

SALİSİLİK ASİT UYGULANMIŞ SALATALIK (*Cucumis sativus* L.) FİDELERİNDE KADMIYUM 'un YARATTIĞI FİZYOLOJİK ve BİYOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER

Zeynep KARABOĞA

Yüksek Lisans Tezi

**Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Yrd. Doç. Dr. Songül ÇANAKCI**

OCAK-2012

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SALİSİLİK ASİT UYGULANMIŞ SALATALIK (*Cucumis sativus* L.)
FİDELERİNDE KADMIYUM 'un YARATTIĞI FİZYOLOJİK ve
BİYOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEYNEP KARABOĞA

091110104

Tezin Enstitüye Teslim Edildiği Tarih : 17 Ocak 2012
Tezin Savunulduğu Tarih : 01 Şubat 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

Endüstriyel gelişme, artan dünya nüfusu ve kentsel yaşamın beraberinde getirdiği çevre kirliliği, özellikle yirminci yüzyılın ikinci yarısından itibaren doğal yaşamı tehdit etmektedir. Çevre kirliliği, ekosistem üzerinde düzensizliklere ve zararlara sebep olarak, canlı yaşamını olumsuz bir şekilde etkileyebilecek olan kirleticilerin çevreye girişi ve bu alanlarda yüksek miktarlarda birikmesi şeklinde tanımlanabilir. Çevre kirliliğinin en tehlikeli olanı ağır metallerin oluşturduğu kirliliktir. Ağır metaller tüm canlılar üzerinde fizyolojik ve biyokimyasal hasarlara neden olmaktadır. Ağır metallerin çevrede olağan dışı şekilde birikmesi, bitkiden insana hemen her çeşit organizma için tehlike arz etmektedir. Bazıları toprak, su ve havada eser miktarlarda bulunsalar dahi bütün canlılar için tehlikeli olabilmektedirler. Ağır metaller içinde en toksik etkiye sahip olan kadmiyumdur.

Salisilik asit, genellikle bir hidroksil grubu ya da onun fonksiyonel türevini taşıyan, aromatik halkaya sahip bir bitki fenolüğüdür. Salisilik asitin bitkilere uygulanması ile ilgili çalışmalar, uygunsuz çevre koşulları sonucunda meydana gelebilecek fizyolojik ve biyokimyasal olumsuzlukları elimine edebileceği yönündedir. Salisilik asitin uygun dozları bitkilerin morfolojik ve fizyolojik gelişimleri üzerine olumlu etkileri olduğu gibi, kadmiyum gibi toksik etkiye sahip ağır metallerin oluşturduğu stresi tolere edebildiğine dair bilgiler de mevcuttur. Bu noktadan hareket ederek, kadmiyumun bitkideki zararına karşı salisilik asitin etkilerini ortaya koymayı amaçlıyoruz.

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimlerini paylaşarak bana destek olan ve tez çalışmamı yönlendiren danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Songül ÇANAKCI 'ya, tez çalışmaları sırasında gerekli laboratuvar imkânını sağlayan, bilgi ve deneyimlerini bizden esirgemeyen Zooloji Ana Bilim Dalı Profesörü Sayın hocam Ökkeş YILMAZ 'a ve Arş. Gör. Sevinç AYDIN 'a teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca maddi ve manevi desteklerini, her zaman olduğu gibi bu süreçte de esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Zeynep KARABOĞA
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	2
1.1.1. Bitkilerde Kadmiyum Toksisitesi	4
1.1.2. Bitkilerde Ağır Metal Alınımı	4
1.2. Salisilik Asit	7
1.2.1. Salisilik Asit Biyosentezi	9
1.2.2. Salisilik Asit Metabolizması	10
1.3. Kadmiyumun Toksisitesi Üzerine Salisilik Asidin Etkileri	11
1.4. Serbest Radikallerin Biyomoleküller Üzerine Etkisi.....	14
2. MATERYAL ve METOT	17
2.1. Bitki Materyali	17
2.2. Bitki Materyaline Yapılan Uygulamalar	18
2.3. Kimyasal Maddeler ve Organik Çözücüler	19
2.4. Kullanılan Aletler ve Cihazlar	19
2.5. Büyüme Parametrelerinin Alınması	19
2.6. Pigment İçeriğinin Belirlenmesi	19
2.7. Kimyasal Analizler	20
2.7.1. Protein Analizi	20
2.7.2. MDA Analizi	21
2.7.3. Glutasyon Analizi	21
2.8. Standartların Hazırlanması	22
2.8.1. Protein Standardı	22
2.8.2. MDA Standardı	22
2.8.3. Glutasyon Standardı	22
2.9. Kalibrasyon Eğrileri	23
2.9.1. Protein Kalibrasyon Eğrisi	23
2.9.2. MDA Kalibrasyon Eğrisi	24
2.9.3. Glutasyon Kalibrasyon Eğrisi	25
3. BULGULAR	26
3.1. Büyüme Parametrelerindeki Değişiklikler	26
3.2. Klorofil (a+b) ve Karotenoid Miktarı	27
3.3. Protein Miktarı	28
3.5. Malondialdehid Miktarı	29
3.6. Glutasyon Miktarı	29
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	30

5.	KAYNAKLAR	32
	ÖZGEÇMİŞ	41

ÖZET

Bu çalışmada salatalık (*Cucumis sativus* 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 (0.75 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 μ M) ayrı ayrı uygulandı. Farklı uygulamalar görmüş fideelerde fide ve yaprak boyu, fide taze ve kuru ağırlığı gibi büyüme parametreleri tespit edildi. Ayrıca fide de protein, yaprakta pigment, malondialdehit ve glutatyon miktarları belirlendi.

Elde edilen sonuçlara göre; salisilik asit ön uygulaması yapılan ve yapılmayan fideelerde söz konusu büyüme parametreleri ve 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 fideelerde 25 μ M kadmiyum konsantrasyonu için salisilik asit ön uygulamasının protein miktarındaki kaybı azaltıcı etkisi tespit edildi ($p < 0.05$). Yine kontrole kıyasla salisilik asit ön uygulaması yapılan ve yapılmayan gruplarda kadmiyum konsantrasyonu arttıkça fideelerde protein miktarında belirgin azalmalar bulundu. Fidelerin yapraklarındaki malondialdehit miktarı salisilik asit ön uygulamalı gruplarda (25 ve 50 μ M) daha düşük bulundu ($p < 0.05$). Kontrole kıyasla bütün gruplarda malondialdehit miktarları yüksek bulundu ($p < 0.05$). Fidelerin yapraklarındaki glutatyon miktarını salisilik asit ön uygulaması 50 μ M kadmiyum konsantrasyonu için artırdı ($p < 0.05$). Kontrole kıyasla genel olarak gruplarda glutatyon miktarları düşük bulundu ($p < 0.05$).

Sonuç olarak seçilen konsantrasyonlara ve planlanan uygulama şekline, süresine bağlı olarak salisilik asit ön uygulamasının kadmiyum toksisitesinin belirli parametreler üzerinde sebep olduğu olumsuz etkileri düzenlediği düşünülmektedir.

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

SUMMARY

Physiological and Biochemical Changes Due to Cadmium on Salicylic Acid Treated Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Seedlings

In this study, developed the seeds of cucumber (*Cucumis sativus* L. cv) seedlings of 15 days were used as the material. Seedlings, roots in the hydroponic method was preferred in all applications. Seedlings, salicylic acid for 24 hours (0.75 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 μ M) 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, malondialdehyde, and glutathione quantities were determined.

According to the results obtained; salicylic acid pre-application and leave the growth parameters of seedlings and leaf pigment (chlorophyll a + b and carotenoids) in terms of quantities has been found statistically not significant differences between the groups ($p \geq 0.05$). However, compared to the control parameters mentioned in the concentration of cadmium increases and decreases in setbacks was significantly ($p < 0.05$). Seedlings treated for 25 μ M concentration of cadmium loss of the effect of reducing the amount of salicylic acid pre-application of protein was detected ($p < 0.05$). Again, compared to control groups of salicylic acid pre-application and leave significant decreases in the amount of protein found seedlings increases the concentration of cadmium. The amount of malondialdehyde leaves of seedlings pre-applied salicylic acid groups (25 and 50 μ M) was lower ($p < 0.05$). Amounts of malondialdehyde were significantly higher in all groups compared to control ($p < 0.05$). Salicylic acid, glutathione, the amount of leaves of seedlings pretreated for 50 μ M cadmium concentration increased ($p < 0.05$). As compared to control groups, the overall amount of glutathione was lower ($p < 0.05$).

As a result, depending on the selected concentrations, the shape of the planned application and the duration of pre-application of salicylic acid is considered organized on cadmium toxicity caused by the adverse effects of certain parameters.

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

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1. Kadmiyum' un bitki içindeki olası taşınım yolları ve lokalizasyonu	6
Şekil 2. Salisilik asit' in açık formülü	8
Şekil 3. Bitkilerde salisilik asit biyosentezinin metabolik yolu	10
Şekil 4. Bitkilerde ROT uzaklaştıran askorbat-glutasyon döngüsü	16
Şekil 5. Çimlenmiş salatalık tohumları	18
Şekil 6. Salatalık fidelerinin uygulama öncesi genel görünümü	18
Şekil 6. Protein kalibrasyon eğrisi.....	23
Şekil 7. MDA kalibrasyon eğrisi.....	24
Şekil 8. Glutasyon kalibrasyon eğrisi	25

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1. Salatalık (<i>Cucumis sativus</i> L.) fidelerinde SA ön uygulamasının, büyüme parametreleri (fide ve yaprak boyu) üzerinde kadmiyumun toksisitesine etkileri.....	27
Tablo 2. Salatalık (<i>Cucumis sativus</i> L.) fidelerinde SA ön uygulamasının, büyüme parametreleri (taze ve kuru ağırlık) üzerinde kadmiyumun toksisitesine etkileri.....	27
Tablo 3. Salatalık (<i>Cucumis sativus</i> L.) fidelerinde SA ön uygulamasının, MDA ve GSH ve miktarları üzerinde kadmiyumun toksisitesine etkileri.....	28
Tablo 4. Salatalık (<i>Cucumis sativus</i> L.) fidelerinde SA ön uygulamasının, pigment ve protein miktarları üzerinde kadmiyumun toksisitesine etkileri	29

KISALTMALAR LİSTESİ

μmol	: Mikromol Asetik Asit
μg	: Mikrogram
ASA	: Asetil Salisilik Asit
BHT	: Butilhidroksitoluen
Cd	: Kadmiyum
cm	: Santimetre
EDTA	: Etilen Diamin Tetra
g	: Gram
GSH	: Glutasyon
N	: Normalite
nm	: Nanometre
nmol	: Nanomol
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
pH	: Hidrojen Gücü (Power of Hydrogen)
SA	: Salisilik Asit
TBA	: 2- Thiobarbutirik
TCA	: Trikloroasetik Asit
TEP	: 1, 1, 3, 3 – Tetraethoxypropane
LPO	: Lipid Peroksidasyonu
SAG	: Salisilik Asit-β-Glukozit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
AsA	: Askorbik Asit
SOD	: Süperoksit Dismutaz
CAT	: Katalaz
APX	: Askorbat Peroksidaz
POD	: Guaiakol Proksidaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
DHAR	: Dehidroaskorbat Redüktaz
MDHAR	: Monodehidroaskorbat Redüktaz
UV	: Ultraviyole

SEMBOLLER LİSTESİ

CaNO₃	: Kalsiyum nitrat
C₇H₆O₃	: Salisilik asit
Cd⁺²	: Kadmiyum iyonu
CdCl²	: Kadmiyum klorür
CO₂	: Karbondioksit
Co	: Kobalt
Cu	: Bakır
CuSO₄	: Bakır sülfat
Fe	: Demir
H₃BO₃	: Borik asit
Hg	: Civa
H₂O	: Su
KH₂PO₄	: Monopotasyumdihidrojen fosfat
K₂PO₄	: Potasyum sülfat
Mn	: Mangan
MnSO₄	: Mangan (II)sülfat
MgSO₄	: Magnezyum sülfat
Mo	: Molibden
Na⁺	: Sodyum iyonu
NaCl	: Sodyum klorür
Na₂MoO₄	: Sodyum molibden
-NH₂	: Amino grubu
(NH₄)₂SO₄	: Amonyum sülfat fosfat
Ni	: Nikel
·OH	: Hidroksil grubu
-SH	: Sülfidril grubu
Zn	: Çinko
Pb	: Kurşun
V	: Vanadyum
Ag	: Gümüş
As	: Arsenik
Sb	: Antimon
W	: Volfram
Cr	: Krom
Al	: Aliminyum

1. GİRİŞ

Stres, biyotik ve abiyotik faktörlerin ayrı ayrı ya da birlikte fizyolojik ve biyokimyasal olaylarda belli değişimleri meydana getirmesi veya organizmada hasar oluşturma kapasitesi olarak tanımlanabilir. Bitkilerin normal gelişme seyrini ve fizyolojik olaylarını etkileyen, yavaşlatan ve/veya durduran tüm çevre etmenleri de stres faktörleri olarak adlandırılmaktadırlar. Stres faktörleri, cansız çevre etmenlerinin bitkide yapmış olduğu stres (abiyotik stres faktörleri) ve canlı çevre etmenlerinin bitkide yapmış olduğu stres (biyotik stres faktörleri) olarak sınıflandırılmıştır [1].

Biyologlar canlı organizmalara elverişli olmayan herhangi bir çevre faktörü için “stres” terimini benimsemişler, elverişsiz bir çevre faktörüne karşı bitkinin hayatta kalabilme yeteneğine ise “stres direnci (tolerans)” adını vermişlerdir. Bir bitkinin herhangi bir strese önceden maruz kalması sonucu toleransı artmış ise, bitkinin alışmış olduğu ya da direncinin artmış olduğu ifade edilmektedir. Alıştırma, adaptasyondan farklıdır. Adaptasyon genellikle pek çok nesil boyunca seçim sonucu kazanılan, genetiksel olarak belirlenmiş direncin düzeyini belirtir. Çevresel streslere adaptasyon ve alışma, morfolojik, anatomik, hücresel, biyokimyasal ve moleküler düzeyde olmak üzere, birbirine bağlı olaylar sonucu oluşmaktadır. Bitkilerin karşılaştıkları bir stres faktörüne karşı verdiği tepkiler, genel olarak kaçınma ve tolerans olarak iki ana başlık altında toplanabilir [2]. Kaçınma, stres faktörlerinin bitki dokularına girişinin önlenmesi veya azaltılmasını ifade ederken, tolerans ise stres faktörlerin etkisini elemine etme, azaltma veya tamir etme mekanizmaları olarak tanımlanabilir.

Bitkilerin maruz kaldıkları çevre faktörleri, onların kalite ve verimlilik 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 getirir. 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.

Son yıllarda, çevre kirliliğine neden olan ve gittikçe daha büyük boyutlarda tehlike oluşturan en önemli etmenlerin başında ağır metaller gelmektedir [3]. 19. yüzyılın sonlarında ve 20. yüzyılın başlarında, madencilik ve sanayi faaliyetleri arttıkça metallerin çevre kirliliği yaygınlaşmıştır. Dünya çapında mevcut maden üretimi açısından bakır (Cu), kadmiyum (Cd), kurşun (Pb) ve civa (Hg) önem taşımaktadır [3]. Topraktaki ağır metaller, endüstri kaynaklı atmosferik tortu, madencilik faaliyetleri, evsel çöp alanları gibi (antropojenik kaynaklar) çeşitli kaynaklar ile fosfat gübresi ve atık su çamurundan oluşabilir [4]. Sonuçta artan sayıda, farklı antropojenik kaynaklardan türetilen bu kirleticiler, giderek çeşitli ekosistemleri ciddi boyutta etkilemiştir [5].

Toplam 90 doğal elementten 53'ü ağır metal olarak kabul edilmektedir [6]. Bu elementler arasında çinko (Zn), nikel (Ni), Cu, kobalt (Co), vanadyum (V) ve Cd toksik elementlerken, yüksek ya da düşük öneme sahip eser elementlerden demir (Fe), molibden (Mo) ve mangan (Mn) önemli mikro besin elementlerdir. Fonksiyonu besin olarak bilinen gümüş (Ag), arsenik (As), Hg, Cd, Pb ve antimon (Sb) bitkiler ve mikroorganizmalar için daha az ya da çok toksik gibi görünmektedir [7]. Ağır metallerin bitki fizyolojisi ve metabolizması üzerindeki toksik etkileri çok kompleks olup, bitkinin türüne ve yaşına, ağır metalin tabiatına ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir [8].

1.1. Ağır Metal Toksisitesi

Ağır metaller yoğunluğu 5 gr/cm^3 ten daha yüksek metaller olarak tanımlanır ve bunların birkaçı biyolojik olarak önemlidir. Ekosistemler içerisinde bitki ve hayvan toplulukları için fizyolojik koşullar altında çözünen 17 ağır metal canlı hücreler için kullanılabilirler [6]. Ağır metaller arasında Zn, Ni, Cu, V, Co, volfram (W) ve Cr konsantrasyonu düşük toksik olmayan elementlerdir. Besin gibi bilinen hiçbir işleve sahip olmayan As, Hg, Ag, Sb, Cd, Pb ve alüminyum (Al), bitki ve mikroorganizmalar için daha az veya daha fazla toksiktir [9,10].

Ağır metaller önemli çevresel kirleticilerdir [8] ve durumları özellikle litojenik ve pedojenik doğal süreçli topraklara, ama aynı zamanda, madencilik, fosil yakıtların yanması, kentsel atık bertarafı, toprak yüzey akışı, metal işleme sanayileri, fosfat gübre uygulaması ve evsel katı atık imha alanları gibi antropojenik faktörler bağlıdır. Evsel ve endüstriyel atıklar topraktaki ağır metal birikiminin kaynağını oluşturmaktadır [11]. İzin

verilen sınırın üzerinde ağır metaller ile kirlenmiş toprak tarımsal verimde düşüöşlere neden olmaktadır [12,13]. Ortamdaki ağır metallerin artışı, çevre kirliliğinin önemli bir nedeni sayılmaktadır.

Geçiş metalleri tarafından üretilen toksisite nörotoksisite, hepatoksisite ve nefrotoksisiteye yol açmaktadır [14]. Bu metallerin farklı çözünürlülüğü, emilimi, taşınması ve kimyasal reaktivitesi vücut içindeki toksisitesinde belirli farklılıklara yol açmaktadır [14]. Toprakta bulunan ağır metallerin kimyasal formu, ilgili metal, pH ve diğer iyonların varlığına bağlıdır [15]. Aşırı miktarda ağır metal varlığı gözlenen bitkilerde toksisite belirtileri hücresel düzeyde bir dizi etkileşimler nedeniyle olabilmektedir [16]. Aktivite inhibisyonu ya da yapının bozulmasına yol açan toksisiteye, proteinlerin sülfidril gruplarına bağlanan metaller neden olabilmektedir [17]. Enzimlerin ligand grupları ile metal etkileşimi büyük ölçüde toksisiteyi tanımlar ve enzimlerin inhibisyonu katalitik olarak aktif grupların maskelenmesinden veya protein denatürasyonundan kaynaklanabilmektedir [15]. Buna ek olarak, aşırı miktarda ağır metal serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu uyarmaktadır [18-21]. Yüksek metal konsantrasyonlarına maruz kalan bitkilerde, oksidatif stres oluşur. Bazı antioksidan enzimler dolaylı olarak metal toksisitesine hücresel yanıtta fitokelatinlerin rolünü tamamlayabilirler [22]. Bitkiler yüksek derecede toksik metaller ile başa çıkmak veya fizyolojik gereksinimlerini karşılayan gerekli metalleri bulundurmak amacıyla metallerin birikimi ve detoksifikasyonunu kontrol etmeye yarayan karmaşık mekanizmalar geliştirmişlerdir. Atmosfer, toprak ve suda aşırı miktarda esansiyel ve esansiyel olmayan metallerin varlığı tüm organizmalar için ciddi sorunlara neden olabilmektedir.

Fotosentetik organizmalar, ağır metallere son derece duyarlıdır. Metal iyonlarının yüksek bitkiler üzerine etkisi fotosentez, solunum, su ve mineral besin alımı gibi fizyolojik fonksiyon bozukluklarını içerir. Ağır metaller, bitki dokusunda su ilişkileri ve su alımının düzenini bozar ve bu şekilde genellikle bütün bitkinin gelişmesi ve yaprak büyümesi azalır [23]. Oksidatif stres sonucu elektron taşınımının bozulmasını ile oksijenin reaktif formlarının sentezlenmesi indüklenir [18]. Ağır metaller yaprakların Fe alımını ve taşınımı dahil olmak üzere esansiyel besin alımı ve dağılımını bozar. Bu metal klorofil sentezi için ve CO₂ asimilasyonu ile bağlantılı tüm süreçlerin normal fonksiyonu için gereklidir [24]. Bitkilerin metabolizması ve fotosentetik parametrelerindeki değişiklikler,

ağır metal uygulaması sonrası, metal kirliliği, metal stresinin süresi ve bitki türlerinin sıralamasına bağlıdır.

1.1.1. Bitkilerde kadmiyum toksisitesi

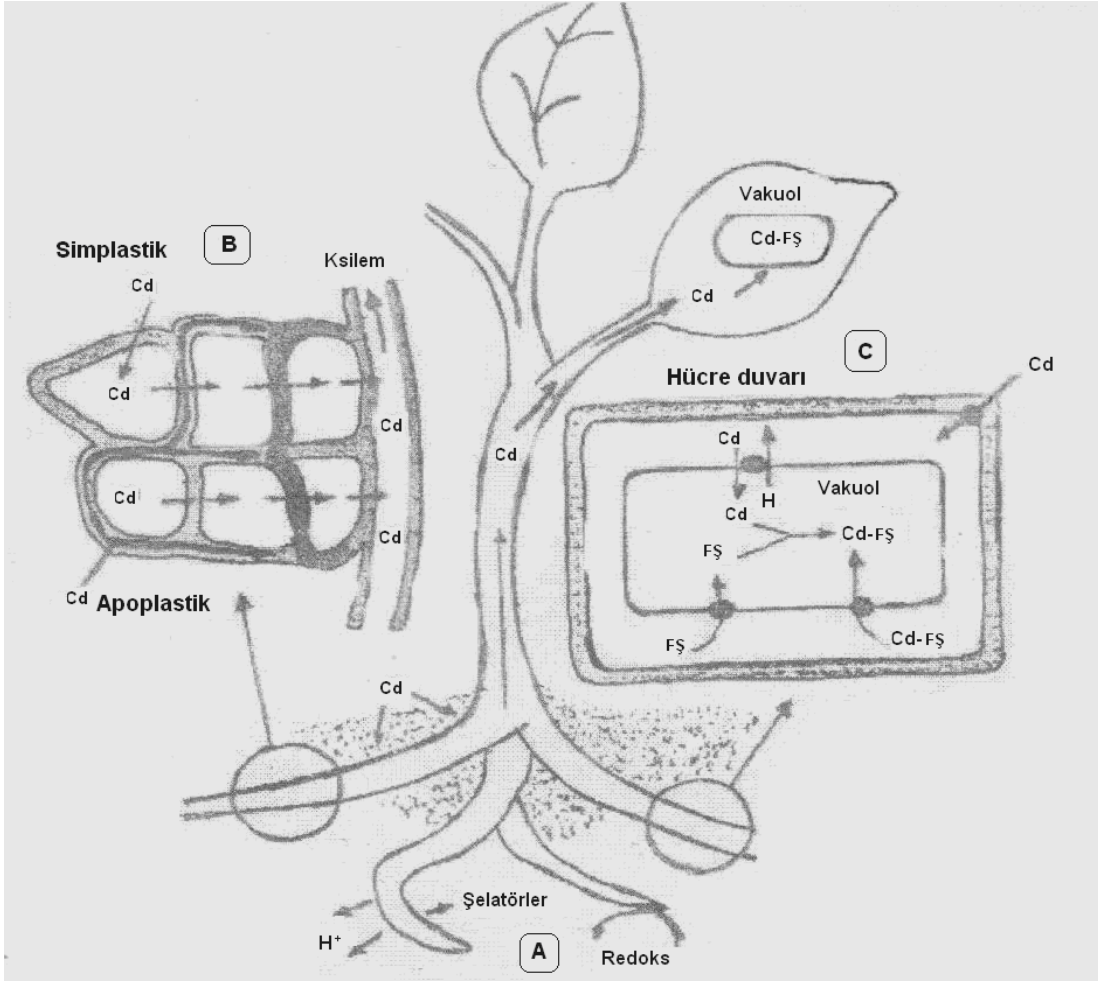
Kadmiyum bitki büyüme ve gelişmesini olumsuz etkileyen esansiyal olmayan bir elementtir. Çevreye güç istasyonları, ısıtma sistemleri, metal işleme sanayileri ve kentsel trafik ile yayılırlar. Elektriksel kaplama, plastik stabilizatörleri ve nikel-kadmiyum pillerinde yaygın olarak kullanılır [25]. Yüksek toksisite ve suda ki yüksek çözünürlüğü nedeniyle son derece önemli bir kirletici olarak kabul edilmektedir [3]. Cd' un deniz ortamına girişindeki başlıca kaynakları atmosferdeki birikimi, evsel su atıkları ve sanayi atıkları içerir.

Bir ağır metal olan Cd, bitkilerde ve hayvanlarda yüksek toksisiteye sahip kuvvetli bir çevresel kirleticidir [25]. Hayvanlarda kadmiyum genotoksisite ve ekotoksisite olarak görülmüştür [26]. Özellikle son yıllarda tarımda önemli oranlarda ürün kaybına yol açan bu ağır metal insan sağlığını da tehdit eden önemli bir unsur haline gelmiştir [27]. Doğada Cd, metallerden, fosfat gübrelemesinden [28] ve kaya mineralizasyon sürecinden [29] serbest kalmaktadır. Toprak-bitki sisteminde bu metalin yüksek oranda mobilitesi besin zincirine girişini kolaylaştırmaktadır [30]. Oksitleyici koşullarda, çözünür ve mobil Cd^{2+} olarak serbest kalan Cd, toprağı bozmakta ve bitkiler tarafından kolaylıkla asimile edilmektedir. Bitkilerin Cd'u aşırı alması ile hemen hemen tüm fizyolojik süreçler bozulmaktadır [17, 31, 32] ve lipid membranları etkilenmektedir [33].

Çevresel bir kirletici olarak Cd' un araştırılması önemli olmakla beraber, bitkide yarattığı toksik etkilerin mekanizması tam olarak anlaşılabilmiş değildir [25]. Kadmiyum, bitkilerde güçlü bir oksidatif stres faktörüdür [34]. Bunun sonucu olarak bitkilerde bir dizi toksik belirtilere neden olmaktadır. Serbest Cd plazmatik kompartmanlarda, hücre metabolizmasını ve düzenlenmesini bozarak, yüksek oranda toksisiteye [17], büyümede gecikmeye, fotosentezin inhibisyonuna, su ilişkilerinde değişikliğe, makro ve mikro besinlerin alınması ve dağıtılmasında sıkıntılara, katyonların dışarı akışına ve serbest radikallerin çoğalmasına yol açmaktadır [35,36].

1.1.2. Bitkilerde Ağır Metal Alınımı

Bitkilerin topraktaki metalleri alabilmeleri için onları hareketli forma geçirmeleri gerekir. Bitkiler toprağa bağlı metallerin hareketini çok farklı yollarla yapabilirler. Örneğin metal şelatlayıcı moleküller topraktaki metali çözmek ve şelat yapmak için rizosfere salgılanabilir (Şekil 1. A). Çözünmüş metal iyonları hücre dışı (apoplastik) ya da hücre içi (simplastik) yollarla kök içine girebilirler (Şekil 1. B). Metal iyonlarının çoğu özel veya genel metal iyon taşıyıcılarla ya da kanallarla serbest enerji yoluyla bitki hücrelerine girerler. Bazı ağır metaller, bitkiler için besin elementi görevi yapan diğer ağır metaller tarafından kullanılan membranlarda lokalize olmuş taşıyıcılardan kolaylıkla geçebilirler [37]. Metal iyonları kök içine girdiklerinde ya depolanırlar ya da sürgünlere gönderilirler. Filizlere metal taşınımı muhtemelen ksilemlerle olur. Ancak metaller floem yoluyla da filizlere dağıtılabilirler [38]. Metal iyonları ksilem borularına girmek için öncelikle kaspari şeridini geçmek zorundadırlar. Hücre dışı taşınma bloke edildiğinden metal iyonları bu suya geçirimsiz hücre duvarı şeridini geçmek için intraselüler olarak hareket etmek zorundadırlar. Ksilem hücre duvarı, metal hareketini önemli ölçüde yavaşlatması beklenen yüksek bir proton değişim kapasitesine sahiptir. Bu nedenle Cd-sitrat gibi metal- şelat kompleksleri transpirasyon akımında metal hareketlerini kolaylaştırırlar. Buna ek olarak metaller floemde organik asitler ve fitoşelatinler ile şelat oluşturarak taşınabilirler [39]. Bir bitki ağır metallerin toksik etkilerine karşı koymak için ya onların hücrelere alınmasını sınırlayarak hücre içine girdiklerinde de detoksifiye etmek ya da ağır metal metabolizmasını geliştirmek zorundadır [40]. Hücresel alınımı azaltarak ağır metal toksisitesinin önlenmesi ile ilgili kanıtlar çok sınırlıdır. Ancak ağır metal alınımını önleme kök ucu meristemi gibi hassas dokular için uygun bir strateji olabilir. Ağır metaller hücre içinde biriktirildiklerinde detoksifiye edilmeleri gerekir. Bu da metale bağlı olan şelatlanma, sınırlama ve çöktürme şeklinde olabilir. Kadmiyumun da tiyolce zengin peptitlerle ilişkili olan fitoşelatinlerin bulunduğu vakuol içinde biriktirildiği bilinmektedir [41] (Şekil 1.C) Cd ve Cd-fitoşelat kompleksinin taşınmasındaki mekanizmalar tonoplasttan geçiş ve Cd' un fitoşelatinlerle ilişkili olarak vakuol içinde biriktirilmesiyle gerçekleşmektedir [42].



Şekil 1. Kadmiyumun bitki içindeki olası taşınım yolları ve lokalizasyonu [39]

Bitkilerdeki Cd toksisitesinin en belirgin özellikleri büyümenin yavaşlaması ve klorozdur. Kloroz toksik metallerin etkileşimi ve Fe eksikliğinden dolayı oluşur. Aşırı Cd birikiminden kaynaklanan kloroz, bu ağır metalin yapraklardaki Fe ile doğrudan ya da dolaylı etkileşimi sonucu ortaya çıkar [15]. Genel anlamda Cd stresi bitkilerde yaprak kıvrılmalarına ve kloroza neden olur. Kök ve sürgünlerde büyümeyi engeller.

Kadmiyum ilk olarak bitki kökleriyle alınır ve toksik etkileri ilk bu bölgede olur. Dokulara geçen Cd, RNA sentezini değiştirebilir ve ribonükleaz aktivitesini inhibe edebilir [43]. Cd ayrıca sürgünlerde nitrat redüktaz aktivitesinin inhibisyonuna neden olarak sürgünlere azot taşınmasının azalmasına neden olabilir [44].

Chen ve ark. (2003) havuç ve turp köklerini su kültürleri için 0, 20, 40, 60, 80 ve 100 mg L⁻¹ ve saksı denemeleri için 0, 20, 60, 100 ve 150 mg L⁻¹ Cd'nin etkisinde bırakarak süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), polifenol oksidaz, peroksidaz aktiviteleri ve malondialdehit (MDA) miktarındaki değişimi araştırmışlardır [45]. Her iki bitkinin tohumlarının çimlenme oranları ve kök büyümeleri düşük Cd uygulamasında bile inhibe olmuştur. Analiz edilen antioksidan enzimlerde her iki türde ve her iki ortamda azalma Cd stresinden dolayı artma olduğu bulunmuştur [45].

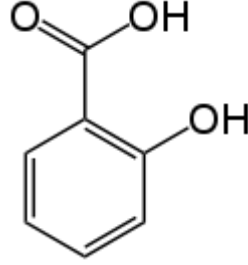
Mendelssohn ve ark. (2001) sucul makrofitlerden *Typha domingensis*'i 0, 20, 40, 60, 80 mg L⁻¹ CdCl₂ etkisinde *Spartina alterniflora*'yı ise 0, 30, 60, 90, 120 mg L⁻¹ CdCl₂ ortamında yetiştirmişlerdir. Kadmiyum uygulaması her iki türde de büyümeyi şiddetli bir biçimde inhibe etmiştir. Yaprak büyümesi kısa süreli düşük Cd etkisinde bile önemli düzeylerde azalmıştır [46].

Uzun süre Cd stresine maruz kalan genç arpa (*Hordeum vulgare* L.) bitkilerinde fotosentetik pigmentlerin şekillenmesi engellenmiş ve çözülebilir proteinlerin içeriğinde azalma gözlenmiştir [31,47]. Ni, Cd ve Mo 'in şeker pancarında (*Beta vulgaris* L.) kuru ağırlık, 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 [8]. Cd uygulanan domates fidelerinin yaprak ve köklerinin hücre membranında linoleik ve linolenik asit miktarının azaldığı tespit edilmiştir [33].

1.2. Salisilik Asit

Salisilik asit (SA), genellikle bir hidroksil grubu ya da onun fonksiyonel türevini taşıyan, aromatik bir halkaya sahip bitki fenoliklerindendir. SA, söğüt ağacının bilimsel ismi olan *Salix*'den türetilmiştir. Amerikanlılar ve Eski Yunanlılar, söğüt ağaçları yapraklarının ve kabuklarının bir ağrı kesici ve ateş düşürücü olarak kullanıldığını biliyorlardı. Labaratuvarda ilk kez 1828 yılında Raffaele Piria isimli bir bilim adamı tarafından izole edilen asetil salisilik asit (ASA) [48], ticari olarak aspirin denilen ve insanlar tarafından en iyi bilinen ve kullanılan antistres bileşiklerden biridir. Kimyasal

formülü $C_7H_6O_3$ olan SA, renksiz kristal yapıda bir organik asit olup açık formülü aşağıdaki gibidir:



Şekil 2. Salisilik asit' in açık formülü

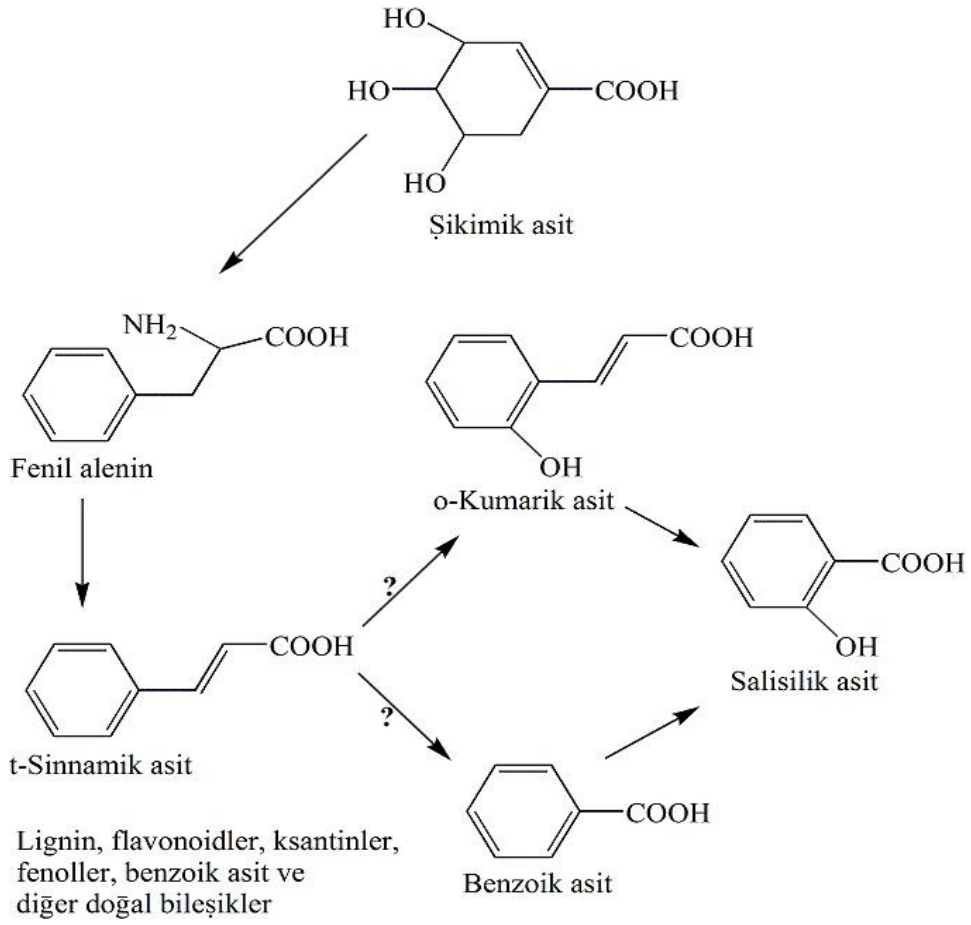
Fenolik bir bileşik olan SA, son zamanlarda bitkilerde çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal rolleri nedeniyle bir bitki hormonu olarak nitelendirilir [49]. Örneğin SA, proteinler ile ilgili patogenezi inhibe eder ve iki pirinç tohum çeşitlerinin çimlenmesi üzerine ağır metallerin inhibitör etkilerini azaltılabilir [50]. Hidroksil ($^{\circ}OH$) grubu taşıyan aromatik halkalı bitki fenoller grubunda yer alan sekonder bir metabolit olan SA' nın birçok çevresel strese bitki tepkilerinin düzenlenmesinde büyük bir rol oynadığı düşünülmektedir [51]. Osmotik stres ve tuzluluk gibi olumsuz çevre koşullarına bitkilerin uyum sağlamasında büyüme düzenleyicilerin kullanımı, bitkilerin strese dayanıklılık geliştirmesini sağlayan yaklaşımlar arasındadır [50]. SA, bitkilerde fizyolojik olayların düzenlenmesinde yardımcı olan, fenolik bileşiklere ait içsel bir büyüme düzenleyicisi olarak kabul edilebilir [52].

Bitkiler için tamamlayıcı biyokimyasal ve genetiksel yaklaşımlar, doğal immün yanıtları ayarlayan sinyal ağını incelemek için kullanılmaktadır. Reseptör aracılı tanıma, nitrik oksit, reaktif oksijen ara ürünleri ve SA arasındaki sinerjik etkileşimlere dayalı, sinyal güçlendirme döngüsü biyotik ve abiyotik strese neden olmaktadır. Farklı stres türlerine karşı harekete geçen alternatif direnç mekanizmaları, SA ve/veya büyüme düzenleyicileri arasında gelişir. Ayrıca SA, patojen saldırılardan sonra bitkilerde lokal ve sistemik hastalıklara direnç yanıtı kurmayı kapsayan önemli bir sinyal elementi olarak tanımlanmıştır [53,54]. Patojen bir saldırıdan sonra, SA düzeyi genellikle artar ve patogeneze ile ilgili proteinleri uyarır, aşırı duyarlı yanıtlar ve sistemik kazanılmış direnç gelişimi başlar. Aşırı duyarlı yanıt süresince SA başlangıç ve yıkım fonksiyonları arasında hassas dengeyi düzenlemek için ortaya çıkar.

Güçlü bir sinyal molekülü olan SA bitkilerde özel biyotik ve abiyotik faktörlere yanıtlar oluşmasını sağlamaktadır [55]. Ayrıca, SA' nın bitkiyi kadmiyum toksisitesinden de koruduğu bilinmektedir [56]. Dışarıdan uygulanan SA, bitkilerde çeşitli savunma genlerini aktive eder. SA düzeyi bitkilerde, belirli sistemik direnç sonucu, enfeksiyon, ultraviyole ışığı ve ozona maruz kalmaya tepki olarak artar ve sinyal sürecinin bir parçası olduğuna inanılır [57].

1.2.1.Salisilik Asit Biyosentezi

Bitkilerde SA oluşumu için iki metabolik yolun bulunduğu ileri sürülmektedir [58]. Bu yollarda, SA' nın β -oksidasyon ve orto-hidroksilasyon reaksiyonlarının oluşum sıralarının birbirinden farklı olduğu saptanmıştır. Bu yönüyle, sağlıklı ve virüs inoküle edilmiş tütün bitkilerinde SA' nın, benzoik asit aracılığıyla sinamik asitten tüvelendiği kanıtlanmıştır (Şekil 3) [59]. Buna göre, *Agrobacterium tumefaciens* ile enfekte olmuş genç domates fidelerinde, sinamik asitin orto-kumarik aside ortohidroksilasyonunun arttığı ve ardından kumarik asitin β -oksidasyonu ile SA oluştuğu ortaya çıkarılmıştır. Sağlıklı bitkilerde ise, SA' nın yaygın biyosentez yolunun, Sinamik asit→Benzoik asit→Salisilik asit şeklinde gerçekleştiği saptanmıştır.



Şekil 3. Bitkilerde salisilik asit biyosentezinin metabolik yolu.

1.2.2.Salisilik Asit Metabolizması

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 hormonların sinyal aktivitelerini kontrol etmekte ve SA' nın bağlı formdan serbest forma dönüşümünü katalizleyerek, bitkide serbest SA seviyesini düzenlemektedir [60]. Tütünde yapılan bir çalışmada, bu bitkinin yapraklarına dışarıdan SA uygulandığında, yaprakların hücrelerarası boşluklarında salisilik asit- β -glukozidaz aktivitesinin ortaya çıktığı saptanmıştır [58]. SAG' ın büyük bir kısmı hücrelerarası boşluklarda bulunurken, SA' nın büyük bir kısmı ise hücrelerin içinde yer almıştır. Çünkü SAG' ın SA' dan şekillenmesi, hücrelerin içinde oluşmaktadır. Bu durum dışarıdan uygulanan SA' nın doğrudan hücrelere girdiğini göstermektedir. Sonuçta, SAG'

ın hücrelerarası boşluklar yoluyla uzak dokulara taşınan bir sinyal rolü oynayabileceği görüşü ortaya çıkmıştır. SA' nın uzun mesafeli taşınımı için uygun şeklinin SAG olduğu düşünülmektedir. Çünkü SAG hem SA' dan daha fazla çözünebilir, hem de daha az toksiktir [61].

SA, bitkilerde büyümeyi düzenleyen ve metabolizma üzerinde etkili olan önemli bir endojen bileşiktir [53,62]. SA' nın bazı bitkilerde çiçeklenmeyi teşvik ettiği [63], termogenik etkide bulunduğu [63,64], termotoleransı arttırdığı [65], yaprak dökümünü önemli oranlarda azalttığı [66], patojenlere karşı direnç sağladığı [67] bildirilmiştir.

SA' nın birçok stres faktörüne karşı (sıcaklık, kuraklık ve soğuk gibi) tolerans sağladığına dair raporlar bulunmaktadır [51]. Bilindiği gibi stres faktörlerinin bitkiler üzerindeki önemli etkilerinden biri yaprak dökümüdür (senesens) ve klorozis de yaprak dökümünün önemli bir dışsal göstergesidir. Domates ve fasulye fideleriyle yapılan bir çalışmada farklı konsantrasyonlardaki SA ve ASA' in soğuk ve kuraklık stresine maruz kalmış fidelerin daha uzun süre yeşil kalabilmesini sağladığı bildirilmiştir [51].

Erwin ve ark (2005) sıcak stresine (40 °C, 96 saat) maruz kalan çim (*Poa pratensis*) bitkilerine yapraktan yapılan SA uygulamasının (0.5 kg.ha⁻¹) bitkilerin fotosentez hızını yüksek tutarak verimin artmasına neden olduğunu ve görsel sıcak stresi zararını azalttığını saptamışlardır [68]. Shakirova ve ark. (2003), 0.05 mM SA ile muamele edilen buğday fidelerinde, fide köklerinin apikal meristeminde hücre bölünme hızlarında ve bitki gelişiminde, dolayısı ile buğday veriminde bir artışa neden olduğunu bildirmiştir [52].

El-Tayeb (2005), tohuma yapılan 1.0 mM SA uygulamalarının fide döneminde tuz stresine maruz bırakılan arpa fideleri üzerine etkilerini incelemiş ve SA ile muamele edilen bitkilerin daha fazla fide yaş ağırlığına, klorofil içeriğine, şeker ve prolin içeriğine sahip olduğunu bildirmiştir [69]. Tari ve ark. (2002), domates bitkisinin SA ile ön muamelesinden sonra tuz stresine alıştırılmasını inceledikleri çalışmalarında, düşük konsantrasyonda (0.01 mM) SA ile muamele edilmiş bitkilerinin 7 gün süren tuz stresine karşı tolerans gösterdiklerini belirtmişlerdir [70].

SA' nın eksojen uygulamalarının mustard fidelerinde sıcaklık stresine karşı [71] ve mısırdada (*Zea mays* L.) soğuk zararına karşı [55] koruma sağladığı tespit edilmiştir. Ayçiçeğine dışardan uygulanan SA, Cu toksisitesine karşı adaptif tepkiyi ve fotosentetik pigmentler için koruyucu reaksiyonları uyardığı, organik çözücülerin birikimi ve membran hasarını azalttığı tespit edilmiştir [72]. Ayrıca SA' nın, Cu stresli bitkilerde klorofil a/b

oranını ve lipid peroksidasyon (LPO) seviyesini önemli derecede azalttığı görülmüştür [72]. Shakirova ve Bezrukova (1997) tarafından SA uygulanan buğday bitkilerinde saliniteye dirençte bir artış olduğu görülmüştür [73]. SA uygulaması arpa fidelerini ağır metal toksisitesine karşı nispeten korumaya neden olduğunu göstermiştir [56]. SA su ihtiyacının yarattığı zarara direnci artırmakta, Pb ve Hg gibi ağır metallerin zararlı etkilerini hafifletmektedir [74,75]. Oksidatif stresin geniş bir alanına karşı hafifletirilmiş bitki cevabında SA' nın rolü olduğu bildirilmektedir [76].

1.3.Kadmiyumun Toksisitesi Üzerine Salisilik Asidin Etkileri

Metwally ve ark. (2003), arpa bitkisinde ağır metal stresine karşı SA' nın etkilerini incelemiştir [56]. Arpa bitkilerine sulama suyu yolu ile uygulanan 0.5 mM düzeyindeki SA uygulamasının, Cd stresi altındaki bitkilerin köklerinde lipid moleküllerinin peroksidasyonunu azaltarak ağır metal stresine karşı tolerans sağlandığı görülmüştür [56]. Ayrıca arpa fidelerinde SA ön uygulamasının Cd' un neden olduğu, kök ve sürgün uzunluğu, taze ve kuru ağırlık artışı, köklerde MDA içeriğini gösteren LPO' nun engellendiği görülmüştür [56]. Bu durum SA' nın Cd' un yarattığı stres mekanizması üzerinde direkt ya da dolaylı olarak rol oynadığını düşündürmektedir. Ayrıca, Cd stresi altındaki arpa fidelerinde büyüme ve fotosentetik parametreler ile antioksidant enzimlerin aktivitesi üzerinde dışardan uygulanan SA' nın pozitif etkisi saptanmıştır [56].

Choudhury ve Kumar (2004), yaptıkları bir çalışmada SA' nın pirinç (*Oryza sativa* L.) için Cd' un yol açtığı oksidatif stres düzenlediği sonucuna varmışlardır [76]. Pirinç (*Oryza sativa* L.) köklerine SA uygulamasının Cd' a karşı kök enine büyümesi ve kuru ağırlıktaki değişimi azalttığı tespit edilmiştir [76]. Guo ve ark. (2009) tarafından pirinç (*Oryza sativa* L.) üzerinde yapılan başka bir çalışma SA ön uygulamasının Cd' un yarattığı toksik etkiye karşı glutatyon (GSH) miktarını hem kök hem de sürgünlerde artırdığına ve MDA seviyesini düşürdüğünü ortaya koymuştur [77].

Mısır bitkisi üzerinde yapılan bir çalışmada, SA ön uygulamasının Cd' un bitki büyüme parametreleri üzerindeki olumsuz etkisini azaltabildiği rapor edilmiştir [78]. Benzer durumu klorofil seviyesinde de gözlemişlerdir. Ayrıca LPO seviyesi SA ön uygulamalı bitkilerde daha düşükken, Cd uygulanan bitkilerde artış gözlenmiştir [78]. Mısır bitkisi üzerinde yapılan başka bir çalışmada da Cd' un oluşturduğu strese karşı SA'

nın rolü incelenmiştir. Cd uygulanan mısır bitkilerinde SA' nın lipit membranları üzerine koruyucu bir rol oynadığı sonucuna varılmıştır [79].

Pirinç fideleri üzerinde yapılan başka bir çalışmada, Cd' un oluşturduğu toksisitenin SA ile hafifletilebileceği rapor edilmiştir. Pirinç tohumları sterilize edilerek 2 gruba ayrılır, yarısı 0,1 mM SA solüsyonu ile 24 saat önyıkamaya tabi tutuldu ve farklı Cd konsantrasyonlarında çimlenmeye bırakıldı. Cd uygulanması sonucu, kök uzunluğu, kök uçlarının mitotik indeksi ve canlılık indeksinde kademeli olarak bir azalma tespit edildi. Ancak SA ile önyıkama yapılan grupta, çimlenme parametreleri ve artan enzim aktivitesi ile mitotik indeks üzerine Cd' un olumsuz etkisinin kısmen azaltılabildiği rapor edildi [80].

Bezelye bitkisinde yapılan bir çalışmada, bitkileri Cd toksisitesinden SA' nın koruyucu rolü araştırıldı. Bezelye fideleri artan Cd konsantrasyonlarına (0.5, 1.0, 2.0 ve 5.0 μ M) maruz kalarak, en yüksek Cd konsantrasyonunda kök ve sürgün taze ağırlığında kademeli olarak bir düşüş tespit edildi. Ayrıca bezelye yapraklarında oksidatif stres, yani LPO, elektrolit sızıntısı ve prolin üretimi ile ilgili bazı önemli parametre düzeylerinde artış olduğu rapor edildi. Ancak tohumlara SA ile ön uygulama yapılarak büyüme, fotosentez ve klorofil miktarı gibi parametreler üzerine Cd' un olumsuz etkisi ve ortaya çıkan oksidatif hasarın azaltılabileceği tespit edildi [81].

Keten bitkisinde yapılan bir çalışmada, SA' nın bitki büyümesi, LPO ve yağ asidi kompozisyonu üzerine Cd toksisitesinin etkileri araştırıldı. Cd biyokütle üretiminin yanı sıra, K, Ca, Mg ve Fe emilimini inhibe ettiği, ayrıca kök ve sürgünlerde önemli ölçüde Cd birikiminin arttığı tespit edildi. Kuru keten taneleri SA içeren solüsyon ile ön yıkama işlemi yapılarak, büyüme periyodu ardından fideyi Cd toksisitesinden kısmen koruyabildiği rapor edildi. Yapraklarda Cd, hem toplam lipit miktarında hem de klorofil miktarında azalmaya, elektrolit sızıntısını, MDA birikimi ile belirtilen LPO oranını önemli ölçüde arttırmıştır. SA ön yıkamasına tabi tutulmuş fidelerin yapraklarında, söz konusu parametrelerde iyileşme tespit edildi [82].

Salatalık fideleri üzerinde yapılan bir çalışmada, CdCl₂ uygulamasının bitki büyümesi, köklerin histolojisi, fotosentetik pigment miktarı ve mineral besin içeriği üzerine etkileri incelenmiştir. Salatalık fideleri 10 gün boyunca 4 farklı CdCl₂ konsantrasyonu (0, 100, 400 ve 1000 μ M) içeren ortamda yetiştirilmiştir. Cd, fideler tarafından kolayca absorbe edildi ve sürgüne oranla köklerde daha fazla biriktiği tespit edildi. Cd' un kök ve sürgün uzunluğu ile fidelerin taze ve kuru biyomasını azalttığı, ayrıca

en yüksek Cd dozunda, klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil içeriğini de azalttığı bildirildi. Salatalık kotiledonlarında, Cd' un artan konsantrasyonlarında karotenoid seviyesinin doğrusal bir şekilde azaldığı tespit edildi. Ayrıca fidelerin, büyüme ve mineral besin içeriği yönünden de olumsuz etkilendiği bildirildi [83].

Mn toksisitesi altındaki salatalık bitkisinde SA' nın, bitki büyümesi, LPO, antioksidan enzimler ve antioksidanlar gibi parametreler üzerine etkileri incelenmiştir. Mn salatalık bitkisinin büyümesini inhibe etmiş ve kloroza neden olmuştur. Ayrıca kök ve sürgünlerde önemli ölçüde Mn birikimi artarak, Ca, Mg ve Zn emilimini de inhibe ettiği rapor edildi. SA uygulaması ile ROS ve LPO düzeyi önemli ölçüde azaldığı bildirildi. Fazla oranda Mn' a maruz kalan salatalık yapraklarında, önemli antioksidanlardan olan askorbat ve GSH içeriğinde, SA uygulanması ile önemli ölçüde bir artış tespit edildi [84].

1.4.Serbest Radikallerin Biyomoleküller Üzerine Etkileri

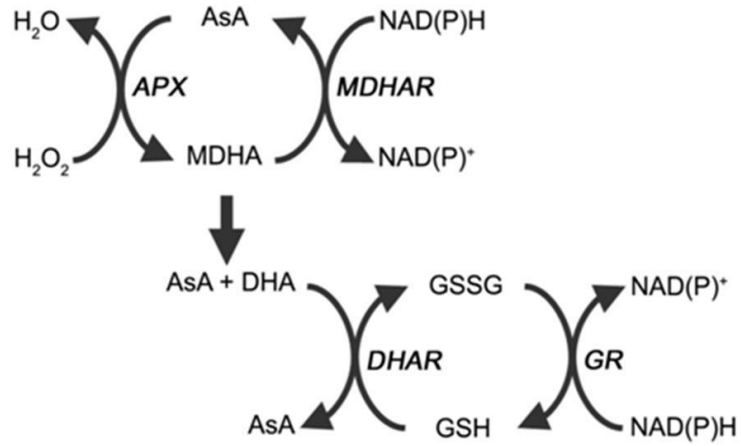
Canlı organizmalar metabolik fonksiyonları için moleküler oksijeni kullanmak zorundadırlar. Metabolik olaylar sırasında elektronların oksijene aktarılamaması sonucu serbest radikaller oluşur. Serbest radikaller genellikle yapılarında çiftleşmemiş elektron bulunduran çok reaktif moleküllerdir. Bunlar hücrede sürekli olarak ya metabolizma ürünleri ya da mitokondriyal solunumda elektron kaçağı sırasında oluşurlar. Serbest radikaller, karbonhidrat, lipit, protein ve DNA gibi biyomoleküllerin tüm sınıfları ve tüm hücre komponentleri ile etkileşme özelliği göstererek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olurlar. Serbest radikallerin en belirgin etkileri, LPO' ya neden olarak bir dizi hasarın ortaya çıkmasında ve ilerlemesinde rol oynamalarıdır. Biyomoleküllerin bütün türleri serbest radikallerin hasarlarından etkilenirler, fakat bunlardan membran lipidleri en hassas ve duyarlı olanlarıdır [85].

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı tüm sistemler koruyucu mekanizmalara sahiptirler. Bu mekanizmalardan bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemeye yönelik olarak çalışmaktadır. Bu işlevleri yapan maddelerin tümüne birden genel olarak antioksidanlar denir [86].

LPO, membrandaki doymamış yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri tarafından alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur. Serbest radikaller özellikleri nedeniyle, lipitler, proteinler ve nükleik asitler ile etkileşerek

hücreye zarar verirler. Çeşitli toksik durumlar sırasında birçok hücre tipinde O_2' nin redüksiyonundan oluşan türlerin üretimiyle oksidatif stres meydana gelir. Bunun sonucunda hücre yapısındaki lipitlerde bozulmalar olur [87]. MDA, biyolojik sistemde lipitlerin oksidasyonu sonucunda oluşmaktadır. MDA ölçümü ile LPO' nun değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Bu bileşikler ya hücrel olarak metabolize olurlar ya da başlangıçta etkili oldukları bölgeden diffüze olup hasarı hücrenin diğer bölümlerine yayarlar.

Reaktif oksijen türlerinin seviyesini kontrol etmek ve hücreleri oksidatif zarardan korumak için bitkiler tarafından geliştirilen karmaşık antioksidant savunma sistemi çeşitli enzimleri ve enzimatik olmayan molekülleri içermektedir [88]. Bitkilerdeki antioksidant enzimler SOD, CAT, askorbat peroksidaz (APX), guaiakol peroksidaz (POD), glutatyon redüktaz (GR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) ve monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) gibi düşük molekül ağırlıklı enzimleri içermektedir [89]. Diğer taraftan, GSH, askorbik asit (AsA), α -tokoferol, lipoik asit gibi enzimatik olmayan antioksidantların oksidatif strese karşı koruma sağladığı bilinmektedir [90]. Peroksidazlar (APX ve POD), H_2O_2 'in temizlenmesinde fonksiyon görmektedir, fakat bu temizlemeyi çeşitli organik ve inorganik indirgenmiş kosubstratların oksidasyonu ile gerçekleştirmektedir [91]. Kloroplastlar ve diğer hücrel bileşenlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunan AsA ve GSH gibi antioksidantlar bitkilerin oksidatif strese karşı olan savunma sisteminde oldukça önemlidir [92]. Bitkilerde yüksek seviyede indirgenmiş/yükseltgenmiş AsA ve GSH oranlarının sürdürülmesi hücrelerde etkin şekilde reaktif oksijen türlerinin (ROS) temizlenmesi için zorunludur. Bu oran indirgeyici güç olarak NADPH kullanan GR, DHAR ve MDHAR enzimleri tarafından sağlanmaktadır (şekil 4) [89,91]. Bitkilerde GSH, H_2O_2 seviyesinin kontrol edilmesinde fonksiyon görmektedir [90]. Artan stres koşullarında zamana bağlı olarak gözlenen daha yüksek GR aktivitesine karşın GSH ve toplam glutatyonun tüketimi artmaktadır.



Şekil 4. Bitkilerde ROS uzaklaştıran askorbat-glutasyon döngüsü (Mittler [91]'den modifiye edilerek alınmıştır).

Ayçiçeği fidelerinden alınan yaprak segmentlerinde ağır metal uygulaması genel anlamda klorofil ve GSH miktarında azalmaya, LPO' da ise artışa yol açmıştır [92]. SA' nın GSH biyosentezinde önemli bir rol oynadığı ileri sürülmektedir [93].

Bu çalışma, salatalık (*Cucumis sativus* L.) fidelerine salisilik asit ön 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 salatalık (*Cucumis sativus* L., Beith Alpha) tohumlarından geliştirilen 15 günlük fideler kullanıldı. Kabakgiller familyasından olan salatalık, tek yıllık ve sarılıcı karakterde olup, sıcak iklim bitkisidir. Anavatanı Hindistan olup, Orta Asya, İran ve Anadolu üzerinden Avrupa'ya yayılmıştır. Hıyar, sistematik açıdan *Dicotyledoneae* sınıfı, *Cucurbitales* takımı, *Cucurbitaceae* familyası içerisinde yer almaktadır. Optimum gelişme sıcaklığı gündüz 21-25 °C, gece 15-18 °C olup, düşük ve yüksek sıcaklıklarda gelişme ve verim olumsuz etkilenmektedir. Toprak nemini çok sevdiğinden kökleri oldukça yüzlek gelişim gösterir. Hafif donlardan bile etkilenen hıyar bitkisi, 0.5-5 °C'lar arasında üşür, -2 °C'de donar. Hıyar tohumlarının çimlenmesi 12 °C'de başlarsa da optimal toprak sıcaklığının çimlenme için 20-22 °C'ler, hava sıcaklığının 22-24 °C'ler arasında olması istenmektedir.

Salatalık fidelerini yetiştirmek amacıyla, tamamen homojen olan tohumlar seçildi ve 3 saat süreyle karanlıkta 23-25 °C'de ıslatıldı. Bu sürenin sonunda tohumlar, ıslak filtre kağıtlarının bulunduğu petri kutularına dizilerek 3 gün süreyle karanlıkta 23-25 °C'de etüvde çimlenmeye bırakıldı. Daha sonra radikula uzunlukları eşit büyüklükte olan çimlenmiş tohumlar seçilerek, önceden hazırlanan besin çözeltisi ile doldurulmuş beherlere ekildi. Burada beherdeki fideler 15 günlük oluncaya kadar belirli aralıklarla besin çözeltisi değiştirildi. Uzun gün periyodunda normal gün ışığında büyüyen tamamen homojen olan fideler deneysel olarak kullanıldı.



Şekil 5. Çimlenmiş salatalık tohumları



Şekil.6. Salatalık fidelerinin uygulamalar öncesi genel görünümü

2.2. Bitki Materyaline Yapılan Uygulamalar:

15 günlük salatalık fideleri aynı sayıda fideden oluşan 8 gruba ayrıldı. Bu grupların yarısı saf su (kontrol), diğer yarısı ise saf suda hazırlanmış SA (0,75 mM) çözeltisiyle dolu beherlere alındı ve burada 24 saat süreyle kökten uygulamaya tabi tutuldu. Bu sürenin sonunda bütün fidelerin kökleri saf su ile yıkanarak kontroller saklı tutulmak koşuluyla (saf su ve SA grubuna ait fideler besin çözeltisine alındı) diğer üçer gruba besin çözeltisinde

hazırlanmış Cd çözeltileri (25, 50, 100 µM) yine kökler yoluyla 24 saat süreyle uygulandı. Daha sonra farklı uygulamalar görmüş gruplara ait fidelerde çeşitli büyüme parametreleri tespit edilip, pigment miktarına bakıldı. Protein, MDA ve GSH analizleri yapıldı. Besin çözeltisi; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 708,45; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 492,94; KH_2PO_4 136,09; K_2SO_4 348,50; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 396,39; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 441,09; H_3BO_3 2,868; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,545; EDTA-Fe 33,0345; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,220; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,080; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,0299.

2.3. Kimyasal Maddeler ve Organik Çözücüler:

Salisilik asit, kadmiyum klorür, aseton, sülfosalisilik asit, etil alkol, toluen, sodyum fosfat tamponu, trikloroasetik asit (TCA), 2-thiobarbutirik asit (TBA), sodyum hidroksit, GSH, TEP, protein kiti, biüret reaktifi, folin reaktifi, hidroklorik asit, bütanol, BHT, bütanol (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 uygulama yapılan bütün gruplarda fidelerin hassas ölçümler yapılarak fide boyu tespit edildi. Fidelerde uygulamalardan önce ve sonra olmak üzere iki boy ölçüldü ve % boy değişimi hesaplandı. Uygulama sonrası fidelerin son taze ağırlıkları tespit edildi. Uygun paketlemeler ve işaretlemeler yapılarak 105 °C'lik etüvde, 3-6 saat aralıklarla sabitleşmiş kuru ağırlıkları tespit edildi. Daha sonra gerekli hesaplamalar yapıldı.

2.6. Pigment İçeriğinin Belirlenmesi:

Uygulama yapılan bütün gruplardan ayrı ayrı 0.5 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 absorpsanları köre karşı okundu. Elde edilen absorpsan değerlerinden mg.g^{-1} taze ağırlık cinsinden pigment tayinine gidildi (Witham ve arkadaşları 1971) [94].

2.7. Kimyasal Analizler:

2.7.1. Protein Analizi:

Salatalık fidelerinde protein ekstraksiyonu Larson-Beevers (1965) metoduna göre yapıldı [95]. Bu amaçla bütün gruplar için ayrı ayrı eşit sayıda fide kullanıldı. Fidelerin toplam ağırlıkları tespit edildi ve steril bir makasla parçalara bölünerek blendera konuldu. Bundan sonra üzerine 100 ml 50 mM sodyum fosfat tamponu eklenerek 4 dk süreyle homojenize edildi. Bu sürenin bitiminde oluşan ekstrakt buhner hunisi ile süzüldü. Daha sonra blender 40 ml tamponla yıkanarak tekrar 30 sn 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 dk 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 [96] ve spektrofotometrede 725 nm'de köre karşı absorpsanları okundu. Spektrofotometrede okunan absorpsan değerleri protein standart eğrisinde yerine konularak buna karşılık gelen protein konsantrasyonu mg.g^{-1} taze ağırlık cinsinden tespit edildi.

2.7.2. MDA Analizi:

Uygulama yapılan bütün gruplardan ayrı ayrı 0.5 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 yapıldı. Santrifüjden sonra üst fazlar ayrı ayrı üç tüpe alındı ve tüplere 4'er ml % 0.5' lik TBA ilave edilip ve vortekslendi. Daha sonra her bir tüpe 0.4' er ml BHT ilave edildi. 95 °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 yapılarak süpernatant kısmı otomatik pipetle dikkatli bir şekilde bir tüpe toplandı. Spektrofotometrede 532 nm' de köre karşı absorbansları okundu. Spektrofotometrede okunan absorbans değerleri MDA standart eğrisinde yerine konularak buna karşılık gelen malondialdehid konsantrasyonu $\mu\text{mol.g}^{-1}$ taze ağırlık cinsinden tespit edildi (Heath, 1968) [97].

2.7.3. Glutasyon Analizi:

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 °C' de 15 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatantın pH' sı 7.5' e ayarlandı ve 412 nm' de absorbansı okundu. Absorbsans sonuçları GSH için hazırlanan standart eğride yerine konularak, $\mu\text{g.g}^{-1}$ taze ağırlık olarak yorumlandı (Ellman, 1959; Griffith 1980) [98-99].

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 standart solüsyonu kullanıldı. Stok proteinden 0.25, 0.50, 0.75 ve 1 mg.ml⁻¹'lik konsantrasyonlar hazırlanarak kullanıldı.

2.8.2. MDA Standardı:

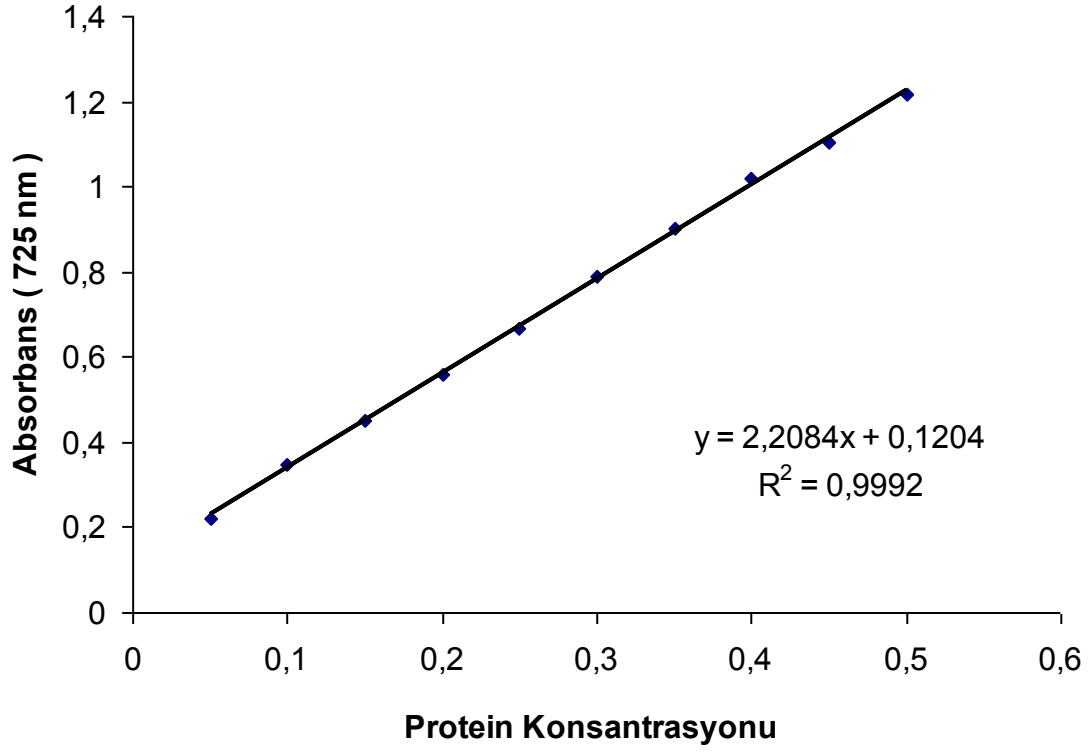
Standart olarak 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (TEP) kullanıldı ve 2, 4, 6 ve 8 nmol. ml⁻¹'lik konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı. Absorbans değerleri kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı.

2.8.3. Glutasyon Standardı:

Bitkisel dokulardaki GSH miktarı tayini saf GSH standardından hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı. Bunun için 1 kör olmak üzere 6 tüp hazırlandı. Hazırlanan GSH standardı (0,0054 gr GSH 10 ml saf su) 20, 40, 60, 80 M ve 100 µg. ml⁻¹, lik olacak şekilde seyreltildi ve kullanıldı.

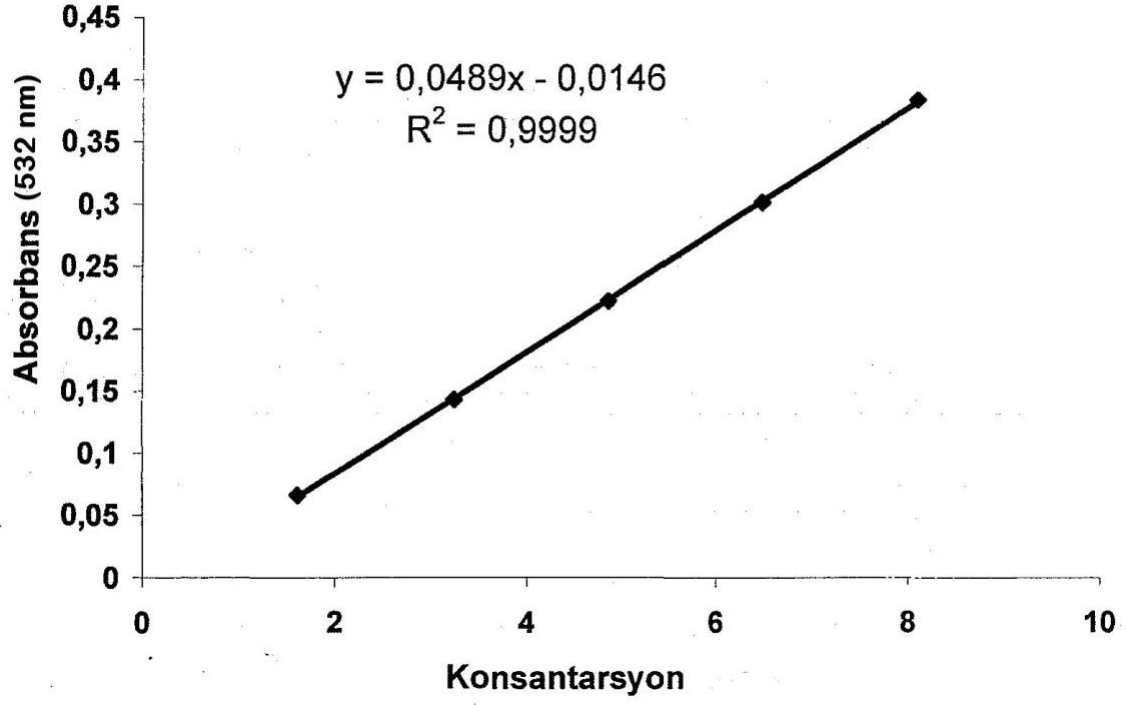
2.9. Kalibrasyon Eğrileri:

2.9.1. Protein Kalibrasyon Eğrisi



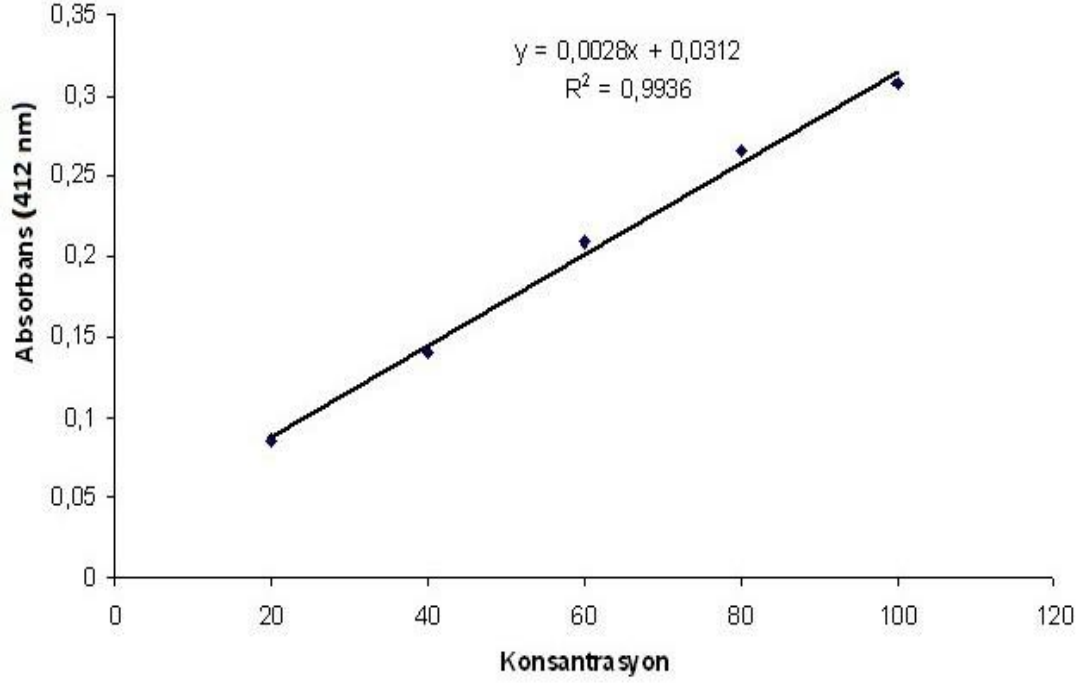
Şekil 6. Protein kalibrasyon eğrisi

2.9.2. MDA Kalibrasyon Eğrisi



Şekil 7. MDA kalibrasyon eğrisi

2.9.3. Glutasyon Kalibrasyon Eğrisi



Şekil 8. Glutasyon kalibrasyon eğrisi

3. BULGULAR

Bu araştırmada farklı Cd konsantrasyonlarının (25, 50 ve 100 µM) salatalık fidelerine uygulanmasından önce SA ön uygulamasının Cd' a verilen fizyolojik ve biyokimyasal cevaplar üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmada, SA ön uygulaması 0.75 mM konsantrasyonunda ve 24 saat olacak şekilde tasarlanmıştır. SA uygulamasından sonra fidelere farklı Cd konsantrasyonları ayrı ayrı gruplar halinde uygulanmıştır. Uygulamaların tümü kökler aracılığıyla hidrofonic yöntem ile yapılmıştır. 24 saatlik ağır metal uygulamasından sonra fideler büyüme parametreleri (fide ve yaprak boyu, fide taze ve kuru ağırlığı) bakımından incelenmiş, yapraklarda pigment, MDA ve GSH miktarları, fidelerde ise protein miktarı analiz edilmiştir.

3.1. Büyüme Parametrelerindeki Değişiklikler

Büyüme parametreleri bakımından; fide boyu ve yaprak boyu üzerindeki değişimlere bakıldığında kontrol grubuna kıyasla SA ön uygulamalı grupta fide boyu farksız bulundu ($p \geq 0,05$), fakat yaprak boyunda % değişimlere dayalı gerilemeler tespit edildi. Kontrole kıyasla hem fide boyu hem de yaprak boyunda Cd konsantrasyonu artışına paralel bir şekilde SA ön uygulaması yapılan ve yapılmayan tüm gruplarda büyümede gerileme ve kayıplar tespit edildi (Tablo 1).

Benzer şekilde fide taze ve kuru ağırlığında da kontrole kıyasla doku yıkımına dayalı olarak kayıplar oluşmuştur ($p < 0,05$). Gerek fide boyu, gerekse fide taze ve kuru ağırlığı üzerinde SA ön uygulaması 100 µM Cd' un olumsuz etkisini destekleyici etkiye yol açmış bulundu (Tablo 1 ve Tablo 2).

Uygulamalardan sonra, gruplar arasında fidelerde makroskobik gözlemlere bakıldığında gerek SA ön uygulamalı gerekse ön uygulamasız gruplarda Cd konsantrasyonu artışına paralel olarak büyüme inhibisyonu, kök uçlarında kahverengi görünüm ve yumuşamalar, gövdede incelme, yapraklarda solgunluk tespit edildi. SA ön uygulamalı gruplar ile ön uygulamasız gruplar arasındaki kıyaslamalar ise, 25 µM ve çoğu zaman 50 µM Cd için SA' nın bitkiyi dayanıklı kılma konusunda başarılı olduğunu düşündürmektedir.

Tablo 1. Salatalık fidelerinde (*Cucumis sativus* L.) SA ön uygulamasının büyüme parametreleri (fide ve yaprak boyu) üzerinde kadmiyumun yol açtığı toksisiteye etkileri

Kadmiyum (μM)	Fide boyu (cm)		Yaprak boyu (cm)	
	SA (0 mM)	SA (0.75 mM)	SA (0 mM)	SA (0.75mM)
Kontrol	23.00 $\pm$ 0.13 (% 0.30 +)	22.98 $\pm$ 0.20 (% 0.26 +)	2.33 $\pm$ 0.05 (% 2.90 +)	2.66 $\pm$ 0.03 (% 1.75 +)
25	21.95 $\pm$ 0.28 (% 0.09 -)	21.96 $\pm$ 0.45 (% 0.07 -)	2.27 $\pm$ 0.03 (% 0.44 +)	2.39 $\pm$ 0.04 (% 0.35)
50	22.01 $\pm$ 0.58 (% 0.18 -)	22.91 $\pm$ 0.25 (% 0.13 -)	2.88 $\pm$ 0.20 (% 0.69 -)	2.27 $\pm$ 0.07 (% 0.44 -)
100	21.40 $\pm$ 0.10 (% 0.29 -)	20.57 $\pm$ 0.40 (% 0.24 -)	2.46 $\pm$ 0.14 (% 1.20 -)	2.34 $\pm$ 0.11 (% 0.85 -)
□ Kontrolle kıyasla , * İlgili gruba kıyasla; p < 0.05 olasılık seviyelerinde önemli. Verilerin ortalaması $\pm$ SE (n: 10)				

Tablo 2. Salatalık fidelerinde (*Cucumis sativus* L.) SA ön uygulamasının büyüme parametreleri (taze ve kuru ağırlık) üzerinde kadmiyumun yol açtığı toksisiteye etkileri

Kadmiyum (μM)	Taze ağırlık (g)		Kuru ağırlık (g)	
	SA (0 mM)	SA (0.75mM)	SA (0 mM)	SA (0.75mM)
Kontrol	0.946 $\pm$ 0.04	0.900 $\pm$ 0.03	0.596 $\pm$ 0.06	0.556 $\pm$ 0.07
25	0.750 $\pm$ 0.05□	0.744 $\pm$ 0.08□	0.443 $\pm$ 0.07□	0.460 $\pm$ 0.07□
50	0.690 $\pm$ 0.05□	0.706 $\pm$ 0.02□	0.403 $\pm$ 0.02□	0.400 $\pm$ 0.06□
100	0.686 $\pm$ 0.10□	0.676 $\pm$ 0.08□	0.392 $\pm$ 0.04□	0.376 $\pm$ 0.04□
□ Kontrolle kıyasla , * İlgili gruba kıyasla; p < 0.05 olasılık seviyelerinde önemli. Verilerin ortalaması $\pm$ SE (n: 10)				

3.2. Klorofil (a+b) ve Karotenoid Miktarı:

Yapılan uygulamaların yaprakta klorofil (a+b) miktarı üzerine etkileri incelendiğinde, kontrol grubu fidelerinin yapraklarına kıyasla SA grubu farksız ($p \geq 0,05$) bulundu. Diğer gruplar yani SA-25, 25, SA-50, 50, SA-100 ve 100 μM Cd gruplarında sırasıyla % 16,62, % 17,12, % 18,03, % 23,73, % 41,3 ve % 27,28 oranlarında klorofil (a+b) miktarlarında

azalmalar tespit edildi ($p < 0,05$). Bununla birlikte ilgili gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark bulunamadı ($p \geq 0,05$) (Tablo 3).

Tablo 3'te görüldüğü üzere, uygulama yapılan SA-25, 25, SA-50, 50, SA-100 ve 100 μM Cd gruplarında kontrole kıyasla sırasıyla % 27,72, % 27,72, % 31,43, % 32,57, % 29,72 ve % 40 oranlarında karotenoid kaybı tespit edildi ($p < 0,05$). Bu parametredeki değişiklikler çok hareketli olmakla beraber ilgili gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p \geq 0,05$) (Tablo 3).

Tablo.3. Salatalık fidelerinde (*Cucumis sativus* L.) SA ön uygulamasının pigment ve protein miktarları üzerinde kadmiyumun yol açtığı toksisiteye etkileri

Kadmiyum (μM)	Klorofil a+b mg.g^{-1} TA		Karotenoid mg.g^{-1} TA		Protein mg.g^{-1} TA	
	SA (0 mM)	SA (0.75 mM)	SA (0 mM)	SA (0.75 mM)	SA (0 mM)	SA (0.75 mM)
Kontrol	1.770 $\pm$ 0.15	1.733 $\pm$ 0.05	0.350 $\pm$ 0.05	0.323 $\pm$ 0.03	1.073 $\pm$ 0.09	0.886 $\pm$ 0.09 $\square$
25 Cd	1.467 $\pm$ 0.12 $\square$	1.476 $\pm$ 0.21 $\square$	0.253 $\pm$ 0.02 $\square$	0.255 $\pm$ 0.06	0.733 $\pm$ 0.04 $\square$	0.920 $\pm$ 0.06*
50 Cd	1.350 $\pm$ 0.13 $\square$	1.451 $\pm$ 0.12 $\square$	0.236 $\pm$ 0.01 $\square$	0.240 $\pm$ 0.05 $\square$	0.674 $\pm$ 0.05 $\square$	0.761 $\pm$ 0.06 $\square$
100 Cd	1.287 $\pm$ 0.11 $\square$	1.039 $\pm$ 0.07 $\square$	0.210 $\pm$ 0.05 $\square$	0.226 $\pm$ 0.04 $\square$	0.670 $\pm$ 0.03 $\square$	0.736 $\pm$ 0.04 $\square$
$\square$ Kontrole kıyasla , * İlgili gruba kıyasla; $p < 0.05$ olasılık seviyelerinde önemli. Verilerin ortalaması $\pm$ SE (n: 3)						

3.3. Protein Miktarı:

Uygulamalar sonrasında kontrol grubu fidelerine kıyasla SA, SA-50, SA-100, 25, 50 ve 100 μM Cd gruplarında sırasıyla % 23,96, % 29,08, % 31,41, % 31,69, % 37,19 ve % 37,55 oranlarında protein kaybı tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Tablo 3'te de görüldüğü üzere sadece 25 μM Cd konsantrasyonu için SA ön uygulaması yapılan fidelerde protein kaybı anlamlı bir şekilde daha az (% 25,51) bulunmuştur ($p < 0,05$).

Tablo.4. Salatalık fidelerinde (*Cucumis sativus* L.) SA ön uygulamasının MDA ve GSH miktarları üzerinde kadmiyumun yol açtığı toksisiteye etkileri

Kadmiyum (μM)	Malondialdehid nmol.g^{-1} TA		Glutasyon $\mu\text{g.g}^{-1}$ TA	
	SA (0 mM)	SA (0.75 mM)	SA (0 mM)	SA (0.75 mM)
Kontrol	33.22 $\pm$ 1.29	40.63 $\pm$ 4.47 $\square$	27.16 $\pm$ 2.91	20.44 $\pm$ 2.68 $\square$
25 Cd	47.02 $\pm$ 4.29 $\square$	34.16 $\pm$ 3.61*	13.25 $\pm$ 3.96 $\square$	21.46 $\pm$ 4.18
50 Cd	54.11 $\pm$ 4.93 $\square$	39.70 $\pm$ 3.29 $\square$ *	22.38 $\pm$ 4.11	33.13 $\pm$ 3.95*
100 Cd	50.13 $\pm$ 4.12 $\square$	47.10 $\pm$ 4.74 $\square$	17.46 $\pm$ 3.43 $\square$	18.46 $\pm$ 5.40 $\square$
$\square$ Kontrole kıyasla , * İlgili gruba kıyasla; Sırasıyla, p <0.05 olasılık seviyelerinde önemli. Verilerin ortalaması $\pm$ SE (n: 3)				

3.4. Malondialdehit Miktarı:

Tablo 4’te görüldüğü üzere kontrol grubu fidelerin yapraklarına kıyasla uygulama yapılan diğer bütün gruplarda MDA miktarı artmış bulundu. Fakat sadece 25, SA-100, 100, SA-50 ve 50 μM Cd uygulanan gruplarda sırasıyla % 41,54, % 41,78, % 50,9, % 19,50 ve % 62,88 oranlarındaki MDA artışı istatistiki açıdan anlamlı bulundu ($p < 0,05$). SA ön uygulaması yapılan gruplarda 25 ve 50 μM Cd uygulamalarına kıyasla % 27,35 ve % 26,63 oranlarında MDA artışının azaldığı tespit edildi ($p < 0,05$).

3.5. Glutasyon Miktarı:

Yapılan uygulamalar sonrasında, fidelerin yapraklarındaki GSH miktarında kontrole kıyasla düşüşler tespit edildi. Sadece 50 μM Cd uygulaması için SA ön uygulamasının % 48,03 oranında bir GSH artışına yol açtığı tespit edildi ($p < 0,05$). Kontrol grubuna kıyasla SA-100, 100 ve 25 μM Cd gruplarında sırasıyla % 32,04, % 35,72 ve % 51,22 oranlarında azalma tespit edildi ($p < 0,05$) (Tablo 4).

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Salatalık fideleri üzerinde yapılan bu çalışmada, fidelere önceden uygulanan SA konsantrasyonunun, daha sonra uygulanan Cd konsantrasyonlarına verilen cevaba etkileri incelenmiştir. Genel olarak fidelere uygulanan kadmiyum konsantrasyonları arttıkça, gerek SA ön uygulaması yapılan gerekse yapılmayan gruplarda kontrole kıyasla fide ve yaprak boyu büyümesini, fide taze ve kuru ağırlık miktarlarını çoğu kez anlamlı bir şekilde azaltmıştır [8, 45, 46]. Benzer sonuçlar farklı bitki türlerinde de rapor edilmiştir [69,76]. Diğer ilgili gruplar arasındaki farklılıklar anlamlı bulunamamıştır. Cd 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 bilhassa kök dokusunda yıkımlara bağlı yumuşamalar gözlenmiştir [27, 80, 81].

Yine fidelerde protein miktarı, yapraklarda da pigment miktarı kontrole kıyasla benzer şekilde azalmıştır [8, 31, 47, 50]. Fakat bu parametreler üzerinde SA ön uygulamalı gruplar ile ön uygulamasız gruplar arasında tespit edilen farklılıklar sadece 25 µM kadmiyum konsantrasyonunda protein yıkımı miktarının azalması şeklinde anlamlı bulunmuştur [56]. Yapraklarda, pigment miktarı bakımından kontrole kıyasla SA ön uygulamalı ve ön uygulamasız gruplarda genel olarak kadmiyum konsantrasyonu arttıkça klorofil (a+b) miktarı düşük bulunmuştur [78, 82, 83]. Bu durum pigment yıkımının artmasından kaynaklanıyor olabilir. Ancak gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan anlamlı bulunmamıştır [8]. Karotenoidlerin miktarı kontrole kıyasla düşük bulunmuştur [8, 56, 83, 92]. Kısacası pigment miktarlarına bakıldığında kontrole kıyasla anlamlı azalmalara rağmen gruplar içinde anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

Özellikle ağır metal stresinde sıklıkla kontrol edilen, oksidatif stresin şiddetini gösteren önemli bir parametre olan ve hücre membranındaki LPO' nun hızına işaret eden MDA [8, 27, 56] konusunda çalışılan grupların yaprakları arasında önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Benzer sonuçlar Cd uygulanmış farklı bitkilerde de

rapor edilmiştir [77, 78]. SA ön uygulaması 25 ve 50 μM Cd uygulaması için etkili olmuştur. SA ön uygulaması her iki konsantrasyon için de MDA miktarını aşağı çekmiştir. Bu durum ağır metal stresinin sebep olduğu oksidatif stresin SA ön uygulamalı gruplarda daha az seviyede yaşandığını düşündürmektedir [84]. SA dozu ve ön uygulama süresinin 100 μM Cd dozu için başarılı olmadığı düşüncesini yaratmıştır [78].

Bitkilerde GSH 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 [77, 84] veya azalma [92] şeklinde farklı sonuçları rapor etmektedir. Salatalık fidelerinin yapraklarında SA ön uygulamalı ve ön uygulamasız bütün gruplarda kontrole kıyasla genel anlamda GSH değerleri düşük bulundu [87]. SA ön uygulamalı gruplarda 50 μM Cd için anlamlı bir artış tespit edildi. Bu artış SA' nın glutatyon biyosentezi konusunda özel bir rol oynadığını [87] düşündürmektedir. Dolayısıyla GSH konusundaki farklılıklar enzimsel bir dayanağa oturtulabilir. Yüksek Cd konsantrasyonu için GSH miktarının artık düşüşe geçtiği tespit edilmiştir [77, 92]. Bu sonuçlar SA ön uygulamalı gruplarda artan GSH' ın serbest radikallere karşı savunmada bir üstünlük sağladığı ya da serbest radikallerin SA ön uygulamalı gruplarda daha az üretildiği şeklinde de yorumlanabilir. Tek başına SA uygulanan grupların fide yapraklarında GSH miktarı kontrole kıyasla düşük bulunmuştur.

SA ön uygulamasının Cd' un yarattığı toksik etkiyi, bu ağır metalin alınımını - taşınımını etkileyerek; veya Cd' un hücrede bağlı forma dönüştürülmesini arttırarak; biyokimyasal reaksiyonlarda rol oynayan enzimlerin aktivitelerini etkileyerek meydana getirmiş olabilir. Dolayısıyla SA' nın ağır metalin toksisitesini hafifletici etkisi, biri toksisite ile yüzleşmeyi azaltmak, diğeri ise toksisite ile mücadelede biyokimyasal bir rol üstlenme şeklinde olabilir. Sonuçlar, salatalık fidelerinde SA ön uygulamasının Cd' un yarattığı oksidatif stresi sınırlı ölçüde de olsa düzenlediğini düşündürmektedir. Bu çalışmanın diğeri bir ayağını oluşturan köklerde de aynı parametrelerin sorgulanmasının konunun tam anlaşılmasına katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- [1] **Taiz, L., Zieger, E.**, 2002. Plant Physrology. 3. Edition, Sinuoer Press.
- [2] **Stewart, F. C.**, 1996. Academic Press Incorporation, Plant Physiology, New York.
- [3] **Pinto, A. P., Mota A. M., de Varennes A., Pinto F. C.**, 2004. Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. Sci. Tot. Environ **326**, 23–247.
- [4] **Williams C. H., David D. J.**, 1976. The accumulation in soil of cadmium residues from phosphate fertilizer and their effects on the cadmium contents of plants. Soil Sci **121**, 86–93.
- [5] **Macfarlane G. R., Burchett M. D.**, 2001. Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stres in the greymangrove, *Avicennia marina* (Forks.) Vierh. Mar. Pollut. Bull. **42**, 233–40.
- [6] **Weast R. C.**, 1984. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 64th edn. CRC Press, Boca Raton.
- [7] **Niess D. H.**, 1999. Microbial heavy-metal resistance. Applied Microbiol. Biotech. **51**, 730–750.
- [8] **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.
- [9] **Sogut, Z., B. Z. Zaimoglu, R. Erdogan and M. Y. Sucu**, 2005. Phytoremediation of landfill leachate using Pennisetum clandestinum. J. Environ. Biol., **26**, 13-20.
- [10] **Beak, K. H., J. Y. Chang, Y. Y. Chang, B. H. Bae, J. Kim and I. S.**, 2006 Lee:Phytoremediation of soil contaminated with cadmium and/or 2,4,6-Trinitrotoluene. J. Environ. Biol., **27**, 311-316.
- [11] **Alloway, B. J.**, 1995. Heavy metal in soils. Blackie Academic and Professional, New York. p. 368.
- [12] **Salt, D. E. and W. E. Rauser**, 1995. MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. Plant Physiol., **107**, 1293-1301.

- [13] **Akinola, M. O. and T. A. Ekiyoyo**, 2006. Accumulation of lead, cadmium and chromium in some plants cultivated along the bank of river Ribilia at Odo-nla area of Ikirodu, Lagos State, Nigeria. *J. Environ. Biol.* **27**, 597-599.
- [14] **Stohs S. J., Bagchi D.**, 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Rad. Biol. Med.* **18**, 321–336.
- [15] **Das P., Samantaray S., Rout G. R.**, 1997. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environ. Pollution* **98**, 29–36.
- [16] **Hall J. L.**, 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* **53**, 1–11.
- [17] **Van Assche F., Clijsters H.**, 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.*, **13**, 195–206.
- [18] **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, Hagemeyer J (eds), *Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems*, pp. 73–97. Springer-Verlag, Berlin.
- [19] **Groppa M. D., Tomaro M. L., Benavides M. P.**, 2001. Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Sci.* **161**, 481–488.
- [20] **Sandalio L. M., Dalurzo H. C., Gomez M., Romero-Puertas M. C., del Rio L. A.**, 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot.*, **52**, 2115–2126.
- [21] **Fornazier R. F., Ferreira R. R., Vitoria A. P., Molina S. M. G., Lea P. J., Azevedo R. A.**, 2002. Effects of cadmium on antioxidant enzyme activities in sugar cane. *Biol. Plant.*, **45**, 91–97.
- [22] **Mazhoudi S., Chaoui A., Ghorbal M., El Ferjani E.**, 1997. Response of antioxidative enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill). *Plant Sci* **127**, 129–137.
- [23] **Poschenrieder C., Barcelo, J.: Water relation in heavy metals stressed plants. – In: Prasad, M.N.V., Hagemayer, J. (ed.), 1999. Heavy Metal Stress in Plants. From Molecules to Ecosystems. Pp. 207-231. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg–New York.**
- [24] **Krupa, Z., Siedlecka, A., Skórzynska-Polit, E., Maksymiec, W.**, 2002. Heavy metal influence on the light phase of photosynthesis. In: Prasad, M.N.V., Strzałka,

- K. (ed.): Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants. Pp. 287-303. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- [25] **Sanita di Toppi L., Gabbrielli R.**, 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* **41**, 105–130.
 - [26] **Bhattacharya M., Chaudhuri M. A.**, 1995. Heavy metal (Pb²⁺ and Cd²⁺) stress-induced damages in *Vigna* seedlings and possible involvement of phytochelation-like substances in mitigation of heavy metal stress. *Indian J. Environ. Bull.* **33**, 236–238.
 - [27] **Seregin, I. V. and V. B., Ivanov**, 2001. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology* **48** (4), 523-544.
 - [28] **Nriagu, J. O., J. M. Pacyna**, 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soil with trace metals. *Nature*, **333**, 134-139.
 - [29] **Baker, A. J. M., K. Ewart, G. A. F. Hendry, P. C. Thrope, and P. L. Walker**, 1990. The evolutionary basis of cadmium tolerance in higher plants. In: 4th International Conference on Environmental Contamination, Barcelona, 23-29.
 - [30] **Nogawa, G., R. Honda, T. Kiod, I. Tsuritani, Y. Yamanda**, 1987. Limits to protect people eating cadmium in rice, based on epidemiological studies. *Trace Subst. Environ Health*, **21**, 431-439.
 - [31] **Vasilev, A., Yordanov, I.**, 1997. Reductive analysis of factors limiting growth of cadmium-treated plants: a review. *Bulg. J. Plant Physiol.*, **23**, 114-133.
 - [32] **Siedlecka, A.**, 1995. Some aspects of interactions between heavy metals and plant mineral nutrients. *Acta Soc. Bot. Pol.*, **64**, 265-272.
 - [33] **Ouariti, O., Boussama, N., Zarrouk, M., Cherif, A., Ghorbal, M. H.**, 1997. Cadmium- and copper- induced changes in tomato membrane lipids. *Phytochemistry*, **45**, 1343-1350.
 - [34] **Hegedűs, A., S. Erdei, G. Horváth**, 2001. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Sci.* **160**, 1085-1093.
 - [35] **Prasad, M. N. V.**, 1995. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environmental and Experimental Botany*, **35**(4), 525-545.
 - [36] **Ramos, I., E. Esteban, J. J. Lucena and A. Gárate**, 2002. Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca* sp. Cd-Mn Interaction. *Plant Science*, **162**, 761-767.

- [37] **Clarkson, D. and Lüttge, U.**, 1989. Mineral Nutrition: Divalent Cations, Transport and Compartmentalization. *Prog. Botany*, **51**, 93-112.
- [38] **Stephan, U. and Scholz, G.**, 1993. Nicotianamine: Mediator of Transport of Iron and Heavy Metals in the Phloem. *Physiol. Plant*, **88**, 522-529.
- [39] **Salt, D. E., Blaylock, M., Kumar, N. P. B. A., Dushenkov, V., Ensley, B. D., Chet, I. and Raskin, I.**, 1995. Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Enviroment Using Plants, *Bio/Technology*, **13**, 468-472.
- [40] **Cumming, J. R. and Taylor, G. J.**, 1990. Mechanisms of Metal Tolerances in Plants: Physiological Adaptation for Exclusion of Metal Ions from the Cytoplasm, p. 329-359.
- [41] **Van Steveninck, R. F. M., Van Steveninck, M. E. and Fernando, D. R.**, 1992. Heavy Metal (Zn, Cd) Tolerance in Selected Clones of Duckweed (*Lemna minor*), *Plant and Soil*, **146**, 271-280.
- [42] **Salt, D. E., and Wagner, G. J.**, 1993. Cadmium Transport Across Tonoplast of Vesicles from Oat Roots. Evidence for a Cd/H Antiport Activity. *J. Biol. Chem.* **268**, 12297-12302.
- [43] **Shah, K. and Dubey, R. S.**, 1995. Effect of Cadmium on RNA Level as well as Activity and Molecular Forms of Ribonuclease in Growing Rice Seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* **33**, 577-584.
- [44] **Hernandez, L. E., Carpena-Ruiz, R. and Garate, A.**, 1996. Alterations in the Mineral Nutrition of Pea Seedlings Exposed to Cadmium. *J. Plant Nutr.*, **19**, 1581-1598.
- [45] **Chen, K. M., Gong, H. J., Chen, G. C., Wang, S. M. and Zhang, C. L.**, 2003. Up-Regulation of Glutathione Metabolism and Changes in Redox Status Involved in Adaptation of Reed (*Phragmites communis*) Ecotypes to Drought-Prone and Saline Habitats. *J. Plant Physiol.*, **160**, 293-301.
- [46] **Mendelssohn, I. A., Mckee, K. L. and Kong, T.**, 2001. A Comparison of Physiological Indicators of Sublethal Cadmium Stress in Wetland Plants. *Environmental and Experimental Botany*, **46**, 263-275.
- [47] **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.

- [48] **Popova, L., Pancheva, T., Uzunova, A.,** 1997. Salicylic Acid: Properties, Biosynthesis and Physiological Role. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, **23**, 85-93.
- [49] **Raskin, L.,** 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol. Biol.*, **43**, 439-463.
- [50] **Mishra, A., Choudhuri, M. A.** 1997. Ameliorating effects of salicylic acid on leaf and induced inhibition of germination and early seedling growth of two rice cultivars. *Seed Sci. Technol.*, **25**, 263-270.
- [51] **Senaratna, T., Touchell, D., Bunn, E. and Dixon, K.,** 2000. Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regulation*, **30**, 157-161.
- [52] **Shakirova, F. M., Sakhabutdinova, A. R., Bezrukova, M. V., Fathutdinova, R. A. and Fathutdinova, D. R.,** 2003. Changes in hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Science*, **164**, 317-322.
- [53] **Alvarez M. E.,** 2000. Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol Biol.*, **44**, 429–442.
- [54] **Klessig D. F., Malamy J.,** 1994. The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol Biol.*, **26**, 1439–1451.
- [55] **Janda, T., Szalai, G., Tari, I., Paldi, E.,** 1999. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effect of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta*, **208**, 175-180.
- [56] **Metwally, A., Finkermeier I., Georgi, M., Dietz, K. J.,** 2003. Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiol.*, **132**, 272-281.
- [57] **Rasmussen J. B., Hammerschmidt R., Zook M. N.,** 1991. Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber inoculation with *Pseudomonas syringal* pv *syringal*. *Plant Physiol*, **97**, 1342–1347.
- [58] **Davies, P. J.,** 1995. Salicylic Acid, Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Kluwer Acad. Pub., London, 833 p.
- [59] **Yalpani, N., J. Leon; M. A. Lawton and I. Raskin,** 1993. Pathway of Salicylic Acid Biosynthesis in Healthy and Virus-Inoculated Tobacco. *Plant Physiol.*, **103**, 315-321.
- [60] **Raskin, I.,** 1995. Salicylic Acid. In: Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Davies (ed.), Kluwer Acad. Pub., London., 188-205 p.

- [61] **Seo, S., K. Ishizuka and Y. Ohashi**, 1995. Induction of Salicylic Acid β -Glucosidase in Tobacco Leaves by Exogenous Salicylic Acid. *Plant Cell Physiol.*, **36** (3), 447-453.
- [62] **Sakhabutdinova, A. R., D. R. Fatkhutdinova, M. V. Bezrukova, F. M. Shakirova**, 2003. Salicylic acid prevents the damaging action of stress factors on wheat plants. *Bulg. J. Plant Physiol.*, Special Issue, 314-319.
- [63] **Raskin, I., Turner, I. M., Melander, W. R.**, 1989. Regulation of Heat Production in The Inflorescences of an *Arum Lily* by Endogenous Salicylic Acid. *Proceedings of National Academy of Science*, **86**(7), 2214-2218.
- [64] **Chen, Z. X., Ricigliano J. W., Klessig, D. F.**, 1993. Purification and Characterization of A Soluble Salicylic Acid-Binding Protein from Tobacco. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, **90**, (20) 9533-9537.
- [65] **James, D. F., Foyer, C. H., Scott, I. M.**, 1998. Changes in Salicylic acid and Antioxidants during Induced Thermotolerance in Mustard Seedlings, *Plant Physiology*, **118**(4), 1455-1461.
- [66] **Ferrarese, I., Moretto, P., Trainotti, L., Rascio N., Casadoro, G.**, 1996. Cellulase Involvement in The Abscission of Peach and Pepper Leaves is Affected by Salicylic Acid, *Journal of Experimental Botany*, **47**(2), 251-257.
- [67] **Salisbury, F. B., Ross, C. W.**, 1992. *Plant Physiology*, Wadsworth Publishing Corporation, Belmont, CA, USA.
- [68] **Ervin, E. H., Zhang, X., Schmidt, R. E.**, 2005. Exogenous Salicylic Acid Enhances Post-Transplant Success of Heated Kentucky. *Crop Science*, **45**(1), 240-244.
- [69] **El-Tayeb, M. A.**, 2005. Response of Barley Grains to The Interactive Effect of Salinity and Salicylic Acid. *Plant Growth Regulation*, **45**, 215-224.
- [70] **Tari, I., Csiszar, J., Szalia, G., Horvath, F., Pecsvaradi, A., Kiss, G., Szepesi, A., Szabo, M., Erdei, L.**, 2002. Acclimation of Tomato Plants to Salinity Stress After a Salicylic Acid Pre-treatment. *Acta Biologica Szegediensis*, **46**(3-4), 55-56.
- [71] **Dat, J. F., H. Lopez-Delgado, C. H. Foyer, I. M. Scott**, 1998. Parallel changes in H_2O_2 and catalase during the thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiol.*, **116**, 1351-1375.

- [72] **El-Tayeb M. A., El-Enay A. E., Ahmed N. L.,** 2006. Salicylic acid-induced adaptive response to copper stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Growth Regul*, **50**, 191-199.
- [73] **Shakirova, F. M., M. V. Bezrukova,** 1997. Induction of wheat resistance against environmental and salinization by salicylic acid. *Biology Bulletin*, **24**, 109-112.
- [74] **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.
- [75] **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.
- [76] **Choudhry, 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.
- [77] **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.
- [78] **Krantev, A., Yordanova, R., Janda, T., Szalai, G. And Popova, L.,** 2006. Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants *Journal of Plant Physiology*, **165**, 920 – 931.
- [79] **Ivanova, A., Krantev, A., Stoyanova, Zh., Popova, L.,** 2008. Cadmium-induced changes in maize leaves and the protective role of salicylic acid. *Gen. Appl. Plant Physioogy*, **34** (3-4), 149-158.
- [80] **Junyu He, Yanfang Ren, Xuebo Pan, Yuping Yan, Cheng Zhu, Dean Jiang,** 2010. Salicylic acid alleviates the toxicity effect of cadmium on germination, seedling growth, and amylase activity of rice. *Journar of Plant Nutrition and Soil Science*, **173**(2), 300-305.
- [81] **Popova L. P., Maslenkova L. T., Yordanova R. Y., Ivanova A. P., Krantev A. P., Szalai G., Janda T.,** 2009. Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, **47**(3), 224-231.

- [82] **A. Belkhadi, H. Hediji, Z. Abbes, I. Nouairi, Z. Barhoumi, M. Zarrouk, W. Chaïbi, W. Djebali,** 2010. Effects of exogenous salicylic acid pre-treatment on cadmium toxicity and leaf lipid content in *Linum usitatissimum* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **73**(5) 1004-1011.
- [83] **Jamile F. G., Fernando T. N., Alexssandro G. B., Luciane B. P., Luciane A. T., Denise C., Carla M. G. de P., Valderi L. D., João B. T. da R. and Maria R. C. S.,** 2009. Photosynthetic pigments content, δ -aminolevulinic acid dehydratase and acid phosphatase activities and mineral nutrients concentration in cadmium-exposed *Cucumis sativus* L. *Biomedical and Life Sciences*, **64**(2), 310-318.
- [84] **Shi Q., Zhu Z.,** 2008. Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. *Environmental and Experimental Botany*, **63**(1-3), 317-326.
- [85] **Gülçin, İ.,** 2002. Isırgan Otuunun (*Urtica dioica*) Antioksidant Aktivitesinin Belirlenmesi, Oksidatif Enzimlerin Karakterizasyonu ve Bazı *in vivo* Etkilerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- [86] **Bast, A. Haenen, G. R. M. M. and Cees, J. A. D.,** 1997. Oxidants and antioxidants: State of the art. *The American Journal of Medicine*, **91**, (Suppl 3C), 30, 3C-2S_3C-13S.
- [87] **Rice-Evans, CA. Diplock, AT. and Symons, M. C. R.,** 1991. Techniques in free radicals research. Elsevier, Amsterdam, vol 22.
- [88] **Vranova, E.,** 2002. Signal Transduction During Oxidative Stress, *J. Exp. Bot.*, **53**, 1227-1236.
- [89] **Noctor, G., Foyer, C.H.,** 1998. Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **49**, 249-279.
- [90] **Gupta, K.J., et al.,** 2005. In Higher Plants, Only Root Mitochondria, But Not Leaf Mitochondria Reduce Nitrite to NO, *In Vitro and In Situ*, *J. Exp. Bot.*, **56**, 2601-2609.
- [91] **Mittler, R.,** 2002. Oxidative Stress, *Trends Plant Sci.*, **7**, 405-410.
- [92] **Gallego S. M., Benavides M. P., Tomaro M. L.,** 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci.*, **121**(2), 151-159.
- [93] **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.

- [94] **Witham, F. H., Blaydes, D. F. and Dewlin, R. M.,** 1971. Experiments in Plant Physiology New york, Von Nonstrand Reinhold Company, 55-56.
- [95] **Larson, L. A. and Beevers, H.,** 1965. Amino acid metabolism in young pea seedlings. Plant Physiol., **40**, 424-432.
- [96] **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. and Rondall, R. J.,** 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol.Chem., **193**, 265-275.
- [97] **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.
- [98] **Elman, G. L.,** 1959. Tissue sulphhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys., **82**, 70-70.
- [99] **Griffith OW.,** 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. Anal Biochem., **106**(1), 207-12.

ÖZGEÇMİŞ

24.08.1986 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.