SALİSİLİK ASİT UYGULANMIŞ NOHUT (*Cicer arietinum* L.) FİDELERİNDE KADMİYUM 'un YARATTIĞI FİZYOLOJİK ve BİYOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER

Bahar DURSUN

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Yrd. Doç. Dr. Songül ÇANAKCI
ELAZIĞ-2012

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SALİSİLİK ASİT UYGULANMIŞ NOHUT (*Cicer arietinum* L.) FİDELERİNDE KADMİYUM 'un YARATTIĞI FİZYOLOJİK ve BİYOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAHAR DURSUN

091110107

Anabilim Dalı: Biyoloji

Programı: Botanik

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Songül ÇANAKCI

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih:10 Ocak 2012

ELAZIĞ-2012

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SALİSİLİK ASİT UYGULANMIŞ NOHUT (*Cicer arietinum* L.) FİDELERİNDE KADMİYUM 'un YARATTIĞI FİZYOLOJİK ve BİYOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAHAR DURSUN

091110107

Tezin Enstitüye Teslim Edildiği Tarih : 10 Ocak 2012
Tezin Savunulduğu Tarih : 25 Ocak 2012

Tez Danışmanı : **Yrd. Doç. Dr. Songül ÇANAKCI (F. Ü)**

Diğer Jüri Üyeleri :

Prof. Dr. Ömer MUNZUROĞLU (F. Ü)
Yrd. Doç. Dr. İsmail TÜRKOĞLU (F.Ü)

OCAK-2012

ÖNSÖZ

Çeşitli kaynaklardan çıkan katı, sıvı ve gaz halindeki kirletici maddelerin hava, su ve toprakta yüksek oranda birikmesi çevre kirliliğinin oluşmasına neden olmaktadır. Hızla artan dünya nüfusunun ihtiyaçlarının karşılanması için teknolojinin gelişmesine bağlı olarak endüstrileşmenin de artması gerekmektedir. Sanayideki bu artış, doğal kaynakların hızla tükenmesine neden olmaktadır. Doğal kaynaklar hızla tükenirken, üretim ve tüketimden kaynaklı atıkların önlemler alınmadan doğaya atılması çevre kirliliğinin oluşmasına ortam sağlamaktadır. Günümüzde çevre kirliliğine neden olan en önemli faktörlerden birini ağır metal birikimi teşkil etmektedir. Tarımsal toprakların ve suların ağır metallerden kısmen temizlenmesi dahi çok pahalı teknik imkânları gerektirmektedir. Kadmiyum toksik gücü çok yüksek olan bir ağır metaldir.

Araştırmamız, nohut (*Cicer arietinum* L.) fidelerine, bitkide endogen olarak üretilen bir molekül olan salisilik asit uygulamasının, kadmiyum kaynaklı oksidatif stresin yarattığı fizyolojik ve biyokimyasal değişimler üzerine etkilerini araştırarak, bu alandaki çalışmalara katkı sağlamayı amaçlamaktadır.

Bu araştırma süresince beni yönlendiren, yakın ilgilerini ve bilgi birikimleri ile sürekli desteklerini esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Songül ÇANAKCI 'ya, laboratuar çalışmalarımı gerçekleştirirken, sürekli yardım ve desteklerini gördüğüm Zooloji Profesörü Sayın hocam Ökkeş YILMAZ 'a ve Arş. Gör. Sevinç AYDIN 'a, tüm yaşamım boyunca olduğu gibi, eğitim ve öğretim hayatımın bu aşamasında da hep yanımda olan değerli aileme ve yine, bu araştırmayı tamamlayabilmemde önemli emekleri olan dayılarım Ferhan YUSUFOĞLU ve Yusuf YUSUFOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunuyorum.

Bu araştırma FÜBAP FF.20.35 nolu proje olarak desteklenmiştir.

Bahar DURSUN
ELAZIĞ-2012

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **II**
İÇİNDEKİLER ..... **III**
ÖZET ..... **V**
SUMMARY ..... **VI**
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... **VII**
TABLOLAR LİSTESİ ..... **VIII**
KISALTMALAR LİSTESİ ..... **IX**
SEMBOLLER LİSTESİ ..... **X**
1. GİRİŞ **1**
1.1. Ağır Metal Toksisitesi 6
1.2. Kadmiyum Toksisitesi 7
1.3. Kadmiyumun Toksisitesi Üzerine Salisilik Asidin Etkileri İle İlgili Çalışmalar 8
2. MATERYAL ve METOT **13**
2.1. Bitki Materyali 13
2.2. Bitki Materyaline Yapılan Uygulamalar 14
2.3. Kimyasal Maddeler ve Organik Çözücüler 15
2.4. Kullanılan Aletler ve Cihazlar 15
2.5. Büyüme Parametrelerinin Alınması 16
2.6. Klorofil (a+b) ve Karotenoid İçeriğinin Belirlenmesi 16
2.7. Kimyasal Analizler 16
2.7.1. Protein Analizi 16
2.7.2. Prolin Analizi 17
2.7.3. MDA Analizi 18
2.7.4. Glutatyon Analizi 18
2.8. Standartların Hazırlanması 19
2.8.1. Protein Standardı 19
2.8.2. Prolin Standardı 19
2.8.3. MDA Standardı 19
2.8.4. Glutatyon Standardı 19
2.9. Kalibrasyon Eğrileri 20
2.9.1. Protein Kalibrasyon Eğrisi 20
2.9.2. Prolin Kalibrasyon Eğrisi 21
2.9.3. MDA Kalibrasyon Eğrisi 22
2.9.4. Glutatyon Kalibrasyon Eğrisi 23
3. BULGULAR **24**
3.1. Büyüme Parametrelerindeki Değişiklikler 24
3.2. Klorofil (a+b) ve Karotenoid Miktarı 28
3.3. Protein Miktarı 28
3.4. Prolin Miktarı 30
3.5. Malondialdehid Miktarı 30
3.6. Glutatyon Miktarı 30
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA **32**

KAYNAKLAR 35
ÖZGEÇMİŞ 41

ÖZET

Bu çalışmada nohut (*Cicer arietinum* L. cv) tohumlarından geliştirilen 15 günlük fideler materyal olarak kullanıldı. Fidelere yapılan tüm uygulamalarda kökten hidrofonik yöntem tercih edildi. Fideler 24 saat süreyle salisilik asit (0.5 mM) ön uygulaması yapılan ve yapılmayan olarak iki gruba ayrıldı. Daha sonra bu iki gruba kendi içinde kontroller (saf su ve salisilik asit) saklı tutulmak koşuluyla kadmiyumun farklı konsantrasyonları (0, 25, 50 ve 100 µM) ayrı ayrı uygulandı. Farklı uygulamalar görmüş fidelerde fide boyu, fide taze ve kuru ağırlığı gibi büyüme parametreleri tespit edildi. Ayrıca fide de protein, yaprakta pigment, prolin, malondialdehit ve glutatyon miktarları belirlendi.

Elde edilen sonuçlara göre; salisilik asit ön uygulaması yapılan ve yapılmayan fidelerde büyüme parametreleri ve protein, yapraklarda pigment (klorofil a+b ve karotenoid) miktarları bakımından ilgili gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan anlamlı bulunamadı ($P \geq 0.05$). Ancak kontrole kıyasla adı geçen parametrelerde kadmiyum konsantrasyonu arttıkça önemli ölçüde gerilemeler ve düşüşler tespit edildi ($P < 0.05$). Uygulama yapılan fidelerin yapraklarında yüksek kadmiyum (50 ve 100 µM) konsantrasyonları için salisilik asit ön uygulamasının prolin miktarındaki artışı azaltıcı etkisi tespit edildi ($P < 0.05$). Ancak salisilik asit ön uygulamasının bu azaltıcı etkisi 50 µM kadmiyum için daha belirgin bulundu. Benzer şekilde malondialdehit miktarı salisilik asit ön uygulamalı gruplarda daha düşük bulundu. Ancak sadece 50 µM kadmiyum konsantrasyonu için malondialdehit miktarındaki düşüş anlamlıydı ($P < 0.05$). Fidelerin yapraklarındaki glutatyon miktarı kontrole kıyasla artış gösterdi ($P < 0.05$). Glutatyon miktarları salisilik asit ön uygulamalı gruplar, ile ilgili gruplar kıyaslandığında daha yüksek bulundu ($P < 0.05$).

Sonuç olarak seçilen konsantrasyonlara, planlanan uygulama şekline ve süresine bağlı olarak salisilik asit ön uygulamasının fidelerde kadmiyumun belirli parametreler üzerinde sebep olduğu toksik etkinin olumsuzluklarını düzenlediği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Nohut, Kadmiyum, Salisilik Asit, Toksik Etki

SUMMARY

Physiologocal and Biochemical Changes Due to Cadmium on Salicylic Acid Treated Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Seedlings

In this study, developed the seeds of chickpea (Cicer arietinum L. cv) seedlings of 15 days was used as the material. Seedlings, roots in the hydroponic method was preferred in all applications. Seedlings, salicylic acid for 24 hours (0.5 mM) were divided into two groups: pre-application and leave. Then these two groups, controls (distilled water and salicylic acid) its own right to be kept in condition, different concentrations of cadmium (0, 25, 50 and 100 microM) were performed separately. Different applications have seen seedlings, seedling length, seedling fresh and dry weight was determined as growth parameters. In addition, seedlings of protein, leaf pigments, proline, malondialdehit, and glutathione quantities were determined.

According to the results obtained; salicylic acid pre-application and leave the growth parameters of seedlings, the differences between the groups in terms of the amount of protein and pigment (Chlorophyll a and b and carotenoids) in leaves was not statistically significant ($P \geq 0.05$). However, compared to the control parameters mentioned in the concentration of cadmium increases, significant declines and declines were found ($P < 0.05$). The application of high cadmium in leaves of seedlings (50 and 100 microM) concentrations of salicylic acid pre-application to increase the effect of reducing the amount of proline was determined ($P < 0.05$). However, the reducing effect of salicylic acid pre-application found more pronounced for the 50 mM Cd. However, the amount of malondialdehyde were lower in the groups pre-applied salicylic acid. Decrease in the amount of malondialdehyde but were significant for only 50 microM concentration of cadmium ($P < 0.05$). The amount of glutathione increased in all groups compared to control seedlings leaves ($P < 0.05$). Groups pre-applied salicylic acid on the amount of glutathione was significantly higher among the groups ($P < 0.05$).

As a result, considered seedlings, depending on the shape and duration of the planned application, selected concentrations, negativity of the specific toxic effects of cadmium organized pre-application of salicylic acid parameters.

Key Words: Chickpea, Cadmium, Salicylic Acid, Toxic Effect

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1. Salisilik asit' in açık formülü 1
Şekil 2. Bitkilerde salisilik asit biyosentezinin metabolik yolu 2
Şekil 3. Çimlendirilmiş nohut tohumları 13
Şekil 4. Uygulama için hazır 15 günlük fideler 14
Şekil 5. Etiketlemeden sonra uygulama yapılmış fideler 15
Şekil 6. Protein kalibrasyon eğrisi 20
Şekil 7. Prolin kalibrasyon eğrisi 21
Şekil 8. MDA kalibrasyon eğrisi 22
Şekil 9. Glutatyon kalibrasyon eğrisi 23
Şekil 10. Bir kontrol fidesinin genel görünümü 25
Şekil 11. SA uygulanmış bir fidenin genel görünümü 27
Şekil 12. Kadmiyum uygulanmış bir fidenin genel görünümü 29
Şekil 13. SA – Kadmiyum uygulanmış bir fidenin genel görünümü 31

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1. Nohut (*Cicer arietinum* L.) fidelerinde SA ön uygulamasının, büyüme parametreleri üzerinde kadmiyumun toksisitesine etkileri 26
Tablo 2. Nohut (*Cicer arietinum* L.) fidelerinde SA ön uygulamasının, fotosentetik pigment ve protein miktarları üzerinde kadmiyumun toksisitesine etkileri 27
Tablo 3. Nohut (*Cicer arietinum* L.) fidelerinde SA ön uygulamasının, MDA, glutatyon ve prolin miktarları üzerinde kadmiyumun toksisitesine etkileri 29

KISALTMALAR LİSTESİ

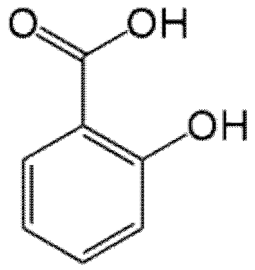
µmol : Mikromol
µg : Mikrogram
ASA : Asetil Salisilik Asit
BHT : Butilhidroksitoluen
Cd : Kadmiyum
cm : Santimetre
EDTA : Etilen Diamin Tetra
g : Gram
GSH : Glutatyon
N : Normalite
nm : Nanometre
nmol : Nanomol
MDA : Malondialdehit
mg : Miligram
ml : Mililitre
mM : Milimolar
pH : Hidrojen Gücü (Power of Hydrogen)
RWC : Nispi Su Miktarı
SA : Salisilik Asit
TA : Taze Ağırlık
TBA : 2- Thiobarbutirik
TCA : Trikloroasetik Asit
TEP : 1, 1, 3, 3 – Tetraethoxypropane
UV : Ultra Viyole

SEMBOLLER LİSTESİ

$CaNO_3$	: Kalsiyum Nitrat
$C_7H_6O_3$	: Salisilik asit
Cd^{+2}	: Kadmiyum iyonu
CO_2	: Karbondioksit
Co	: Kobalt
Cu	: Bakır
$CuSO_4$	: Bakır sülfat
Fe	: Demir
H_3BO_3	: Borik asit
Hg	: Civa
H_2O	: Su
KH_2PO_4	: Monopotasyumdihidrojen fosfat
K_2PO_4	: Potasyum sülfat
Mn	: Mangan
$MnSO_4$	: Mangan (II)Sülfat
$MgSO_4$	: Magnezyum sülfat
Mo	: Molibden
Na^+	: Sodyum iyonu
NaCl	: Sodyum klorür
Na_2MoO_4	: Sodyum Molibden
$-NH_2$	: Amino grubu
$(NH_4)_2SO_4$	: Amonyum sülfat
Ni	: Nikel
-OH	: Hidroksil grubu
-SH	: Sülfidril grubu
Zn	: Çinko

1.GİRİŞ

Amerikalı yerliler ve eski Yunanlılar, söğüt ağacı yapraklarının ve kabuklarının bir ağrı kesici ve ateş düşürücü olarak kullanıldığını biliyorlardı. Salisin ile salisilik alkol gukozid formunda ilk kez 1828 yılında söğüt kabuğundan izole edilmiştir. Salisilik asit adı, söğüt ağacının bilimsel ismi olan *Salix*'den türetilmiştir. Asetil salisilik asit (ASA), halk dilinde aspirin salisilik asidin ticari formu olup, sıklıkla kullanılan antistres bileşiklerden biridir [1]. Kimyasal formülü $C_7H_6O_3$ olan salisilik asit, renksiz kristal yapıda bir organik asit olup açık formülü aşağıdaki gibidir.

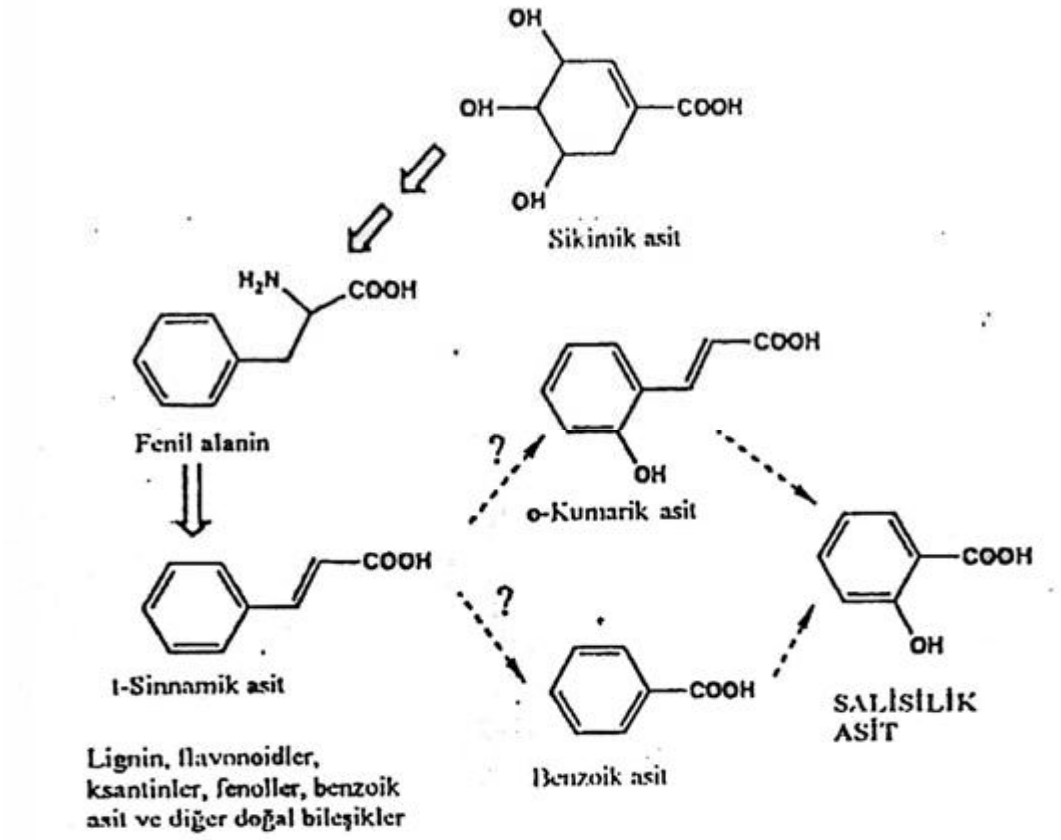


Şekil 1. Salisilik asit' in açık formülü

Günümüzde salisilik asidin (SA) genellikle birçok bitkide bulunduğu ve önemli bir büyüme düzenliyici molekül olduğu bazı bilim adamları tarafından kabul edilmektedir [2]. SA' nın bitkilerde taşınımı hakkında kesin bir bilgi olmamakla birlikte fiziksel özellikleri bozulmadan floemde taşınabildiği hakkında güçlü kanıtlar bulunmaktadır. Bitkilerde SA şikimik asitten benzoik asit ve kumarik asit yolu ile sentezlenmektedir.

Bitkilerde salisilik asit (orto-hidroksi benzoik asit) oluşumu için iki metabolik yolun bulunduğu ileri sürülmektedir [3]. Bu yollarda, salisilik asidin β-oksidasyon ve orto-hidroksilasyon reaksiyonlarının oluşum sıralarının birbirinden farklı olduğu saptanmıştır. Bu yönüyle, sağlıklı ve virüs inoküle edilmiş tütün bitkilerinde salisilik asidin, benzoik asit aracılığıyla sinnamik asitten türevlendiği kanıtlanmıştır (Şekil 2) [4]. Buna göre, *Agrobacterium tumefaciens* ile enfekte olmuş genç domates fidelerinde, sinnamik asidin orto-kumarik aside orto-hidroksilasyonunun arttığı ve ardından kumarik asitin β-oksidasyonu ile salisilik asit oluştuğu ortaya konulmuştur. Sağlıklı bitkilerde ise, salisilik

asidin yaygın biyosentez yolunun, Sinnamik asit → Benzoik asit → Salisilik asit şeklinde gerçekleştiği saptanmıştır.



Şekil 2. Bitkilerde salisilik asit biyosentezinin metabolik yolu.

Bitkilerde SA, metabolik olarak aktif olan serbest formunun dışında, esterler ve glukozidler olarak bağlı formlarda da bulunabilir. SA bitkilerde genellikle bir şeker bileşiği olan salisilik asit-β-glukozit (SAG) şeklinde, yani inaktif bir formda (depo formu) bulunmaktadır. β-glukozidaz enzimi, bitkilerde fitohormonların sinyal aktivitelerini kontrol etmekte ve salisilik asidin bağlı formdan serbest forma dönüşümünü katalizleyerek, bitkide serbest SA seviyesini düzenlemektedir. Tütünde yapılan bir çalışmada, bu bitkinin yapraklarına dışarıdan SA uygulandığında, yaprakların hücreler arası boşluklarında salisilik asit-β-glukozidaz aktivitesinin arttığı saptanmıştır. SAG'ın büyük bir kısmı hücreler arası boşluklarda bulunurken, SA'nın büyük bir kısmı ise hücrelerin içinde yer almıştır. Çünkü SAG'ın salisilik asitten şekillenmesi, hücrelerin içinde oluşmaktadır. Bu durum dışarıdan uygulanan SA'nın doğrudan hücrelere girdiğini göstermektedir. Sonuçta,

SAG'ın hücreler arası boşluklar yoluyla uzak dokulara taşınan bir sinyal rolü oynayabileceği görüşü ortaya çıkmıştır. Salisilik asidin uzun mesafeli taşınımı için uygun şeklinin SAG olduğu düşünülmektedir. Çünkü SAG hem salisilik asitten daha fazla çözünebilir, hem de daha az toksiktir [1].

Salisilik asit doğal olarak meydana gelen endogen bir bitki hormonudur [1]. Hidroksil (OH-) grubu taşıyan aromatik halkalı bitki fenolleri grubunda yer alan sekonder bir metabolit olan SA' nın birçok çevresel strese karşı bitki yanıtlarının düzenlenmesinde büyük bir rol oynadığı düşünülmektedir [5, 6]. Biyotik ve abiyotik stres toleransı üzerinde çeşitli etkileri olduğu bilinen önemli bir sinyal molekülüdür [7]. Salisilik asit (SA) bitkilerde, stresin yol açtığı zararlı gelişmelerin etkilerini zayıflatan önemli bir madde olarak da bilinmektedir [8]. SA çeşitli abiyotik streslere karşı bitki direncinin artmasında önemli bir rol oynamaktadır [9]. Ayrıca SA kadmiyum toksisitesinden bitkiyi koruyucu olarak da bilinmektedir [10].

Salisilik asit ilk olarak tütün bitkisinde sürgün oluşumunu teşvik edici ve çiçeklenmeyi uyarıcı etkisini ortaya koyan bir çalışmada kullanılmıştır [11]. SA'nın arpa köklerinde fosfat, yulaf köklerinde ise potasyum alınımını engellediği rapor edilmiştir [12, 13]. Pancheva ve arkadaşları (1996) arpa fideleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada 100 µM ve 1 mM SA'nın uzun süreli uygulanması sonucunda kök ve fidelerin büyümesinin azaldığı, ayrıca klorofil ve protein içeriğinin ve CO_2 asimilasyon oranının azaldığını rapor etmişlerdir [14]. Fariduddin ve arkadaşları (2003) *Brassica juncea* ile yaptıkları bir çalışmada yüksek SA konsantrasyonlarının gösterdiği inhibitör etkinin aksine düşük SA konsantrasyonlarının klorofil a+b miktarını, nitrat redüktaz aktivitesini, net fotosentetik oranı arttırdığını tespit etmişlerdir [15].

Stres, biyotik ve abiyotik faktörlerin ayrı ayrı ya da birlikte fizyolojik ve biyokimyasal olaylarda belli değişimleri meydana getirmesi veya organizmada hasar oluşturma kapasitesi olarak tanımlanmaktadır. Biyologlar bitkiler için elverişli olmayan herhangi bir çevre faktörü için "stres" terimini benimsemişler, elverişsiz bir çevre faktörüne karşı bitkinin hayatta kalabilme yeteneğine ise "stres drenci " (tolerans) adını vermişlerdir [16].

Bitkinin bir strese önceden maruz kalması sonucu toleransı artmış ise, bitkinin alışmış olduğu ifade edilir. Adaptasyon genellikle pek çok nesil boyunca seçilim sonucu kazanılan, genetiksel olarak belirlenmiş direncin düzeyini belirttiği için alıştırma adaptasyondan farklıdır. Çevresel streslere adaptasyon ve alışma, morfolojik, anatomik, hücresel,

biyokimyasal ve moleküler düzeyde olmak üzere, birbirine bağlı çok sayıda olaylar sonucu oluşur.

Bitkilerin maruz kaldıkları çevre faktörleri, onların kalitesi ve verimliliği üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Verimli bir yetiştiricilik için bitkilerin optimum çevre isteklerinin karşılanması zorunludur. Bunları iklim faktörleri, toprak faktörleri, doğal olmayan kirleticiler, şeklinde sınıflandırmak mümkündür. Bu optimum isteklerde meydana gelen her türlü sapma o bitki için stresi meydana getirmektedir. Bitkilerin ortalama veriminin %50'den fazla azalmasına neden olan abiyotik stres, dünyadaki tarımsal ürün kaybının birincil nedenidir. Abiyotik stres morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişimlere neden olarak bitki büyüme ve verimliliğini olumsuz etkilemektedir [17]. Bitkisel üretimde verimi sınırlayan; düşük ve yüksek sıcaklık, atmosfer kirliliği, tuzluluk, kuraklık, yetersiz beslenme, radyasyon gibi etmenler abiyotik stres faktörleridir [18].

Sharma ve arkadaşları (1996) *Arabidopsis thaliana* üzerinde yaptıkları bir çalışmada, ozon ve UV ışığının olumsuz etkilerinin SA tarafından azaltıldığını belirlemişlerdir [19]. Mısır ve kışlık buğday bitkilerinde SA'nın düşük sıcaklık stresine karşı koruma sağladığı gösterilmiştir [20, 21]. Yine salisilik asidin hardal fidelerinde sıcaklık toleransını indüklediği, tuz ve ozmotik strese, ozon, UV ışıkları, kuraklık, herbisit ve patojenlere karşı bitki yanıtlarını koruyucu yönde değiştirdiği gösterilmiştir [22-29].

SA'nın eksogen uygulamalarının mustard fidelerinde sıcaklık stresine karşı [24] ve mısırda (*Zea mays* L.) soğuk zararına karşı [20] koruma sağladığı tespit edilmiştir. Shakirova (1997) ve Bezrukova (2001) tarafından SA uygulanan buğday bitkilerinde saliniteye dirençte bir artış olduğu görülmüştür [30, 31]. Janda ve arkadaşları (1999) hidroponik yetiştirme şartlarında mısırda yaptıkları bir çalışmada besin çözeltisine 0,5 mM SA ilave edilmesinin don stresine karşı koruma sağladığını belirlemişler ve bu etkinin SA uygulanmış mısır bitkilerinde don toleransını artıran antioksidan enzimlerin sentezinin yapılmasından kaynaklandığını tespit etmişlerdir [8].

Çanakcı ve Munzuroğlu (2004) fasulye çeliklerine 50 ppm ASA ile muamele etmişler ve daha sonra tuz (% 1'lik NaCl) stresine maruz bırakmışlardır. ASA uygulanan çeliklerin uygulanmayan çeliklere oranla yüksek klorofil a ve b içerdiğini ve protein içeriklerinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir [32].

Tayeb (2005) yaptığı çalışmada, ekim öncesi 1mM SA çözeltisi uygulanan arpa tohumlarına 0, 50, 100, 150 ve 200 mM NaCl uygulamasının etkisini araştırmıştır. Artan NaCl seviyesinin çimlenme yüzdesini azalttığını ve 15 günlük fidelerde hem kök hem

yapraklarda büyüme parametrelerinin (taze ve kuru ağırlık) gerilediğini tespit etmiştir. Ayrıca potasyum, kalsiyum, fosfor ve şeker içeriğinin, yaprak nispi su miktarının (RWC) ve fotosentetik pigmentlerin (klorofil a, b ve karotenoidler) içeriğini azaldığını rapor etmiştir. Buna karşılık Na^+ miktarı, çözünebilir şekerler, prolin ve lipid peroksidasyon seviyesi ve peroksidaz aktivitesinin arttığını fakat çözünebilir proteinlerin miktarının azaldığını saptamıştır. Tek başına SA uygulamasının fidelerde yaprak nispi su içeriği, taze ve kuru ağırlıkları, fotosentetik pigmentler, çözünebilir sakkaritler, fosfor içeriğini ve peroksidaz aktivitesini arttırdığı bulunmuştur. Buna karşılık SA ön uygulamasıyla tuz stresi altında Na^+ miktarı, çözünebilir protein içeriği, lipid peroksidasyon seviyesi, elektrolit sızıntının önemli derecede azaldığı belirlenmiştir. Sonuç olarak önceden uygulanan SA' nın arpa fidelerinde fotosentetik pigmentler için tuz stresine karşı önemli ölçüde koruyucu etkiye neden olduğunu ve membran bütünlüğünü sağlamak suretiyle bitki büyümesini teşvik ettiğini ortaya koymuştur [33].

Senaratna ve arkadaşları (2000) domates ve fasulye üzerinde yaptıkları çalışmada SA ve ASA' nın fizyolojik olarak etkili konsantrasyonlarının sıcaklık, don ve kuraklık stresine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada SA veya ASA' nın 0,1- 0,5 mM' lik konsantrasyonları uygulanmış tohumlardan elde edilen bitkilerin sıcaklık, don ve kuraklık stresine karşı toleranslarının arttığını belirlemişlerdir. Ayrıca yapraklara 0,5 mM SA ve ASA püskürtülmesiyle yapılan çalışmada sıcaklık, don ve kuraklık stresine dayanıklılık konusunda tohum aşamasındaki uygulamalar kadar etkili olmadığı saptanmıştır [26].

Son zamanlarda salisilik asidin bazı bitkileri ağır metallere karşı korumada da etkili olduğu bildirilmektedir. Salisilik asit ön muamelesinin; pirinç bitkisinde kurşun ve civanın neden olduğu membran hasarlarını giderici, mısır ile arpadaki kadmiyum toksisitesini azaltıcı etkisi görülmüştür [20, 9, 10].

Çeşitli kaynaklardan çıkan katı, sıvı ve gaz halindeki kirletici maddelerin hava, su ve toprakta yüksek oranda birikmesi çevre kirliliğinin oluşmasına neden olmaktadır. Hızla artan dünya nüfusunun ihtiyaçlarının karşılanması için teknolojinin gelişmesine bağlı olarak endüstrileşmenin de artması gerekmektedir. Sanayideki bu artış beraberinde var olan doğal kaynakların hızla tükenmesine neden olmaktadır. Doğal kaynaklar hızla tükenirken, üretim ve tüketimden kaynaklı atıkların önlemler alınmadan doğaya atılması çevre kirliliğinin oluşmasına ortam sağlamaktadır. Günümüz dünyasında çevre kirliliği çok önemli bir sorundur. Çevre kirliliğinin en önemli nedenleri aşağıda kısaca sıralanmıştır:

- Hızlı nüfus artışı
- Plansız kentleşme
- Plansız endüstrileşme
- Doğal kaynakların dengesiz kullanılması

Ekolojik dengenin bozulmasında en önemli etmen ağır metal bulunduran atıklardır. Ağır metal kirliliğine neden olan etmenler; doğal, tarımsal, endüstriyel, evsel etmenler olarak sayılabilir. Doğal etmenler; sel, rüzgâr ve yağmur gibi doğal olaylar sonucu ağır metaller kayaçlardan aşınarak su kaynaklarına taşınmaktadır. Tarımsal etmenler olarak ise; tarım alanlarında zararlılara ve yabancı otlara karşı kullanılan tarım ilaçları yapımında kullanılan ağır metal içerikleridir. Endüstriyel etmenlerde; ağır metallerin en fazla kullanıldığı metal endüstrisidir. Son olarak evsel etmenlerin asıl nedenini insan kaynakları oluşturmaktadır.

1.1.Ağır Metal Toksisitesi

Ağır metaller, önemli çevresel kirletici unsurlardır [34]. Ağır metal kirliliği bitkiler üzerinde önemli abiyotik stres kaynaklarından birini teşkil etmektedir. Ağır metallerin ileri seviyede toksik zararı bitkilerde kök, gövde ve yaprak gelişimini engellemektedir. Yüksek dozda ağır metal etkisiyle bitkilerde, kloroza ve nekrotik doku, yaprağın % 50'sini kaplamakta, böylece fotosentetik aktivitede azalmalar meydana gelmektedir. Bitkilerde ağır metal birikimi bitki büyüme hızı ve fizyolojik fonksiyonlar üzerinde doğrudan olumsuz etki oluşturmaktadır [35]. Ağır metal fazlalığı serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu uyarmaktadır [36]. Giderek artan endüstriyel ve evsel atıklar, tarımsal fungisit oluşumu, maden işletmeciliği gibi sektörlerin ürettiği kirleticiler ekosistemleri etkilemektedir [37]. Toprakta bulunan ağır metallerin zararlı etkisi söz konusu metalin kimyasal formu, pH ve diğer iyonların varlığına bağlıdır [38]. Doğada toksik gücü farklı çok sayıda ağır metal bulunmaktadır [39]. Bu elementler arasında Zn, Ni, Cu, Co ve Cd toksik elementler iken, az ya da çok öneme sahip eser elementlerden Fe, Mo ve Mn önemli mikro besinlerdir [40].

1.2.Kadmiyum Toksisitesi

Bir ağır metal olan kadmiyumun (Cd) tarım topraklarında bulunması esasen kayaçlardan aşınma kaynaklı olabileceği gibi, endüstriyel faaliyetler, fosforlu gübreler ve evsel atıklar gibi insan faaliyetleri sonucunda da olabilmektedir [41]. Tarımsal topraklarda yüksek seviyelere ulaşabilmekte olup, bitkiler tarafından kolay emilmektedir. Topraktaki kadmiyum artışı bitkinin türüne ve taşınma düzeylerine göre farklı yanıtlar doğurmaktadır [42]. Kadmiyum bitki bünyesinde azot ve karbonhidrat metabolizmalarını değiştirmesinden dolayı birçok fizyolojik değişikliğe neden olmaktadır. Proteinlerin –SH gruplarındaki enzimleri inaktive edip, stomaların kapanmasına, transpirasyonun azalmasına ve klorofil biyosentezinin bozulmasına neden olmaktadır [43]. Fazla miktarda alındıklarında bitkide; fitotoksik etkiye, klorozise, kök ve gövde büyümesinde gerilemeye yol açarak bitkiyi ölüme götürmektedir [17]. Kadmiyumun toksik etkileri; bitki yapraklarında stoma açılmasını engellemek, su dengesini bozma ve mineral besin alımındaki azalma olarak belirlenmiştir [44-46]. Kadmiyum toksisitesi, serbest oksijen radikali üretimi ve çeşitli antioksidan enzimlerin aktivitelerinin değişmesiyle oksidatif stres oluşturmaktadır.

Kadmiyum, bitkilerde güçlü bir oksidatif stres faktörüdür [47]. Bunun sonucu olarak bitkilerde bir dizi toksik belirtilere neden olmaktadır. Cd^{+2} plazmatik kompartmanlarda hücre metabolizmasını ve düzenlenmesini bozarak, yüksek oranda toksisiteye [48], büyümede gecikmeye, fotosentezin inhibisyonuna, su ilişkilerinde değişikliğe, makro ve mikro besinlerin alınması ve dağıtılmasında sıkıntılara, katyonların dışarı akışına ve serbest radikallerin çoğalmasına [49, 50] yol açmaktadır.

Choudhury ve arkadaşları (2004) tarafından pirinç kökleri üzerinde yapılan bir çalışmada kadmiyum toksisitesine bağlı olarak Cd miktarı artıkça bitki ağırlığı, süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz enzimlerinin aktivitesinin azaldığı, MDA içeriğinin arttığı tespit edilmiştir. Yine salisilik asit ön uygulaması yapılmış fidelerin köklerine kıyasla ön uygulama yapılmayanlarda düşük konsantrasyonlarda kadmiyum için glutatyon miktarı artmış, yüksek konsantrasyonlarda kadmiyum için glutatyon miktarı azalmış bulunmuştur. Bu çalışma da salisilik asidin pirinç köklerinde kadmiyumun yol açtığı oksidatif stresi regüle edici potansiyel bir etkiye sahip olduğu ileri sürülmüştür [12]. Ayçiçeği bitkisinde yapılan bir çalışmada artan kadmiyum konsantrasyonuna bağlı olarak yapraklarda redükte

glutatyon miktarının arttığı rapor edilmiştir [51]. Bu durum salisilik asidin bu süreçte glutatyon sentezine giden alternatif bir yolda çalıştığını düşündürmektedir [52, 53]

Uzun süre Cd stresine maruz kalan genç arpa (*Hordeum vulgare* L.) bitkilerinde fotosentetik pigmentlerin şekillenmesi engellenmiş ve çözülebilir proteinlerin içeriğinde azalma gözlenmiştir [54, 55]. Bezelye (*Pisum sativum*) bitkisinde yapılan bir diğer çalışmada 50 μM Cd' un yapraklardaki transpirasyon, fotosentez oranı ve klorofil sentezini azalttığı rapor edilmiştir [56].

Şeker pancarında (*Beta vulgaris* L.) nikel, kadmiyum ve molibden'in kuru ağırlık miktarına, nitrat içeriğine, nitrat redüktaz ve glutamin sentetazın aktivitesine, çözülebilir protein içeriğine etkileri araştırılmış ve söz konusu parametreler üzerinde en zararlı etkiye sahip ağır metalin Cd olduğu sonucuna varılmıştır [57].

Kadmiyumun yarattığı stres koşullarında azot metabolizmasında iş gören enzimler olan nitrat redüktaz ve nitrit redüktazın aktiviteleri azalmaktadır [58]. Bu durum bitkilerin nitrat asimilasyonunu azaltmaktadır. Domates ve fasulye bitkilerinde yapılan bir çalışmada 0-50 mM $CdCl_2$ içeren besin çözeltilerinin uygulanması sonucu kadmiyumun bitki köklerindeki nitrat redüktaz aktivitesini azalttığı bildirilmiştir [59].

1.3. Kadmiyumun Toksisitesi Üzerine Salisilik Asidin Etkileri İle İlgili Çalışmalar

Salisilik asit su eksikliğinin yarattığı zarara direnci artırmakta, kurşun ve civa gibi ağır metallerin zararlı etkilerini hafifletmektedir [60, 18]. Oksidatif stresin geniş bir alanına karşı hafifleştirilmiş bitki cevabında SA' nın rolü olduğu bildirilmektedir. Pirinç (*Oryza sativa* L.) köklerinde SA uygulamasının Cd'a karşı kök enine büyümesi ve kuru ağırlıktaki değişimi azalttığı, ayrıca oksidatif stresi düzenlediği tespit edilmiştir [12]. Cd stresi altındaki arpa fidelerinde büyüme ve fotosentetik parametreler ile antioksidant enzimlerin aktivitesi üzerinde dışarıdan uygulanan SA' nın pozitif etkisi saptanmıştır. Dıştan kadmiyum uygulamasının kökte salisilik asit içeriğinde artışa neden olduğu rapor edilmiştir [13].

Pal ve arkadaşları (2002), Cd stresi altındaki mısır bitkilerine uygulanan salisilik asit (0,5 mM) ön uygulamasının etkisini araştırmışlar. Bu çalışmada, SA ve kadmiyum (0,5 mM) uygulandığında hasarın SA uygulanmamışlara göre daha az olduğunu, ancak SA uygulamasının yüksek kadmiyum konsantrasyonunda kök sisteminde zarara neden olduğunu, oksidatif stresi desteklediği saptanmıştır [10].

Ivanova ve arkadaşları (2008), mısır bitkisi yapraklarında kadmiyumun neden olduğu değişikliklere karşı salisilik asidin rolünü incelemişlerdir. İlk olarak mısır yapraklarını iki gruba ayırıp SA ve saf su ön uygulaması yapmışlardır. Daha sonra Cd uygulamasını üç farklı doz kullanarak gerekleştirmişler. Çalışmada salisilik asit ön uygulamalı gruplarda düşük stres etkileri ve ön uygulama yapılmamış kadmiyum grupların da yüksek stres etkileri gözlenmiştir. Bu yüksek stres etkileri; biyokimyasal ve fizyolojik değişikleri olarak tespit edilmiştir. Yağ asitleri profilindeki değişiklikler ön uygulama yapılmış gruplarda ön uygulama yapılmayanlar kıyasla önemsiz bulunmuştur. Salisilik asit ön uygulaması yapılmamış gruplarda trienoic yağ asidinde kuvvetli düşüş ve doymuş yağ asitlerinde ise artış meydana geldiği ve bu şekilde 18:0 » 18:3 oranının bozulduğu bildirilmiştir. Cd ile muamele edilmiş mısır bitkilerinde SA' nın membran lipidlerini koruyucu rol oynadığı sonucuna varılmıştır [61].

Krantev ve arkadaşları (2007) tarafından mısır bitkisinde kadmiyumun oksidatif stres zararlarına ve fotonsentez üzerindeki olumsuz etkilerine karşı SA ile ön muamelinin olumsuz etkileri azaltıcı rolü araştırılmıştır. Kadmiyum bitkide kök ve sürgün kuru ağırlığında, klorofil içeriğinde ve büyüme parametrelerinde düşüşe yol açmıştır. Yine kadmiyum oksidatif stres ile ilgili birçok parametrelerde değişikliğe yol açmıştır. Prolin, hidrojen peroksit ve lipid peroksidasyon seviyelerinde artışa neden olmuştur. SA ile ön muamele edilmiş gruplarda büyüme parametreleri, kök ve sürgün kuru ağırlığı ve klorofil içeriğindeki düşüş azalmıştır. Yine oksidatif stres ile ilgili olan parametrelerdeki artışta azalmıştır. Bu veriler SA ile ön muamele edilmiş kadmiyum stresi altındaki bitkilerde oksidatif stres zararına ve fotosentez üzerindeki etkilere karşı salisilik asidin hücreleri koruyucu bir rolü olduğu düşüncesini doğurmaktadır [62].

Metwally ve arkadaşları (2003), arpa bitkisinde salisilik asidin kadmiyum toksisitesini hafiflettiğini göstermişlerdir. Salisilik asit 0,5 mM kadmiyum ise 25 µM olarak uygulanmıştır. Salisilik asit uygulanmadan sadece kadmiyum uygulamasında; malondialdehit (MDA) içeriği, hidrojen peroksiti metabolize eden askorbat peroksidaz ve katalaz gibi enzimlerin arttığı gözlenmiştir. Kök ve sürgün uzunluğu, kuru ve yaş ağırlık, yapraklarda klorofil içeriğinde azalma görülmüştür. Ancak bu çalışma salisilik asit uygulamasının aynı parametreler üzerinde kadmiyumun bu zararlı etkilerini hafiflettiğini göstermiştir. Yapraklarda klorofil içeriği, bitkinin yaş ve kuru ağırlığı, kök ve sürgün uzamasındaki azalma giderilmiştir. Salisilik asidin kadmiyum toksisitesine karşı

antioksidan savunma sistemi üzerinde çok etkili olmasa da oluşan pek çok kötü etkileri hafiflettiği gözlenmiştir [9].

Choudhury ve arkadaşları (2004), pirinç bitkisinin köklerinde kadmiyumun neden olduğu oksidatif stres oluşumlarının salisilik asit muamelesi ile azalmasını incelemişlerdir. Salisilik asit tarafından kadmiyumun sebep olduğu oksidatif stresin sonucu olan biyokimyasal ve fizyolojik değişiklikleri azalttığı rapor edilmiştir. 24 saatlik kadmiyum uygulaması köklerde aşırı derecede kadmiyum birikimine ve bitki köklerinin kütlesinde azalmaya yol açmıştır. 16 saatlik salisilik asit uygulaması bitki kök kütlesinin normale yakın olmasını sağlamıştır. Kadmiyum uygulaması sonrasında lipid peroksidasyonu, hidrojen peroksit ve süperoksit radikali artışı gözlenmiştir. Salisilik asit uygulaması kadmiyumun oluşturduğu lipid peroksidasyonu, hidrojen peroksit ve süperoksit radikali artışını azalttığı tespit edilmiştir. Yine salisilik asit uygulamasıyla antioksidan enzimlerin artışı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar salisilik asidin kadmiyumun pirinç köklerindeki zararlı etkisini azalttığını veya düzenlediğini ortaya koymuştur [12].

Guo ve arkadaşları (2008), pirinç bitkisinde, kadmiyumun antioksidan enzimlerin çalışması ve hücre ölümü üzerindeki etkilerine karşı salisilik asidin düzenleyici rolünü araştırmışlardır. Uygulamalar köklere yapılmıştır. Kadmiyum uygulamasına maruz kalan köklerde kadmiyum biriktiği gözlenmiştir. Kadmiyum birikimi antioksidan enzimlerim (süperoksit dismutaz, peroksidaz ve katalaz) aktivitelerini önemli ölçüde baskılamıştır. Böylece hidrojen peroksit parçalanmamasına, lipid peroksidasyonuna, hücre ölümüne ve büyüme inhibisyonuna neden olmuştur. Salisilik asit ön uygulaması olan bitkilerde ise enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların konsantrasyonlarını arttırmıştır. Ayrıca salisilik asit, hidrojen peroksit ve malondialdehit seviyelerinin azalması sebebiyle oksidatif zararı hafifletmiştir. Dolayısıyla salisilik asit ön muamelesi kök ve sürgünlerde kadmiyumun neden olduğu büyüme inhibisyonunu azaltmıştır. Salisilik asit ön uygulamasının kadmiyumun toksik etkisine karşı glutatyon miktarı kök ve sürgünlerde artmıştır. Yine kadmiyum uygulanan fide köklerinde uygulanmayanlara kıyasla glutatyon miktarının daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu araştırmanın diğer bir sonucu ise salisilik asitin kadmiyumun oluşturduğu zararı hafifletmiş ve dolayısıyla düzenlemiş olmasıdır [63].

Tantrey ve arkadaşları (2010), nohut fidelerinde Cd ve civa (Hg)'nın klorofil a, b, total klorofil ve prolin üzerindeki etkisini araştırmışlardır. 10 ve 25 µM Cd ve Hg ile

muamele edilen fidelerde klorofil ve prolin içeriğini etkilediği belirtilmiştir. Bu etki klorofil içeriğindeki azalma ve prolin içeriğindeki artış şeklinde kaydedilmiştir [64].

Hassan ve arkadaşları (2007) tarafından kum kültüründe yetişen nohut (*Cicer arietinum*) fidelerine 0, 50, 100, 150 µM Cd uygulaması yapılmıştır. Büyüme evresinde olan fidelere 5, 15 ve 25 günlük iken yapılan Cd uygulaması sonucunda; kök ve sürgün taze ve kuru kütlesinin azaldığı, kök ve yaprak prolin içeriğinin arttığı rapor edilmiştir. Kadmiyum uygulamasının oluşturduğu zarar 5 günlük fidelerde belirgin olmakla beraber, fidelerin daha sonra ki büyüme evrelerinde (15 ve 25 günlük) artan kadmiyum dozuna paralel şekilde daha da arttığı tespit edilmiştir [65].

Proteinler, aminoasitlerin zincir halinde birbirlerine bağlanmasından oluşan büyük organik bileşiklerdir. Her proteinin kendisine has özelliklerinin olmasını sağlayan özel aminoasit dizilimleri vardır. Proteinlerin işlevlerinin çoğu, kendisini oluşturan aminoasitlerin özelliklerinin tayin edilmesiyle anlaşılabilmektedir. Protein zincirinde bir aminoasitin karboksil grubunun bir diğerinin amino grubuna bağlanmasıyla oluşan bağ peptit bağı olarak adlandırılır. Her proteindeki aminoasit dizisinin sırası bir gen tarafından tanımlanır ve genetik kod ile kodlanmıştır. Proteinler belli işlevleri yerine getirmek için beraberce de çalışabilirler ve bazıları bir araya gelip kararlı kompleksler oluşturabilir. Polisakkaritler, nükleik asitler ve yağlar gibi biyolojik makro moleküllere benzer şekilde, proteinler de canlı organizmaların temel bileşenlerindendir ve hücrelerin içindeki her süreçte yer alırlar. Çoğu protein, biyokimyasal tepkimelerde katalizör işlevi olan enzimlerdir ve metabolizma için yaşamsal bir role sahiptir.

Prolin, proteinleri oluşturan 20 aminoasitten biridir. Diğer tüm aminoasitler birincil amino grubu taşımalarına rağmen, prolin yan zincirindeki üç karbon atomu bir halka oluşturarak tekrar peptid bağındaki nitrojen atomuna bağlandığı için, birincil amino grubundan yoksundur ($-NH_2$). Prolindeki nitrojen (azot) aslında ikincil amino olarak nitelendirilebilir. Prolin bazen aminoasit olarak da adlandırılmaktadır. Aslında, IUPAC adlandırma sistemine göre amino grupları karbon-nitrojen arasında çifte bağ bulunması gerekir. Biyolojik terminolojide, aminoasit kategorisi genellikle prolin de içermektedir. Non-esansiyel ve glukojenik aminoasittir. Sentezi ve yıkımı alfa ketoglutarat üzerinden olur. Prolin dehidrogenaz ile prolin 5-karboksilat sentezlenir. Prolin 5-karboksilattan glutamat semialdehit dehidrogenaz ile glutamat oluşur ve bunu glutamatın transaminasyonu ile alfa ketoglutarat oluşumu izler.

Tuz stresinde prolin birikiminin kesin rolü tam olarak tespit edilememesine karşın, genel olarak prolinin tuza dayanıklılığın bir göstergesi olarak çalıştığı kabul edilmektedir [66, 67] . Stres koşullarında büyüme gelişme gösteren bitkilerde prolin birikimi türe özgü nitelik taşımakta, ayrıca aynı türün variyeteleri arasında bile farklılıklar göstermektedir [68, 69].

Malondialdehit (MDA) membran lipid peroksidasyonunun önemli bir ürünüdür. Her hangi bir stres faktörünün hücre membranları üzerinde lipid peroksidasyonuna ne ölçüde yol açtığını bu ürünün miktarına bakarak tayin etmek mümkündür [12].

Glutatyon (GSH); hücrelerde suda çözünebilir formlarda bulunan düşük molekül ağırlıklı antioksidan bir moleküldür [70]. Glutatyon genellikle tüm hücrelerde milimolar (mM) düzeylerde bulunur [71]. Hücre içi GSH derişimi hücre tipine bağlı olarak 0.5-10 mM arasında değişmektedir. GSH'ın hücre içi lokalizasyonu incelendiğinde, sitoplazma ve mitokondriye ait havuzların, GSH içeriklerinin birbirinden farklı olduğu ve sitosolik havuzun hücresel savunma fonksiyonu ile karakterize edilirken, mitokondriyal havuzun mitokondrinin fonksiyonlarının korunabilmesi açısından gerekli olduğu düşünülmektedir [72].

Bu çalışma, nohut (*Cicer arietinum* L.) fidelerine salisilik asit uygulamasının, Cd kaynaklı oksidatif stresin yarattığı fizyolojik ve biyokimyasal değişimler üzerine etkilerini araştırarak, bu alandaki çalışmalara katkı sağlamayı amaçlamaktadır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Bitki Materyali:

Çalışmamızda bitkisel materyal olarak dikotil bir bitki olan nohut (*Cicer arietinum* L.cv. ispanyol) tohumlarından geliştirilen fideler kullanıldı. Nohut baklagiller (*Fabaceae*) familyasının *Faboideae* alt familyasına ait *Cicer* cinsinden bir baklagil türüdür. Nohut Asya kökenli olup kolay yetiştirilen bir bitkidir. Tohumla çoğalan, tek yıllık bir bitki olup, fide boyu 50 santimetreyi aşmayan bir bitkidir. Türkiye'de yetiştiği yerler Batı, Orta ve Güneydoğu Anadolu'dur. Nohut yemeklik baklagillerden olup, derin bir kazık köke sahiptir. Nohut kuraklığa dayanıklıdır. Toprak isteği az olan bir bitkidir. Kumlu kireçli topraklarda iyi yetişir. Kumlu tınlı topraklar, nohut için idealdir. Nohut tohumlarının optimum çimlenmesi için ortalama 15º C sıcaklığa ihtiyaç vardır. Nohut havada serbest azotu tespit etmesi bakımından oldukça önemlidir. Tohumları proteince çok zengin olup (% 18-31) aynı zamanda bir sanayi ham maddesidir. Nohut ihtiva ettiği protein, mineral maddeler ve vitaminler yönünden çok zengin bulunması dolayısıyla, asırlardır insanların beslenmesinde büyük roller oynamıştır.

Şekil.3 Çimlendirilmiş nohut tohumları

Bu amaçla tamamen homojen olan (uniform) tohumlar seçildi ve 5 saat süreyle karanlıkta 23-25 ^{o}C'de musluk suyunda ıslatıldı. Bu sürenin sonunda tohumlar hava alabilecekleri kapaklı çimlendirme kutularına dizilerek 3 gün süreyle 23-25 ^{o}C' de etüvde çimlenmeye bırakıldı. Daha sonra radikula uzunlukları eşit büyüklükte olan çimlenmiş tohumlar seçilerek önceden hazırlanan belirli oranlarda kum ve toprak karışımıyla doldurulmuş plastik saksılara ekildi. Burada fideler uzun gün periyodunda (16/8) normal gün ışığında 15 günlük oluncaya kadar belirli aralıklarla ve eşit miktarda sulandı. 15 günlük fidelerden, tamamen homojen büyüyen fideler seçilerek deney materyali olarak kullanıldı.

Şekil 4. Uygulama için hazır 15 günlük fideler

2.2. Bitki Materyaline Yapılan Uygulamalar:

15 günlük nohut fideleri aynı sayıda fideden oluşan 8 gruba ayrıldı. Bu grupların yarısı saf su, diğer yarısı ise saf suda hazırlanmış % 99'luk salisilik asitin (0.5 mM) sulu çözeltisiyle dolu kavanozlara alındı ve burada 1 gün süreyle uygulamaya tabi tutuldu. Bu sürenin sonunda bütün fidelerin kökleri yıkanarak kontroller saklı tutulmak koşuluyla (saf su ve SA grubuna ait fideler besin çözeltisine alındı) diğer üçer gruba $CdCl_2$' den besin solüsyonu ile hazırlanan farklı kadmiyum konsantrasyonları (25, 50 ve 100 µM) yine kökler yoluyla 1 gün süreyle uygulandı. SA uygulamasından sonra fideler bir gün dinlendirildi. Daha sonra farklı uygulamalar görmüş gruplara ait fidelerde çeşitli büyüme parametreleri tespit edildi, pigment miktarına bakıldı, prolin, protein, MDA ve redükte

glutatyon analizleri yapıldı. Besin çözeltisi; $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ 708,45; $MgSO_4.7H_2O$ 492,94; KH_2PO_4 136,09; K_2SO_4 348,50; $(NH_4)_2SO_4$ 396,39; $CaCl_2.2H_2O$ 441,09; H_3BO_3 2,868; $MnSO_4.H_2O$ 1,545; EDTA-Fe 33,0345; $ZnSO_4.7H_2O$ 0,220; $CuSO_4.5H_2O$ 0,080; $Na_2MoO_4.2H_2O$ 0,0299.

Şekil 5. Etiketlemeden sonra uygulama yapılmış fideler

2.3. Kimyasal Maddeler ve Organik Çözücüler:

Salisilik asit, kadmiyum klorür, aseton, sülfosalisilik asit, ninhidrin, etil alkol, glasiyel asetik asit, toluen, sodyum fosfat tamponu, trikloroasetik asit(TCA), 2-thiobarbutirik asit (TBA), sodyum hidroksit, biüret reaktifi, folin reaktifi, hidroklorik asit, BHT, bütanol, TEP, prolin, GSH ve protein standardı (kullanılan bu kimyasallar Merck, Sigma ve Fluka firmalarından temin edildi).

2.4. Kullanılan Aletler ve Cihazlar:

Homojenizatör, etüv, döner buharlaştırıcı (rotavapor), UV spektrofotometre, vorteks, sonikasyon, hassas terazi, otomatik pipetler, buzdolabı, su banyosu.

2.5. Büyüme Parametrelerinin Alınması:

Bu amaçla bütün gruplarda başlangıçta çok homojen fideler kullanıldığından sadece nihai boy ölçümleri esas alındı. Uygulama sonrası fidelerin son ağırlıkları tespit edildi. Uygun paketlemeler ve işaretlemeler yapılarak 105 ^{o}C' lik etüvde 3-6 saat aralıklarla sabitleşmiş kuru ağırlıkları tespit edildi. Böylelikle taze ağırlıktaki kuru madde miktarı belirlendi.

2.6. Klorofil (a+b) ve Karotenoid İçeriğinin Belirlenmesi:

Uygulama yapılan bütün gruplardan ayrı ayrı 1 g taze yaprak dokusu materyal olarak kullanıldı. Bütün bu işlemler her bir grup için ayrı ayrı yapıldı. Steril bir havanda küçük parçalara ayrılan yaprak dokusu 40 ml % 80' lik aseton ile 3-4 dk ezildi ve yeşil renkli bir ekstrakt elde edildi. Daha sonra bu ekstrakt buhner hunisi ile vakumlanarak süzüldü. Geri kalan tortu 30 ml % 80'lik aseton ile tekrar ezildi. Bu işlem tortunun rengi tamamen beyazlaşıncaya kadar sürdürüldü ve buhner hunisi ile süzülerek süzüntüler birleştirildi. Geriye kalan renksiz tortu % 80'lik asetonla yıkanarak toplam süzüntünün son hacmi 100 ml' ye tamamlandı. Daha sonra spektrofotometrede ekstraktların 440, 645 ve 663 nm dalga boylarında ayrı ayrı absorbansları köre karşı okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden mg.g^{-1} taze ağırlık cinsinden pigment tayinine gidildi (Witham ve arkadaşları 1971) [73].

2.7. Kimyasal Analizler:

2.7.1. Protein Analizi:

Nohut fidelerinde protein ekstraksiyonu Larson-Beevers (1965) [74] metoduna göre yapıldı. Bu amaçla bütün gruplar için ayrı ayrı eşit sayıda fide kullanıldı. Fidelerin

köklerinde bulunan nodüller ayıklandıktan sonra toplam ağırlıkları tespit edildi ve steril bir makasla parçalara bölünerek blendıra konuldu. Bundan sonra üzerine 100 ml 50 mM sodyum fosfat tamponu eklenerek 4 dakika süreyle homojenize edildi. Bu sürenin bitiminde oluşan ekstrakt buhner hunisi ile süzüldü. Daha sonra blendır 40 ml tamponla yıkanarak tekrar 30 saniye süreyle homojenize edildi ve süzüldü. Süzüntüler toplamı 250'lik bir mezüre aktarıldı ve saf su ile hacmi 150 ml ye tamamlandı. Bundan sonra 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak içine bu süzüntüden 10 ml konuldu ve 10 dakika süreyle buz banyosunda tutuldu. Sonra tüpün üzerine % 20'lik TCA' dan 3.3 ml ilave edildi ve tekrar 10 dakika süreyle buz banyosunda bekletildi. Bu sürenin bitiminde buz banyosundan çıkarılan tüpler 2000 gravitede 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant kısmı atıldı. Pelet kısmına ise 2 ml % 1'lik TCA ilave edildi. Aynı süre ve gravitede santrifüj işlemi tekrarlanarak süpernatant kısmı atıldı. Bundan sonra pelete 5 ml 0.1 N sodyum hidroksit ilave edildi ve 10 dakika vortekslendi.

Daha sonra bu karışımdan bir deney tüpüne 0.2 ml alındı ve Lowry (1951) metoduna göre uygulamalar yapıldı ve spektrofotometrede 725 nm'de köre karşı absorbansları okundu [75]. Spektrofotometrede okunan absorbans değerleri protein standart eğrisinde yerine konularak buna karşılık gelen protein konsantrasyonu $mg.g^{-1}$ taze ağırlık cinsinden tespit edildi.

2.7.2. Prolin Analizi:

Uygulama yapılan bütün gruplardan ayrı ayrı 0.5 g taze yaprak dokusu materyal olarak kullanıldı. Yapraklardaki serbest prolin miktarı asit Ninhidrin yöntemine göre spektrofotometrik olarak analiz edildi (Bates, 1973) [76].

Analizde, 0.5 g yaprak materyali kullanıldı. Yaprak dokusu 10 ml %3'lük sulu sülfosalisilik asit içinde homojenize edilip whatman no:2 filtre kağıdından süzüldü (% 3'lük sülfosalisilik asit; 3 g sülfosalisilik asit + 100 ml safsu ile hazırlandı). Süzüntünün 2 ml'si 2 ml ninhidrin (0.2 g ninhidrin + % 96'lık 20 ml etil alkolde çözülür ve saf suyla 200 ml'ye tamamlanır) ve 2 ml glasiyel asetik asit(soğuk) ile beraber bir test tüpü içinde 100 ºC'de (su banyosunda) 1saat reaksiyona sokuldu ve reaksiyon buz banyosunda tamamlandı. Daha sonra bu karışıma 4 ml toluen ilave edildi ve 15-20 saniye vortekslendi. Kromofor içeren toluen fazı aspire edilerek oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Spektrofotometrede 520 nm'de absorbansları okundu. Spektrofotometrede okunan

absorbans değerleri prolin standart eğrisinde yerine konularak buna karşılık gelen prolin konsantrasyonu μmol.g^{-1} taze ağırlık cinsinden tespit edildi.

2.7.3 MDA Analizi:

Uygulama yapılan bütün gruplardan ayrı ayrı 1 g yaprak dokusu alındı ve üzerine 10 ml % 0.1'lik TCA ilave edilerek steril bir havanda parçalandı. Elde edilen homojenat 3 santrifüj tüpüne eşit şekilde paylaştırıldı ve 6000 gravitede 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üst fazlar ayrı ayrı üç tüpe alındı ve tüplere 4'er ml % 0.5'lik TBARS ilave edildi ve vortekslendi. Daha sonra her bir tüpe 0.4 'er ml BHT ilave edildi. 95 ^{o}C'de 30-45 dakika ısıtıldı ve buz banyosunda aniden soğutuldu (oda sıcaklığında 10-15 dakika bekletilir). Her bir tüpe 3'er ml bütanol ilave edilip, vortekslendi ve santrifüj edilerek süpernatant kısmı otomatik pipetle dikkatli bir şekilde bir tüpe toplandı. Spektrofotometrede 532 nm'de köre karşı absorbansları okundu. Spektrofotometrede okunan absorbans değerleri TBARS standart eğrisinde yerine konularak buna karşılık gelen malondialdehit konsantrasyonu nmol.g^{-1} taze ağırlık cinsinden tespit edildi (Heath, 1968) [77].

2.7.4. Glutatyon Analizi:

Uygulama yapılan bütün gruplardan ayrı ayrı 1 g taze yaprak dokusu materyal olarak kullanıldı. 1 g yaprak dokusu tartıldı ve bir erlen içine konuldu. Üzerine 30 ml % 5'lik TCA eklenerek homojenize edildi. elde edilen homojenat 6000 gravitede 4 ºC' de 15 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatantın pH' sı 7.5' e ayarlandı ve 412 nm' de absorbansı okundu. Absorsbans sonuçları GSH için hazırlanan standart eğride yerine konularak, μg.g^{-1} taze ağırlık olarak yorumlandı (Ellman, 1959; Griffith 1980) [78, 79].

İstatistik Analizler:

Çalışmamızdaki bütün parametreler 3 tekrarlı olarak yapıldı. Verilerin doğruluk değerleri SPSS - 15 paket programı kullanılarak ortalama ve One -way ANOVA ile test edildi.

2.8. Standartların Hazırlanması:

2.8.1. Protein Standardı:

Protein standardının hazırlanmasında protein stok solüsyonu kullanıldı. Stok proteinden 0.25, 0.50, 0.75 ve 1 $mg.ml^{-1}$'lik sulu konsantrasyonlar hazırlanarak kullanıldı.

2.8.2. Prolin Standardı:

Prolin standardının hazırlanmasında saf prolin'den 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 $\mu g.ml^{-1}$'lik konsantrasyonlarda sulu çözeltiler kullanıldı.

2.8.3. MDA Standardı:

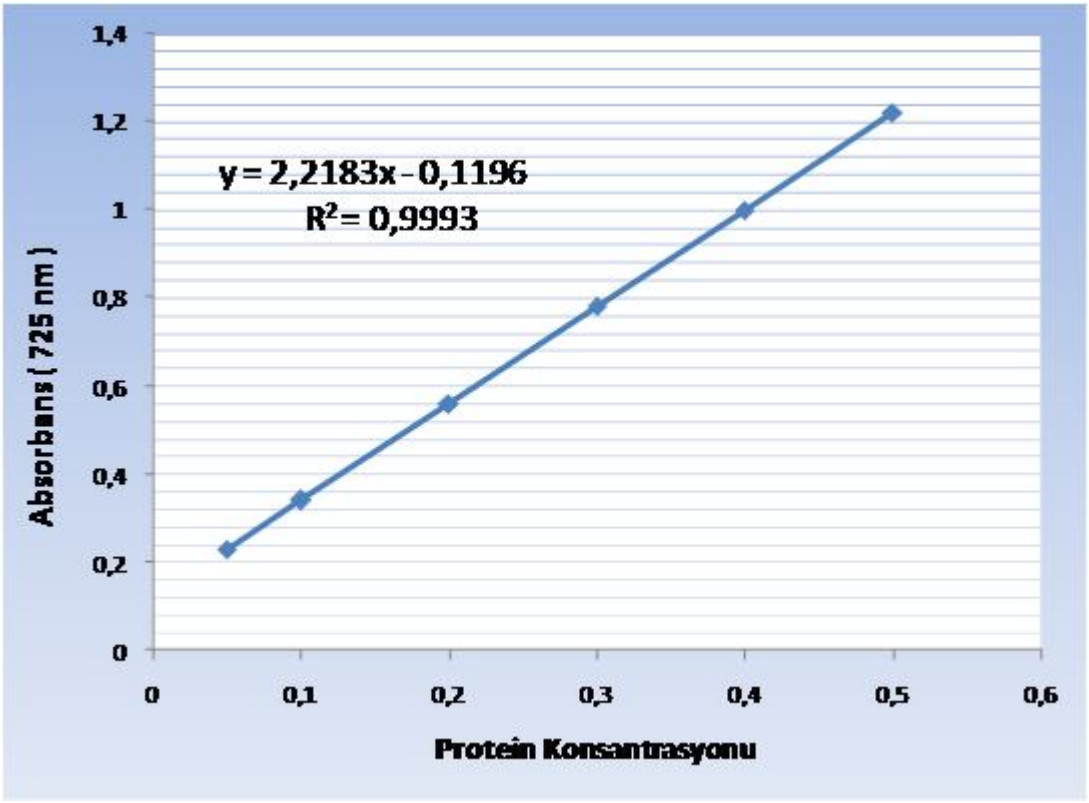
Standart olarak 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (TEP) kullanıldı, 2, 4, 6 ve 8 $nmol.ml^{-1}$'lik konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlandı. Absorbans değerleri kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı.

2.8.4. Glutatyon Standardı:

Bitkisel dokulardaki GSH miktarı tayini saf GSH standardından hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı. Bunun için biri kör olmak üzere 6 tüp hazırlandı. Hazırlanan GSH standardı (0.0054 g GSH 10 ml saf su) 20, 40, 60, 80 ve 100 $\mu g.\ ml^{-1}$'lik olacak şekilinde seyreltildi.

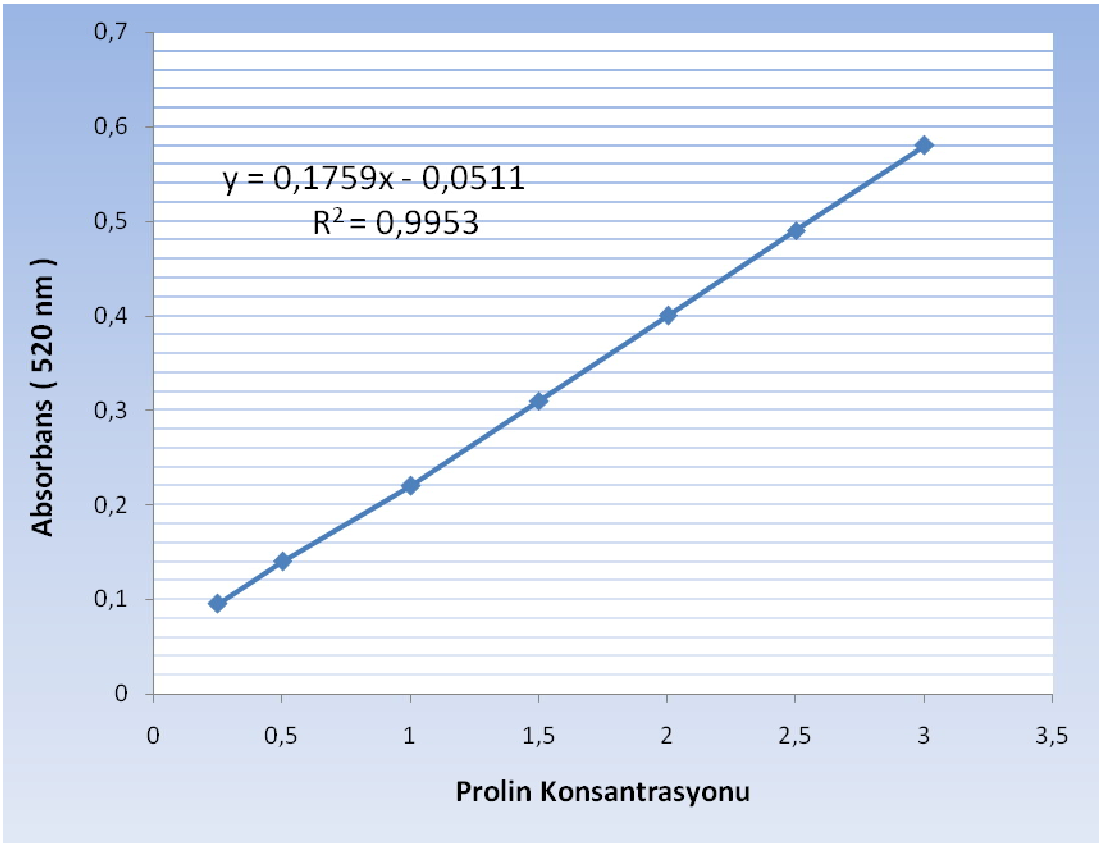
2.9. Kalibrasyon Eğrileri

2.9.1. Protein Kalibrasyon Eğrisi



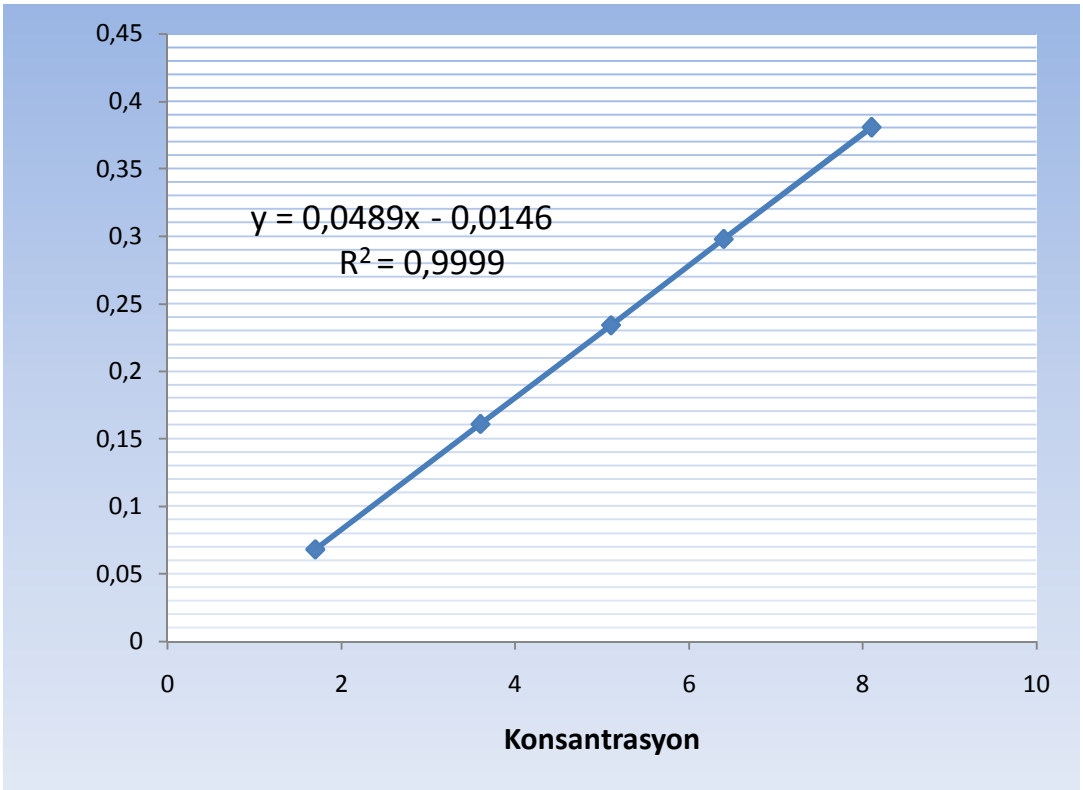
Şekil 6. Protein kalibrasyon eğrisi

2.9.2. Prolin Kalibrasyon Eğrisi



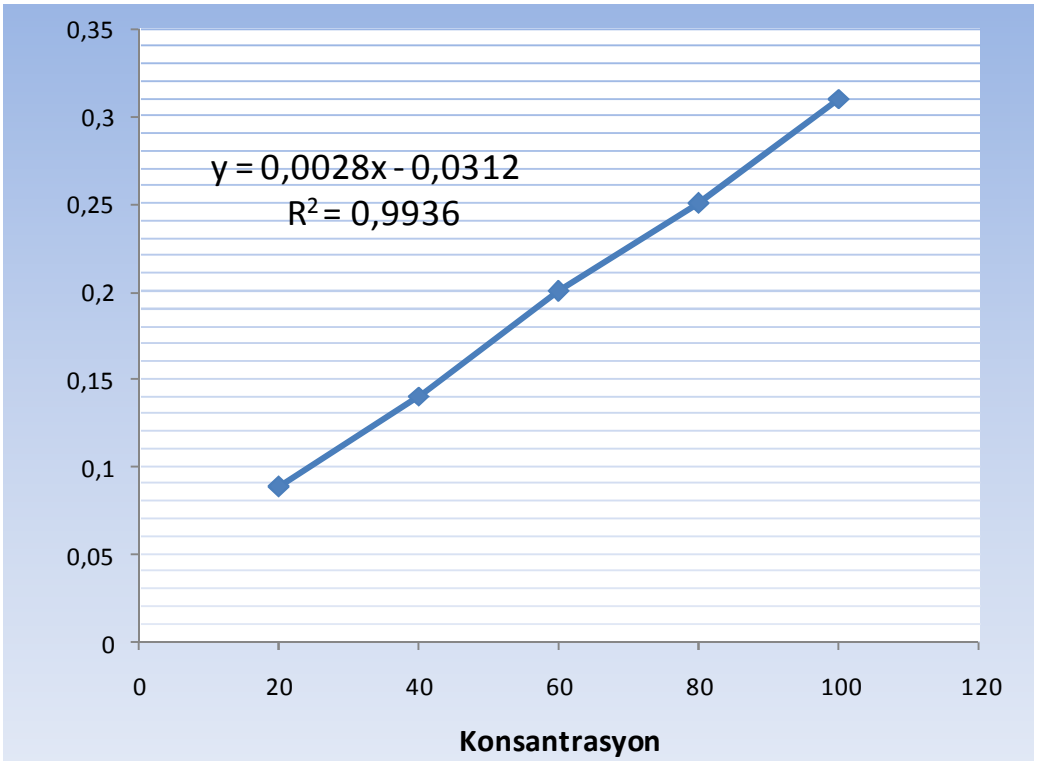
Şekil 7. Prolin kalibrasyon eğrisi

2.9.3. MDA Kalibrasyon Eğrisi



Şekil 8. MDA kalibrasyon eğrisi

2.9.4. Glutatyon Kalibrasyon Eğrisi



Şekil 9. Glutatyon kalibrasyon eğrisi

3. BULGULAR

Bu araştırmada farklı kadmiyum konsantrasyonlarının (25, 50 ve 100 µM) nohut fidelerine uygulanmasından önce salisilik asit ön uygulamasının kadmiyuma verilen fizyolojik ve biyokimyasal cevaplar üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmada, salisilik asit ön uygulaması 0.5 mM konsantrasyonunda ve 24 saat olacak şekilde tasarlanmıştır. Salisilik asit uygulamasından sonra fideler bir gün süreyle dinlendirilmiş ve daha sonra farklı kadmiyum konsantrasyonları ayrı ayrı gruplara uygulanmıştır. Uygulamaların tümü kökler aracılığıyla hidrofonik yöntem ile yapılmıştır. 24 saatlik ağır metal uygulamasından sonra fideler, büyüme parametreleri (fide boyu, fide taze ağırlığı ve kuru ağırlığı) bakımından incelenmiş, yapraklar pigment, prolin, malondialdehit ve redükte glutatyon (GSH) miktarları, fideler ise protein miktarı bakımından analiz edilmiştir.

3.1. Büyüme Parametrelerindeki Değişiklikler

Büyüme parametreleri bakımından kontrol ile SA ve 25 µM Cd gruplarına ait fideler arasında fide boyu uzaması üzerinde istatistiki açıdan anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($P \geq 0.05$). Ancak SA - 50 µM Cd, SA - 25 µM Cd, SA - 100 µM Cd, 50 µM Cd ve 100 µM Cd gruplarına ait fideler kontrol grubuna göre fide boy uzamasında sırasıyla % 5.60, % 6.80 , % 7.59, % 8.41 ve % 9.20 oranlarında gecikmeye yol açmıştır. Ayrıca bütün grupların ilk tespit edilen boyları ile son tespit edilen boyları arasındaki % değişim artma ve azalma şeklinde Tablo-1' de parantez içinde verilmiştir. Fakat salisilik asit ön uygulaması yapılan ve yapılmayan kadmiyum gruplarına ait fideler arasında fide boy uzaması bakımından tespit edilen farklar istatistiki açıdan anlamlı bulunamamıştır ($P \geq 0.05$).

Benzer şekilde fide taze ağırlığı bakımından kontrol ile SA, 25 µM Cd ve SA- 50 µM Cd gruplarına ait fidelerin taze ağırlıkları bakımından istatistiki açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P \geq 0.05$). Ancak SA -25 µM Cd, SA -100 µM Cd, 50 µM Cd ve 100 µM Cd gruplarına ait fidelerin taze ağırlık artışı kontrol grubu fidelerine kıyasla sırasıyla % 14.08, % 15.27, % 15.57 ve % 19.17 oranlarında geride kalmış olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Fakat salisilik asit ön uygulaması yapılan ve yapılmayan kadmiyum gruplarına

ait fideler arasında taze ağırlık bakımından tespit edilen farklar anlamlı bulunamamıştır ($P \geq 0.05$).

Şekil 10. Bir kontrol fidesinin genel görünümü

Kuru ağırlık miktarlarına bakıldığında, sadece SA - 100 µM Cd ve 100 µM Cd gruplarına ait fidelerde kontrol grubuna kıyasla % 21.37 ve % 16.24 oranlarında anlamlı bir azalışa yol açmıştır. Diğer ilgili gruplardaki fidelerin kuru ağırlık azalışları anlamlı bulunamamıştır ($P \geq 0.05$).

Tablo 1. Nohut (*Cicer arietinum* L.) fidelerinde SA ön uygulamasının, büyüme parametreleri üzerinde kadmiyumun toksisitesine etkileri

Kadmiyum (µM)	Fide boyu (cm)		Taze ağırlık (g)		Kuru ağırlık (g)	
	SA (0 mM)	SA (0.5 mM)	SA (0 mM)	SA (0.5 mM)	SA (0 mM)	SA (0.5 mM)
saf su	41.66±0.76 (% 8.20 +)	40.58±0.50 (% 4.96 +)	3.34±0.23	3.17±0.06	1.17±0.07	1.15±0.05
25	40.50±1.00 (% 1.68 +)	38.83±0.57 (% 0.43 +)¤*	3.02±0.06	2.87±0.19¤	1.19±0.07	1.04±0.12
50	38.16±0.76 (% 2.62 -)¤	39.33±1.25 (% 0.83 -)¤	2.82±0.11¤	2.99±0.10¤	1.12±0.06	1.09±0.07
100	37.83±0.76 (% 4.41 -)¤	38.50±0.50 (% 1.71 -)¤	2.70±0.17¤	2.83±0.20¤	0.98±0.06¤	0.92±0.10¤

¤Kontrole kıyasla, *İlgili gruba kıyasla; $p<0.05$ olasılık seviyelerinde önemli. Verilerin ortalaması ±SE (n: 10)

Uygulamalardan sonra, gruplara ait fideler arasında makroskobik gözlemlerimize baktığımızda gerek salisilik asit ön uygulamalı gerekse ön uygulamasız gruplarda kadmiyum konsantrasyonu artışına paralel olarak büyüme inhibisyonu belirgin bir şekilde gözlendi. Bu gözlemlerimiz özellikle adventif köklenmenin geride kaldığı, primer kök uçlarında renk değişimi ve doku yumuşaması olduğunu bize gösterdi. Gövde ve yapraklara bakıldığında cılızlaşma ve büzüşmeler meydana geldiği tespit edildi. Salisilik asit ön uygulamalı gruplar ile ön uygulamasız gruplar arasındaki kıyaslamada ise 25 µM Cd için çok belirgin bir fark gözlenmezken, 100 µM Cd'a kıyasla 50 µM Cd için salisilik asidin bitkiyi tolere etme konusunda daha başarılı olduğunu gözlemlendi.

Şekil 11. SA uygulanmış bir fidenin genel görünümü

Tablo 2. Nohut (*Cicer arietinum* L.) fidelerinde SA ön uygulamasının, fotosentetik pigment ve protein miktarları üzerinde kadmiyumun toksisitesine etkileri

Kadmiyum (µM)	Klorofil a+b mg.g^{-1} TA		Karotenoid mg.g^{-1}TA		Protein mg.g^{-1}TA	
	SA (0 mM)	SA (0.5 mM)	SA (0 mM)	SA (0.5 mM)	SA (0 mM)	SA (0.5 mM)
saf su	2.877±0.11	2.693±0.14	0.362 ±0.01	0.394±0.02	1.84±0.24	1.75±0.34
25	2.520±0.13¤	2.443±0.18¤	0.341±0.03	0.335±0.05	1.59±0.31	1.58±0.27
50	2.236±0.06¤	2.366±0.07¤	0.350±0.01	0.375±0.01	1.30±0.27¤	1.33±0.18¤
100	2.053±0.07¤	2.183±0.16¤	0.278±0.05¤	0.295±0.02¤	1.23±0.22¤	1.29±0.15¤
¤Kontrole kıyasla, *İlgili gruba kıyasla; $p<0.05$ olasılık seviyelerinde önemli. Verilerin ortalaması ±SE (n: 3)						

3.2. Klorofil (a+b) ve Karotenoid Miktarı

Yapılan uygulamaların yaprakta klorofil (a+b) miktarı üzerine etkileri incelendiğinde, kontrol grubu fidelerine kıyasla salisilik asit grubu arasında fark tespit edilememiştir. Ancak gerek salisilik asit ön uygulaması yapılan gerekse yapılmayan gruplarda kadmiyum konsantrasyonunun artışına paralel olarak klorofil (a+b) miktarının önemli ölçüde azalmış olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla 25 µM Cd, SA - 25 µM Cd, SA - 50 µM Cd, 50 µM Cd, SA - 100 µM Cd ve 100 µM Cd gruplarında sırasıyla % 12.41, % 15.09, % 17.98, % 22.29, % 24.13 ve % 28.65 oranlarında azalma tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Fakat bu parametre için ilgili gruplar kendi içinde anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($P \geq 0.05$).

Tablo 2 de görüldüğü üzere uygulama yapılan grupların sadece SA - 100 µM Cd ve 100 µM Cd uygulamaları dışında diğer bütün gruplarda kontrol fidelerinin yapraklarına kıyasla karotenoid miktarı farksız bulunmuştur ($P \geq 0.05$). Kontrol grubuna kıyasla SA - 100 µM Cd ve 100 µM Cd uygulanan gruplarda sırasıyla % 18.51 ve % 23.21 oranlarında karotenoidler yıkıma uğramıştır ($P < 0.05$). Yine benzer şekilde salisilik asit ön uygulaması yapılan ve yapılmayan ilgili gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir ($P \geq 0.05$). Fakat bu parametredeki değişimler çok hareketli bulunmuştur.

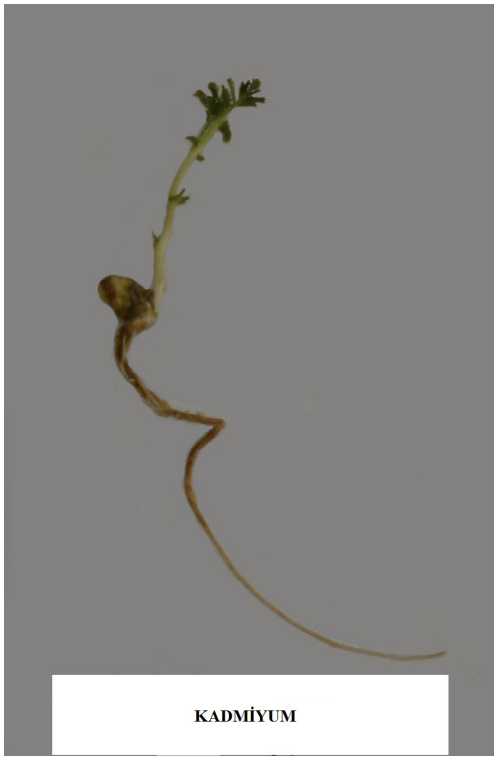
3.3. Protein Miktarı

Uygulamalar sonrasında kontrol grubu fidelerine kıyasla SA - 25 µM Cd, 25 µM Cd ve SA grubu fidelerde protein miktarı bakımından tespit edilen farklar anlamlı bulunamamıştır ($P \geq 0.05$). Ancak SA -50 µM Cd, 50 µM Cd, SA -100 µM Cd ve 100 µM Cd gruplarına ait fidelerde kontrol grubu fidelerine kıyasla sırasıyla % 27.72, % 29.35, % 29.90 ve % 33.16 oranlarında önemli ölçüde azalmalar tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Fakat bu parametreler için salisilik asit ön uygulaması yapılan ve yapılmayan kadmiyum gruplarına ait fideler arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan anlamlı bulunamamıştır ($P \geq 0.05$).

Tablo 3. Nohut (*Cicer arietinum* L.) fidelerinde SA ön uygulamasının, MDA, glutatyon ve prolin miktarları üzerinde kadmiyumun toksisitesine etkileri

Kadmiyum (µM)	Prolin µmol.g^{-1}TA		Glutatyon µg.g^{-1}TA		MDA nmol.g^{-1}TA	
	SA (0 mM)	SA (0.5 mM)	SA (0 mM)	SA (0.5 mM)	SA (0 mM)	SA (0.5 mM)
saf su	2.57±0.14	2.67±0.12	20.16±2.84	26.05±2.76¤	51.97±8.77	53.85±8.62
25	2.83±0.17	2.53±0.13	26.55±4.83	33.10±4.92¤	68.17±7.37	61.91±5.07
50	4.02±0.22¤	3.19±0.41*	28.27±4.45¤	38.44±5.25¤*	77.70±7.43¤	58.40±7.63*
100	3.99±0.12¤	3.40±0.40¤	31.49±5.48¤	34.16±4.00¤	81.65±8.12¤	74.61±8.07¤

¤Kontrole kıyasla, *İlgili gruba kıyasla; $p<0.05$ olasılık seviyelerinde önemli. Verilerin ortalaması ±SE (n: 3)



Şekil 12. Kadmiyum uygulanmış bir fidenin genel görünümü

3.4. Prolin Miktarı

Yapraklarda prolin miktarı kontrol grubuna kıyasla SA - 50 µM Cd, SA - 100 µM Cd, 50 µM Cd ve 100 µM Cd gruplarında sırasıyla % 24.12, % 32.29, % 56.42 ve % 55.25 oranlarında tespit edilmiştir. Ayrıca salisilik asit ön uygulaması yapılmayan 50 ve 100 µM Cd gruplarına ait fidelerin yapraklarına kıyasla, salisilik asit ön uygulaması yapılan gruplarda sırasıyla % 20.65 ve % 14.79 oranlarında azalma meydana geldiği tespit edilmiştir ($P < 0.05$).

Diğer grupların fidelerinden alınan yapraklardaki prolin miktarı farklılıkları kontrol grubuna kıyasla ve birbirlerine kıyasla anlamlı bulunamamıştır ($P \geq 0.05$).

3.5. Malondialdehit Miktarı

Yapılan uygulamalar sonrasında, fidelerin yapraklarındaki MDA miktarında kontrol grubu fidelerine kıyasla 25 µM Cd, SA - 100 µM Cd, 50 µM Cd ve 100 µM Cd gruplarında sırasıyla % 31.17, % 43.56, % 49.50 ve % 57.10 oranlarında artış tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Ayrıca salisilik asit ön uygulaması yapılmayan gruplara kıyasla sadece 50 µM Cd uygulanan ön uygulamalı gruptaki fide yapraklarında MDA miktarı % 24.84 oranında azaldığı tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Diğer ön uygulamasız kadmiyum uygulanan gruplarda MDA miktarı daha fazla bulunmakla birlikte ön uygulamalı gruplarla kıyaslandığında istatistiki açıdan anlamlı bulunamamıştır ($P \geq 0.05$).

3.6. Glutatyon Miktarı

Yapılan uygulamalar sırasında, fidelerin yapraklarındaki GSH miktarında kontrol grubu fidelerine kıyasla SA, SA - 25 µM Cd, 50 µM Cd, SA - 50 µM Cd, 100 µM Cd ve SA - 100 µM Cd gruplarda sırasıyla % 29.21, % 64.18, % 40.22, % 90.67, % 56.20 ve % 69.44 oranlarında arttığı tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Salisilik asit ön uygulamalılara kıyasla ön uygulamasız gruplarda GSH miktarı hep düşük bulunmakla beraber, sadece 50 µM Cd uygulaması için tespit edilen düşüş anlamlı bulunmuştur ($P < 0.05$). 50 µM Cd uygulanan salisilik asit ön uygulamasız gruba kıyasla salisilik asit ön uygulamalı olanda % 35.97 oranında GSH artışı tespit edilmiştir.

Şekil 13. SA – Kadmiyum uygulanmış bir fidenin genel görünümü

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Nohut *(Cicer arietinum* L. cv) fideleri üzerinde yapılan bu çalışmada, fidelere önceden uygulanan salisilik asit konsantrasyonunun, daha sonra uygulanan kadmiyum konsantrasyonlarına verilen cevaba etkileri incelenmiştir. Genel olarak fidelere uygulanan kadmiyum konsantrasyonları arttıkça, gerek salisilik asit ön uygulaması yapılan gerekse yapılmayan gruplarda kontrole kıyasla fide boyu büyümesini, taze ve kuru ağırlık miktarlarını çoğu kez anlamlı bir şekilde azaltmıştır [9, 12, 13, 49, 50, 62, 63, 65]. Yine fidelerde protein miktarı, yapraklarda da pigment miktarı aynı şekilde azalmıştır. Benzer sonuçlar kadmiyum uygulanmış farklı bitkilerde de rapor edilmiştir [9, 13, 49, 50, 54-57, 62, 64]. Fakat bu parametreler üzerinde salisilik asit ön uygulamalı gruplar ile ön uygulamasız gruplar arasında tespit edilen farklılıklar istatistiki açıdan anlamlı bulunamamıştır. Kadmiyum uygulamalarından sonra daha uzun süre gözlem altına alınmadan, hemen analizlere gidilmiş olması, özellikle büyüme parametrelerinde gruplarda tespit edilen olumsuz etkilerin yansımalarının daha az belirgin olmasına yol açmıştır. Ancak makroskobik anlamda yapraklarda nekrozis, klorozis, büzüşme ve özellikle kök dokusunda yıkımlara bağlı yumuşamalar gözlenmiştir. Salisilik asit ön uygulamasının kadmiyumun yarattığı toksik etkiyi membranların geçirgenliğini azaltmak veya bütünlüğünü korumak suretiyle gerçekleştirdiği düşünülmektedir [12,13].

Özellikle ağır metal stresinde sıklıkla kontrol edilen bir parametre olan ve yapraklarda sorgulanan prolin miktarı konusunda kontrole kıyasla diğer gruplarda anlamlı artışlar tespit edilmiştir. Ancak bu parametre bakımından salisilik asit ön uygulamalı 50 ve 100 µM kadmiyum uygulanmış fidelerde, ön uygulama yapılmayan söz konusu gruplara kıyasla anlamlı ölçüde azalma tespit edilmiştir [62,64]. Bu durum ağır metal stresinin sebep olduğu oksidatif stresin salisilik asit ön uygulamalı gruplarda daha az seviyede yaşandığını düşündürmektedir. Fakat bu konuda salisilik asit ön uygulamalı ve ön uygulamasız 25 µM kadmiyum uygulamaları hem birbirine hem de kontrole kıyasla anlamlı bir fark sergileyememiştir.

Yapraklarda, oksidatif stresin şiddetini gösteren önemli bir parametre olan ve hücre membranındaki lipit peroksidasonunun hızını gösteren MDA konusunda çalışılan gruplar arasında önemli farklılıklar tespit edilmiştir [12]. Salisilik asit ön uygulaması 50 µM kadmiyum uygulaması için, 100 µM kadmiyum uygulamasına karşın daha etkili olmuştur.

Salisilik ön uygulaması her iki konsantrasyon için de MDA miktarını aşağı çekmiştir. Ancak sadece 50 µM kadmiyum için bu başarısı istatistiki açıdan anlamlı bulunmuştur. Öyle ki bu konuda kontrol grubuna yakın değerler tespit edilmiştir. Bu durum bizde seçilen salisilik asit konsantrasyonun ve ön uygulama süresinin 100 µM kadmiyum dozu için başarılı olamadığı düşüncesini yaratmıştır [9, 63].

Bitkilerde glutatyon serbest radikallerle mücadele eden ve normal bir hücrede de belirli bir seviyede bulunan antioksidan koruyucu sisteme ait önemli bir non-enzimatik temizleyici moleküldür. Mevcut literatürler bu molekülün oksidatif stres karşısında türe ve seçilen dokuya göre artma [51, 63] veya azalma [12] şeklinde farklı sonuçları rapor etmektedir. Nohut fidelerinin yapraklarında salisilik asit ön uygulamalı ve ön uygulamasız bütün gruplarda kontrole kıyasla genel anlamda glutatyon değerleri yüksek bulundu [51, 63]. Salisilik asit ön uygulamalı gruplarda 50 µM kadmiyum için anlamlı bir artış tespit edildi. Benzer artış salisilik asidin glutatyon biyosentezi konusunda özel bir rol oynadığını düşündürmektedir [52]. Dolayısıyla glutatyon konusundaki farklılıklar enzimsel bir dayanağa oturtulabilir. Yüksek kadmiyum konsantrasyonu için GSH miktarının artık düşüşe geçtiği tespit edilmiştir [12]. Bu sonuçlar salisilik asit ön uygulamalı gruplarda artan glutatyonun serbest radikallere karşı savunmada bir üstünlük sağladığı ya da serbest radikallerin salisilik asit ön uygulamalı gruplarda daha az üretildiği şeklinde de yorumlanabilir. Nitekim tek başına salisilik asit uygulanan grupların fide yapraklarında glutatyon miktarı kontrole kıyasla daha fazla bulunmuştur.

Yapraklarda, pigment miktarı bakımından kontrole kıyasla salisilik asit ön uygulamalı ve ön uygulamasız gruplarda genel olarak kadmiyum konsantrasyonu arttıkça klorofil a+b miktarı düşük bulunmuştur. Bu durum pigment yıkımının artmasından kaynaklanıyor olabilir [49, 50, 54-56, 64]. Ancak gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan anlamlı bulunmamıştır [13, 50, 54]. Karotenoidlerin miktarı sadece 100 Cd ve SA - 100 Cd grupları için kontrole kıyasla düşük bulunmuştur [9, 64]. Kısacası pigment miktarlarına bakıldığında kontrole kıyasla anlamlı azalmalara rağmen, ilgili gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

Elde edilen veriler 25 µM kadmiyum uygulamasının olumsuz etkiyi yaratma konusunda daha az başarılı olduğunu, 100 µM kadmiyumun ise bazı parametreler için salisilik asit ile birlikte dahi önemli yıkımlara yol açtığını göstermektedir. Genel anlamda salisilik asit uygulaması kadmiyuma bağlı oksidatif stresin olumsuz etkilerini nohut fidelerinde bazı parametreler için istatistiki açıdan anlamlı olarak azaltmıştır. Sonuç olarak

elde edilen bulgular salisilik asit ön uygulamasının kadmiyumun yarattığı oksidatif stresi sınırlı ölçüde de olsa düzenleyebildiğini düşündürmektedir. Ancak bu çalışmanın diğer bir ayağını oluşturan köklerde de aynı parametrelerin sorgulanmasının ve diğer antioksidan enzimatik olan ve olmayan temizleyici unsurların da çalışılmasının konunun tam anlaşılmasına katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

[1] **Hayat S., Ahmad A.**, Salicylic acid : a plant hormone, Deparment of Botany.

[2] **Arteca R. N.,** 1996. Plant Growth Substance Principles and Applications. Chapman and Hall, New York, 332p.

[3] **Davies, P. J.,** 1995. Salicylic Acid, Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Klower Acad. Pub., London, 833 p.

[4] **Yalpani, N.; P. Silverma; T. M. A. Wilson; D. A. Kleier and I. Raskin,** 1991. Salicylic Acid is A Systemic Signal and An Inducer of Pathogenesis- Related Proteins in Virus – Infected Tobacco. The Plant Cell, **3**, 809-818.

[5] **Glass, A.D.,** 1973a. Influence of phenolic acids on ion uptake. III. Inhibition of potassium absorption. Chemistry and Physiology of salicylic acid J. Exp. Bot., **25**, 1104-1113.

[6] **Glass, A. D.,** 1973b. Influence of phenolic acids on ion uptake. I. Inhibition of phosphate uptake. Plant physiol, **51,** 1037-1041.

[7] **Nafees A. Khan, Shabina Syeed, Asim Masood,** 2010. Application of salicylic acid increases contents of nutrients and antioxidative metabolism in mungbean and alleviates adverse effects of salinity stress. Internatıonal Journal of Plant Biology; 1e 1doi:4081/pb.2010 e1.

[8] **Durner J., Shah J., Klessig D. F**., 1997, Salicylic acid and disease resistance in plants. Trends Plant Sci, **2**, 266-74.

[9] **Metwally A., Finkemeier I., Georgi M., Dietz K.J.,** 2003. Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. Plant Physiol, **132**, 272-81.

[10] **Pal, M., Szalai G., Horvath, E., Janda, T., Paldi, E.,** 2002. Effect of salicylic acid during heavy metal stress. Proc. 7th Hungarian Cong. Plant Physiol, **46**, 119-120.

[11] **Ebehard, S., N. Doubrava, V. Marta, D. Mohnon, A. Southhwick, A. Darviell and P. Albersheim.,** 1989. Pectic cell wall fragments regulate tobacco thin-cell layer explant morphogenesis. Plant Cell, **1,** 747-755.

[12] **Choudhury, S., S. K. Panda,** 2004. Role of Salicylic acid in Regulating Cadmium Induced Oxidative in *Oryza sativa* L. Roots. Bulg. J. Plant Physiol, **30** (3-4), 95-110.

[13] **Ashraf, M., I. Finkemeier, M. Georgi and K. J. Dietz,** 2003.Salicylic acid alleviates the cadmium Toxicity in Barley Seedlins. Plant Physiology, **132**, 272-281.

[14] **Pancheva T. V., Popova L. P., Uzunova A. N.,** 1996. Effects of salicylic acid on growth and photosynthesis in barley plants. J. Plant Physiol, **149**, 57-63.

[15] **Fariduddin Q., Hayat S. and Ahmad A.,** 2003. Salicylic acid Influences Net Photosynthetic Rate, Carboxylation Efficiency, Nitrate Reductase Activity and Seed Yield in *Brassica juncea*. Photosynthetica, **41** (2), 281-284.

[16] **Levitt, J.,** 1980. Responses of plants to environmental stresses, Vol. 1,2nd ed. Academic Pres, New York.

[17] Bitki fizyolojisi Lincoln taiz. University of California, santa cruz, eduardo zeiger university of California, los Angeles çeviri editörü prof. Dr. İsmail Türkan Ege Üniversitesi, İzmir.

[18] **Lawlor, D. W. and Cornic, G.,** 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. Plant Cell Environ, **25**, 275-294.

[19] **Sharma Y. K., Leon J., Raskin I., Davis K. R.,** 1996. Ozone-induced responses in Arabidopsis thaliana – the role of salicylic acid in the accumulation of defence-related transcripts and induced resistance. Proc Natl Acad Sci USA; **93**, 5099–104.

[20] **Janda T., Szalai G., Tari I., Pa´ldi E.,** 1999. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (Zea mays L.) plants. Planta, **208**, 175–180.

[21] **Tasgin E., Attici O., Nalbantogly B.,** 2003. Effect of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. Plant Growth Regul, **41**, 231–6.

[22] **Chen Z., Iyer S., Caplan A., Klessig D. F., Fan B.,** 1997. Differential accumulation of salicylic acid and salicylic acidsensitive catalase in different rice tissues. Plant Physiol, **114**, 193–201.

[23] **Dat J. F., Foyer C. H., Scott I. M.,** 1998a. Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings. Plant Physiol, **118**, 1455–61.

[24] **Dat J. F., Lopez-Delgado H., Foyer C. H., Scott I. M.,** 1998b. Parallel changes in H_2O_2 and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. Plant Physiol, **116**, 1351–7.

[25] **Borsani O., Valpuesta V., Botella M. A.,** 2001. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in Arabidopsis seedlings. Plant Physiol, **126**, 1024-30.

[26] **Senaratna T., Touchell D., Bunns E., Dixon K.,** 2000. Acetyl salicylic acid (aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. Plant Growth Regul, **30**, 157–61.

[27] **Ananieva E. A., Christov K. N., Popova L. P.,** 2004. Exogenous treatment with salicylic acid leads to increased antioxidant capacity in leaves of barley plants exposed to paraquat. J Plant Physiol, **161**, 319–28.

[28] **Malamy J., Carr J. P., Klessig D. F., Raskin I.,** 1990. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. Science;250:1.

[29] **Durner J., Shah J., Klessig D. F.,** 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. Trends Plant Sci, **7**, 266–74.

[30] **Shakirova, F. M., M. V. Bezrukova,** 1997. Induction of wheat resistance against environmental and salinization by salicylic acid. Biology Bulletin, **24**, 109-112.

[31] **Bezrukova, M. V., R. Sakhabutdinova, R. A. Fatkhutdinova, I. Kyldiarova,** 2001. The role of hormonal changes in protective action of salicylic acid on growth of wheat seedlings under water deficit. Agrochemiya (Russ.), **2**, 51-54.

[32] **Çanakçı S., Munzuroğlu Ö.,** 2004, Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Çeliklerinde Ağırlık Değişimleri, Pigment ve Protein Miktarları Üzerine Asetil Salisilik Asit ve Tuz (NaCl) Uygulamasının Karşılıklı Etkileri GÜ, Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi, Cilt 24, Sayı **1**, 23-40.

[33] **El-Tayeb M. A.,** 2005. Response of Barley Grains to The Interactive Effect of Salinity and Salicylic Acid. Plant Growth Regulation, **45**, 215-224.

[34] **Angelone, M. and C. Bini**, 1992. Trace element concentration in the soil and plants of Western Europe. In:Biogeochemistry of trace metal (Ed.: M.I. Arbor). D.C. Adriano, Lewis Publishers. pp. 19-670.

[35] **Wool House, H. W.,** 1983. Encyclopedia of plant physiology. In:Toxicity and tolerance in the responses of plants of metals (Eds: O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond and H. Ziiegler). New Series, Vol. **12** C, Springer-Verlag, Berlin. pp. 245-300.

[36] **Dietz K. J., Baier M., Kramer U.,** 1999. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: Prasad MNV, Hagemeger J (eds), Heavy metal stress in plants from molecules to ecosystems, pp. 73-97. Springer-Verlag, Berlin.

[37] **Macfarlane G. R., Burcheft M. D.,** 2001. Photosynthtic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the greyman grove, Avicennia marina (Forsk) Vierh. Mar. Pollut. Bull., **42**, 233-40.

[38] **Das P., Samantaray S., Rout G. R.,** 1997. Studies an cadmium toxicity in plants: a review. Environ. Pollution, **98**, 29-36.

[39] **Weast R. C.,** 1984. CRC Handbook of chemistry and Physics. 64th edn. CRC Press, Boca Raton.

[40] **Niess D. H,** 1999. Microbial heavy-metal resistance. Applied Microbiol. Biotech., **51**, 730-750.

[41] **Assche, F. V. and Clijsters, H.,** 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants, Plant and Cell Environment, **13**, 195-206.

[42] **Epstein, E. and A. J. Bloom,** 2005. Mineral Nutrition of Plant Principles and Perspective. 2nd Edn., Sinauer Assosiates, Inc. Publishers, Massachusetts.

[43] **Sheoran, I. S., Singal, H. R. and Singh, R.,** 1990. Effect of cadmium and nickel on photosynthesis and enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeon pea (*Cajanus cajon* L.) Photosynthesis Research, **23**, 345-351.

[44] **Kahle H.,** 1993. Response of roots of trees to heavy metals. Environ Exp Bot, **33**, 99–119.

[45] **Barcelo J., Poschenrieder C.,** 1990. Plant water relations as affected by heavy metal stress: review. J Plant Nutr, **13**, 1–37.

[46] **Boussama N., Quariti O., Ghorbal M. H.,** 1999. Changes in growth and nitrogen assimilation in barley seedlings under cadmium stress. J Plant Nutr, **22**, 731–52.

[47] **Hegedűs, A., S. Erdei, G. Horváth,** 2001. Comparative studies of H_2O_2 detoxifying enzymes in gren and greening barley seedlings under cadmium stres. Plant Sci., **160**, 1085-1093.

[48] **Van Assche, F., H. Clijsters,** 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. Plant Cell Environ, **13**,195-206.

[49] **Prasad, M. N. V.,** 1995. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. Environmental and Experimental Botany, **35**(4), 525-545.

[50] **Ramos, I., E. Esteban, J. J. Lucena and A. Gárate,** 2002. Cadmium uptake and subcellular distribution in plants os *Lactuca* sp. Cd-Mn Interaction. Plant Science, **162**, 761-767.

[51] **Hatata M. M., Abdel-Aal E. A.**, 2008. Oxidative stress and Antioxidant Defense Mechanismis in Respense to Cadmium Treatments. American- Eurasion J.Agric.& Environ. Sci, **416**, 655-669.

[52] **Freeman J. L., Garcia D., Kim D., Hopf A., Salt D. E.,** 2005. Constitutively elevated salicylic acid signals glutathione-mediated nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. Plant Physiol, **137,** 1082-91.

[53] **Yoshida, S., Tamaoki, M., Ioki, M., Ogawa, D., Sato, Y., Aono, M., Kubo, A., Saji, S., Saji, H., Satoh, S. and Nakajima, N.**, 2009. Ethylene and salicylic acid control glutathione biosynthesis in ozone-exposed *Arabidopsis thaliana*. Physiologia Plantarum, **136**(3), 284-298.

[54] **Vassilev, A. And I. Yordanov,** 1997. Reductive analysis of factors limiting growth of cadmium-treated plants: A review. Bulgarian Journal of Plant Physiology, **23** (3-4),114-133.

[55] **Klimentina, D. K., S. S. Lyudmila, P. S. Zlatimira and F. Urs,** 2006. Cadmium Stres in Barley: Growth, Leaf Pigment and Protein Composition and Detoxification of Reactive Oxygen Species. Journal of Plant Nutrition, **29**, 451-468.

[56] **Sandalio, L. M., Dalurzo, H. C., Gomez, M., Puortas-Romero M. C. and del Rio, L.A.,** 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea Plants Journal of Experimental Botany, **52** (362), 2115-2126.

[57] **Kevrešan, S., N. Petrović, M. Popović and J. Kandrać,** 1998. Effect of heavy metals on nitrate and protein metabolism in sugar beet. Biologia Plantarum, **41** (2), 235-240.

[58] **Govia, H., Garbel, M. H. and Meyer, C.,** 2000. Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean. Plant Physiology and Biochemistry, **38**, 629-638.

[59] **Quariti, O., Govia, H. and Ghorbal, M. H.,** 1997. Responses of Bean and Tomato Plants to Cadmium: Growth, Mineral Nutrition and Nitrate Reduction. Plant Physiology and Biochemistry, **35** (5), 347-354.

[60] **Mishra, A., M. A., Choudhuri,** 1999. Effects of salicylic acid on heavy metal-induced membrane degradation mediated by lipoxygenase in rice. Biol. Plant, **42**, 409- 415.

[61] **Ivanova A., Krantev A., Stoynova Z., Popova L.,** 2008. Cadmium Induced Changes in Maize Leaves and The Protective Role of Salicylic Acid, Gen. Appl. Plant Physiology, **34** (3-4), 149-159.

[62] **Krantev A., Yordonova R., Janda T., Szalar G., and Popova L.,** 2008. Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants, journal of Plant Physiology, **165**, 920-931.

[63] **Guo B., Liang Y., Zhu Y.,** 2009. Does salicylic acid regulate antioxidant defense system, cell death, cadmium uptake and partitioning to acquire cadmium tolerance in rice? Journal of Plant Physiology, **166** (1), 20-31.

[64] **Tantrey M. S. and Agnihatri R. K.,** 2010. Chlorophyll and Proline Content of Gram (*Cicer arietinum*) under Cadmium and Mercury Treatments, Reseach Journal of Agricultural Sciences, **1** (2), 199-122.

[65] **Hassan, M. J., Shao, G. and Zhang, G.,** 2006. Influence of Cadmium Toxicity on Growth and Antioxidant Enzyme Activity in Rice Cultivars with Different Grain Cadmium Accumulation. Journal of Plant Nutrition, **28**(7), 1259-1270.

[66] **Lin, C. C. and Kao, C. J.,** 1996. Proline accumulation is associated with inhibition of rice seedling root growth caused by naCl. Plant Science, **114**, 121-128.

[67] **Lutts, S., Kinet, J. M. and Bouharmont, J.,** 1996. Effects of salt stress on growth, mineral nutrition and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. Plant Growth Regul, **19**, 207-218.

[68] **Cavalieri, A. J. and Huang, A. H. C.,** 1979. Evaluation of proline accumulation in the adaptation of diverse species of marsh halophytes to the saline environment. Amer. J. Bot., **66**, 307-312.

[69] **Singh, T. N., Aspinal, D. and Paleg, L. G.,** 1972. Proline accumulation and varietal adaptability to drought in barley: A potential metabolic measure of drought resistance. Nature (London), **236,** 188-190.

[70] **Travacio, M. Polo, J. M. and Llesuy, S.,** 2000. Chromium (VI) induces oxidative stress in the mouse brain. Toxicol., **150**, 137-146.

[71] **Sen, C. K.,** 1997. Nutritional biochemistry of cellular glutathione. Nut. Biochem., **8**, 660-662.

[72] **Reed, D. J.,** 2001. Mechanisms of Chemically Induced Cell Injuriy and Cellular Protections Mechanisms, pp.697, Eds. HODGSON, E. & SMART, R. C. Introduction to biochemical toxicology. Wiley-Interscience, New York, Third edition.

[73] **Witham, F. H., Blaydes, D. F. and Dewlin, R. M.,** 1971. Experiments in Plant Physiology New york, Von Nonstrand Reinhold Company, 55-56.

[74] **Larson, L.A. and Beevers, H.,** 1965. Amino acid metabolism in young pea seedlings. Plant Physiol, **40**, 424-432.

[75] **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. and Rondall, R. J.,** 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**, 265-275.

[76] **Bates L. S., Waldern R. P. and Teare, I. D.,** 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil, **39**(1), 205-207.

[77] **Heath R. L., Packer, L.,** 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys., **125** (1), 189-98.

[78] **Elman, G. L.,** 1959. Tissue sulphydryl groups. Arch. Biochem. Biophys., **82** pp. 70-77.

[79] **Griffith O. W.,** 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfid using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. Anal. Biochem., **106** (1), 207-12.

ÖZGEÇMİŞ

01.01.1987 yılında Elazığ'da doğdum. İlk ve orta öğrenimini Elazığ'da, tamamladım. 2005 yılında Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde lisans öğrenimine başladım. 2009 yılında lisans programından mezun oldum ve aynı yıl Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde Botanik A.B.D. yüksek lisans eğitimine başladım.