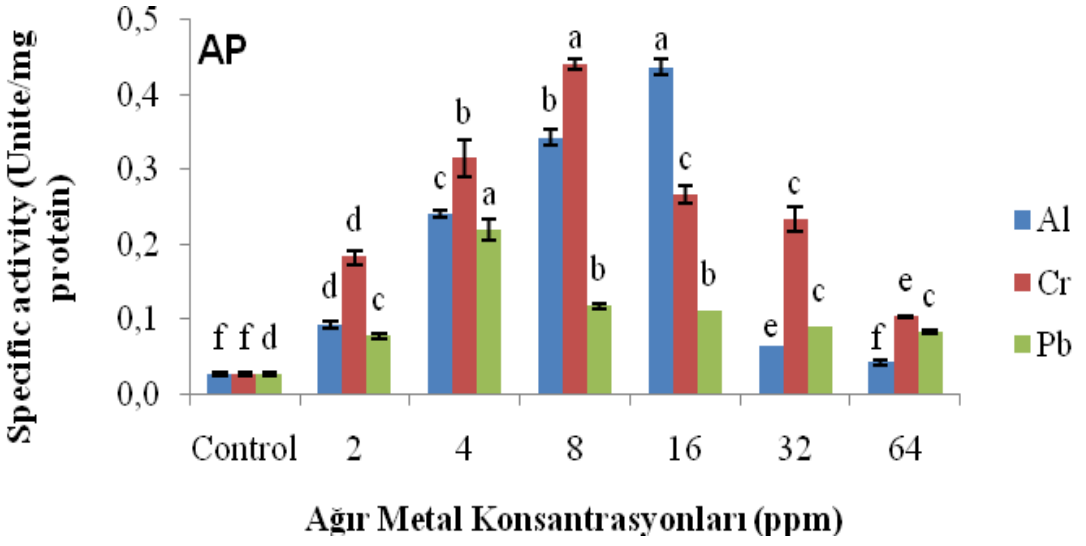
*p≤0.05; **p≤0.01

Pb uygulanan sorgum bitkisinin yaprak ve köklerinde bulunan AP içerikleri Tablo 3. 15.' te verilmiştir. Tablo 3. 15. incelendiğinde Pb dozu artışı ile birlikte yaprakta ve kökte AP içeriği önce artmış daha sonra azalmaya başlamıştır. En yüksek AP içeriği yaprakta 0.220 ünite/mg protein ile 4 ppm Pb uygulamasından elde edilmiş ve kökte 0.187 ünite/mg protein ile 16 ppm Pb uygulamasından elde edilmiştir. En düşük AP içerikleri ise yaprak ve kökte sırasıyla 0.027 ve 0.057 ünite/mg protein ile kontrol uygulamasından elde edilmiştir.

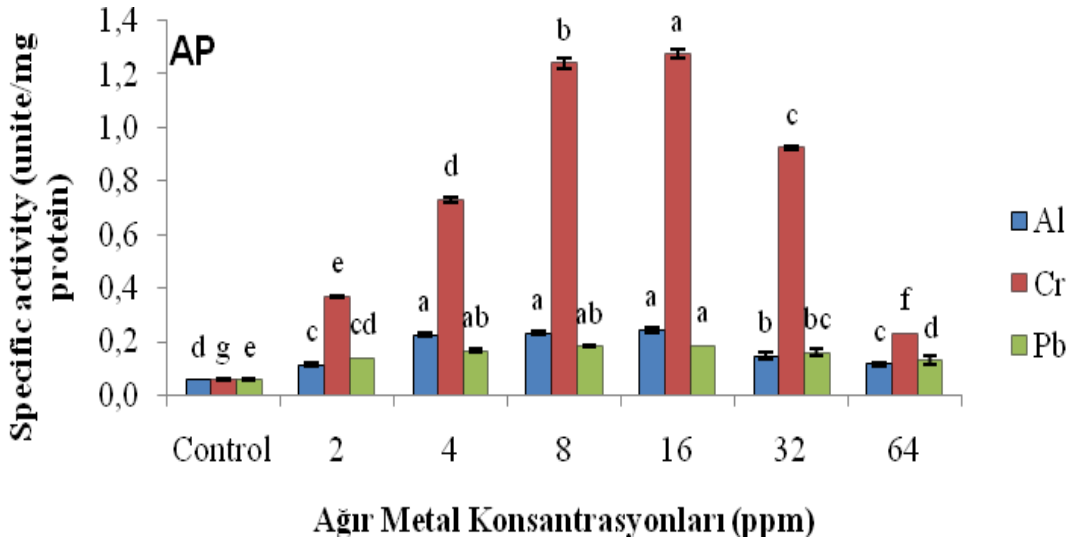
Tablo 3.15. Pb dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki AP içerikleri (ünite/mg protein)

Pb Dozları	Yaprak	Kök
Kontrol	0.027 d	0.057 e
2 ppm	0.077 c	0.140 cd
4 ppm	0.220 a	0.166 ab
8 ppm	0.117 b	0.182 ab
16 ppm	0.110 b	0.187 a
32 ppm	0.090 c	0.161 bc
64 ppm	0.083 c	0.131 d
Önem derecesi	**	**

*p≤0.05; **p≤0.01



Şekil 2. 20. Sorgum bitkisinin yapraklarındaki AP seviyeleri



Şekil 2. 21. Sorgum bitkisinin köklerindeki AP seviyeleri

3.4.3. Glutatyon Redüktaz'a Ait Bulgular

Sorgum bitkisine uygulanan Al dozları hem yapraktaki hem de kökteki GR içeriğine etkisi etkisi %1 seviyesinde önemli ($p \leq 0.01$) çıkmıştır (Tablo 3. 16.).

Sorgum bitkisine uygulanan Cr dozları hem yapraktaki hem de kökteki GR içeriğine etkisi etkisi %1 seviyesinde önemli ($p \leq 0.01$) çıkmıştır (Tablo 3. 17.).

Sorgum bitkisine uygulanan Pb dozları hem yapraktaki hem de kökteki GR içeriğine etkisi etkisi %1 seviyesinde önemli ($p \leq 0.01$) çıkmıştır (Tablo 3.18.).

Al uygulanan sorgum bitkisinin yaprak ve köklerinde bulunan GR içerikleri Tablo 3. 16. ' da verilmiştir. Tablo 3. 16. incelendiğinde Al dozu artışı ile birlikte GR içeriği artmaya başlamıştır. En yüksek GR içeriği yaprakta ve kökte sırasıyla 0.738 ve 0.828 ünite/mg protein ile 64 ppm Al uygulamasından elde edilmiştir. En düşük GR içerikleri ise yaprak ve kökte sırasıyla 0.115 ve 0.024 ünite/mg protein ile kontrol uygulamasından elde edilmiştir.

Tablo 3.16. Al dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki GR içerikleri (ünite/mg protein)

Al Dozları	**Yaprak**	**Kök**
Kontrol	0.115 e	0.024 g
2 ppm	0.125 e	0.060 f
4 ppm	0.234 d	0.173 e
8 ppm	0.362 c	0.275 d
16 ppm	0.499 b	0.340 c
32 ppm	0.716 a	0.679 b
64 ppm	0.738 a	0.828 a
Önem derecesi	**	**

*$p \leq 0.05$; **$p \leq 0.01$

Cr uygulanan sorgum bitkisinin yaprak ve köklerinde bulunan GR içerikleri Tablo 3. 17. ' de verilmiştir. Tablo 3. 17. incelendiğinde Cr dozu artışı ile birlikte GR içeriği önce artmış daha sonra azalmıştır. En yüksek GR içeriği yaprakta 0.503 ünite/mg protein ile 16 ppm Cr uygulamasından elde edilirken, kökte ise 1.166 ünite/mg protein ile 32 ppm Cr uygulamasından elde edilmiştir. En düşük GR içerikleri ise yaprak ve kökte sırasıyla 0.115 ve 0.024 ünite/mg protein ile kontrol uygulamasından elde edilmiştir.

Tablo 3. 17. Cr dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki GR içerikleri (ünite/mg protein)

Cr Dozları	Yaprak	Kök
Kontrol	0.115 f	0.024 e
2 ppm	0.164 e	0.125 d
4 ppm	0.258 d	0.343 c
8 ppm	0.465 b	0.367 c
16 ppm	0.503 a	0.831 b
32 ppm	0.325 c	1.166 a
64 ppm	0.264 d	0.341 c
Önem derecesi	**	**

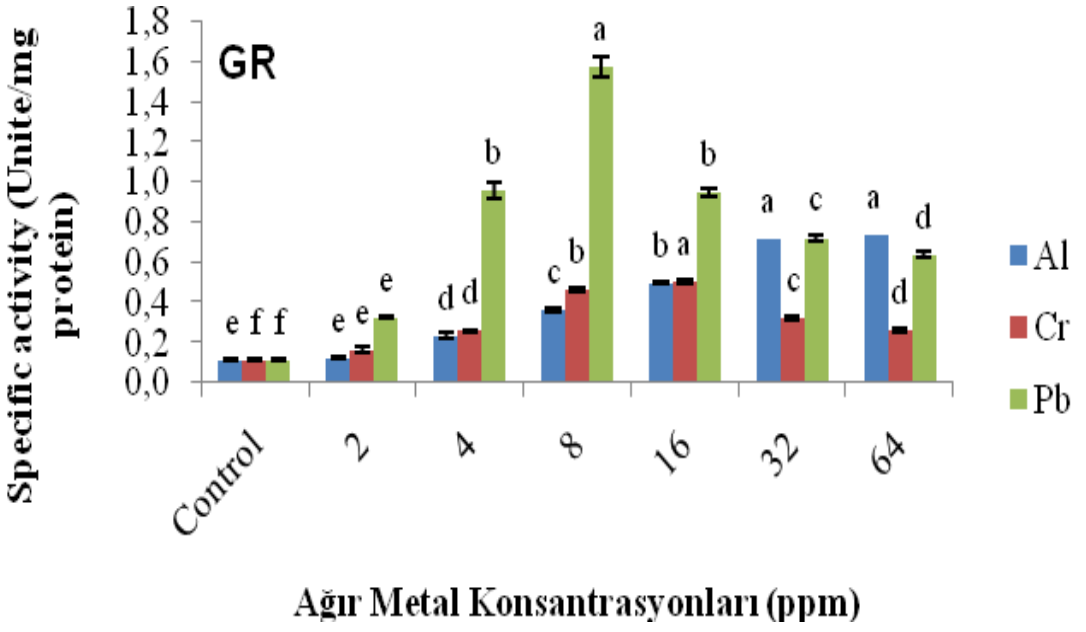
*p≤0.05; **p≤0.01

Pb uygulanan sorgum bitkisinin yaprak ve köklerinde bulunan GR içerikleri Tablo 3. 18. ' de verilmiştir. Tablo 3. 18. incelendiğinde Pb dozu artışı ile birlikte GR içeriği yaprakta önce artmış daha sonra azalmıştır, kökte ise artamaya başlamıştır. En yüksek GR içeriği yaprakta 1.573 ünite/mg protein ile 8 ppm Pb uygulamasından elde edilirken, kökte ise 0.584 ünite/mg protein ile 64 ppm Pb uygulamasından elde edilmiştir. En düşük GR içerikleri ise yaprak ve kökte sırasıyla 0.113 ve 0.024 ünite/mg protein ile kontrol uygulamasından elde edilmiştir.

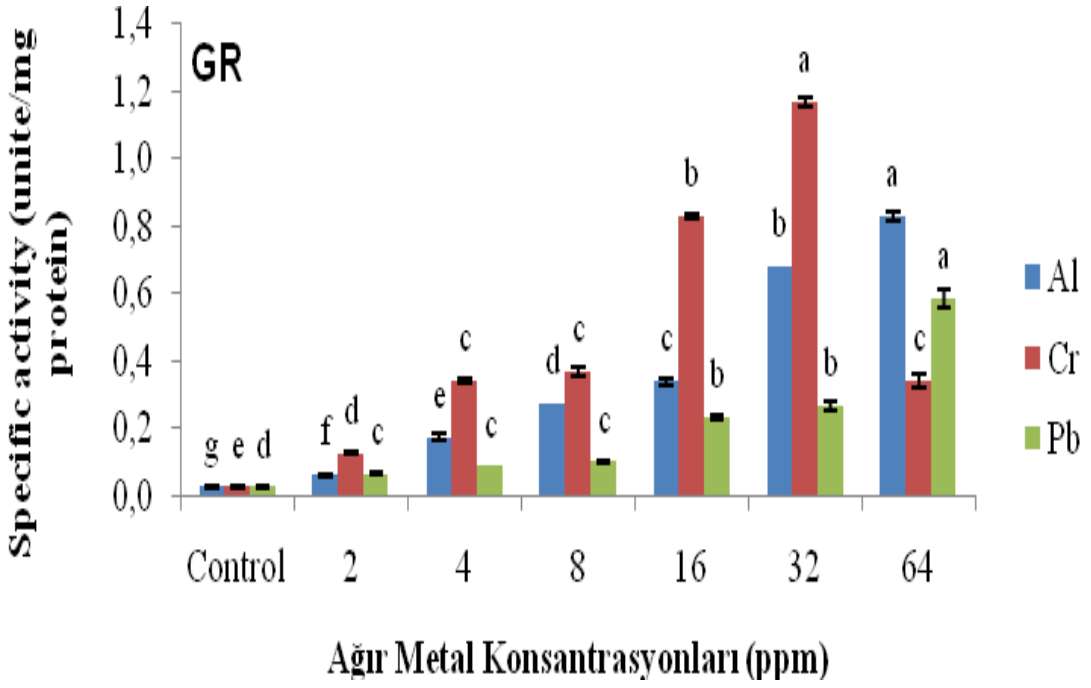
Tablo 3.18. Pb dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki GR içerikleri (ünite/mg protein)

Pb Dozları	Yaprak	Kök
Kontrol	0.113f	0.024 d
2 ppm	0.327 e	0.064 c
4 ppm	0.960 b	0.085 c
8 ppm	1.573 a	0.100 c
16 ppm	0.950 b	0.232 b
32 ppm	0.723 c	0.266 b
64 ppm	0.640 d	0.584 a
Önem derecesi	**	**

*p≤0.05; **p≤0.01



Şekil 2. 22. Sorgum bitkisinin yapraklarındaki GR seviyeleri



Şekil 2. 23. Sorgum bitkisinin köklerindeki GR seviyeleri

3.4.4. Glutatyon S-Transferaz'a Ait Bulgular

Sorgum bitkisine uygulanan Al dozları hem yapraktaki hem de kökteki GST içeriğine etkisi etkisi %1 seviyesinde önemli ($p \leq 0.01$) çıkmıştır (Tablo 3. 19.).

Sorgum bitkisine uygulanan Cr dozları hem yapraktaki hem de kökteki GST içeriğine etkisi etkisi %1 seviyesinde önemli ($p \leq 0.01$) çıkmıştır (Tablo 3. 20.).

Sorgum bitkisine uygulanan Pb dozları hem yapraktaki hem de kökteki GST içeriğine etkisi etkisi %1 seviyesinde önemli ($p \leq 0.01$) çıkmıştır (Tablo 3. 21.).

Al uygulanan sorgum bitkisinin yaprak ve köklerinde bulunan GST içerikleri Tablo 3. 19. ' da verilmiştir. Tablo 3. 19. incelendiğinde Al dozu artışı ile birlikte GST içeriği önce artmış daha sonra azalmıştır. En yüksek GST içeriği yaprakta 3.532 ünite/mg protein ile 4 ppm Al uygulamasından elde edilirken, kökte 4.099 ünite/mg protein ile 16 ppm Al uygulamasından elde edilmiştir. En düşük GST içerikleri ise yaprak ve kökte sırasıyla 0.386 ve 0.340 ünite/mg protein ile kontrol uygulamasından elde edilmiştir.

Tablo 3. 19. Al dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki GST içerikleri (ünite/mg protein)

Al Dozları	**Yaprak**	**Kök**
Kontrol	0.386 f	0.340 f
2 ppm	1.474 c	2.090 e
4 ppm	3.532 a	3.183 c
8 ppm	2.718 b	3.601 b
16 ppm	1.494 c	4.099 a
32 ppm	1.322 d	2.684 d
64 ppm	1.043 e	1.887 e
Önem derecesi	****	****

*$p \leq 0.05$; **$p \leq 0.01$

Cr uygulanan sorgum bitkisinin yaprak ve köklerinde bulunan GST içerikleri Tablo 3. 20 'de verilmiştir. Tablo 3. 20. incelendiğinde Cr dozu artışı ile birlikte GST içeriği önce artmış daha sonra azalmıştır. En yüksek GST içeriği yaprakta 2.184 ünite/mg protein ile 8 ppm Cr uygulamasından elde edilirken, kökte 4.269 ünite/mg protein ile 16 ppm Cr uygulamasından elde edilmiştir. En düşük GST içerikleri ise yaprak ve kökte sırasıyla 0.386 ve 0.340 ünite/mg protein ile kontrol uygulamasından elde edilmiştir.

Tablo 3.20. Cr dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki GST içerikleri (ünite/mg protein)

Cr Dozları	Yaprak	Kök
Kontrol	0.386 d	0.340 f
2 ppm	0.782 c	1.122 d
4 ppm	1.511 b	1.435 c
8 ppm	2.184 a	2.236 b
16 ppm	1.345 b	4.269 a
32 ppm	0.820 c	1.528 c
64 ppm	0.470 d	0.920 e
Önem derecesi	**	**

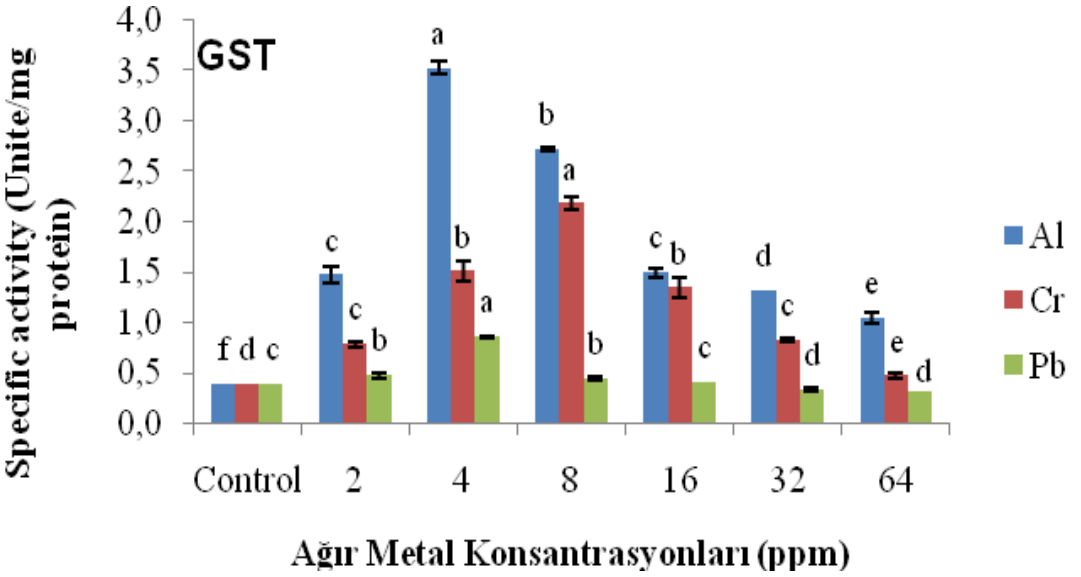
*p≤0.05; **p≤0.01

Pb uygulanan sorgum bitkisinin yaprak ve köklerinde bulunan GST içerikleri Tablo 3. 21. ' de verilmiştir. Tablo 3. 21. incelendiğinde Pb dozu artışı ile birlikte yaprakta GST içeriği önce artmış daha sonra azalmış, kökte ise artmaya devam etmiştir. En yüksek GST içeriği yaprakta 0.857 ünite/mg protein ile 4 ppm Pb uygulamasından elde edilirken, kökte 0.748 ünite/mg protein ile 64 ppm Pb uygulamasından elde edilmiştir. En düşük GST içerikleri yaprakta 0.387 ünite/mg protein ile 64 ppm Pb uygulamasından elde edilirken, kökte 0.137 ünite/mg protein ile kontrol uygulamasından elde edilmiştir.

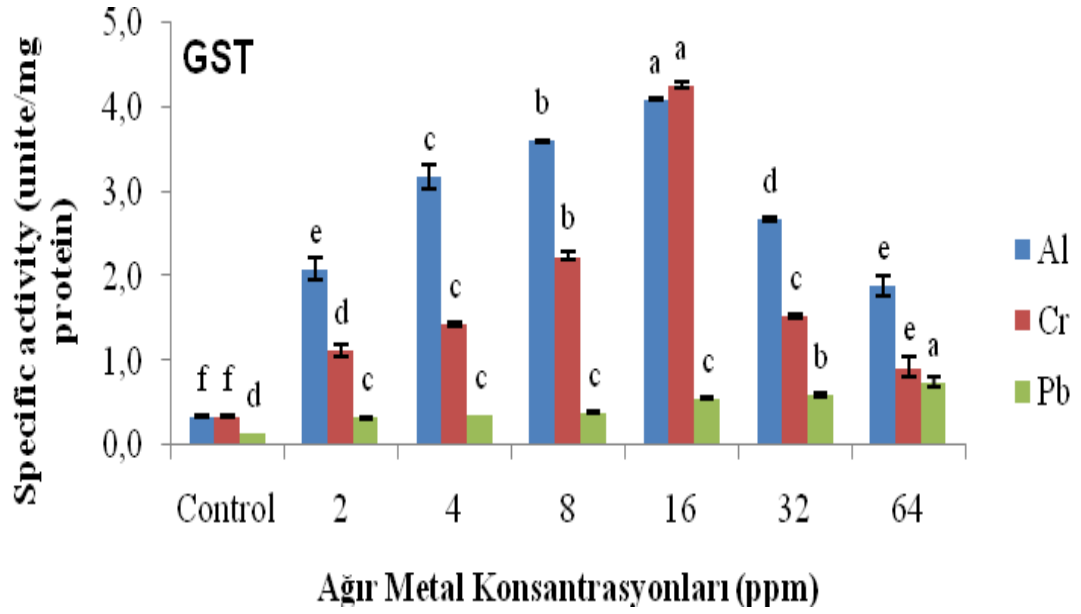
Tablo 3.21. Pb dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki GST içerikleri (ünite/mg protein)

Pb Dozları	Yaprak	Kök
Kontrol	0.387 c	0.137 d
2 ppm	0.473 b	0.330 c
4 ppm	0.857 a	0.352 c
8 ppm	0.447 b	0.385 c
16 ppm	0.408 c	0.559 c
32 ppm	0.333 d	0.592 b
64 ppm	0.317 d	0.748 a
Önem derecesi	**	**

*p≤0.05; **p≤0.01



Şekil 2.24. Sorgum bitkisinin yapraklarındaki GST seviyeleri



Şekil 2.25. Sorgum bitkisinin köklerindeki GST seviyeleri

3.4.5. Süperoksit Dismutaz'a Ait Bulgular

Sorgum bitkisine uygulanan Al dozları hem yapraktaki hem de kökteki SOD içeriğine etkisi etkisi %1 seviyesinde önemli ($p \leq 0.01$) çıkmıştır (Tablo 3. 22.).

Sorgum bitkisine uygulanan Cr dozları hem yapraktaki hem de kökteki SOD içeriğine etkisi etkisi %1 seviyesinde önemli ($p \leq 0.01$) çıkmıştır (Tablo 3. 23.).

Sorgum bitkisine uygulanan Pb dozları hem yapraktaki hem de kökteki SOD içeriğine etkisi etkisi %1 seviyesinde önemli ($p \leq 0.01$) çıkmıştır (Tablo 3. 24.).

Al uygulanan sorgum bitkisinin yaprak ve köklerinde bulunan SOD içerikleri Tablo 3. 22 ' de verilmiştir. Tablo 3. 22. incelendiğinde Al dozu artışı ile birlikte SOD içeriği yaprakta önce artmış daha sonra azalmış, kökte ise artmaya devam etmiştir. En yüksek SOD içeriği yaprakta 0.386 ünite/mg protein ile 8 ppm Al uygulamasından elde edilirken, kökte 0.889 ünite/mg protein ile 64 ppm Al uygulamasından elde edilmiştir. En düşük SOD içerikleri ise yaprak ve kökte sırasıyla 0.042 ve 0.060 ünite/mg protein ile kontrol uygulamasından elde edilmiştir.

Tablo 3.22. Al dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki SOD içerikleri (ünite/mg protein)

Al Dozları	**Yaprak**	**Kök**
Kontrol	0.042 g	0.060 f
2 ppm	0.146 e	0.256 e
4 ppm	0.273 c	0.272 de
8 ppm	0.386 a	0.292 d
16 ppm	0.321 b	0.359 c
32 ppm	0.228 d	0.829 b
64 ppm	0.088 f	0.889 a
Önem derecesi	**	**

*$p \leq 0.05$; **$p \leq 0.01$

Cr uygulanan sorgum bitkisinin yaprak ve köklerinde bulunan SOD içerikleri Tablo 3. 23'te verilmiştir. Tablo 3. 23. incelendiğinde Cr dozu artışı ile birlikte SOD içeriği yaprakta önce artmış daha sonra azalmış, kökte ise artmaya devam etmiştir. En yüksek SOD içeriği yaprakta 1.446 ünite/mg protein ile 8 ppm Cr uygulamasından elde edilirken, kökte 1.478 ünite/mg protein ile 64 ppm Cr uygulamasından elde edilmiştir. En düşük SOD içerikleri ise yaprak ve kökte sırasıyla 0.042 ve 0.060 ünite/mg protein ile kontrol uygulamasından elde edilmiştir.

Tablo 3.23. Cr dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki SOD içerikleri

Cr Dozları	Yaprak	Kök
Kontrol	0.042 f	0.060 e
2 ppm	0.483 d	0.583 d
4 ppm	1.286 b	0.821 c
8 ppm	1.446 a	0.845 c
16 ppm	0.939 c	1.412 b
32 ppm	0.272 e	1.447 ab
64 ppm	0.270 e	1.478 a
Önem derecesi	**	**

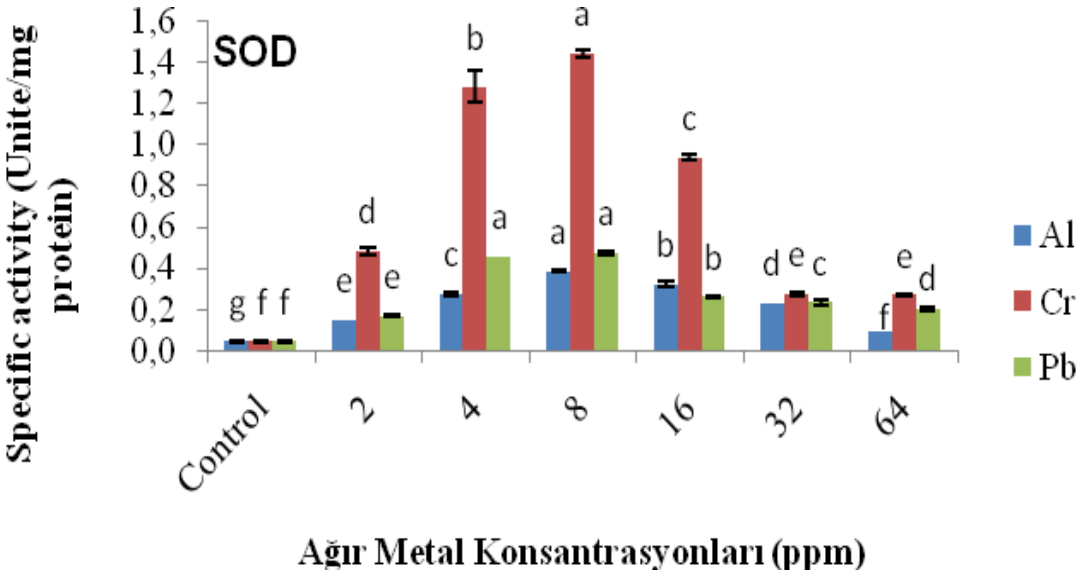
*p≤0.05; **p≤0.01

Pb uygulanan sorgum bitkisinin yaprak ve köklerinde bulunan SOD içerikleri Tablo 3. 24 ' te verilmiştir. Tablo 3. 24. incelendiğinde Pb dozu artışı ile birlikte SOD içeriği önce artmış daha sonra azalmıştır. En yüksek SOD içeriği yaprakta 0.477 ünite/mg protein ile 8 ppm Pb uygulamasından elde edilirken, kökte 0.387 ünite/mg protein ile 32 ppm Pb uygulamasından elde edilmiştir. En düşük SOD içerikleri ise yaprak ve kökte sırasıyla 0.043ve 0.060 ünite/mg protein ile kontrol uygulamasından elde edilmiştir.

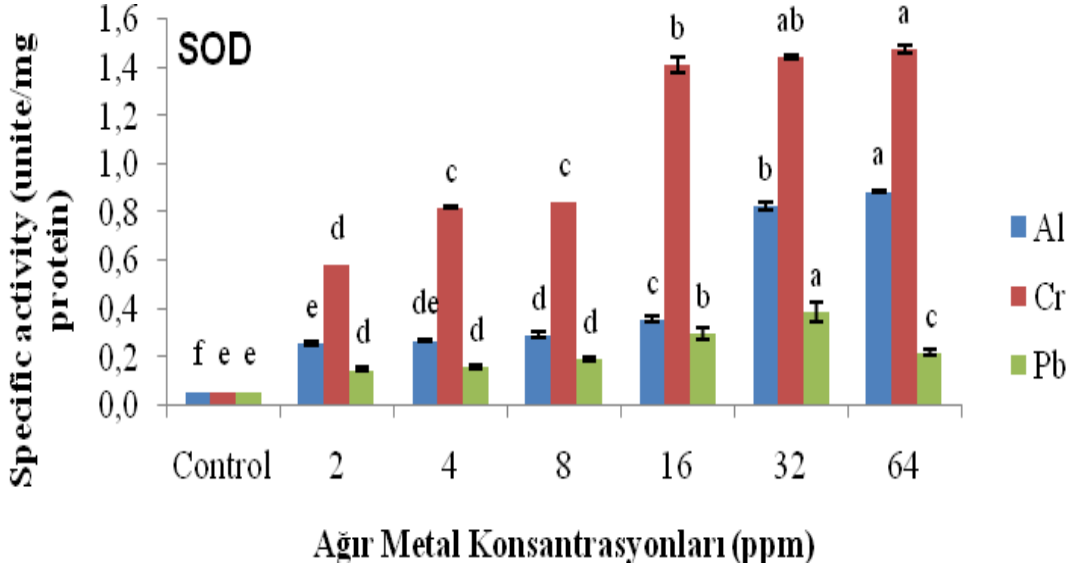
Tablo 3. 24. Pb dozlarının uygulandığı sorgum bitkisinin yaprak ve köklerindeki SOD içerikleri (ünite/mg protein)

Pb Dozları	Yaprak	Kök
Kontrol	0.043 f	0.060 e
2 ppm	0.167 e	0.150 d
4 ppm	0.453 a	0.160 d
8 ppm	0.477 a	0.193 d
16 ppm	0.260 b	0.299 b
32 ppm	0.233 c	0.387 a
64 ppm	0.197 d	0.220 c
Önem derecesi	**	**

*p≤0.05; **p≤0.01



Şekil 2.26. Sorgum bitkisinin yapraklarındaki SOD seviyeleri



Şekil 2.27. Sorgum bitkisinin köklerindeki SOD seviyeleri

3.4.6. Ağır Metal Uygulanmış Sorgum Bitkisinin Kök ve Yapraklarında Incelenen Özelliklere Ait Korelasyonlar

Tablo 3. 25. incelendiğinde MDA ve GR ile toplam klorofil içerikleri arasında olumsuz ve önemli bir ilişki olduğu, SOD ve CAT arasında MDA ile Prolin ve GR arasında olumlu ve önemli ilişkiler bulunmuştur.

Tablo 3.25. Al uygulaması yapılmış Sorgum bitkisinin yapraklarında incelenen özelliklere ait korelasyon tablosu

Al	Klorofil a	Klorofil b	Top.Kro.	CAT	MDA	Prolin	SOD	AP	GR	GST
Klorofil a	1									
Klorofil b	0.590	1								
Total Kro.	**0.941**	**0.829**	1							
CAT	-0.532	-0.131	-0.423	1						
MDA	**-0.963**	-0.428	**-0.847**	0.523	1					
Prolin	-0.729	-0.506	-0.718	0.082	**0.785**	1				
SOD	-0.263	0.125	-0.129	**0.835**	0.199	-0.302	1			
AP	-0.048	0.063	-0.007	0.591	0.135	-0.172	0.463	1		
GR	**-0.980**	-0.621	**-0.940**	0.456	**0.958**	**0.755**	0.121	0.019	1	
GST	-0.026	0.302	0.109	0.325	-0.019	-0.294	0.723	0.276	-0.161	1

**** Koyu renkli yazılmış olanlar %5seviyesinde önemli bulunmuştur.***

Cr uygulaması yapılmış sorgum yapraklarında toplam klorofil ile SOD, AP ve GST arasında, CAT ile GR arasında MDA ile Prolin arasında SOD ile AP ve GST arasında ve AP ile GST arasında olumlu ve önemli ilişkiler bulunmuştur (Tablo 3. 26.).

Tablo 3.26. Cr uygulaması yapılmış Sorgum bitkisinin yapraklarında incelenen özelliklere ait korelasyon tablosu

Cr	Klorofil a	Klorofil b	Top.Kro.	CAT	MDA	Prolin	SOD	AP	GR	GST
Klorofil a	1									
Klorofil b	**0.899**	1								
Total Kro.	**0.995**	**0.938**	1							
CAT	0.071	0.445	0.157	1						
MDA	-0.468	-0.160	-0.407	0.333	1					
Prolin	-0.577	-0.467	-0.562	-0.256	**0.815**	1				
SOD	**0.892**	**0.970**	**0.926**	0.337	-0.178	-0.400	1			
AP	**0.839**	**0.967**	**0.883**	0.465	-0.033	-0.365	**0.916**	1		
GR	0.311	0.654	0.394	**0.775**	0.381	-0.067	0.639	0.736	1	
GST	**0.868**	**0.963**	**0.905**	0.390	-0.183	-0.445	**0.961**	**0.965**	0.722	1

**** Koyu renkli yazılmış olanlar %5seviyesinde önemli bulunmuştur.***

Pb uygulaması yapılmış sorgum bitkisinde incelenen özelliklere ait korelasyon değerleri Tablo 3. 27.' de verilmiştir. Tablo ya göre MDA ve toplam klorofil arasında olumsuz ve önemli bir ilişki bulunmuştur. CAT ile SOD ve GR arasında SOD ile AP ve GR arasında ve AP ile GST arasında olumlu ve önemli ilişkiler belirlenmiştir.

Tablo 3.27. Pb uygulaması yapılmış Sorgum bitkisinin yapraklarında incelenen özelliklere ait korelasyon tablosu

Pb	Klorofil a	Klorofil b	Top.Kro.	CAT	MDA	Prolin	SOD	AP	GR	GST
Klorofil a	1									
Klorofil b	0.243	1								
Total Kro.	**0.916**	0.612	1							
CAT	-0.301	0.168	-0.175	1						
MDA	-0.707	**-0.815**	**-0.913**	-0.117	1					
Prolin	-0.522	-0.549	-0.653	-0.255	0.718	1				
SOD	-0.409	0.270	-0.222	**0.959**	-0.089	-0.170	1			
AP	-0.395	0.464	-0.129	0.749	-0.121	-0.142	**0.838**	1		
GR	-0.443	-0.033	-0.375	**0.954**	0.078	-0.092	**0.912**	0.589	1	
GST	0.054	**0.770**	0.363	0.482	-0.531	-0.344	0.589	**0.854**	0.233	1

**** Koyu renkli yazılmış olanlar %5seviyesinde önemli bulunmuştur.***

Al uygulaması yapılmış sorgum bitkisinin köklerinde incelenen özelliklere ait korelasyon değerleri Tablo 3. 28.' de verilmiştir. CAT ile AP arasında, MDA ile Prolin, AP ve GST arasında, Prolinile AP ve GST arasında, SOD ile GR arasında ve AP ile GST arasında olumlu ve önemli ilişki olduğu belirlenmiştir.

Tablo 3.28. Al uygulaması yapılmış Sorgum bitkisinin köklerinde incelenen özelliklere ait korelasyon tablosu

	CAT	MDA	Prolin	SOD	AP	GR	GST
CAT	1						
MDA	0,657	1					
Prolin	0,748	**0,835**	1				
SOD	-0,222	0,185	0,184	1			
AP	**0,864**	**0,828**	**0,863**	-0,036	1		
GR	-0,131	0,145	0,181	**0,975**	0,035	1	
GST	0,741	**0,916**	**0,839**	0,124	**0,963**	0,162	1

**** Koyu renkli yazılmış olanlar %5seviyesinde önemli bulunmuştur.***

Tablo 3. 29. incelendiğinde Cr uygulamasın yapılmış sorgum bitkisi kökünde CAT ile Prolin, AP ve GST arasıında, MDA ile Prolin, AP ve GST arasında, SOD ile GR arasında ve AP ile GST arasında olumlu ve önemli etkileşimler belirlenmiştir.

Tablo 3.29. Cr uygulaması yapılmış Sorgum bitkisinin köklerinde incelenen özelliklere ait korelasyon tablosu

	CAT	MDA	Prolin	SOD	AP	GR	GST
CAT	1						
MDA	0,734	1					
Prolin	**0,940**	**0,820**	1				
SOD	0,471	0,333	0,627	1			
AP	**0,875**	**0,837**	**0,924**	0,493	1		
GR	0,617	0,214	0,676	**0,775**	0,651	1	
GST	**0,971**	**0,762**	**0,924**	0,514	**0,847**	0,548	1

**** Koyu renkli yazılmış olanlar %5seviyesinde önemli bulunmuştur.***

Pb uygulaması yapılmış sorgum bitkisine ait köklerde incelenen özelliklere ait korelasyonların bulunduğu Tablo 3. 30. incelendiğinde CAT ile Prolin, GR ve GST arasında, Prolin ile SOD, GR ve GST arasında, SOD ile GST arasında ve GR ile GST arasında önemli pozitif ilişkiler belirlenmiştir.

Tablo 3.30. Pb uygulaması yapılmış Sorgum bitkisinin köklerinde incelenen özelliklere ait korelasyon tablosu

	CAT	MDA	Prolin	SOD	AP	GR	GST
CAT	1						
MDA	0,386	1					
Prolin	**0,920**	0,152	1				
SOD	0,728	0,147	**0,825**	1			
AP	0,618	0,589	0,604	0,644	1		
GR	**0,852**	-0,001	**0,775**	0,487	0,138	1	
GST	**0,966**	0,158	**0,916**	**0,755**	0,490	**0,917**	1

**** Koyu renkli yazılmış olanlar %5seviyesinde önemli bulunmuştur.***

4. BÖLÜM

TARTIŞMA- SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada hem kök hem de yapraklarda prolin, klorofil (a, b ve toplam) içeriği, lipidperoksidasyonu ve CAT, SOD, APX, GR ve GST enzim aktiviteli üzerine etkilerini gözlemleyebilmek için sorgum bitkilerine (*S. bicolor* L.) farklı saksılara kontrollü koşullar altında altı farklı konsantrasyonda (2, 4, 8, 16, 32, 64 ppm) Al, Cr ve Pb uygulanmıştır.

Bitkilerde ağır metal birikimi Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) oluşumuyla oksidatif strese neden olur. Reaktif oksijen türleri tekli oksijen (O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit radikali (O^{2-}) ve hidroksil radikali (HO) olarak bilinen türlerdir [101]. Önlenmediği veya ortadan kaldırılmadığı sürece bu türler geri dönüşü olmayan metabolik bozukluklara neden olabilir. Bu nedenle, CAT, SOD, APX, GR, GST gibi antioksidant enzimlerin üretimi ağır metal birikiminden doğan oksidatif stresin en aza indirgenmesinde kritik önem arz etmektedir. Bu çalışmada kök ve yapraklarda prolin, MDA ve antioksidant enzimler aktivitelerindeki değişimler bitkilerin Al, Cr ve Pb a karşı fizyolojik tepkisi olarak algılanmıştır.

Araştırma sonuçları 4 ppm ve üzeri dozlarda Al dozlarının Chl-a miktarını ve 32 ve 64 ppm dozlarının ise toplam Chl miktarını önemli düzeyde azalttığını ortaya koymuştur. Benzer şekilde 8 ppm ve müteakip Pb dozlarında da toplam Chl miktarında bir azalma gözlenmiştir. Bu sonuçlar Panda et al (2003)'nı buğday türlerinde ağır metal iyonları ile gerçekleştirdiği çalışmanın sonuçları ile uyumludur [100]. Pb konsantrasyonlarına bağlı toplam Chl içeriğine yönelik bulgular ise Zengin ve Munzuroglu (2005) tarafından fasulye fidelerinde yapılan çalışmanın sonuçları ile uyum göstermektedir[102]. Özellikle Al ve Pb uygulanan bitkilerin yapraklarında klorofil azalması klorofilin parçalanmasındaki artış kloroza da bağlanabilir [22]. Bu çalışmada 64 ppm Al, Cr ve Pb

uygulamalarında toplam Chl değerlerinde gözlenen azalmalar sırasıyla %32, 4 ve 34 olarak tespit edilmiştir. Benzer şekilde Oncel et al., (2000) Pb ve Cd ye maruz kalmış *Triticum aestivum* bitkilerinde toplam Chl içeriğinde %50 lik bir azalma rapor etmiştir [103]. Fakat ilginç bir şekilde Al uygulamaları, 2 ppm dozundaki keskin artış hariç, Chl b düzeylerinde herhangi bir değişime neden olmamıştır. Hem Al hemde Cr uygulamalarında Chl a ve b içerikleri toplam Chl içeriği ile pozitif bir ilişki sergilemesine rağmen, Pb uygulamaları ile Chl a içerileri arasındaki kayda değer bir ilişki gözlenmiştir. Öte yandan 2-16 ppm dozlarında Cr uygulamaları Chl b ve toplam Chl içerinde kayda değer bir artış sergilemiştir. Benzer bir durum Vartika et al., (2004) tarafından *Ocimumtenui florum* için de rapor edilmiştir [105]. Chl b açısından 4, 8 ve 16 ppm dozlarında Cr uygulamaları önemli artışlara neden olmuştur. Pb uygulamalarında ise kontrol uygulamasına kıyasla Chl a içeriklerinde bir azalma gözlenmiş, fakat 64 ppm dozu dışında diğer dozlar arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir.

MDA içeriği olarak sorgum kök ve yapraklarının lipit peroksidasyonu Şekil 2. 11. ve 2. 12. ‘ de gösterilmiştir. Artan Al, Cr ve Pb dozları ile birlikte sürekli bir artış gözlenmektedir. MDA aktivitesinde Cr’ un 2-4 ve 16-32 ppm dozları ve Pb nin 2-4 ppm dozları arasındaki farklar önemsiz bulunmuştur. Fakat kök MDA değerlerinde Al (39.85) ile Cr (23.18) ve Pb (39.46) için en yüksek seviyeler sırasıyla 4 ve 8 ppm dozlarında ulaşılmıştır. Burada bitkilerin ağır metallere karşı MDA tepkisinin köklere kıyasla yapraklarda çok daha baskın olduğu bariz bir şekilde görülmektedir. Bu da ROS’ ların ortadan kaldırılması için antioksidant enzim aktivitelerinin köklerde Al ve Cr için 16 ppm ve üzeri dozlarda ve Pb için ise 8 ppm ve üzeri dozlarda yapraklara kıyasla çok daha etkin bir şekilde çalıştığını ortaya koymaktadır (Şekil 2. 11. ve 2. 12.). Al uygulamalarında MDA değerleri Chl a ve toplam Chl içeriği ile negatif bir korelasyon sergilemiştir. Pb uygulamalarında benzer bir eğilim toplam Chl ile Chl b arasında da gözlenmiştir. Bunun nedeni ise oksidatifstres koşullarında dokularda serbest radikal birikiminin bir sonucu olarak MDA düzeyinde ortaya çıkan artış ve artan antioksidant enzim aktivitesine bağlı olarak H_2O_2 düzelerinde ve membran hasarlarında gözlenen azalma olarak değerlendirilmiştir [105]. Mevcut sonuçlar dokularda gelişmiş lipidperoksidasyonu rapor eden Malmir (2011)’in bulguları ile uyumlu bulunmuştur [106]. Diğer araştırmacılar da Cr, Zn, Cd ve Pb uygulamalarıyla buğday bitkilerinde MDA düzeylerinde önemli artışlar rapor etmişlerdir [100].

Prolin stres koşullarında bitki dokularında üretilen en yaygın metabolitlerden biri olarak belirlenmiştir [108]. ROS giderici, ozmotik koruyucu ve membran düzenleyici özelliklerinden dolayı prolin stres koşullarından koruyucu bir rol oynamaktadır [107, 109, 110]. Al, Cr ve Pb' nun artan dozları prolin düzeylerinde sürekli bir artışa neden olmuş, fakat Al ve Cr' nin 2-16 ppm dozları ve Pb' nin 2 ppm dozu yaprak prolin seviyelerinde önemli bir değişime neden olmamıştır (Şekil 2. 13. ve 2. 14.). Öte yandan kontrol uygulamasına kıyasla Al, Cr ve Pb nin 64 ppm dozunda prolin düzeylerinde sırasıyla 5, 21 ve 40 kat artış tahmin edilmiştir. Al, Cr ve Pb nin tüm dozlarında yaprak prolin düzeylerinde gözlenen sürekli artış trendi bitkilerin ağır metal stresine tipik bir tepkisi olarak değerlendirilebilir. Bunun yanı sıra yaprak MDA düzeyinde gözlenen eş zamanlı artışlar MDA düzeyleri ile prolin düzeyleri arasındaki bariz korelasyonu da işaret etmektedir [111]. Zengin ve Munzuroglu (2005)'un fasulye fideleri üzerinde gerçekleştirdiği çalışmasında ortaya koyduğu sonuçlar bu çalışmada prolin sevilerine ilişkin elde edilen sonuçları destekler niteliktedir [102]. Al uygulamalarından elde edilen en yüksek kök prolin düzeyi (91.24 nmol/g taze ağırlık) yaprak prolin düzeyinden (248.76 nmol/g taze ağırlık) yaklaşık 4.2 kat daha azdır. Yaprak prolin düzeyi tüm elementlerin 64 ppm dozunda keskin bir artış göstermiştir. Aynı dozda Al ve Cr uygulamalarıyla kök prolin düzeyinde bir azalma gözlenmiş olup bu azalış Al ve Cr' un bitki üst aksamlarına yer değiştirdiğini işaret etmektedir. Prolin içeriğindeki artış ağır metal birikiminin detoksifkasyonunda oynadığı antioksidant rolü ortaya koymaktadır [112].

Kontrol uygulamasına kıyasla yaprak SOD aktivesi tüm ağır metal dozlarında kayda değer bir farklılık sergilemiştir. Fakat Cr' un 32 ila 64 ppm dozları ile Pb' nin 4 ila 8 ppm dozları arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Yapraklarda en yüksek SOD seviyesi tüm elementlerde 8 ppm dozunda erişilmiştir ve ardından müteakip dozlarda stabil bir düşüş kaydedilmiştir. Kontrol uygulamasına kıyasla Al, Pb ve Cr' un 8 ppm dozunda elde edilen SOD aktivitesi sırasıyla 9, 11 ve 34 kat daha yüksek bulunmuştur (Şekil 2. 26. ve 2. 27.). SOD aktivitesinde 16 ppm ve sonrasında gözlenen düşüşler oksijen engelleyen fonksiyonun yavaş yavaş zayıfladığını işaret etmektedir. Bu bulgular Zhang et al., (2007) tarafından rapor edilen sonuçlarla uyumlu bulunmuştur[105]. Yaprakların tersine kök SOD aktivitesi Al ve Cr dozlarına bir tepki olarak sürekli bir artış göstermiş buda yapraklara kıyasla köklerde enzim aktivitesinin daha iyi koruyucu

fonksiyon sergilediğini işaret etmektedir. Scandalios (2002) tarafından da belirtildiği gibi, SOD aktivitesi bitkinin köklerdeki antioksidatif strese karşı toleransı ile ilişkili olabilir [113]. Köklerde en yüksek SOD düzeyine Al (0.889 ünite/mg protein) ve Cr (1.478 ünite/mg protein) için 64 ppm dozunda ulaşılmışken yapraklarda en yüksek düzeye Cr (1.446 ünite/mg protein) için 8 ppm dozunda ulaşılmıştır. Pb uygulamalarında en yüksek SOD oranı köklerde 32 ppm (0.387 ünite/mg protein) ve yapraklarda ise 8 ppm (0.447 ünite/mg protein) dozunda elde edilmiştir (Şekil 2. 26. ve 2. 27.). Al ve Cr da kök SOD aktivitesi GR ile ve Pb uygulamalarında ise GST ile pozitif bir korelasyon sergilemiştir. Öte yandan Al ve Pb uygulamalarında yapraklardaki CAT aktivitesi ile direkt bir ilişki sergilemiştir. Burada vurgulanması gereken diğer bir nokta da yaprak SOD aktivitesi sadece Cr uygulamalarında Chl a, b ve toplam Chl ile pozitif bir korelasyon sergilemiş olmasıdır.

Yaprak APX aktivitesi Al için 2-32 ppm dozları arasında önemli düzeyde farklılık göstermiş ve en yüksek orana (0.437 ünite/mg protein) 16 ppm dozunda ulaşılmıştır. Kök APX aktivitesi ise 16 ppm (0.244 ünite/mg protein) e kadar tüm alüminyum dozlarında sürekli bir artış göstermiş ve ardından bir düşüş sergilemiştir. Cr için enyüksek yaprak APX aktivitesi 8 ppm (0.440 ünite/mg protein) ve Pb için ise 4 ppm (0.220 ünite/mg protein) dozunda, köklerde ise en yüksek seviyeye Cr (1.278 ünite/mg protein) ve Pb (0.187 ünite/mg protein) için 16 ppm dozunda ulaşılmıştır. Bitkilerin ağır metallere karşı APX yanıtı yapraklara kıyasla köklerde daha yüksek düzeyde gözlenmiştir (Şekil 2. 20. ve 2. 21.). Köklerde hem Al hemde Cr uygulamaları için APX aktivitesi ile CAT, MDA, Proline ve GST arasında pozitif bir korelasyon gözlenmiştir. Fakat aynı durum Al için diğer enzimler arasında gözlenmemiş ve yapraktaki SOD activitesi hariç Cr ve Pb için de gözlenmemiştir.

Kontrol uygulamasına kıyasla yaprak CAT aktivitesi Al, Cr ve Pb' nin tüm dozlarında daha yüksek gözlenmiştir. Al ve Cr' un 2-16 ppm dozları ve Pb nin 2-8 ppm dozları arasında artan bir trend gözlenmiştir. Müteakip dozlarda ise bir düşüş ortaya çıkmıştır. En yüksek CAT aktivitesi düzeyinde Al ile Pb ve Cr' un etkisi sırasıyla %20 ve %9 daha fazladır. Öte yandan Al için kök CAT aktivitesi sadece 4, 8 ve 16 ppm dozlarında bir artış göstermiştir. Yaprak değerlerine tezat bir şekilde, 32-64 ppm dozları ile kontrol uygulaması arasında CAT aktivitesi bakımından bir farklılık gözlenmemiştir. Al a tepki olarak yaprak CAT aktivitesi maksimum düzeyde iken köklere olarak tepkinin

neredeyse 2.5 katı düzeyindedir (Şekil 2. 18. ve 2. 19.). Cr un 2-16 ppm dozları arasında sürekli bir artış gözlenmiş, fakat 32 ve 64 ppm dozlarında ise bir düşüş ortaya çıkmıştır. 64 ppm de kök CAT aktivitesi kontrol uygulamasından farksız bulunmuştur. Öte yandan Pb nin kök CAT aktivitesi üzerine etkisi yaprağın tersine sürekli bir artış sergilemiştir. Bu bulgular Malmir et al (2011)' nun Cr ağır metali ile sorgum üzerinde gerçekleştirdiği çalışmasının sonuçları ile uyum sergilemektedir [106]. Araştırmacılar Cr uygulamaları ile birlikte artan GST, CAT ve GR aktiviteleri rapor etmişlerdir. Panda et al (2003) düşük Cr konsantrasyonlarında CAT aktivitesinin arttığını fakat daha yüksek dozlarda da bu çalışma sonuçlarına benzer şekilde CAT aktivitesinde artışlar olduğunu ortaya koymuşlardır [100]. Fakat bu durum bu çalışmadaki yüksek Pb dozlarından gözlenen kök katalaz aktivitesi için geçerli değildir, yapraklar için geçerlidir. Pb uygulamalarında CAT aktivitesi köklerde GR ve GST ile pozitif bir ilişki sergilerken yapraklarda SOD ve GR ile pozitif bir ilişki göstermiştir; Cr uygulamalarında köklerde proline, APX ve GST ile yapraklarda ise GR ile pozitif bir ilişki sergilemiş, Al uygulamalarında ise köklerde APX ve yapraklarda SOD ile aynı ilişkiyi sergilemiştir.

Cr ve Pb nin tüm dozları yaprak GR aktivitesinde kontrol uygulamasına kıyasla önemli düzeyde artışa neden olurken en yüksek seviyeye Cr uygulamalarında 16 ppm ve Pb uygulamalarında ise 8 ppm dozunda erişilmiştir. Al uygulamalarında ise 4 ppm dozundan başlayarak sürekli bir artış gözlenmiştir. Benzer bir eğilim Al uygulamaların tüm dozlarında kök Gr aktivitesinde de gözlenmiştir (Şekil 2. 22. ve 2. 23.). En yüksek yaprak Gr aktivitesi Pb için 8 ppm (1.573 ünite/mg protein), Cr için 16 ppm (0.503 ünite/mg protein) ve Al için ise 64 ppm (0.738 ünite/mg protein) dozunda gözlenmiştir. Bitkinin Pb dozlarına yanıtı Al ve Cr a kıyasla daha yüksek düzeydedir. Cr uygulamalarında en yüksek aktivite köklerde 32 ppm ve yapraklarda 16 ppm dozunda gözlenmiştir. Pb uygulamalarında kök GR aktivitesi tüm dozlarda artış göstermiş ve 64 ppm dozunda en yüksek seviyeye (0.548 ünite/mg protein) ulaşmıştır, söz konusu en yüksek seviyeye yapraklarda 8 ppm (1.573 ünite/mg protein) dozunda ulaşılmıştır. Pb uygulamalarında GR aktivitesi köklerde CAT, Proline ve GST ile, yapraklarda ise SOD ile pozitif bir ilişki sergilemiştir. Benzer pozitif bir ilişki Cr uygulamalarında köklerde SOD ile ve yapraklarda ise CAT ile gözlenmiş, Al uygulamalarında ise köklerde SOD ve yapraklarda MDA ve prolin ile gözlenmiştir.

Al, Cr ve Pb nun tüm dozlarında yaprak GST aktivitesinde kontrol uygulamasına kıyasla önemli bir artış gözlenmiştir. Maksimum seviyeye ise Al için 4 ppm (2.718 ünite/mg protein), Pb için yine 4 ppm (0.857 ünite/mg protein) ve Cr için 8 ppm (2.184 ünite/mg protein) dozunda ulaşılmıştır. Tüm elementlerin müteakip dozlarında tedrici bir azalma gözlenmiştir. Yapraklara kıyasla bitkilerin kök GST seviyelerine tepkisi daha yüksek düzeydedir. Maksimum GST aktivitesi Al için 16 ppm (4.099 ünite/mg protein), Cr için yine 16 ppm (4.269 ünite/mg protein) ve Pb için ise 64 ppm (0.748 ünite/mg protein) dozunda gözlenmiştir (Şekil 2. 24. ve 2. 25.). GST aktivesi ile Al için köklerde MDA, Proline ve APX arasında; Cr için köklerde CAT, MDA, Proline ve APX ve yapraklarda ise SOD ve APX arasında; Pb için ise köklerde CAT, Proline, SOD ve GR ve yapraklarda APX arasında pozitif korelasyonlar gözlenmiştir.

Bitkilerin ağır metal stresine tepkileri multijenik olup hücre detoksifikasyonunun yanı sıra hem ozmotik hem de iyonik dengeleri içermektedir. Hücre detoksifikastyonu etkinliği anti oksidant savunma mekanizmalarına bağlıdır [105].

Sonuç ve Öneriler

Sonuç olarak, Al ve Cr uygulamalarında köklerde prolin, MDA, APX ve GST arasında ve tüm elementler için kök GST aktiviteleri arasında pozitif korelasyonlar söz konudur. Aynı şekilde, yapraklarda ise Al ve Cr için proline ve MDA arasında pozitif korelasyonlar gözlenmiştir. Al, Cr ve Pb ağır metallerinin *Sorghumbicolor* bitkisinde baskın bir oksidatif strese neden olduğu ve ROS üretiminin klorofil içeriğine müdahale ettiği gözlenmiştir. Ağır metaller arasında Cr düzeylerinin özellikle yapraklarda önemli bir SOD, APX ve GST aktivitesine neden olduğu ve klorofil biyosentezine de önemli etkileri olduğu gözlenmiştir. Yapraklardaki enzim aktiviteleri köklerden daha yüksek bulunmuş olup bu da yapraklardaki daha yüksek lipidperoksidasyon düzeylerini işaret etmekte ve ağır metal stresine karşı daha yüksek toleransı açıklayabilmektedir. Buna rağmen, antioksidant enzimlerin devreye girmesi sorgum hücrelerini ağır metal toksisitesinden korumak için yeterli olmayabilir, bu nedenle söz konusu bulguların geçerliliğini ispat etmek için daha ileri düzeyde çalışmalara gerek vardır.

KAYNAKLAR

1. House LR. 1985. A Guide To Sorghum Breeding. Pp. 1-8. 2nd Edn. Patancheru. A. P. 502324. India: International Crops Research Institute for Semi-Arid Tropics.
2. Woods JDO, Hall MI., Muzondo Gosse G., and Soontornchaınackseng P. 1995. Bioethanol Production from Sweet Sorghum: Interchange of Research and Experience Between EU and Developing Countries (Zimbabwe and Thailand). Brussels. EU. pp. 1–74.
3. Kımber CT., 2000. Origins of Domesticated Sorghum and Its Early Diffusion to India and China. pp. 3-96. *In* C. W. Smith. R. A. Frederiksen (Eds.) Sorghum: Origin. History. Technology. And Production. Wiley Series in Crop Science. New York.
4. FAO. 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **www.fao.com**
5. Wenman. C.. (Technical Director. Triangle Ltd. Zimbabwe). 1999. Pers. comm. 'Potential for crystalline sugar production from sweet sorghum''.
6. Poehlman JM, Sleper DA. 1995. Breeding Field Crops. pp. 345–366. 4th Edn. Iowa State University Press / AMES.
7. Rooney WL, 2004. Sorghum Improvements-Integrating Traditional and New Technology to Produce Improved Genotypes. **Advances in Agronomy. 83**:37–109.
8. Sanderson MA., Jones RM., Ward J. and Wolfe R., 1992. Silage Sorghum Performance Trial at Stevensville: Forage Research in Texas. Rep. PR-5018. Texas Agric. Exp. Stn.. Stephensville.
9. Kimbrough L., 2002. Corn and Sorghum for Silage. Extension Service of Mississippi State University. URL: **http://msucares.com/pubs/infosheets/is485.htm**
10. Rosenow. D.T., Quisenberry. J.E., Wendt. C.W.. and Clark L.E.. 1983. Drought Tolerant Sorghum and Cotton Germplasm. **Agricultural Water Management.,7**:207–222.

11. Dahlberg. J. 2000. Classification And Characterization of The World Collection of Sorghum. Pp. 99-130. *In* C.W. Smith. R. A. Frederiksen (Eds.) Sorghum: Origin. History. Technology. And Production. Wiley Series in Crop Science. New York.

12. Duke JA., 1983. Handbook of Energy Crops. **www.hort.purdue.edu/ newcrop/duke_energy/Sorghum_bicolor.html**

13. Nieboer E., Richardson DHS., 1980. The Replacement of the Nondescript Term "Heavy Metals" by a Biologically and Chemically Significant Classification of Metals Ions. **Environ. Pollut., 1:**3-26.

14. Salomon SW, Förstner U., Metals in Hydrocycle. Springer-Verlag. Berlin. pp. 49. 1984.

15. Lepp NW., 1981. Effect of Metal Pollution on Plants. Apl. Sci. Publ.. London. 1(2).

16. Cha JW, Kim BW., 1975. Ecological Studies of Plants for the Control of Environmental Pollution. IV. Growth of Various Plant Species as Influenced by Soil-Applied Cadmium. **Kor. J. Bot.. 18**. 23-30.

17. Ouzounidou G., Eleftheriou EP., Karataglis S., 1992. Ecophysical and Ultrastructural Effects of Copper in Thlaspi ochroleucum (*Cruciferae*). **Can. J. Bot.. 70:**947-57.

18. Poschenrieder CH, Gunse B, Barcelo J., 1989. Influence of Cadmium on Water Relations. Stomatal Resistance and Absisic Acid Content in Expanding Bean Leaves. **Plant Physiol.. 190:**1365-1371.

19. Lidon FC, Ramalho J., Henriques FS., 1993. Copper Inhibition of Rice Photosynthesis. **Plant Physiol.. 142:**12-17.

20. Nussbaum S., Shemutz D., Brunold C., Regulation of Assimilatory Sulfate Reduction by Cadmium in *Zea mays* L.. **Plant Physiol..** 88. 1407. 1988.

21. Doncheva S., Nicolov B., Ogneva V., 1996. Effect of Copper Excess on the Morphology of the Nucleus in Maize Root Meristem Cells. **Physiol. Plantarum.** 118-122.

22. Somashekaraiah BV., Padmaja K., Prasad ARK., 1992. Phytotoxicity of Cadmium Ions on Germinating Seedlings of Mung Bean (*Phaseolus vulgaris*)

Involvement of Lipid Peroxides in Chlorophyll Degradation. **Physiol. Plantarum. 85:**85-89.

23. Munzuroğlu Ö, Geçkil H, 2002. Effects of Metals on Seed Germination. Root Elongation. and Coleoptile and Hypocotyl Growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. Environ. **Cont. Toxi.. 43:**203-213.

24. Kennedy CD, Gonsalves FAN, 1987. The Action of Divalent Zinc. Cadmium. Mercury. Copper and Lead on the Trans-Root Potential and Efflux of Excised Roots. **Exp. Bot.. 38:**800-817.

25. Bergmann W., 1992. Nutritional Disorders of Plants: Development. Visual and Analytical Diagnosis. New York. s. 695.

26. Alloway BJ and Ayres DC., 1993. Chemical Principles of Environmental Pollution. Chapman & Hall. U.K.. s. 291.

27. Kinnersely AM., 1993. The Role of Phytochelates in Plant Growth and Productivity. Plant Growth Regulation. 12: 207-217.

28. Romheld V., 1991. The Role of Phytosiderophores in Acquisition of Iron and Other Micronutrients in Graminaceous Species. An Ecological Approach. **Plant and Soil. 130**: 127-134.

29. Clarkson DT and Luttge U., 1989. 3. Mineral Nutrision: Divalent Cations. Transport and Compartmentalization. Prog. Botany. 51: 93-112.

30. Salt DE, Blaylock M, Kumar NPBA, Dushenkov V, Ensley BD., Chet I. and Raskın I., 1995. Phytoremediation: A Novel Strategy for The Removal of Toxic Metals from The Environment Using Plants. **Biotechnology, 13**: 468-474.

31. Stephan UW and Scholz G., 1993. Nicotianamine: Mediator of Transport of Iron and Heavy Metals in The Phloem. **Physiol. Plant. 88**: 522-529.

32. Cumming JR and Taylor GJ., 1990. Mechanism of Metal Tolerances in Plants: Physiological Adaptation for Exclusion of Metal Ions from The Cytoplasm. In: Stres Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms. Alscher. R.G. and Cumming. J.R. (Eds.) Wiley-Liss. Inc.. 329-359.

33. Thurman DA., 1981. Mechanism of Metal Tolerance in Higher Plants. In: Effect of Heavy Metal Pollution on Plants. LEPP. N:V: (Ed.) Applied Science Publishers. London. England. 239-249.

34. Brooks A, Collins CJ and Thurman DA., 1981. The Mechanism of Zinc Tolerance in Grasses. **Journal of Plant Nutrition, 3**:695-705.

35. Reeves RD, and Baker AJM., 1999. Metal-accumulating plants. In Phytoremediation of toxic Metals: Using Plants to Clean up the Environment. eds. I Raskin. BD Ensley. pp 193-229. John Wiley&Sons Inc. New York.

36. Banks MK, Kulakow P, Schwab AP, Chen Z ve Rathbone K., 2003. Degradation of Crude Oil in the Rhizosphere of Sorghum bicolor. **International Journal of Phytoremediation. 5:**225-234.

37. Aksu E and Yıldız N., 2004. Heavy Metal Stress and Tolerance of Plants. International Soil Congress on Natural Resource Management for Sustainable Development. Erzurum.

38. Kochian LV., 1995. Cellular Mechanisms of Aluminum Toxicity and Resistance in Plants. **Anna. Rev. Plant. Physiol Plant Mol. Biol. 46**: 237-260.

39. Foy CD., 1983. The Physiology Of Plant Adaptation To Metal Stres. Iowa State **J. Res.,** 57:355.

40. Haug A., 1984. Moleculer Aspects Of Aluminum Toxicity. Crit. Rev. Plant Sci.. 1.345- 373.

41. Özbek H., Kaya Z., Gök. M ve Kaptan. H.. 1995. Toprak Bilimi. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fak. Genel Yayın No: 73 Ders Kitapları Yayın No:16. Adana.

42. Khan. A.G..Kuek. C., Chaudhry TM., Khoo CS and Hayes WJ., 2000. Role of plants. mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. **Chemosphere** (41):197-207.

43. Dürüst N., Dürüst Y., Tuğrul D and Zengin M., 2004. Heavy Metal Contents of Pinus Radiata Trees of İzmit (Turkey). **Asian Journal of Chemistry**. 16(2):1129-1134.

44. Sharma P. and Dubey RS., 2005.Lead toxicity in plants. **Braz. J. Plant Physiol. 17**(1):35-52.

45. Halliwell B. 1991. Drug Antioxidant Effects. **Drugs. 42**(4):569-605.

46. Halliwell B.. Gutteridge. MC., 1984. Oxygen Toxicity. Oxygen Radicals. Transition Metals and Disesae. **Biochem. J..** 219:1-14.

47. Schutzendubel A., Polle A., 2002. Plant Responses to Abiotic Stresses: Heavy Metal- Induced Oxidative Stress and Protection by Mycorrhization. **J. Exp. Bot.. 53:**1351-1365.

48. Gossett DR, Millhollon EP, Lucas MC., 1994. Antioxidant Response to NaCl Stress in Salt-Tolerant and Salt-Sensitive Cultivars of Cotton. **Crop Sci.. 34:**706-714.

49. Hou W, Chen X, Song. G.. Wang. Q.. Chang. C.C.. 2007. Effects of Copper and Cadmium on Heavy Metal Polluted Waterbody Restoration by Duckweed (*Lemna minor*). **Plant Physiol. Biochem. 45:**62-69.

50. Mehta. S.K.. Gaur. J.P.. 1999. Heavy Metal Induced Proline Accumulation and its Role in Ameliorating Metal Toxicity in *Chlorella vulgaris*. **New Phyto. 143:**253-259.

51. Perl-Treves. R.. Perl. A.. Molecular Oxygen and its Reactive Derivates. (D. Inze and M. Van Montagu Eds.) Oxidative Stress in Plants. Taylor & Francis Inc.. London. pp. 1-31. 2002.

52. Mc Kersie. B.D.. Lehsem. Y.Y.. Oxidative Stress. In: Stress and Stress Coping in Cultivated Plants. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht-Boston-London. pp. 256. 1994.

53. Alscher RG, Donahue JL, Cramer CL., Reactive Oxygen Species and Antioxidants: Relationships in Green Cells. **Physiol. Plant.. 100**:224-233. 1997.

54. Kour H, Perkins MJ., 1991. The Free Radical Chemistry of Food Additives. In Ed: Arvoma O.I. Halliwell B.. Free Radicals and Food Additives. **New York. 42**(4). 569-605.

55. Macaskie LE, Dean ACR., 1984. Cadmium Accumulation by a *Citrobacter sp*.. **Gen.. Mikrobiol.. 130:**53-62.

56. Foyer CH, Halliwell B., 1976. The Presence of Glutathione Reductase in Chloroplast: a Proposed Role in Ascorbic Acid Metabolism. **Planta. 133:**21-25.

57. Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, Van Breuegem F, 2000. Dual Action of the Active Oxygen Species During Plant Stress Responses. **Cell. Mol. Life. Sci.. 57:**779-795.

58. Cicerali NI., 2004. Effect of stress on antioxidant defense systems of sensitive and resistant cultivars of lentil (*Lens culinaris* M). Yüksek Lisans Tezi. ODTÜ. Ankara.

59. Del Rio LA, Pastori GM, Palma JM and et al. 1998. The Activated Oxygen Role of Peroxisomes in Senescence. **Plant Physiol.. 116:**1195-1200.

60. Davies KJA., 2000. Oxidative Stress. Antioxidant Defenses and Damage Removal. Repair and Replacement Systems. **IUBMB Life. 50:**279-289.

61. Feibo W., Four Barley Genotypes Respond Differently to Cadmium: Lipid Peroxidation and Activities of Antioxidant Capacity. Environ. Exp. Bot.. 2002.

62. Polle A., 2001. Dissecting The Superoxide Dismutase. Ascorbate Peroxidase. Glutathione Pathway in Chloroplast by Metabolic Modelling. Computer Simulations As a Step Towards Flux Analysis. **Plant Physiol. 126:**445-462.

63. Scandalios JG., 1993. Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. **Plant Physiol. 101**:7-12.

64. Misra N, Ajay G., 2006. Effect of Salinity and Different Nitrogen Sources on the Activity of Antioxidant Enzymes and Indole Alkoloid Content in *Catarantus roseus* Seedlings. **J.. Plant Physiol.** 164:11-18.

65. Martin JF., Le Lagunage En Traitement Tertiaire. Experimentation A Partir De Plantes Aquatiques Superieures. La Technique De Le'eau Et De L'assainissement. No: 376-Avril. 23-24. 1978.

66. Van Camp W, Van Montagu M, Inze D., 1994. Superoxide Dismutases. In: Foyer. C.H.. Mullineaux. P.M. (Eds.). Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants. CRC Press. **Boca Raton.** 317-341.

67. Scandalios JG, Guan L, Polidoros AN., 1997. Catalases in Plants: Gene Structure. Properties. Regulation and Expression. In J.G. Scadalios. (Ed.). Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses. (Monograph Series. Vol. 34). **Cold Spring Harbor Laboratory Pres. Cold Spring Harbor**. 343-406.

68. Northwest Life Science Specialties NWLSS TM Catalase Activity Assay Data Sheet E-Mail: Sales@Nwlifescience.Com

69. Volk S, Feierabend J., 1989. Photoinactivation of Catalase at Low Temperature and its Relevance to Photosynthetic and Peroxide Metabolism in Leaves. **Plant Cell Environ.** 12:701-712.

70. Sharp KH., Raven E., Enzyme-Substurat Interactions in Askorbate Peroxidase. University of Leicester. Cambridge. UK. NPR. 10. pp. 303. 2003.

71. Creighton TE., 1999. (Ed) Encyclopedia of Molecular Biology. Wiley 1(4): 632-634.

72. Oxisresearch™A, Division of OXIS Health Products. Inc. Spectrophotometric Assay for Glutathione Reductase for Research. **http.//www.oxfordbiomed.com**. Catalog Number 21018D Data Sheete.

73. Lo WJ, Chiou YC, Hsu YT and et al. 2007. Enzymatic and Nonenzymatic Synthesis of Glutathione Conjugates: Application to The Understanding of a Parasite's Defense System and Alternative to the Discovery of Potent Glutathione S-Transferase Inhibitors. **Bioconjugate Chem.. 18:**109-120.

74. Oztetik E, Boyoglu S., Kandemir G., Kopriva S. and et al. 2003. Cellular Defence in Stressed *Pinus brutia* Seedlings by Glutathione STransferases. **Europ. J. Biochem.. 4:**10-16.

75. Türkan İ., Comparative Lipid Peroksidation. 2004. Antioxidant Defence System and Proline Content in Roots of Two Rice Cultivars Differing in Salt Tolerance. **Environ. Exp. Bot.. 53:**247-257.

76. Raskin I, Kumar PBAN, Dushenkov S and Salt DE., 1994. Bioconcentration of Heavy Metals by Plants. **Current Opinion in Biotechnology**, 5: 285-290

77. Kovacs M., Nyary L and Toth L., 1984. The Microelement Content of Some Submerged and Floating Aquatic Plants. **Acta Bot.Hung. 30**: 173-185

78. St-Cyr L., Campbell GC and Guertin K., 1994. Evaluation of The Role of Submerged Plant Beds in The Metal Budget of A Fluvial Lake. **Hydrobiologia.** 291:141-156.

79. Nriagu JO.,1992. Toxic Metal Pollution in Africa. Sci. Total Environ. 121: 1-37.

80. Baumhardt. G.R. and Welch. L.F.. 1972. Lead Uptake and Corn Growth with Soil-Applied Lead. J. Environ. Qual. 1: 92-94.

81. Woolhouse. H.W.. 1983. Toxicity and Tolerance in Responses to Metals. In: O.L. Lange. P.S. Nobel. C.B. Osmond. H. Ziegler. (Eds.). Physiolgical Plant Ecology III. Responses to The Chemical and Biological Environment. Springer. Berlin. Heidelberg. New York. 284-285.

82. Ramel. C.. 1973. The Effect of Metal Compounds on Chromosome Segregation. **Mut. Res.** 21: 45-46.

83. Liu DH, Jiang WS, Wang W, Zhao FM, Lu C. 1994. Effects of Lead on Root Growth Cell Division and Nucleolus of Allium cepa. **Environ. Pollut. 86**: 1-4.

84. Lane SD, Martin ES, 1980. Further Observations on The Distribution of Lead in Juvenile Roots of *Raphanus sativus.* **Z. Pflanzen- Physiol. 97**:145-152.

85. Johnson WR and Proctor J., 1977. A Comparative Study of Metal Levels in Plants From Two Contrasting Lead mine Sites. **Plant Soil. 46**:251-257.

86. Keser G., 2005. *Nasturtium officinale* R. Br.'De Kurşunun Strese Bağlı Enzimlerin Aktivitelerine. Gelişmeye. Mineral ve Klorofil İçeriğine Etkileri. Doktora Tezi. Adana

87. Bazzaz FA, Rolfe GL, Windle P., 1974. Differing Sensitivity of Corn and Soybean Photosynthesis and Transpiration to Lead Contamination. **J. Environ. Qual. 3**: 156-158.

88. Sauerbeck D., 1983. Landw. Forsch. **Sonderh, 39**: 108-129.

89. Ali MB, Vajpayee P, Tripathi RD and et al., 2000. Mercury Bioaccumulation Induces Oxidative Stres and Toxicity to Submerged Macrophyta *Potamogeton crispus* L. Bull. Environ. Contam. **Toxicol. 65**: 573-582.

90. Hommond-Kosack KE and Jones JDG., 1996. Resistance Gene-Dependent Plant Defence Responses. **Plant Cell. 8**:1773-1791.

91. Del Rio LA, Sandalio LM, Yanez J. and et al, 1985. Induction of Manganese-Containing Superoxide Dismutase in Leaves of *Pisum sativum* I.. by High Nutrient Levels of Zinc and Manganese. **J. Inorg. Biochem.** 24: 25-34.

92. Malecka A., Jarmuszkiewıcz W. and Tomaszewska B., 2001. Antioksidative Defense to Lead Stres in Subcellular Compartments of Pea Root Cells. **Acta Biochimica Polonica, 48**:687-698.

93. Evans CE, Kamptrath EJ., 1970. Lime Response As Related To Percent Aluminium Saturation.Solution Aluminium And Organik Matter Content. **Soil Sci. Soc. Amer. Proc.** 34:893

94. Macleod LB, Jackson LP., 1965. Effect of Concentration of the Al ion on Root Development and Establishment of Legume Seedlings. **Canadian J.Soil Science,** 45:221.

95. Matsumoto H., 2000. Cell Biology of Aluminum Toxicity and Tolerance in Higher Plants. **International Review of Cytology.** 200:1-47.

96. Wang SY, Jiao H. and Faust M., 1991. Change in ascorbate. Glutathione and related enzyme activitiy during thidiazuron. Bud Break of Apple. **Plant Phisol. 82:**231–236.

97. Misra N., Gupta AK., 2006. Effect of Salinity and Different Nitrogen Sources on the Activity of Antioxidant Enziymes and Indole Alkoloid Content in *Catarantus roseus* Seedlings. **Journal of Plant Physiology, 163**(1):11-8.

98. Karabal E, Yücel M, Öktem HA., 2003. Antioxidant Responses of Tolerant and Sensitive Barley Cultivars to Boron Toxicity. **Plant Science**, 925-933.

99. Toprak. G.. 2007. Cd ve Cu Ağır Metal Stresi Uygulanan *Phanerochaete chrysosporium*'da Antioksidan Enzimlerde Değişen Miktarların Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi.

100. Panda SK, Chaodhury I, Khan MH, 2003. Heavy metal phyto-toxicity induces lipid peroxidation and affect antioxidants in wheat leaves. **Biol. Plant. 46:**289-294.

101. Devi SR, Prasad MNV, 1998. Copper toxicity in *Ceratophyllumdemersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: Response of antioxidant enzymes and antioxidants. **Plant Sci. 138:**157–165.

102. Zengin FK and Munzuroglu Ö, 2005. Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgarıs* L.) seedlings. ActaBiologicaCracoviensia Series Botanica.47(2), 157–164.

103. Oncel I, Keles Y. and Ustun AS, 2000. Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings. **Environmental Pollution. 107:**315–320.

104. Vartika R, Poornima V, Shri Nath S, Shanta M, 2004. Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, praline level and eugenol content of *Ocimumtenuiflorum,* **L. Plant Sci. 167:**1159-1169.

105. Zhang FQ, Wang YS, Lou ZP, Dong JD, 2007. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandeliacandel* and *Bruguieragymnorrhiza*). **Chemosphere. 67:**44–50.

106. MalmirHeidar A., 2011. Comparison of antioxidant enzyme activities in leaves stems and roots of Sorghum (Sorghum bicolor L.) exposed to Chromium (VI). **African Journal of Plant Science. 5**(8), 436-444.

107. Matysik J., Alia Bhalu B., Mohanty P., 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. **Curr. Sci. 82:**525-532.

108. Gajewska E, Skłodowska M, Słaba, M, Mazur J., 2006. Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. **Biologia Plantarum, 50**(4):653-659.

109. Alia P, Pardha S, 1991. Proline accumulation under heavy metal stress. **J. Plant Physiol.** 138:554-558.

110. Bandurska H., 2001. Does proline accumulated in leaves of water deficit stressed barley plants confine cell membrane injuries? II. Proline accumulation during hardening and its involvement in reducing membrane injuries in leaves subjected to severe osmotic stress. **Acta Physiol. Plant. 23**:483-490.

111. Alia KV, Prasad SK, Saradhi PP, 1995. Effect of zinc on free radicals and proline in Brassica and Cajanus. **Phytoctitry. 39**(1), 4S47.

112. Singh S and Sinha S. 2005. Accumulation of metals and its effects in (*Brassica juncea*L.) Czern. (cv. Rohini) grown on various amendments of tannery waste. **Ecotoxicology and Environment Safety., 62:**118–127.

113. Scandalios JG, 2002. The rise of ROS. **Trends Biochem Sci. 27**(9), 483–6.

ÖZGEÇMİŞ

29.07.1987 Kayseri ili Sarıoğlan ilçesi doğumlu olup medeni halim bekardır. İlköğretimimi Hacı Mustafa Gazioğlu İlköğretim Okulunda tamamlayıp Lise eğitimimi 2001-2004 yılları arasında Kayseri Melikgazi Lisesinde tamamladım. Lisans eğitimimi 2008-2011 yılları arasında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ziraat Mühendisliği Bölümü Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalı'nda tamamladım. Yüksek lisans eğitimime 2012 yılında Erciyes Üniversitesi Seyrani Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı'nda başlayarak halen devam ettirmekteyim. Yabancı dilim İngilizcedir.

Yazışma adresi:

Fevzi çakmak mah.

Bozantı cad.

No: 52/29

Kocasinan/KAYSERİ

Tel: 0 554 919 70 11

E-mail: seymayilmaz1652@gmail.com