T.C
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS

KURŞUN (Pb) STRESİ ALTINDAKİ BUĞDAY BİTKİLERİNE ASPARAGİN UYGULAMASININ FİZYOLOJİK ve BİYOKİMYASAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mehmet SÜRÜCÜ

TOPRAK BİLİMİ VE BİTKİ BESLEME ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA

2022

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vi
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 4
3. MATERYAL ve YÖNTEM 8
3.1. Materyal 8
3.1.1. Denemenin kurulduğu yer ve tarih 8
3.1.2. Bitki özellikleri 8
3.1.3. Denemenin yürütülmesi 8
3.2. Yöntem 10
3.2.1. Bitki yaş ve kuru ağırlığı 10
3.2.2. Kurşun içeriğinin belirlenmesi 10
3.2.3. SPAD değeri 10
3.2.4. % ES (Elektrolit sızıntısı) belirlenmesi 10
3.2.5. Lipit peroksidasyonu veya malondialdehid (MDA) tayini 11
3.2.6. Hidrojen peroksit (H_2O_2) belirlenmesi 11
3.2.7. Antioksidan enzim ekstraksiyonu 12
3.2.8. Katalaz (CAT) enziminin tayini 12
3.2.9. Süperoksit dismütaz (SOD) aktivitesi 12
3.2.10. Peroksidaz (POD) ölçümü 12
3.2.11. Verilerin değerlendirilmesi 13
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 14
4.1. Buğday Bitkisinin Yeşil Aksam Yaş ve Kuru Ağırlıkları 14
4.2. Buğday Yaprak ve Köklerinde Pb Miktarı 16
4.3. Buğday Bitkisinin SPAD Değerleri 16
4.4. % ES (Elektrolit Sızıntısı) 18
4.5. Asparaginin Kurşun Toksisitesinde Yetişen Buğday Bitkisinin Malondialdehid (MDA) içeriği Üzerine Etkisi 20
4.6. Asparaginin Kurşun Toksisitesinde Yetişen Buğday Bitkisinin Hidrejen Peroksit (H_2O_2) içeriği Üzerine Etkisi 21
4.7. Asparaginin Kurşun Toksisitesinde Yetişen Buğday Bitkisinin Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Üzerine Etkisi 23
4.8. Asparaginin Kurşun Toksisitesinde Yetişen Buğday Bitkisinin Katalaz (CAT) Enzimi Üzerine Etkisi 24
4.9. Asparaginin Kurşun Toksisitesinde Yetişen Buğday Bitkisinin Peroksidaz (POD) içeriği Üzerine Etkisi 26
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 28
5.1. Sonuçlar 28
5.2. Öneriler 29
KAYNAKLAR 30
ÖZGEÇMİŞ ..... 错误!未定义书签。

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KURŞUN (Pb) STRESİ ALTINDAKİ BUĞDAY BİTKİLERİNE ASPARAGİN UYGULAMASININ FİZYOLOJİK ve BİYOKİMYASAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mehmet SÜRÜCÜ

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Cengiz KAYA
YIL: 2022, Sayfa: 33

Bu çalışma, kurşun (Pb) toksisitesine maruz kalan buğday bitkilerine yapraktan Asparagin (ASN) uygulamasının bitki fizyolojik gelişimine ve antioksidan savunma sistemine olan etkilerini incelemek amacıyla kontrolsüz sera koşullarında saksı ortamında gerçekleştirildi**.** Tüm serilerde sulama eşit miktarda ve aynı zamanda besin solüsyonu ile yapıldı. Kontrol bitkileri sadece besin solusyonu ile beslendi. Kurşun stresi için 0.1 mM Pb ($PbCI_2$) olarak besin solüsyonu ile beraber uygulandı. Araştırmada 0, 10 mM, 20 mM ve 40 mM olmak üzere 4 farklı asparagin dozu kullanıldı ve ASN bitkilere yapraktan püskürtülerek uygulandı. Bitkiler 10. haftada hasat edildi ve deneme amacına yönelik gerekli analizler yapıldı. Kurşun toksisitesi buğday bitkisinin yaş ağırlığı, kuru ağırlığı ve SPAD değerlerini önemli düzeyde düşürdü. Buna karşın yapraktan ASN uygulaması buğday bitkisinin yaş ağırlığı, kuru ağırlığı ve SPAD değerlerini önemli derecede iyileştirmiştir. Pb toksisitesi bitkinin elektrolit sızıntısını (ES), hidrojen peroksit (H_2O_2), malondialdehid (MDA) içeriğini artırdığı belirlendi. Pb stresindeki buğday bitkilerine ASN uygulaması ile elektrolit sızıntısı (ES), hidrojen peroksit (H_2O_2), malondialdehid (MDA) içeriğinde, bitki yaprak ve köklerin Pb miktarında azalma gözlemlendi ve en iyi sonuçlar 40 mM ASN uygulamasında belirlendi. Kurşun toksisitesi buğday bitkilerinin antioksidan savunma sistemlerini yani süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD) ve katalaz (CAT) aktivitelerini artırmıştır. Kurşun stresine maruz kalan bitkilere ASN uygulaması ile SOD, POD ve CAT aktivitelerinde önemli artışlar oldu ve en yüksek aktivite 40 mM ASN + 0.1 mM Pb uygulamasında belirlendi. Pb toksisitesine maruz kalan buğday bitkilerinde incelenen tüm parametrelerde umut verici en iyi sonuçlar 40 mM ASN uygulamasında belirlendi. ASN'nin, stres koşullarında antioksidan savunma sistemini etkinleştirmesi Pb toksisitesine karşı toleransı yükseltmesi ve stresi azaltmasında önemli işlevi olduğu belirlendi.

ANAHTAR KELİMELER: Asparagin, kurşun, buğday, antioksidan savunma sistemi

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL EFFECTS OF ASPARAGINE APPLICATIONON WHEAT PLANT UNDER LEAD (Pb) STRESS

Mehmet SÜRÜCÜ

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Soil Science and Plant Nutrition

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Cengiz KAYA
Year: 2022, Page: 33

This study was carried out under uncontrolled greenhouse conditions in a potted environment to examine the effects of foliar application of Asparagine (ASN) on wheat plants exposed to lead (Pb) toxicity on plant physiological development and antioxidant defense system. In all series, irrigation was done with equal amount of nutrient solution at the same time. Control plants were fed with nutrient solution only. It was applied with 0.1 mM Pb (as $PbCl_2$) nutrient solution for lead stress. In the study, 4 different doses of asparagine, 0, 10 mM, 20 mM, and 40 mM, were used and ASN was applied to the plants by foliar spraying. The plants were harvested at week 10 and the necessary analyzes were made for the purpose of the experiment. Lead toxicity significantly decreased the fresh weight, dry weight and SPAD values of the wheat plant. On the other hand, foliar ASN application significantly improved the fresh weight, dry weight and SPAD values of wheat plant. It was determined that Pb toxicity increased the electrolyte leakage (ES), hydrogen peroxide (H_2O_2), malondialdehyde (MDA) content of the plant. Electrolyte leakage (ES), hydrogen peroxide (H_2O_2), malondialdehyde (MDA) content, Pb content of plant leaves and roots decreased with ASN application to wheat plants under Pb stress, and the best results were determined in 40 mM ASN application. Lead toxicity increased the antioxidant defense systems of wheat plants, namely superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) activities. There were significant increases in SOD, POD and CAT activities with ASN application to plants exposed to lead stress, and the highest activity was determined in 40 Mm ASN + 0.1 mM Pb application. The best promising results in all parameters examined in wheat plants exposed to Pb toxicity were determined in the application of 40 mM ASN. It has been determined that ASN has an important function in activating the antioxidant defense system under stress conditions, increasing tolerance to Pb toxicity and reducing stress.

KEY WORDS: Asparagine, lead, wheat, anti defense system

TEŞEKKÜR

Çalışmanın her aşamasında gerekli fikir ve bilgisinden yararlandığım danışmanım Sayın Prof. Dr. Cengiz KAYA'ya desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Çalışma süresinde her zaman yardımlarını ve fikirlerini aldığım Arş. Gör. Ferhat UĞURLAR'a teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim boyunca her koşulda yardımcı olan doktora öğrencisi sevgili Hayriye GÜNBEGİ'ye teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca her zaman en büyük destekçim olan değerli annem Rahime SÜRÜCÜ ve değerli babam Ali SÜRÜCÜ'ye çok teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 3. 1. Denemenin kurulumu 9
Şekil 4. 1. Farklı uygulamaların buğday bitkisinin SPAD değerlerine (klorofil içeriğine) etkisi 17
Şekil 4. 2. Farklı uygulamaların buğday bitkisinde % ES (Elektrolit Sızıntı) üzerine etkisi 18
Şekil 4. 3. Buğday yapraklarında Malondialdehid (MDA) konsantrasyonu 20
Şekil 4. 4. Buğday bitkisinde Hidrojen Peroksit (H_2O_2) konsantrasyonu 21
Şekil 4. 5. Buğday bitkisinde farklı uygulamaların süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi 23
Şekil 4. 6. Kurşun ve ASN uygulamalarının katalaz (CAT) enzimi aktivitesine etkisi 24
Şekil 4. 7. Farklı uygulamalar sonrası buğday bitkisinde Peroksidaz (POD) ölçümü sonuçları 26

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3. 1. Deneme Planı 9
Çizelge 4. 1. Farklı uygulamaların buğday bitkisinin yeşil aksam yaş ağırlığına etkisi..... 14
Çizelge 4. 2. Farklı uygulamaların buğday bitkisinin yeşil aksam kuru ağırlığına etkisi..... 15
Çizelge 4. 3. Farklı uygulamaların buğday yaprak ve köklerinin kurşun içeriğine etkisi 16

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABA	Absisik Asit
APX	Askorbat Peroksidaz
ASN	Asparagin
CAT	Katalaz
Cd	Kadminyum
GA3	Galik Asit
H_2O	Su
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
MDA	Malondialdehid
mM	Milimolar
N:C	Azot Karbon oranı
NACI	Tuz
O_2	Oksijene
Pb	Kurşun
$Pb(NO_3)_2$	Kurşun(II) Nitrat
POD	Peroksidaz
ppm	Parts per million (milyonda bir)
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit Dismütaz
Zn	Çinko
µM	Mikromolar
%	Yüzde birim

1. GİRİŞ

Ağır metal kirliliği, hızlı sanayileşme ve kentleşme nedeniyle bitki sağlığı ve verimliliği üzerinde olumsuz etkilere sahiptir. Toprakta ağır metal birikimi biyo yarayışlılığını önemli oranda olumsuz etkilemektedir. Ağır metallerden biri olan kurşun (Pb), bitkiler için temel elementler arasında yer almazken çevre koruma ajansına (EPA) göre çevredeki en yaygın kirleticidir (Keser, 2005; Lamhamdi ve ark., 2013).

Endüstriyel atıklar, kömürün yanması, kurşunlu benzinin yanması, insektisitler (böcek ilaçları) ve kimyasal gübrelerin (fosforlu gübreler) kullanımı sonucu Pb, havaya, toprağa ve suya karışabilir (Landıs ve ark., 2004). Bu nedenle Pb, toprak, hava ve su ortamını en çok kirleten ağır metallerden biridir. Bitkiler tarafından esas olarak kök sistemi yoluyla emilir ve daha sonra toksisite belirtileri gösterir. Pb fitotoksitesi, topraktan bitki köklerine hareket etmesi ve bitki bünyesine alımından sonra genç dokularda, sürgünlerin çeşitli bölgelerinde belirtileri görülmektedir (Verma ve ark., 2003). Pb stresi kök gelişimini olumsuz etkileyerek, besin elementi alımını önemli düzeyde engellemektedir (Sharma ve ark., 2005).

Pb, çeşitli ağır metaller gibi bitki hücrelerine girdiğinde, artan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi nedeniyle büyüyen bitki kısımlarında oksidatif strese neden olur (Verma ve ark, 2003). Reaktif oksijen türlerine ‘serbest radikaller’ adı da verilmektedir. Serbest radikaller eşleşmemiş elektron yapısına sahipler ve başka molekülerle etkileşime girerek elektron alır ya da verirler. Oksidatif stres: protein, lipit karbonhidrat ve DNA yapısını bozabilir, hatta stres süresi uzaması durumunda geri dönüşümsüz tahribatlara neden olabilmektedir (Denli ve ark., 2014). Bitkilerin stres faktörlerine karşı tepkileri kaçınma ve toleranstır. Serbest radikal hasarını önlemek için bitkiler doğal olarak antioksidan savunma sistemleri (antioksidanlar) olarak adlandırılan savunma sistemlerini geliştirmişlerdir. Bu savunma sistemi enzimatik ve enzimatik olmayan olarak ikiye ayrılır. Enzimatik antioksidanlar: katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD), askorbat peroksidaz (APX) enzimlerinden oluşmaktadır (Esim ve ark., 2014). Hücre hasarları oluşmasına

ve bitki üretkenliğinin azalmasına neden olan oksidatif stres koşulları altında bitkilerde sinyal iletimi, bitki gelişim düzenleyicileri tarafından yapılmaktadır. Bitki gelişim düzenleyicilerinden olan asparagin, protein sentezinin kısıtlanmasına biyolojik bir yanıt olarak birikir. Eksojen olarak uygulanan asparagin antioksidan savunma sistemini aktive ederek bitkiyi oksidatif stres hasarlarından korur (Lea, 2007; Ak ve ark., 2011).

Asparagin ($C_4H_8N_2O_3$), moleküler kütlesi 132.12 ve izoelektrik noktası 5.41 olan bir amino asit amididir. Hem asitlerde hem de alkalilerde çözünür olmasına rağmen, suda sadece orta derecede çözünür ve kolayca beyaz monohidrat kristalleri oluşturur. Aynı zamanda yüksek bir N:C oranına sahiptir, çözünür formda sadece birkaç enzimatik reaksiyon için bir substrattır ve fizyolojik koşullar altında çok az net yüke sahiptir. Bu nedenle ideal bir depolama bileşiği oluşturur ve çeşitli durumlarda birikir. Benzer şekilde, özellikle baklagil bitkilerinde azotun taşınan önemli bir şeklidir (Lea, 2007).

Bitkilerde, en yaygın amidlerden biri olan asparaginin, özellikle aktif olarak büyüyen dokularda protein sentezinin birincil kaynağı olduğu bildirilmiştir. Aspartatın serbest karboksilik asit grubunun negatif yükünden yoksun olmasına rağmen, asparagin bir miktar polariteyi korur ve sıklıkla enzimlerin aktif bölgesinde anahtar bir rol oynar (Mansfield ve ark., 2006). Tüm temel amino asitlerin biyosentezi, sabit N'nin bir donörü olarak asparaginden elde edilebilir. Serbest amino asitler genellikle buğday tanesinin toplam nitrojen içeriğinin yaklaşık %5'ini veya daha azını oluşturur, asparagin ise toplamın %10'unu veya daha azını oluşturmaktadır (Lea, 2007).

Tahıllar arasında üretimi ve tüketimi en fazla olan buğday dünyanın pek çok yerinde yetişebilen, kültür bitkileri arasında üretimi ve ekim alanı en fazla olan, canlıların (insan ve hayvan) beslenmesinde kullanılan temel bir bitkisel üründür (Gökalp, 2015). Buğday üretimini sınırlandıran çevresel etmenler, artan nüfusun gıda ihtiyacının karşılanmasında önemli sorunlara yol açmaktadır.

Bu tez çalışmasında, Pb toksisitesine maruz kalan buğday bitkilerinin, tolerans mekanizmalarının geliştirilmesi amacı ile dışsal asparagin uygulamasının oksidatif stres ve antioksidan enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Ağır metallerin mısır (Zea mays L.) bitkisi üzerinde etkisini belirmek amacıyla sera koşullarında saksı denemesi ile araştırılmıştır. Cd; 25, 50 µM ve Pb; 50, 100 µM olarak uygulanmıştır. Kontrol grubuna göre hem Cd hem de Pb uygulanan mısırlarda, toprak üstü yaş ve kuru aksam ağırlığı, toprak altı yaş ve kuru aksam ağırlıklarında önemli bir azalma olmasına rağmen antioksidan enzim aktivitelerinin de arttırdığını bildirmiştir (Tuna ve ark., 2015).

Pb, çevrede yüksek miktarlarda bulunan toksik elementlerden biridir. Bitki morfolojisi, büyümesi ve fotosentetik süreçleri üzerinde olumsuz etki yaparak enzim aktivitelerinin inhibisyonuna, su dengesizliğine, membran geçirgenliği üzerinde değişikliklere neden olur ve mineral beslenmesini bozar (Sharma ve ark., 2005; Sreekanth ve ark., 2010).

Kurşun toksisitesinin bitkilerdeki belirtileri: verim ve kalite kaybı, yaprak yaşlanması, bodur büyüme, zayıf kök gelişimi, yapraklarda klorotik nekrotik lekeler vb. belirtiler görüldüğü belirtilmiştir (Özay, 2008). Pb'nin bitkilerde üzerindeki toksisitesi, topraktaki konsantrasyonuna ve çözünürlüğüne, bitki tarafından alınımı ve taşınmasına bağlıdır (An, 2006). Bitkiler Pb'yi topraktaki çözeltiden kökleri yoluyla emer ve daha sonra Pb_2+ 'nin en büyük oranı kökler içinde çözünmez bir formda birikir (Wierzbicka ve ark., 2007).

Kıvırcık salata bitkilerine 150 ve 300 ppm Pb uygulanan bir çalışmada: kıvırcık salata bitkilerinin gelişimi, toprak üstü yaş ve kuru aksam ağırlıkları, morfolojik özellikler: kök ve gövde boylarının diğer uygulamalara göre en fazla 300 ppm Pb uygulamasında engellendiği bildirilmiştir (Kıran, 2015).

Kum kültüründe yapılan bir çalışmada çeltik bitkisine belli periyotlar ile uygulanan 500 ve 1000 mM $Pb(NO_3)_2$ dozları sürgün büyümesini % 25 ve kök büyümesini % 22-42 oranında düşürdüğünü bildirmiştir. Kökler tarafından emilen Pb

miktarı sürgünlerin 1.7-3.3 katı kadar daha fazla olduğu görülmüş ve Pb elementinin kökler tarafından sürgünlere göre daha fazla biriktiği belirtilmiştir (Verma ve ark., 2003).

Besin alımı üzerine yapılan bir çalışmada hidroponik koşullar altında ıspanak (Spinacia oleracea) ve buğday (Triticum aestivum) bitkilerine 1.5, 3, 5 mM konsantrasyonunda $Pb(NO_3)_2$ kurşun nitrat uygulanmıştır. Çoğu mineral iyonunun (Na, K, Ca, P, Mg, Fe, Cu ve Zn) toplam miktarları ve konsantrasyonlarının azaldığı bildirilmiştir (Lamhamdi ve ark., 2013).

Yapılan bir çalışmada, Tosunbey ve Ceyhan 99 buğday çeşitlerine farklı derişimlerde 10 ve 100 mg/L Pb uygulamasının, çeşitlerin morfolojik ve fizyolojik özelliklerine etkisi incelenmiştir. Her iki buğday çeşidinde de yüksek doz Pb uygulaması ile büyüme ve gelişmede azalma, yapraklarda kloroz ve kahverengileşmeler gözlemlendi. Her iki çeşitte kökte ve yeşil aksamın protein oranı artan Pb konsantrasyonuyla azalmıştır (Çolak, 2009).

Pb'nin olumsuz etkisini incelemek amacıyla, Chakwal-97 ve Sehar-2006 olan iki buğday çeşidi farklı konsantrasyonlarda (0, 40 ve 60 ppm) Pb ile muamele edilmiştir. Yapılan saksı denemesinde Pb'nin sürgün, kök uzunluğu, yeşil aksam ve kuru ağırlığı, kardeşlenme vb. morfolojik parametreleri olumsuz etkilediği bildirilmiştir (Bhatti ve ark., 2013).

Büyüme ortamındaki Pb konsantrasyonu arttıkça buğday bitkilerinin Pb alımının arttığı ve ortamdan kök hücrelere plazma membranı katyon kanalları, özellikle Ca_2+ kanalları ile taşındığı belirtilmiştir (Seregin ve ark., 2008).

Bitkilerin yaşamlarını sürdürdükleri alanlarda, yaşamlarının herhangi bir döneminde ortaya çıkan ve bitkilerde büyüme, gelişmeyi, metabolizmayı olumsuz etkileyen veya engelleyen çevresel faktörler stres olarak ifade edilir (Yılmaz ve ark., 2011).

Bitkilerde bulunan antioksidan enzimler ve bazı metabolitler, oksidatif hasara direnmek için, stres dönemlerinde bitkilerin adaptasyonuna ve hayatta kalmasında önemli rol oynar (Malecka ve ark., 2001; Denli ve ark., 2014).

Enzimatik antioksidanlar: katalaz (CAT), peroksidaz (POD) süperoksit dismutaz (SOD) ve askorbat peroksidaz (APX) enzimleridir. Katalaz: Oksidatif stres koşulları altınd asüperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi sonucu oluşan zararlı olan hidrojen peroksidi (H_2O_2) suya (H_2O) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşüp zararsız olmasını sağlar. Süperoksit dismutaz (SOD), oksitatif stres sırasında süperoksit anyon radikalini (O_2^-) katalizleyerek aktif oksijen varlığında hayatta kalmasını ve reaksiyon sonunda hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküller oksijen (O_2) oluşumunu sağlar (Esim ve ark., 2014; Çolak, 2017; Kireçci, 2018).

Bitkiler Pb toksisitesine karşı farklı savunma stratejilerine sahiptir. İlk stratejileri, onu hariç tutarak veya bir hücre duvarına bağlayarak metalin hücreye girmesini önlemektir. İkinci savunma mekanizması ise, farklı alt hücre bölmelerinde antioksidanların (enzimatik ve enzimatik olmayan) varlığı yoluyla ROS tarafından tetiklenen oksidatif hasardan kaçınmasıdır (Corpas, 2013).

Oksidadif stres ve antioksidan savunma sistemi üzerine yapılan bir çalışmada, biber (Capsicum annuum L.) bitkisine Cd, Pb ve Cd+Pb şeklinde üç farklı uygulama yapılmıştır. Cd ve Pb'nin tek başına uygulamalarında, kuru ağırlık, klorofil içeriği, elektrolit sızıntı (EL) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarında belirgin artış görüldüğünü bildirmiştir. Cd ve Pb'nin birlikte uygulanması: malondialdehit (MDA), peroksidaz (POD), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve enzimatik antioksidanların aktivitelerinde en önemli artışı ve en fazla zararlı etkinin birlikte uygulamasında görüldüğünü bildirmiştir (Kaya ve ark., 2019).

Birden fazla yerde yetiştirilen genotiplerin karşılaştırılması, olgun tahıldaki asparagin konsantrasyonu üzerinde çevrenin büyük bir etkisi olduğunu bildirilmiştir. Yağış ve sıcaklığın, tahıl gelişimi sırasında (başak ve hasat arasında) en büyük etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Deliave ark., 2016). Amerika Birleşik Devletleri'nin

Nebraska Eyaletinde yapılan bir çalışmada tahıldaki asparagin konsantrasyonunun hem genotip hem de üretim ortamından etkilendiğini ve üretim ortamının asparagin konsantrasyona etkisinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Navrotskyi ve ark., 2018).

Kanada da farklı ekmeklik buğday çeşitleri üzerine yapılan bir çalışmada, iki farklı yerde ve dört gübreleme işlemi (azot ve/veya kükürt seviyesi) uygulanmıştır. Buğdayın asparagin konsantrasyonu, yetiştirme yeri, çeşit ve bunların etkileşiminden önemli ölçüde etkilenmiş, ancak gübre (azot ve/veya kükürt seviyesi) uygulamasından etkilenmemiştir (Malunga ve ark., 2020).

Chaffei ve ark., (2004) yaptıkları araştırmada, Cd'nin domates köklerinin asparagin konsantrasyonunda yaklaşık 10 kat artışa neden olduğu, ancak yapraklarda bu oranın 4 kart olduğunu gözlemlemiştir. Bununla birlikte, glutaminin ksilem ve floemde taşınan başlıca amino asit olduğunu ve kadmiyumdan çok az etkilendiği bildirilmiştir.

Elmada, tam çiçeklenme zamanında ksilemdeki toplam amino asit azotunun yarısından fazlasını asparaginin oluşturduğunu, bunu arginin, glutamin ve aspartatın izlediği rapor edilmiştir (Malaguti ve ark., 2001).

Çok çeşitli mercimek (Lens) türlerinin çimlenen tohumları incelenmiş ve asparaginin, tüm türlerin fidelerinde niceliksel olarak açık ara farkla en önemli protein amino asit olduğu bulunmuştur (Rozan ve ark., 2001).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Sera koşullarında yürütülen bu çalışmanın ana materyalleri: buğday tohumu, perlit, Hoagland besin çözeltisi, kurşun (Pb), asparagin, 4 litrelik plastik saksılar ve analizler için laboratuvarda kullanılan materyallerdir.

3.1.1. Denemenin kurulduğu yer ve tarih

Bu çalışma, Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesinde Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümüne ait cam serada yürütülmüştür. Çalışma 21/01/2021 ve 02/04/2021 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Bitki özellikleri

Denemede, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yerel olarak kullanılan ve ticari ismi Edessa olan makarnalık buğday çeşidi kullanılmıştır. İyi bakım şartlarında protein oranı % 14.0–17.3 arasında ve dekara verimi 944 kg'dır. Başak yapısı kılçıklı olup kötü hava koşullarına ve yatmaya dayanıklıdır (Bioturca Tohum, 2021).

3.1.3. Denemenin yürütülmesi

Perlit ile doldurulan her bir saksıya 40 adet buğday tohumu ekilmiş ve can suları verilmiştir. Tohumların ekildiği günü takiben 10. günde çimlenme gerçekleşmiştir. Çimlenmenin ardından her saksıda 20 adet bitki kalacak biçimde bitkiler seyreltilmiştir. Denemenin kurulumuna ait görünüm Şekil 3.1.'de verilmiştir.



Şekil 3. 1. Denemenin kurulumu

Tüm serilerde sulama 2 günde bir eşit miktarda besin solüsyonu ile yapılmıştır. Bitkiler çimlendikten 15 gün sonra iki günde bir olacak şekilde toplamda 3 defa asparagin (10 20 40 mM) yapraklardan uygulanmıştır. Asparagin uygulamasından 3 gün sonra 0.1 mM Pb kontrol hariç diğer serilere uygulanmıştır. Deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Deneme planı Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3. 1. Deneme Planı

Uygulamalar	**Kurşun (Pb) Dozu**	**Asparagin Dozu**
Kontrol	-	-
Kurşun Toksitesi	0.1 mM	-
Kurşun Toksitesi	0.1 mM	10 mM
Kurşun Toksitesi	0.1 mM	20 mM
Kurşun Toksitesi	0.1 mM	40 mM

3.2. Yöntem

Bitkiler 10. haftanın sonunda hasat edilmiştir. Pb toksisitesi altında bulunan buğday bitkilerine farklı dozlarda asparagin uygulamasının buğday bitkisinin fizyolojik gelişimine, bitkinin tolerans ve direnci üzerine etkisini belirlemek amacıyla aşağıda verilen analizler yapılmıştır.

3.2.1. Bitki yaş ve kuru ağırlığı

Bitkiler saksı yüzeyinden kesilerek yeşil aksamın yaş ağırlıkları tartılmıştır. Yaş ağırlıkları alınan bitkiler 70°C sıcaklıkta kurutma dolabında ağırlıkları sabitleşene kadar bekletildi ve kuru ağırlıkları alındı.

3.2.2. Kurşun içeriğinin belirlenmesi

İyi öğütülmüş yaprak materyali 550°C'de 6 saat boyunca küllendi. Elde edilen külün içine 5 ml sıcak HCI (2 M) eklendi (Chapman ve Pratt 1982). Pb konsantrasyonu, atomik absorpsiyon spektrofotometresi kullanılarak ölçüldü.

3.2.3. SPAD değeri

Saksıların her birinden alınan 5 buğday bitkisinin bayrak yaprakları belirlenmiş, yapraktaki klorofil içeriği SPAD cihazı ile ölçülmüştür.

3.2.4. % ES (Elektrolit sızıntısı) belirlenmesi

Bitkilerin % ES değeri belirlemek için 0,1 g bitki yaprağı 3 mm uzunluğunda kesilerek içerisinde 10 ml deiyonize su bulunan deney tüplerine koyulmuştur. Tüpler 32°C sıcaklıkta sıcak su banyosunda 2 saat süreyle bekletilmiştir. Daha sonra EC metre ile (EC1) elektrik iletkenlikleri belirlendi. EC'leri belirlenen tüpler 121°C' de 20 dakika süresince bekletilmiştir. Ardından örnekler oda sıcaklığına soğutularak bu

ortamdaki elektrik iletkenliği (EC2) belirlendi. Elektrolit sızıntısı % olarak aşağıda verilen formül ile hesaplandı (Dionisio-Sese ve Tobita, 1998).

$$ES = EC_1/EC_2 \times 100 \quad (3.1)$$

3.2.5. Lipit peroksidasyonu veya malondialdehid (MDA) tayini

Yapraklardaki MDA konsantrasyonu (Jebara ve ark. 2005) yöntemine göre belirlenmiştir. 500 g taze yaprak örneği % 0.1 (w/v) trikloroasetik asitile homojenize edilmiştir. Ardından 12000 g ve +4ºC de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Üst kısımdan alınan 1000 µl alikot, trikloroasetik (20 g/100 ml) içinde hazırlanan tiyobarbütirik asit (500 mg/100 ml) ile karıştırılarak 95ºC'de su banyosunda 30 dakika bekletilmiştir. En son elde edilen örnekler buz üzerinde soğutulmuştur. Örneklerin 532 ve 600 nm'deki absorbasları spektrofotometrede ölçülmüştür. Bitki yapraklarındaki MDA konsantrasyonu aşağıdaki formül ile nmol g^{-1} taze ağırlık olarak belirlenmiştir (Sairam ve Saxena, 2000).

MDA nmol g-1 YA = [(Ekstrakt Hacmi (ml) x [(A532-A600) / (155 mM-1 cm-1)])/ Örnek Miktarı (g)] x 103 (3.2)

3.2.6. Hidrojen peroksit (H_2O_2) belirlenmesi

Yapraklardaki H_2O_2 konsantrasyonun belirlenmesinde Loreto ve Velikova (2000) tarafından bildirilen prosedür uygulandı. 500 mg yaprak dokusu % 0,1 Tri-kloro- asetikasit çözeltisinde homojenize edilmiştir. Süpernatant 10.000 RCF'de 10 dk. santrifüj edildi. 500 µl örnek üzerine K-fosfat tampon (0,01 M, pH 7.0) ile 1M KI ilave edilmiş ve absorbans değerleri 390 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Bitkilerin H_2O_2 konsantrasyonu hazırlanan standart grafikten hesaplanmıştır.

3.2.7. Antioksidan enzim ekstraksiyonu

Taze bitki yapraklarından 500 mg tartılarak sıvı azot ile öğütülmüştür. Daha sonra 100 mM potasyum fosfat tamponu (%1 polyvinylpyrrolidone ve 1000 µM EDTA içerir, pH: 7,0) içerisinde homojenizasyona uğratıldı. Ekstrakt 15000 RCF ve +4°C sıcaklıkta 15 dk. santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant bitkilerin CAT, POD, SOD ve protein içeriğinin belirlenmesinde kullanıldı.

3.2.8. Katalaz (CAT) enziminin tayini

Katalaz aktivitesinin tayini Milosevic, ve Slusarenko (1996) prosedürüne göre belirlendi. 10 µL bitki ekstraktının reaksiyon çözeltisine (0,01 M H_2O_2 , 0,05 M K-fosfat (pH 7.0) ve 0,04 M Titriplex III) ilave edilmesiyle oluşturulan karışımının absorbansı 240 nm de 3 dakika boyunca ölçülmüştür. CAT aktivitesinin hesaplanması, 1 dakika içinde H_2O_2'nin parçalanmasını sağlayan enzim miktarı belirlendi ve sonuçlar U/mg/protein olarak ifade edilmiştir.

3.2.9. Süperoksit dismütaz (SOD) aktivitesi

Beauchamp ve Fridovich (1971) tarafından bildirilen yöntem uygulandı. Ekstraksyon çözeltisinden 25 µl alınarak üzerine 0.1 mM Na-EDTA, 0,05 mol L^{-1} potasyum fosfat (pH 7.8), 13 mmol L^{-1} L-methionine, 33 µmol L^{-1} NBT ve 5 µM riboflavin eklenmiştir. Bir tane bitki materyali olmadan kontrol hazırlanmıştır. 10-15 dk beyaz ışık altında bekletildikten sonra 560 nm dalga boyunda okuması yapılmıştır. Sonuçlar U/mg/protein olarak ifade edilmiştir.

3.2.10. Peroksidaz (POD) ölçümü

Peroksidaz ölçümü (Cvikrova et al. 1994) tarafından bildirilenyönteme göre belirlenmiştir.10 µL yaprak ekstraktı reaksiyon çözeltisine (0,05 M soydum fosfat (pH 6.5), 5 mM guaicol ve 0,005 M H_2O_2) eklenerek karışımın absorbansı 470 nm de

ve 1 dk ara ile 5 dk boyunca okunmuştur. Peroksidaz enzim aktivitesi (POD aktivitesi) =ΔA_{470}/dakika/mg protein formülüyle hesaplanmıştır.

3.2.11. Verilerin değerlendirilmesi

Kurulan deneme 3x3 faktöryel deneme deseninin, veri sonuçları ve ölçümleri ANOVA analizi ile elde edilmiştir. Yapılan çalışmada, çalışmanın ortalama ölçüm sonuçları ve standart hata değerleri belirlenmiştir. Duncan ($P \leq 0,05$) testi ile karşılaştırılmak üzere, ortalamalar arasındaki farklar değerlendirilmiştir. Çalışma sonuçları grafikler şeklinde verilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Buğday Bitkisinin Yeşil Aksam Yaş ve Kuru Ağırlıkları

Pb toksisitesi altında yetişen buğday bitkisine farklı dozlarda asparagin uygulamasının bitkinin yeşil aksam yaş ve kuru ağırlığına olan etkisini belirlemek amacıyla istatiksel olarak sonuçlar aşağıdaki tablolarda verilmiştir. Farklı uygulamaların buğday bitkisinin yeşil aksam yaş ağırlığına etkisi Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4. 1. Farklı uygulamaların buğday bitkisinin yeşil aksam yaş ağırlığına etkisi

Uygulamalar	**Yeşil aksam yaş ağırlık(g/saksı)**
Kontrol	$14,3\pm1,233^{a}$
Pb (0.1 mM)	$3,1\pm0,206^{c}$
Pb (0.1 mM) + 10 mM ASN	$4,8\pm0,511^{bc}$
Pb (0.1 mM) + 20 mM ASN	$7,2\pm0,408^{b}$
Pb (0.1 mM) + 40 mM ASN	$12,8\pm1,808^{a}$

Kontrol ve kurşun (Pb) stresi (0.1 mM $PbCI_2$) altında yetiştirilen buğday bitkisine yapraktan püskürtülerek farklı dozlarda asparagin (ASN 1: 10 mM, ASN 2: 20 mM, ASN 3: 40 mM) uygulamasının yeşil aksam yaş ağırlık değerlerine etkisi çizelgede verildi (ortalama ± standart hata). Duncan'ın çoklu aralık testine göre, aynı sütundaki farklı harfler önemli farklılıkları gösterir ($P \leq 0.05$).

Rady ve ark., (2016) yaptıkları bir çalışmada buğday bitkisine (Triticum aestivum L., cv. Sakha 93) Pb uygulamasının bitkinin yaş ağırlığını önemli bir oranda azalttığını bildirmiştir. Araştırmamızda benzer şekilde Pb toksisitesi (Pb (0.1 mM)) altında buğday bitkisinin yeşil aksam yaş ağırlığı kontrole göre % 78.33 oranında azalmıştır.

Pb toksisitesi altında bulunan buğday bitkilerine 10 ve 20 mM dozlarında uygulanan asparaginin bitki yeşil aksam yaş ağırlığına etkisi önemsiz görülürken, 40

mM ASN uygulaması % 312.90 oranında önemli artış sağlamıştır. Bunun nedeni uygulanan ASN'nin yapraktaki klorofil miktarını ve fotosentezi pozitif yönde etkilemiş olması ve bu sayede yaprak alanı artması sonucu bitkide yaş ağırlıkta önemli artış görülmüştür. 40 mM uygulanan ASN buğday bitkilerinde iyileştirme gerçekleştirdiği görülmüştür. Muameleler arasında istatistiki olarak ($P \leq 0,05$) fark bulunmuştur.

Çizelge 4. 2. Farklı uygulamaların buğday bitkisinin yeşil aksam kuru ağırlığına etkisi

Uygulamalar	**Yeşil aksam kuru ağırlık(g/saksı)**
Kontrol	$2,1 \pm 0,187^{a}$
Pb (0.1 mM)	$0,7 \pm 0,029^{c}$
Pb (0.1 mM) + 10 mM ASN	$0,9 \pm 0,072^{bc}$
Pb (0.1 mM) + 20 mM ASN	$1,3 \pm 0,218^{ab}$
Pb (0.1 mM) + 40 mM ASN	$1,7 \pm 0,445^{a}$

Kontrol ve kurşun (Pb) stresi (0.1 mM $PbCI_2$) altında yetiştirilen buğday bitkisine yapraktan püskürtülerek farklı dozlarda asparagin (ASN 1: 10 mM, ASN 2: 20 mM, ASN 3: 40 mM) uygulamasının yeşil aksam kuru ağırlık değerlerine etkisi çizelgede verildi (ortalama ± standart hata). Duncan'ın çoklu aralık testine göre, aynı sütundaki farklı harfler önemli farklılıkları gösterir ($P \leq 0.05$).

Yapılan bir çalışmada ayçiceği bitkisine 0, 200, 400, 600 ve 800 µM dozlarında uygulanan Pb artan oranlara göre kök kuru ağırlığında düşüş gerçekleştiğini bildirmiştir (Azad ve ark., 2011). Araştırmamızda benzer şekilde Pb toksisitesi altında bulunan bitkilerin yeşil aksam kuru ağırlığını kontrolle kıyasladığımızda % 66.67 oranında bir azalma olduğu belirlenmiştir.

Pb toksisitesine maruz kalan buğday bitkilerine 10 ve 20 mM dozlarında uygulanan asparagin bitkilerin yeşil aksam kuru ağırlığında önemsiz görülürken uygulanan 40 mM asparagin % 142.85 oranında önemli bir artış sağlamıştır. Uygulanan 40 mM ASN yapraktaki klorofil miktarını, yaprak alanını, fotosentezi pozitif yönde etkilemiş ve Pb toksisitesi altında bulunan buğday bitkilerinde iyileşme

olduğunu göstermiştir. Muameleler arasında istatistiki olarak (P≤0,05) fark bulunmuştur.

4.2. Buğday Yaprak ve Köklerinde Pb Miktarı

Kurşun toksisitesine maruz kalan buğday bitkilerine farklı asparagin uygulamalarının bitkinin kurşun içeriğine olan etkisi Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

Çizelge 4. 3. Farklı uygulamaların buğday yaprak ve köklerinin kurşun içeriğine etkisi

Uygulamalar	Yaprak (mg/kg)	Kök (mg/kg)
Kontrol	0 ± 0^{d}	0 ± 0^{d}
Pb	$216,7 \pm 9,28^{a}$	$341,0 \pm 7,81^{a}$
Pb+ASN1	$192,3 \pm 3,71^{b}$	$311,7 \pm 4,41^{b}$
Pb+ASN2	$179,3 \pm 2,40^{b}$	$313,3 \pm 13,02^{b}$
Pb+ASN3	$136,7 \pm 6,01^{c}$	$250,0 \pm 11,55^{c}$

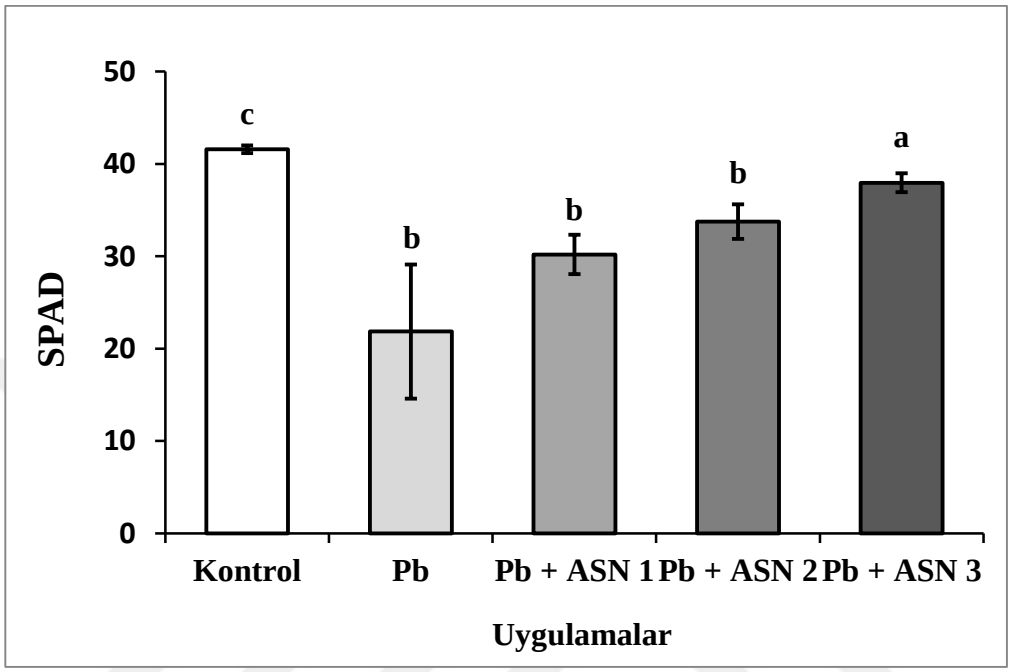
Kontrol ve kurşun (Pb) stresi (0.1 mM $PbCI_2$) altında yetiştirilen buğday bitkisine yapraktan püskürtülerek farklı dozlarda asparagin (ASN 1: 10 mM, ASN 2: 20 mM, ASN 3: 40 mM) uygulamasının bitkinin kurşun içeriği değerlerine etkisi çizelgede verildi (ortalama ± standart hata). Duncan'ın çoklu aralık testine göre, aynı sütundaki farklı harfler önemli farklılıkları gösterir (P ≤0.05).

Pb toksisitesine maruz kalan buğday bitkilerine uygulanan 10 ve 20 mM ASN bitki yaprak ve köklerdeki kurşunu azaltmıştır. Özellikle 40 mM uygulanan ASN yaprak ve köklerde Pb içeriğini azaltarak toleransı artırdığı görülmüştür. Muameleler arasındaki farklılık istatistiki açıdan (P≤0,05) önemli bulunmuştur.

4.3. Buğday Bitkisinin SPAD Değerleri

Sera koşullarında saksı denemesi olarak yürütülen bu çalışmada Pb toksisitesi etkisi altında bulunan buğday bitkilerine farklı dozlarda asparagin uygulamalarının

bitki klorofil miktarını belirlemek amacıyla SPAD 502 cihazıyla okumalar yapılmıştır. Farklı uygulamaların buğday bitkisinin SPAD değerlerine (klorofil içeriğine) etkisi Şekil 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4. 1. Farklı uygulamaların buğday bitkisinin SPAD değerlerine (klorofil içeriğine) etkisi

Kontrol ve kurşun (Pb) stresi (0.1 mM $PbCI_2$) altında yetiştirilen buğday bitkisine yapraktan püskürtülerek farklı dozlarda asparagin (ASN 1: 10 mM, ASN 2: 20 mM, ASN 3: 40 mM) uygulamasının SPAD değerlerine etkisi grafikte verildi (ortalama ± standart hata). Duncan'ın çoklu aralık testine göre, aynı sütundaki farklı harfler önemli farklılıkları gösterir ($P \leq 0.05$).

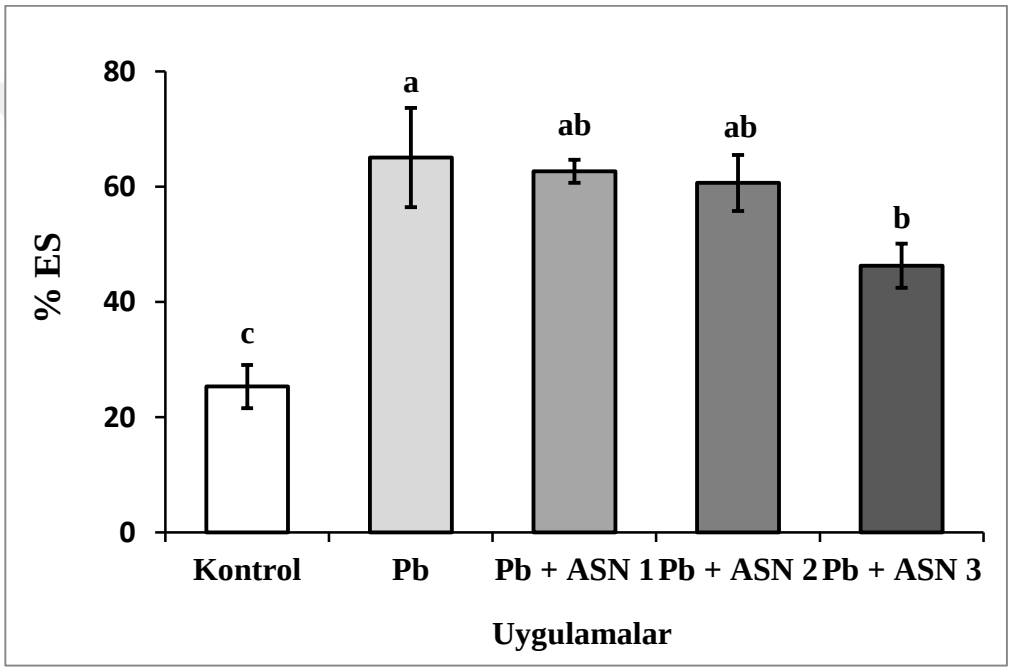
Pamuk bitkilerine uygulanan Pb (50, 100 µM) kontrole kıyasla her iki Pb dozunda SPAD değerlerinde önemli bir azalma olduğunu bildirmiştir (Bharwana ve ark., 2013). Benzer bir durum da yapılan başka bir çalışmada, buğday bitkilerine 0.5 ve 1.0 mM $Pb(NO_3)_2$ uygulanması bitkilerin klorofil içeriği Pb toksisitesinde azaldığı bildirilmiştir (Hasanuzzamana ve ark., 2018). Araştırmamızda benzer şekilde Pb uygulaması kontrol uygulamasına göre SPAD değerlerini önemli düzeyde düşürmüştür.

Pb toksisitesi altında bulunan bitkilere 10 ve 20 mM uygulanan ASN değerleri önemsiz görülmüştür. 40 mM uygulanan ASN gruplarında bulunan bitkilerin SPAD

değerlerinde önemli bir artış görülmüştür. Muameleler arasında istatistiki olarak (P≤0,05) fark bulunmuştur.

4.4. % ES (Elektrolit Sızıntısı)

Şekil 4.2.'de Pb toksisitesi altında bulunan buğday bitkisine farklı dozlarda uygulanan asparaginin hücre zarı geçirgenliğine % ES (elektrolit sızıntısı) olan etkisi ve toleransı verilmiştir.



Şekil 4. 2. Farklı uygulamaların buğday bitkisinde % ES (Elektrolit Sızıntı) üzerine etkisi

Kontrol ve kurşun (Pb) stresi (0.1 mM $PbCI_2$) altında yetiştirilen buğday bitkisine yapraktan püskürtülerek farklı dozlarda asparagin (ASN 1: 10 mM, ASN 2: 20 mM, ASN 3: 40 mM) uygulamasının elektrolit sızıntı (% ES) değerlerine etkisi grafikte verildi (ortalama ± standart hata). Duncan'ın çoklu aralık testine göre, aynı sütundaki farklı harfler önemli farklılıkları gösterir (P ≤0.05).

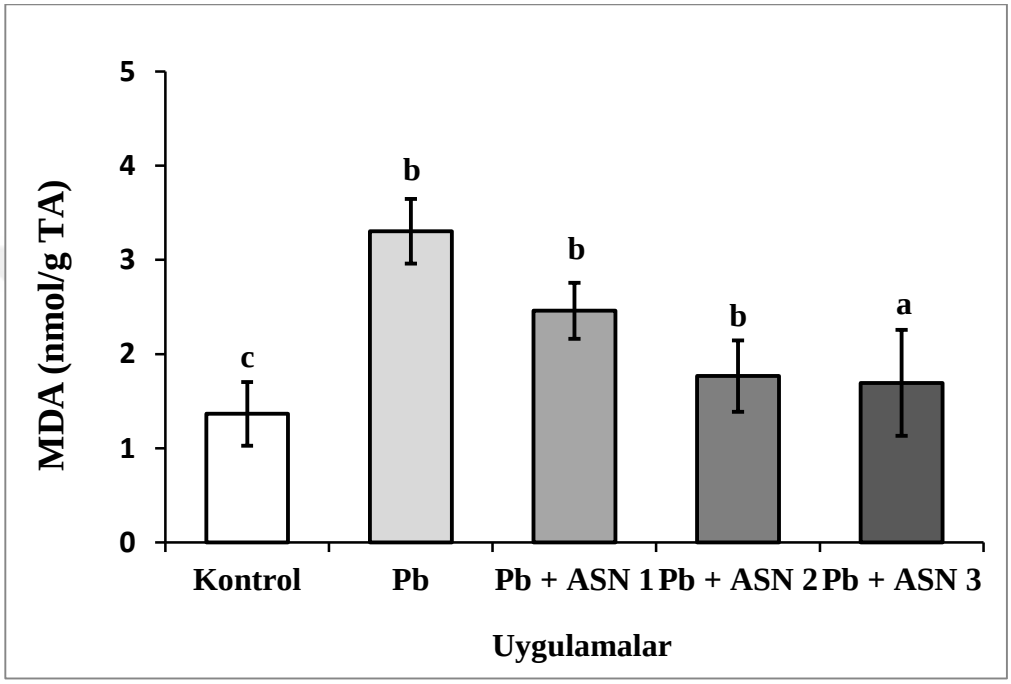
Pb toksisitesi altında bulunan pamuk bitkileri kontrole kıyasla artan Pb dozu (50, 100 μM) ile membran yaralanmalarına neden olduğuve elektrolit sızıntıyı önemli düzeyde arttırdığı bildirilmiştir (Bharwana ve ark., 2013). Pb stresi altındaki buğday bitkilerinin membran stabilitesinde meydana gelen yaralanma ve değişiklikler nedeniyle membran geçirgenliğinde artışa neden olduğu ve dolayısıyla elektrolit sızıntıda önemli düzeyde bir artış olduğu bildirilmiştir (Mostafa ve ark.,

2016). Araştırmamızda benzer şekilde Pb toksisitesi altında bulunan buğday bitkilerinin kontrol serisine göre elektrolit sızıntı oranında önemli bir artış olduğu görülmüştür.

Pb toksisitesi altında bulunan bitkilere, 20 ve 40 mM uygulanan ASN uygulamaları önemsiz görülmüştür. 40 mM ASN uygulaması ise ASN içinde bulunan aminoasitler sayesinde bitkideki yeşil aksam artışı, membran geçirgenliğinde azalışa neden olmuştur. Bu azalma elektrolit sızıntı miktarında önemli bir azalma gerçekleştiğini göstermiştir. Muameleler arasında istatistiki olarak ($P \leq 0,05$) fark bulunmuştur.

4.5. Asparaginin Kurşun Toksisitesinde Yetişen Buğday Bitkisinin Malondialdehid (MDA) içeriği Üzerine Etkisi

Şekil 4.3.'de kurşun toksisitesi ve toksisite altında bulunan buğday bitkilerine uygulanan asparaginin Malondialdehid (MDA) içeriği üzerine etkisi verilmiştir.



Şekil 4. 3. Buğday yapraklarında Malondialdehid (MDA) konsantrasyonu

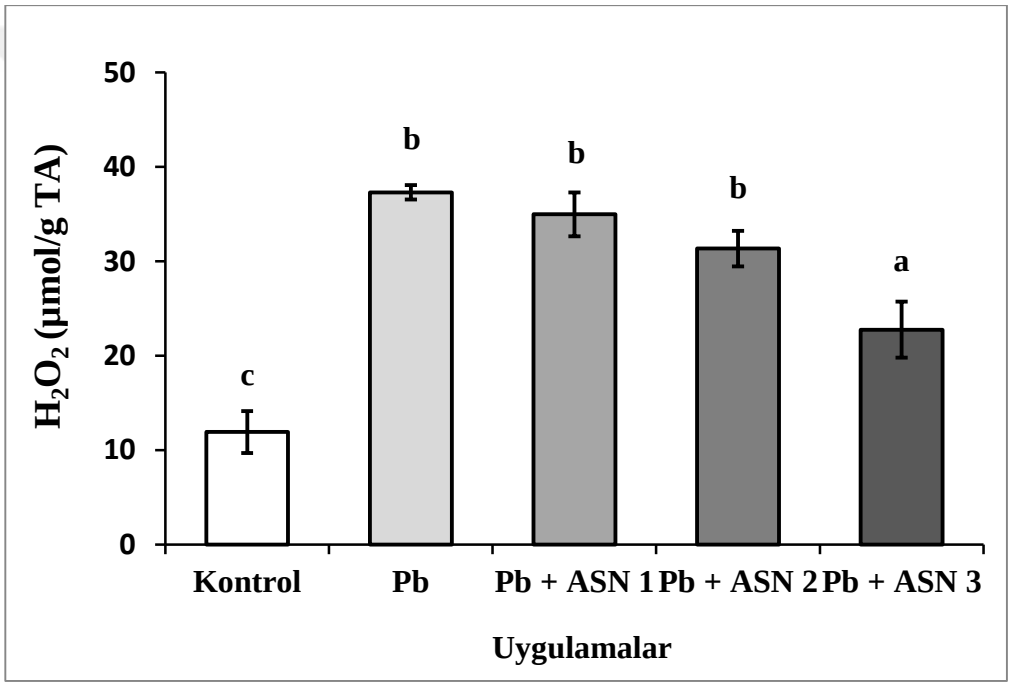
Kontrol ve kurşun (Pb) stresi (0.1 mM $PbCI_2$) altında yetiştirilen buğday bitkisine yapraktan püskürtülerek farklı dozlarda asparagin (ASN 1: 10 mM, ASN 2: 20 mM, ASN 3: 40 mM) uygulamasının malondialdehid (MDA) değerlerine etkisi grafikte verildi (ortalama ± standart hata). Duncan'ın çoklu aralık testine göre, aynı sütundaki farklı harfler önemli farklılıkları gösterir ($P \leq 0.05$).

Sorgum bitkisine uygulanan farklı Pb dozları (2, 4, 8, 16, 32 ve 64 ppm) hem yaprakta hemde kökte MDA içeriğini önemli ölçüde artırmıştır (Yılmaz, 2015). İki arpa genotipi olan Tarm-92 ve Tokak 157/37 da uygulanan Pb uygulamaları Tarm-92 de 10 ve 15 mM, Tokak 157/37 de ise yalnız 15 mM Pb uygulaması arpa yapraklarında MDA içeriğini kontrole kıyasla arttırdığını bildirmiştir (Gezer, 2011). Araştırmamızda benzer şekilde Pb toksisitesine maruz kalan buğday bitkileri ile kontrol serisi kıyaslandığında Pb toksisitesi altında bulunan seride hücre membranlarında tahribata yol açtığı için MDA oranının önemli derecede arttığı görülmüştür.

Pb toksitesi altında bulunan bitkilerine 20 ve 40 mM uygulanan ASN gruplarında ise hücre membran hasarında eşit oranda azalma görülmüştür. Muameleler arasında istatistiki olarak (P≤0,05) fark bulunmuştur.

4.6. Asparaginin Kurşun Toksisitesinde Yetişen Buğday Bitkisinin Hidrejen Peroksit (H_2O_2) içeriği Üzerine Etkisi

Şekil 4.4.'de kurşun toksisitesi ve asparagin uygulamasının H_2O_2 birikimi üzerine etkisi verilmiştir.



Şekil 4. 4. Buğday bitkisinde Hidrojen Peroksit (H_2O_2) konsantrasyonu

Kontrol ve kurşun (Pb) stresi (0.1 mM $PbCI_2$) altında yetiştirilen buğday bitkisine yapraktan püskürtülerek farklı dozlarda asparagin (ASN 1: 10 mM, ASN 2: 20 mM, ASN 3: 40 mM) uygulamasının hidrojen peroksit (H_2O_2) değerlerine etkisi grafikte verildi (ortalama ± standart hata). Duncan'ın çoklu aralık testine göre, aynı sütundaki farklı harfler önemli farklılıkları gösterir (P ≤0.05).

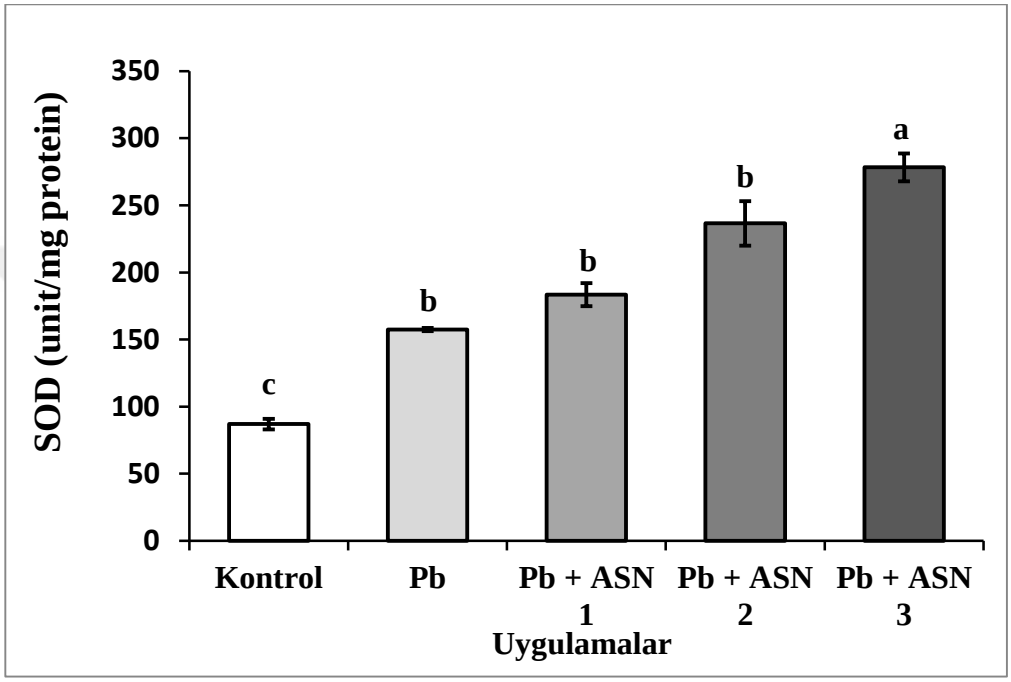
Buğday bitkisine (TriticumaestivumL. cv. Karahan99) uygulanan kadminyum (100 ve 200 µM) süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi artış göstermiş ve bu artış H_2O_2 miktarının arttığını bildirmiştir (Kabakçı, 2018). Arpa bitkisi (HordeumvulgareL.) Tokak-157/37 genotip cinsine uygulanan 15 mM Pb ağır metalinin yaprak dokularında hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarında önemli bir artışa

neden olduğu belirtilmiştir (Gezer, 2011). Araştırmamızda benzer şekilde Pb toksisitesi altında bulunan buğday bitkilerinin kontrol uygulaması bitkilerine göre H_2O_2 konsantrasyon oranında önemli bir artış olduğu görülmüştür.

Pb toksisitesi altında bulunan bitkilere uygulanan ASN uygulamaları arasında yapılan kıyaslamada 10 ve 20 mM ASN uygulamaları önemsiz görülmüştür. 40 mM ASN uygulamasında ise hücrelerde birikimi ve konsantrasyon artışı mutasyona ve ileri seviyelerde hücre ölümlerine neden olan H_2O_2 konsantrasyonunda önemli ölçüde azalma meydana getirmiştir. Muameleler arasında istatistiki olarak ($P \leq 0,05$) fark bulunmuştur.

4.7. Asparaginin Kurşun Toksisitesinde Yetişen Buğday Bitkisinin Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.5.'de kurşun toksisitesi ve ASN uygulamalarının buğday bitkisinde süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi üzerine olan etkileri verilmiştir.



Şekil 4. 5. Buğday bitkisinde farklı uygulamaların süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi üzerine etkisi

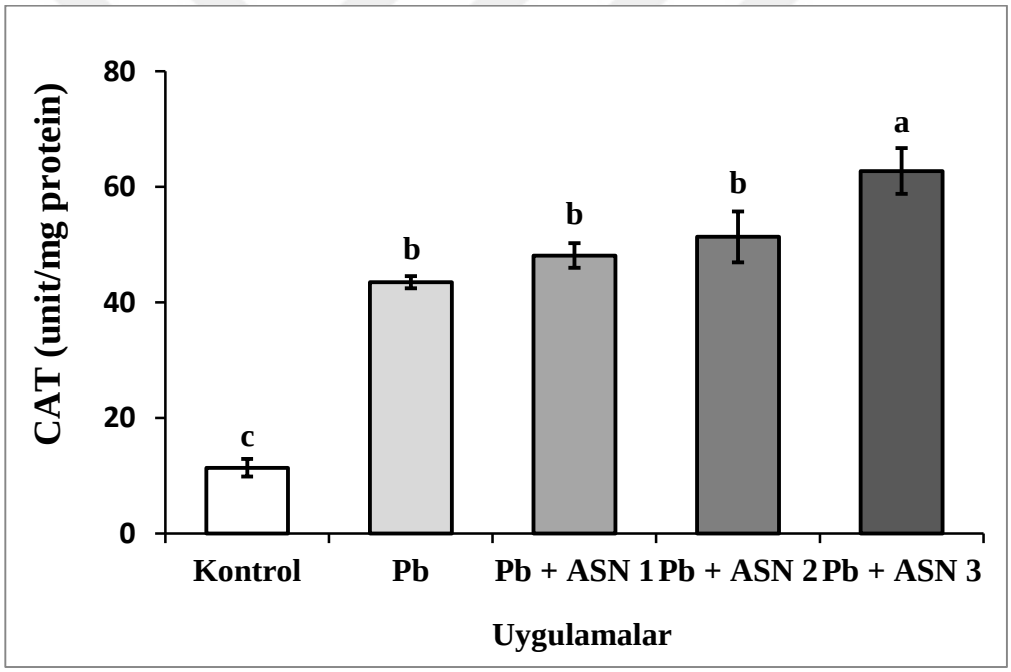
Kontrol ve kurşun (Pb) stresi (0.1 mM $PbCI_2$) altında yetiştirilen buğday bitkisine yapraktan püskürtülerek farklı dozlarda asparagin (ASN 1: 10 mM, ASN 2: 20 mM, ASN 3: 40 mM) uygulamasının süperoksit dismutaz (SOD) değerlerine etkisi grafikte verildi (ortalama ± standart hata). Duncan'ın çoklu aralık testine göre, aynı sütundaki farklı harfler önemli farklılıkları gösterir ($P \leq 0.05$).

SOD enzim aktivetesi, Pb ile kirlenmiş toprakta yetiştirilen çeltik bitkisinde önemli düzeyde artış gerçekleştiğini bildirilmiştir (Rao ve ark., 2018). Yapılan bir başka çalışmada buğday bitkisine uygulanan kadminyum (Cd) ağır metali stres sürecince, süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini artırdığı belirtilmiştir (Kabakçı, 2018). Araştırmamızda benzer şekilde Pb toksisitesi altında bulunan buğday bitkilerinde kontrol serisine göre SOD aktivitesinde önemli oranda bir artış göstermiştir.

Pb toksisitesi altında bulunan bitkilere 10 ve 20 mM uygulanan ASN eşit miktarda artış sağlamış ama bu artış önemsiz görülmüştür. 40 mM ASN uygulamasında, süperoksit (O_2^-) radikalini uzaklaştıran SOD enzim aktivitesininen belirgin farkı ve en önemli artışı görülmüştür. Muameleler arasında istatistiki olarak ($P \leq 0,05$) fark bulunmuştur.

4.8. Asparaginin Kurşun Toksisitesinde Yetişen Buğday Bitkisinin Katalaz (CAT) Enzimi Üzerine Etkisi

Şekil 4.6.'da kurşun toksisitesi ve ASN uygulamalarının perlit ortamında katalaz (CAT) enzimi üzerine olan etkisi verilmiştir.



Şekil 4. 6. Kurşun ve ASN uygulamalarının katalaz (CAT) enzimi aktivitesine etkisi

Kontrol ve kurşun (Pb) stresi (0.1 mM $PbCI_2$) altında yetiştirilen buğday bitkisine yapraktan püskürtülerek farklı dozlarda asparagin (ASN 1: 10 mM, ASN 2: 20 mM, ASN 3: 40 mM) uygulamasının katalaz (CAT) değerlerine etkisi grafikte verildi (ortalama ± standart hata). Duncan'ın çoklu aralık testine göre, aynı sütundaki farklı harfler önemli farklılıkları gösterir ($P \leq 0.05$).

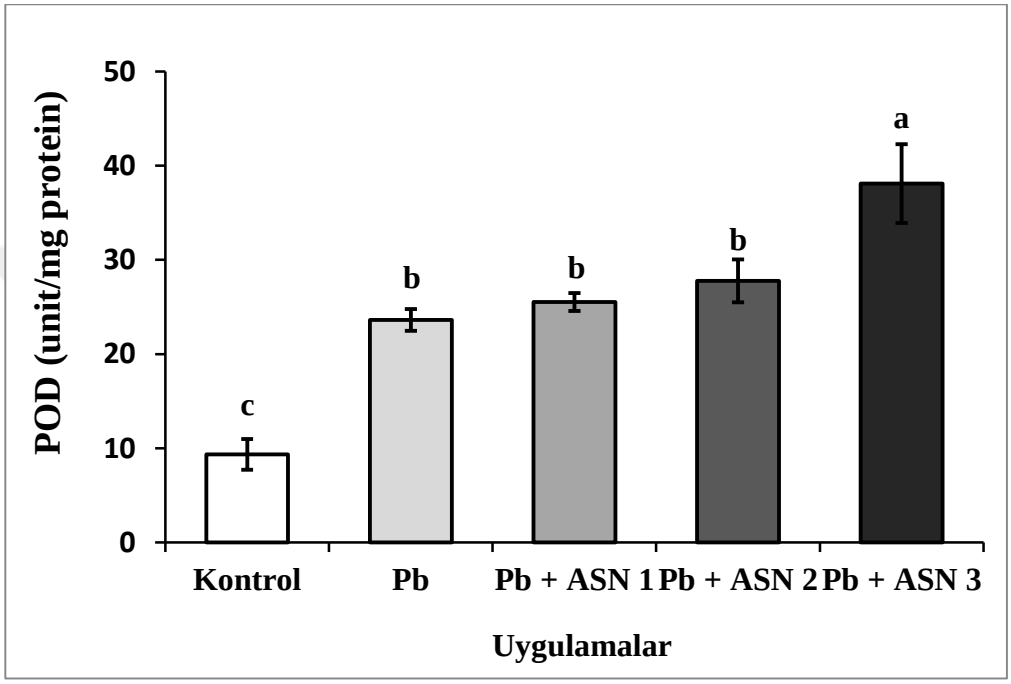
Farklı Pb derişimlerinde (0, 25, 50, 100, 200, 250, 500 ppm) 14 gün boyunca bırakılan Nasturtium officinale bitkisinin gövdesinde CAT aktivitesi artan Pb derişimine göre arttığı ve en önemli artışın 250 ve 500 ppm'de görüldüğü

bildirilmiştir (Keser, 2005). Yapılan bir çalışmada buğday bitkisine (TriticumaestivumL.) uygulanan kadminyum (100, 200 ve 300 μM) kontrole göre uygulanan düşük konsantrasyonlardaki Pb, düşük katalaz (CAT) aktivitesi, yüksek konsantrasyonlarda uygulanan Pb ise yüksek katalaz (CAT) aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir (Ak ve ark, 2011). Araştırmamızda benzer şekilde Pb toksisitesine maruz kalan seri kontrol serisine göre CAT enzim aktivitesinde önemli oranda bir artış göstermiştir.

Pb toksisitesi altında bulunan bitkilere uygulanan farklı dozlarda ASN uygulamaları kıyaslandığında, 10 ve 20 mM ASN uygulamaları önemsiz görülmüştür. 40 mM ASN uygulamasında ise oksidatif stres sonucu oluşan hidrojen peroksidi (H_2O_2) suya (H_2O) ve oksijene (O_2) parçalanmasını (detoksifikasyonu) sağlayan özel bir protein olan katalaz (CAT) enzim aktivitesini önemli derecede arttırmıştır. Muameleler arasında istatistiki olarak ($P \leq 0,05$) fark bulunmuştur.

4.9. Asparaginin Kurşun Toksisitesinde Yetişen Buğday Bitkisinin Peroksidaz (POD) içeriği Üzerine Etkisi

Şekil 4.7.'de Pb toksisitesi ve ASN uygulamalarının cam serada plastik saksılarda yetişen buğday bitkilerinin POD içeriğine olan etkisi verilmiştir.



Şekil 4. 7. Farklı uygulamalar sonrası buğday bitkisinde Peroksidaz (POD) ölçümü sonuçları

Kontrol ve kurşun (Pb) stresi (0.1 mM $PbCI_2$) altında yetiştirilen buğday bitkisine yapraktan püskürtülerek farklı dozlarda asparagin (ASN 1: 10 mM, ASN 2: 20 mM, ASN 3: 40 mM) uygulamasının peroksidaz (POD) değerlerine etkisi grafikte verildi (ortalama ± standart hata). Duncan'ın çoklu aralık testine göre, aynı sütundaki farklı harfler önemli farklılıkları gösterir ($P \leq 0.05$).

Farklı düzeyde Pb içeren su ile sulanan kıvırcık salata (Lactucasativavar. crispa) bitkisinin POD enzim aktivetesinin suyun artan Pb düzeyine göre arttığı bildirilmiştir (Kıran ve ark, 2014). Araştırmamızda benzer şekilde, hidrojen peroksidin (H_2O_2) detoksifikasyonunu gerçekleştiren POD enzim aktivitesi açısından değerlendirildiğinde, Pb toksisitesi serisi kontrol serisine göre POD değerlerinde önemli bir artış göstermektedir.

Pb toksisitesi altında bulunan bitkilere 10 ve 20 mM uygulanan ASN önemli görülmemiştir. 40 mM uygulanan ASN ise önemli miktarda POD enzim aktivitesini

artırması sonucu H_2O_2 konsantrasyonunu önemli derecede azalttığı görülmüştür. Muameleler arasında istatistiki olarak ($P \leq 0,05$) fark bulunmuştur.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Sanayi devrimi ile ağır metallerin havaya, suya ve toprağa karışmasıyla gün geçtikçe tarım alanları ve tarım alanlarından yararlanma oranları azalmaktadır. Ağır metallerin yarattığı toksik etkisi sonucu oluşan abiyotik stres, bitkisel üretimi özellikle sanayi bölgelerine yakın yerlerde ve otoyol kenarlarında daha çok etkilemektedir. Yapılan bu çalışma, bitkide işlevi bakımından sinyal molekülü olarak görev alan asparaginin, kurşun (Pb) toksisitesi altında bulunan bitkilerinin fizyolojik gelişimi, oksitatif stresi ve antioksidan savunma sistemleri incelenmiştir.

Tez çalışmasında Pb toksisitesi altında bulunan buğday bitkilerinin yaş ve kuru ağırlıkları düşmüştür. Pb toksisitesi altında bulunan bitkilere uygulanan 40 mM ASN buğday bitkilerinin yaş ve kuru ağırlık oranını önemli derecede artırdığını göstermiştir. Artan ASN dozuna paralel olarak yaprak ve kök Pb miktarı azalmıştır. Pb toksisitesi altında bulunan bitkilerin SPAD değerlerinde belirgin bir azalma görülürken 40 mM ASN uygulanan bitkilerin SPAD değerlerinde belirgin bir artış gerçekleşmiştir. Pb toksisitesi altında bulunan buğday bitkilerinde % ES değerinde önemli oranda artış görülmüştür. Pb toksisitesi altında bulunan buğday bitkilerine uygulanan 40 mM asparagin % ES değerlerinde önemli bir azalma sağlamıştır.

Pb toksisitesi altında bulunan buğday bitkilerinin Malondialdehit (MDA) değerlerinde önemli artış görülürken uygulanan 20 ve 40 mM ASN uygulamalarının MDA değerlerinde azalma görülmesine rağmen aralarında fark bulunmamıştır. Pb toksisitesine maruz kalan buğday bitkilerinde hidrojen peroksit (H_2O_2) değerlerinde önemli bir artış gerçekleşmiştir. Pb toksisitesi koşullarında uygulanan 40 mM ASN hidrojen peroksit değerlerinde önemli bir azalma sağlamıştır.

Pb toksisitesi altında bulunan buğday bitkilerinde antioksidan savunma sistemleri: katalaz enzimi (CAT), süperoksit dismütaz (SOD) ve peroksidaz (POD)

değerlerinde artış görülmüştür. Mevcut toksit koşullarında uygulanan 40 mM ASN ise antioksidan değerlerinde önemli derecede artış gerçekleştirmiştir. Bu da asparaginin antioksidan savunma sistemini uyararak buğday bitkisinin kendisini korumaya teşvik ettiğini göstermektedir.

5.2. Öneriler

Pb toksisitesine maruz kalan buğday bitkisine farklı dozlarda dışsal ASN uygulamasının antioksidan aktivite ve bitki fizyolojik gelişimine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan bu araşırmada 40 mM ASN uygulamasının stres altındaki bitkilerin toleransını önemli düzeyde arttırdığı tespit edilmiştir.

ASN uygulamalarının Pb stresi altındaki farklı buğday çeşitleri etkinliğinin test edilerek bitki gelişimi incelenmelidir. Farklı genotipler üzerinde yapılacak araştırmada en uygun dozlar tespit edilerek çiftçi koşullarında etkinliği incelenebilir. Stresin etkilerini hafifletmede etkin rol oynamasına karşın ASN uygulamalarında ekonomik analiz yapılarak uygulama maliyeti ve alınacak verim karşılaştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

AK, A. and E. Y., 2011. Ecotoxicological effects of heavy metal stress on antioxidant enzyme levels of Triticum aestivum cv. Alpu. Biological Diversity and Conservation, 1-22.

AN, Y.-J., 2006. Assessment of comparative of lead and copper using plant assay. Chemosphere, 1359-1365.

AZAD HN, and S. H., 2011. Toxic effects of lead on growth and some biochemical and ionic parameters of sunflower (Helianthus annuus L.) seedlings. J. Biol. Sci., 3(4): 398-403.

BEAUCHAMP, C. and IRWIN FRIDOVICH, 1971. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. Analytıcal Bıochemıstry, 44: 276-287.

BHARWANA SA, and A. S., 2013. Alleviation of Lead Toxicity by Silicon is Related to Elevated Photosynthesis, Antioxidant Enzymes Suppressed Lead Uptake and Oxidative Stress in Cotton. Bioremediation & Biodegradation, 1-9.

BHATTİ, K. H., and S. A., 2013. Effect of Heavy Metal Lead (Pb) Stress of Different Concentration on Wheat (Triticum aestivum L.). Middle-East Journal of Scientific Research, 14 (2): 148-154.

BİOTURCA TOHUM., 2021. Bioturca Tohum Web Sitesi: https://bioturca.com.tr/urun/edessa-makarnalik-bugday/ adresinden alınmıştır.

CHAFFEİ C., P. K. and D., 2004. Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in Lycopersicon esculentum leading to a metabolic safeguard through an amino acid storage strategy. Plant Cell Physiology, 1681–1693.

CHAPMAN HD, and P. P., 1982. Methods of Plant Analysis IMethods of Analysis for Soils, Plants and Water. ChapmanPublishers, Riverside, CA. 169-170

CORPAS, D. and K., 2013. Lead tolerance in plants: strategies for phytoremediation. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2158

ÇOLAK, N., 2017. Buğday Bitkisinde (Triticum Aestivum L.) N-Asetilsistein'in Ağır Metal Toksisitesine Karşı İyileştirici Etkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tez Çalışması, 1-21.

ÇOLAK, U., 2009. Gaziantep ilinde ekimi yapılan ekmeklik buğday çeşitlerinde (tosunbey, ceyhan 99) kurşun stresinin fizyolojik ve morfolojik etkileri ile kurşuna tolerans düzeyleriŋi belirlenmesi. Gaziantep Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep, 1-47.

CVİKROVA, M. and H., 1994. Phenolic acids and peroxidase activity in alfalfa (Medicago sativa) embryogenic cultures after ethephon treatment. Physiol. plant, 9: 226-233.

DELİA I. COROL, and C. R., 2016. 1H-NMR screening for the high-throughput determination of genotype and environmental effects on the content of asparagine in wheat grain. Plant Biotechnology Journal, 128-139.

DENLİ, Z., ve G. A., 2014. Kiwano (cucumis metuliferus) bitkisindeki peroksidaz enzimleri üzerine amino asit etkisinin incelenmesi. SAÜ. Fen Bil. Der., 18(2): 105-109.

DİONİSİO-SESE, M.L. and TOBİTA, S., 1998. Antioxidant responses of riceseedlings to salinity stress. Plant Sci, 135: 1–9.

ESİM, N., Ö. ve A., 2014. Nitrik Oksit'in Mısır (Zea mays L) Bitkisinde Oksidatif Stres ve Antioksidan Enzimler Üzerine Etkisi. Tr. J. Nature Sci., 1-33.

GEZER, E., 2011. Arpa (hordeum vulgare l.) Bitkisinin bazı çeşitlerinde ağır metal stresi etkilerinin fizyolojik olarak araştırılması.Yüksek Lisans Tez Çalışması, 1-43

GÖKALP, Ö., 2015. Mardin'de buğday ekim alanlarında sorun olan yabancı otlar ve buğday ürününe karışan yabancı ot tohumlarının belirlenmesi. Yüksek Lisans Tez Çalışması, 1-35.

HASANUZZAMANA, M. and K. N., 2018. Exogenous glutathione attenuates lead-induced oxidative stress in wheat by improving antioxidant defense and physiological mechanisms. Journal of Plant Interaction, 203-212.

JEBARA, S. and J., 2005. Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (Phaseolus vulgaris) nodules under salt stress. Journal of Plant Physiology, 162(8); 929-936.

KABAKÇI, M., 2018. Kadmiyum stresine maruz bırakılan buğday (triticum aestivum) fidelerinde antioksidan enzim aktiviteleri üzerine dışarıdan uygulanan gallik asitin etkileri. Yüksek Lisans Tez Çalışması, 1-55.

KAYA, C., and N. A., 2019. Alleviating effect of nitric oxide on oxidative stress and antioxidant defence system in pepper (Capsicum annuum L.) plants exposed to cadmium and lead toxicity applied separately or in combination. Scientia Horticulturae, Elsevıer, 52-60.

KESER, G., 2005. Nasturtium officinale R. Br.'de kurşunun strese bağlı enzimlerin aktivitelerine, gelişmeye, mineral ve klorofil içeriğine etkileri. Çukurova Üniversitesi, Fen bilimleri enstitüsü, Doktora Tez Çalışması, 1-57.

KIRAN, S. ve K., 2014. Kurşun İçeriği Yüksek Su İle Sulanan Kıvırcık Salata (Lactuca sativa var. crispa) Bitkilerinin Bazı Özellikleri Üzerine Hümik Asit Uygulamalarının Etkisi. Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi, 7(1): 14-19

KIRAN, S. ve S., 2015. Kurşunun Kıvırcık Salata (Lactuca sativa var. crispa) Bitkisinin Bazı Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerine Etkisi. Iğdır Univ. J. Inst. Sci. & Tech., 5(1): 83-88.

KİREÇCİ, O. ve A., 2018. Bitkilerde Enzimatik ve Enzimatik Olmayan Antioksidanlar. BEU Journal of Science, 7 (2): 473-483.

LANDIS, W. and A., 2004. Environmental Toxicology. CRC Pres. LLC, Boca Raton, FL., 483.

LAMHAMDİ, M., O. E.-M. and E., 2013. Effect of lead stress on mineral content and growth of wheat (Triticum aestivum) and spinach (Spinacia oleracea) Seedlings. Saudi Journal of Biological Sciences, 29-36.

LEA, P. and S., 2007. Asparagine in plants. Ann. Appl. Biol., 50: 1-26.

LORETO, F. and VELİKOVA, V., 2000. Isoprene produced by leaves protects thephotosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products,and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. Plant Physiol, 27:1781-1787.

MALECKA, A., and W. J., 2001. Antioxidative defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells. Acta Biochim, 48: 687-698.

MALAGUTİ, D., M. and P., 2001. Translocation of amino acids in the xylem of apple trees in spring as a consequence of both N remobilization and root uptake. Journal of Experimental Botany, 52: 1665–1671.

MALUNGA, L.K., and N. A., 2020. Association of asparagine concentration in wheat with cultivar, location, fertilizer and their interaction. Elsevıer, 1-6.
MANSFİELD J., G. S. and H., 2006. Secretory phospholipase A2 from Arabidopsis thaliana: insights into the three-dimensional structure and the amino acids involved in catalysis. Biochemistry, 45: 5687-5694.
NAVROTSKYİ, S. and B., 2018. Variation in asparagine concentration in Nebraska wheat. Cereal Chem., 95: 264–273.
NAGAJYOTİ, P. C., and K. D., 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. Environ Chem Lett, 199–216.
ÖZAY, C., 2008. Kurşun zehirliliğinin brassica rapa l.var.rapa'da bazı fizyolojik, biyokimyasal ve genotoksik etkileri. Tez Çalışması, 1-46.
RADY, M. M., A. and -Y., 2016. Response of Wheat Growth and Productivity to Exogenous Polyamines under Lead Stress. J. Crop Sci. Biotech., 363-371.
RAO, G. and U., 2018. Ultrasonic seed treatment improved physiological and yield traits of rice under lead toxicity. Environmental Science and Pollution Research, 33637-33644.
ROZAN P., K. and Y., 2001. Amino acids in seeds and seedlings of the genus Lens. Phytochemistry, 58: 281–289.
SAIRAM, R. K. and SEXENA, D., 2000. Oxidative Stress and Antioxidants in Wheat Genotypes: Possible Mechanism of Water Stress Tolerance. Journal of Agronomy and Crop Science 184: 55-61.
SEREGİN, I.V., and A. K., 2008. Roles of root and shoot tissues in transport and accumulation of cadmium, lead, nickel, and strontium. Rus. J. Plant Physiol., 55: 1–22.
SHARMA, P. and A. 2005. Lead toxicity in plants. Braz. J. Plant Physiol., 17(1): 35-52.
SREEKANTH, P. and C., 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review., 199–216.
TUNA, A. L., M. and Y., 2015. Maıze (zea mays l.) Plant responses to excess copper, cadmıum, cobalt, lead and chromıum. Fresenius Environmental Bulletin, 3996-4006.
VERMA, S. and V., 2003. Lead toxcitiy induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. Plant Sci., 164: 645-655.
YILMAZ, E., ve A. L., 2011. Bitkilerin Tuz Stresi Etkilerine Karsı Gelistirdikleri Tolerans Stratejileri. C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi, 47-66.
YILMAZ, H. Ş., 2015. Bazı ağır metal uygulamalarının sorgum (sorghum bicolor L.) Bitkisinin enzim aktivitesi üzerine etkisi. Tez Çalışması, 1-74.
WİERZBİCKA, M., P. and P., 2007. Comparison of the toxicity and distribution of cadmium and lead in plant cells. Protoplasma, 231: 99–111.