



BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ SONUÇ RAPORU

Farklı süre ve konsantrasyonlarda kadmiyum ağır metale maruz bırakılmış kabak (*Cucurbita pepo*) bitkisinde antioksidan stres enzimi genlerinin mRNA ifade seviyelerinin incelenmesi

Investigation of mRNA expression levels of antioxidative stress enzyme genes in pumpkin (*Cucurbita pepo*) exposed to cadmium heavy metal at different time and concentrations.

Proje No:

Neübap YLTPF24

Proje Yürütücüsü:

Musa KAR

Fen Edebiyat Fakültesi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Araştırmacılar:

Semih ALAN

NEÜ BAP
Nevşehir, 2019

ÖZET

Farklı süre ve konsantrasyonlarda kadmiyum ağır metale maruz bırakılmış kabak (*Cucurbita pepo*) bitkisinde antioksidan stres enzimi genlerinin mRNA ifade seviyelerinin incelenmesi

Biyotik ve abiyotik stres faktörleri sonucu meydana gelen oksidatif stres, hücresel hasarın en önemli sebeplerinin başında gelmektedir. Sessil yapıları nedeni ile bitkiler çeşitli çevresel streslere uyum sağlamak için düzenleyici mekanizmalar geliştirmiştir. Oksidatif stresin başlıca sonuçlarından biri H_2O_2 üretimi de dâhil olmak üzere reaktif oksijen türlerinin hücresel konsantrasyonundaki artıştır. Ayrıca H_2O_2 , bitkilerde solunum ve fotosentez metabolizmalarının yan ürünü olarak üretilir. H_2O_2 , hücrelerdeki ikili rolü nedeniyle çok yönlü bir molekül görevi görür. Sinyal iletim ağlarında ikincil bir haberci olarak hareket ettiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada farklı süre ve konsantrasyonlarda Cd ağır metale maruz bırakılan kabak (*Cucurbita pepo*) bitkisinde stres alakalı genlerde meydana gelen ekspresyon seviyelerindeki değişim ve H_2O_2 ile ilişkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda H_2O_2 'nin kabak bitkisi kökündeki hücrelerde belli bir konsantrasyona kadar ekspresyonları yukarı yönlü düzenler iken belli konsantrasyondan sonra aşağı yönlü düzenlediği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Oksidatif sinyalizasyon, Reaktif oksijen türleri, Gen ekspresyonu

ABSTRACT

Investigation of mRNA expression levels of antioxidative stress enzyme genes in pumpkin (*Cucurbita pepo*) exposed to cadmium heavy metal at different time and concentrations

Oxidative stress caused by biotic and abiotic stress factors is the most important cause of cellular damage. Due to their sessile structures, plants have developed regulatory mechanisms to adapt to various environmental stresses. One of the major consequences of oxidative stress is the increase in the cellular concentration of reactive oxygen species, including H_2O_2 production. In addition, H_2O_2 is produced as a by-product of respiratory and photosynthetic metabolisms in plants. H_2O_2 acts as a multifaceted molecule because of its dual role in cells. It has been found to act as a secondary messenger in signal transmission networks. In this study, the changes in expression levels of stress-related genes and their relationship with H_2O_2 in pumpkin (*Cucurbita pepo*) plant exposed to Cd heavy metal at different durations and

concentrations were investigated. As a result of this study, while the cells in the roots of H_2O_2 's pumpkin regulate expressions upwards up to a certain concentration, they regulate it downwards after a certain concentration.

Keywords: Oxidative signaling, Reactive oxygen species, Gene expression

1. Giriş

Reaktif oksijen türleri (ROT) solunum ve fotosentez gibi çeşitli metabolik yolların yan ürünleri olarak üretilmektedir. Bütün aerobik organizmalar solunum sırasında son elektron alıcısı olarak oksijen molekülünü kullandıkları için bazı durumlarda elektron alış verişinde düzensizlikler meydana gelir ve durum bu da singlet oksijen (1O_2), süperoksit radikal (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi çok reaktif ve bu nedenle toksik ara maddelerin oluşumuna neden olur. Yüksek reaktif özellikte olan ROT çeşitleri, buldukları ortamda hücre membranlarına ve hücresel bileşenlere ciddi zararlar verebilmektedir. Bunun yanı sıra ROT, DNA, karbonhidratlar, proteinler ve lipitlere karşı yüksek ilgi ile bağlanabilme ve oldukça yıkıcı sonuçlara sebep olabilmektedir (Zimmermann et al. 2006). Bu özelliklerinde dolayı hücresel ROT konsantrasyonu enzimatik ve enzimatik olmayan detoksifikasyon mekanizmaları ile kararlı bir dengede tutulmaya çalışılmaktadır (Ahmad 2014). Olumsuz çevre faktörlerine bağlı olarak bu dengenin bozulması “oksidatif patlama” adı verilen hücre içi ROT seviyelerinin hızlı artışı olarak tanımlanan fenomene neden olur. Bu stresin olası etkilerini azaltmak için ROT’un bitki sisteminde uzaklaştırılması hayati önem kazanmaktadır (Azarabadi et al. 2017).

Bununla birlikte bitkideki söz konusu oksidatif denge; sıcaklık, ağır metal iyonları, soğuk, tuzluluk, kuraklık, ışık gibi birçok farklı abiyotik çevresel faktör tarafından bozulabilir (Boyer 1982).

Bununla birlikte, bitkilerdeki ROT konsantrasyonunun dengelenmesi, Superoxide dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPX), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon S-transferazlar (GST'ler), glutatyon redüktaz gibi enzimler ve askorbat, glutatyon (GSH), a-tokoferol ve flavonoidler gibi enzimatik olmayan bileşikler tarafından kontrol edilir (Khan et al. 2017).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, farklı stres koşullarında, bitkilerin çeşitli fizyolojik ve hücresel değişiklikleri içeren çok karmaşık bir şekilde tepki verdiğini ortaya koymaktadır. Stres tepkisi ile mücadele etmek için, bitkiler hormonal düzenlemelerden türetilmiş çeşitli sinyal mekanizmalarını kullanırlar. Bununla birlikte, çeşitli araştırmalar bitkilerin gelişmeyi ve çeşitli fizyolojik tepkileri düzenlemek için ROT'u sinyal molekülleri olarak kullandığını göstermektedir. Bilim adamları, ROT üretimine ve bitki büyümesinin ve stres toleransının düzenlenmesinde çeşitli hormonal sinyal yolu ile entegrasyonuna odaklanmışlardır (Vanderauwera et al. 2009).

H_2O_2 ve sinyalizasyon rolü arasındaki bağlantıyı araştıran öncül çalışmalar, H_2O_2 'nin oksidatif metabolizmanın önemli bir parçası olduğu, bitki hücre duvarının güçlenmesi, xylem

farklılaşması ve stoma kontrolünde hücre duvarının gevşemesi gibi bitki gelişmesi büyümesi için esansiyel olan olaylarda sinyal yollarında görev aldıklarını bildirmişlerdir (Dempsey and Klessig 1994)

Çok yönlü bir molekül olan H_2O_2 , normal seviyelerde önemli bir sinyal görevi görür, oysa abiyotik veya biyotik stres koşullarında konsantrasyonunun artması oksidatif strese neden olmaktadır. Moleküler yapısının küçük olması ve membranlar arasında kolaylıkla diffüze olabilmesi, diğer ROT'lara nispeten daha uzun yarılanma ömrüne sahip olması, eşsiz bir stabiliteye sahip olması, daha az reaktiviteye sahip olması ve sinyal iletim yollarında merkezi bir oyuncu gibi davranması H_2O_2 yi diğer ROT molekülleri arasında bir adım öne çıkarmıştır (Cuypers et al. 2016).

Bitkilerde, H_2O_2 toksik olmayan seviyedeki konsantrasyonlarda anahtar bir faktör olarak çalışır. Bir sinyal molekülü olarak, çeşitli yollara karışarak biyotik ve abiyotik strese tolerans gösterir (Baxter et al. 2014; Kar 2018). H_2O_2 , bir abiyotik stresörün lokal etkisini sistemik dokulara ileterek bitkilerde genel bir hazırlama sinyali olarak işlev görmektedir (Karpinski et al. 1999). Abiyotik strese cevap olarak H_2O_2 tarafından tetiklenmiş olan sinyaller ile aktive edilen cevapların mekanizması, sistemik kazanılmış adaptasyon (SAA) olarak ifade edilir ve bu adaptasyon H_2O_2 molekülü sayesinde gerçekleştirilir (Suzuki et al. 2013).

Son yıllarda yapılan bir çalışmada ağır metal stresine maruz bırakılmış nohut bitkisindeki stresten sorumlu genler ile H_2O_2 arasında bir ilişki olduğunu ortaya konulmuş ve H_2O_2 'nin belli bir süre ve konsantrasyona kadar stres sorumlu genlerin ekspresyonunu arttırdığı, ancak belli bir konsantrasyondan sonra azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir (Kar 2018). Yine benzer şekilde Tombuloğlu ve ark (2012); Boron stresine maruz bıraktığı domates bitkisinde, maruziyetin uzamasına bağlı olarak gen ekspresyonlarında azalma olduğunu bildirmişlerdir (Tombuloglu et al. 2012).

Bitkilerin hücresel H_2O_2 miktarını ayarlamak için kullandıkları ince ve hassas mekanizmaların anlaşılması ve ilişkili sinyal yolları gelecekte tarımı iyileştirmenin anahtarı olabilir. Bitki hücrelerine potansiyel olarak zarar vermesine rağmen, ROT oksidatif sinyalizasyon, sistemik kazanılmış aklimasyon ve hormonlarla işbirliği içinde sistemik kazanılmış direnç sağlayan yararlı haberciler olarak düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan bilimsel araştırmalara rağmen, ROT'ların hücresel mekanizmaları tam olarak açıklanamamıştır (Hossain et al. 2015).

Bu çalışmanın amacı temel olarak hücresel H_2O_2 nin stresden sorumlu genlerin ekspresyon düzeylerine olan etkisini ortaya koymaktır. Bu bağlamda kabak bitkisi köklerinde farklı süre ve konsantrasyonlarda oldukça toksik olan ve bitkilerde geri dönüşümsüz hasarlara yol açan kadmiyum (Cd) ağır metaline maruz bırakılmıştır. MDA akümüasyonu ve hücresel H_2O_2

içeriği hesaplanmıştır. Ayrıca stres alakalı genlerin ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişim hesaplanmış ve hücrel H₂O₂ ile ilişkisi açıklanmaya çalışılmıştır.

2. Materyal-Metod

2.1. Bitki materyali ve yetiştirme koşulları

Cucurbita pepo tohumları 25 derece nemli perlit içinde kökleri ve ilk yaprakları çıkana kadar çimlendirme işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra içerisinde 40 ml Sigma Hoagland's No. 2 Basal Salt Mixture çözeltisi bulunan 400 ml beherler içinde hidroponik ortamda köklerin uzaması sağlanmıştır. Kök uzunlukları 10-15 cm (14 gün) olduktan sonra beherlere konsantrasyonlar sırasıyla 50, 100 ve 200 µM olacak şekilde CdCl₂ eklenmiştir. 12, 24 ve 48 saatlik süreler ile Cd'ya maruz bırakılmıştır. Yetiştirme çemberinde ışık/karanlık fotoperiyodu 16:8 olarak ayarlanmış. Bütün uygulamalar 3'er tekrar olarak yapılmıştır.

2.2. Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi (MDA Analizi)

Bitkide stres etkisini göstermek ve gen ifadesi düzeyleriyle karşılaştırmak amacıyla malondialdehit (MDA) analizi ile lipit peroksidasyonu belirlenmiştir (Hodges et al. 1999).

Malondialdehit (MDA) Analizi

1- 100 mg yaprak örneği %80'lik 1 ml alkol ile homojenize edilir. 3000 g de +4 °C'de 10 dk santrifüj edilir.

2- Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant ikiye bölünür;

a) 1 hacim alınır + 1 hacim %20'lik TCA (trichloroaceticacid) + 1 hacim %0,01'lik BHT (butylated hydroxytoluene) eklenir. (-TBA)

b). 1 hacim alınır + 1 hacim %0,65 TBA (2-thiobarbituric acid) içeren %20'lik TCA + 1 hacim %0,01'lik BHT eklenir. (+TBA)

3- a ve b şeklinde ayrılmış ve yukarıdaki şekilde hazırlanmış olan tüpler 95 °C'de 25 dk inkübasyon sonrası ani bir şekilde soğutma amacıyla buza alınır.

4- Soğuyan örnek 3000 g'de 10 dk santrifüj edilir ve süpernatant alınır.

5- Birinci aşamada 532-600 nm'de, ikinci aşamada ise 532-600-440 nm'de ölçülür. Spektrofotometrede okunan değerler ile yüzde MDA seviyelerinin hesaplanmasında aşağıdaki formüller kullanılmıştır.

ABS=Absorbans

MDA=Malondialdehit

1- ((ABS 532+TBA)-(ABS 600+TBA)-(ABS 532-TBA)-(ABS 600-TBA)= A

2- ((ABS 440+TBA)-(ABS 600+TBA)x0,0971=B

3- nmol MDA/ml= (A-B/157000)x10⁶

2.3. H₂O₂ konsantrasyonunun belirlenmesi

Hücrel H₂O₂ determinasyonu için Junglee ve ark. Kullandıkları yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır (Junglee et al. 2014). Kök dokuları (500 mg) %0.1 (w/v) lik 5 ml trichloroacetic acid (TAC) ile +4 derecede homojenize edilmiş ve 12.000 rpm de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Ayrı bir tüpe süpernetandan 0.5 ml alınmış üzerine 0.5 ml 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) eklenmiş daha sonra 1 M potassium iodide (1ml) eklenmiştir. Absorbans 280 nm de quartz küvet ile ölçülmüş ve Junglee ve ark.'ın gradual H₂O₂ konsantrasyonları kullanarak hesapladıkları standart eğri denklemine göre hücredeki H₂O₂ konsantrasyonu tespit edilmiştir (Junglee et al. 2014).

2.4. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Total RNA izolasyonu Thermo GeneJET Plant RNA Purification Kit kullanılarak üreticinin kullanım klavuzundaki yönergelerine göre yapıldı. Donovix marka mikro hacim spektrofotometresi kullanılarak 260/280 ve 230/260 nanometredeki absorbans değerleri ölçülerek RNA yoğunlukları tespit edildi ve cDNA sentezinde kullanıldı. First strand cDNA sentezi için ise RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit kullanıldı.

2.5. Kantitatif gerçek zamanlı PCR analizi

Gerçek zamanlı real time analizi Bioneer Exicycler Tm 96 fast cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Real time amplifikasyonu için AccuPower® DualStar™ qPCR PreMix kullanıldı. Bu premixin hazırlanması için 1 µl forward primer, 1µl reverse primer, 5 µl cDNA ve 13 µl DEPC-water eklenerek son hacim 20 µl olarak ayarlanmıştır. Kontrol primer olarak house-keeping gen actin kullanılmıştır. Primer dizileri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Kabak bitkisi için kullanılan primerlerin baz dizisi ürün boyları ve gen bank kodları

Gen	Primer çifti	Sequence (5' – 3')	PRC ürün boyu	Gene Bank kodu
Metallothionein	MT F MT R	GAGTGGGAAGGGGTAAGTGC ACCAACCCAATACCACACCG	105	XM_023657362.1
Superoxide dismutase Cu-ZnSOD	Cu-ZnSOD F Cu-ZnSOD R	TCGCCATGCTGGTGT ATGGAGATAGGTCCAGATAGAGG	102	MG014229.1
Catalase	Cat F Cat R	GTCACCCATGAGATCCGCA CCAAGAGACCTATCCGCCTG	161	D55645
Ascorbat peroxidase	APX F APX1 R	TAGGCTCTTGGAGCCCATCA AACCCTTGGTAGCATCAGGC	179	KF954415.1
Actin-11	Actin F Actin R	CCTCTCAATCCCAAAGCTAAC AG CTGTTGGCTGTTCTGCTATCT	91	HM594170

2.6. İstatistiksel Analiz

Gerçek zamanlı kantitatif PCR sonuçları analizinde hedef genin kaç kat eksprese oldğunu tespit etmek için Livak ve Schmittgen'in $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanılmıştır (Livak and Schmittgen 2001). Ayrıca gruplar arasında farkın tespiti için tek yönlü varyans analizi ve post-hoc (Duncan) testi uygulanmıştır. Bütün istatistiksel hesaplamalar SPSS 22 paket program ile yapılmıştır.

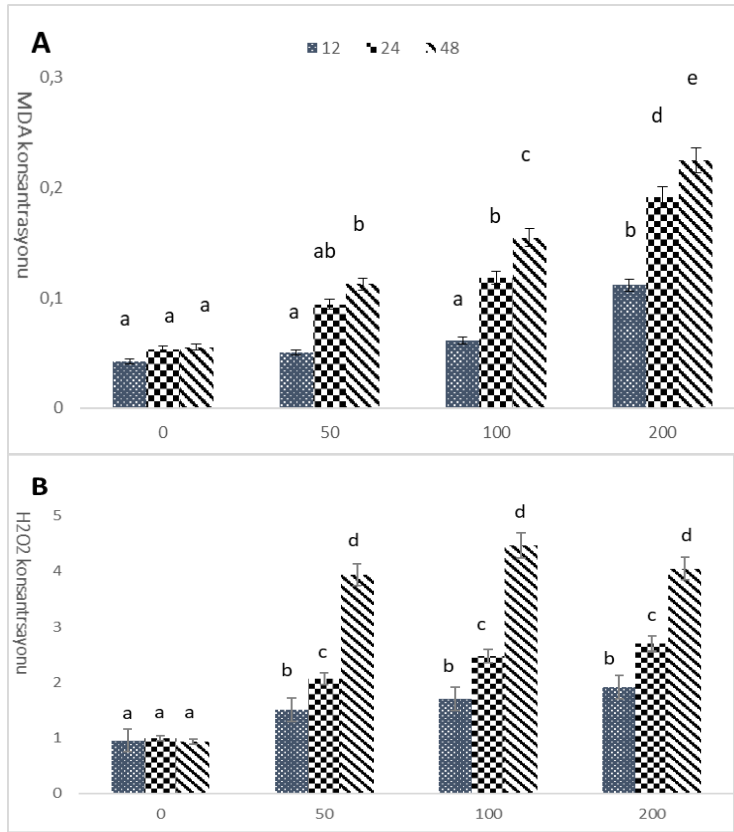
3. Bulgular

3.1. Lipit peroksidasyon (MDA)

MDA birikimine bakıldığı zaman istatistiksel olarak en yüksek MDA akümüasyonu 48 saat 200 μM uygulamada meydana gelmiştir. En düşük MDA akümüasyonu beklendiği gibi kontrol grubunda meydana gelirken, 12 ve 24 saatlik 50 μM lık uygulama ile kontrol grubu arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır (Fig. 1A) ($p < 0.05$).

3.2. H_2O_2 konsantrasyonu

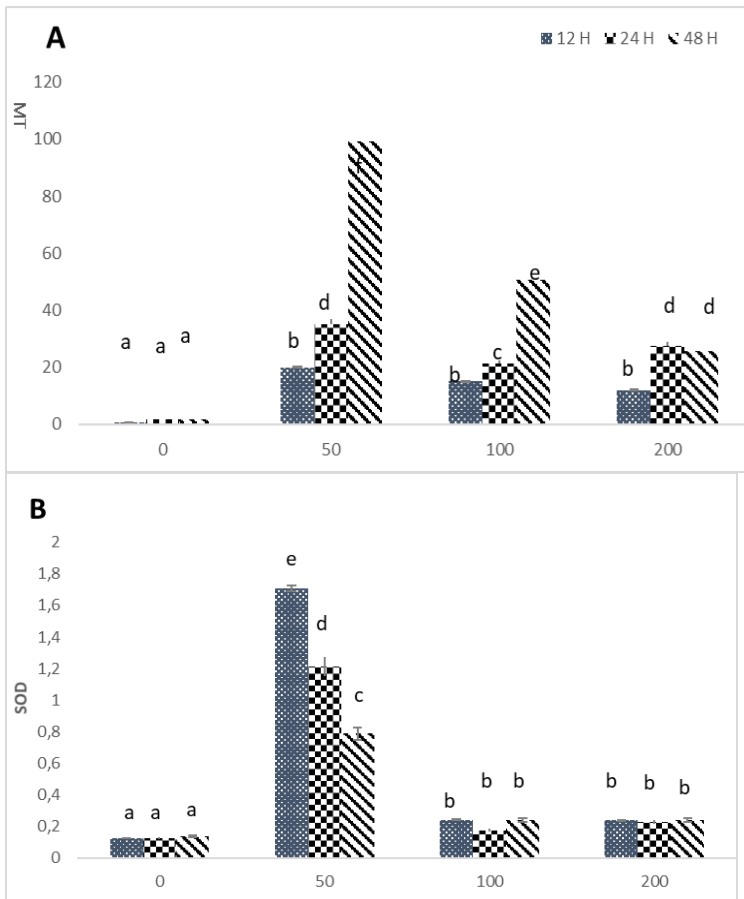
Hüresel H_2O_2 birikimi, Cd konsantrasyonları açısından bakıldığında, aynı uygulama konsantrasyonu içindeki farklı sürelerde üretilen H_2O_2 miktarı istatistiksel olarak birbirinden farklıdır. Ancak, uygulama süreleri açısından bakıldığında, konsantrasyonlar arasında belirgin bir fark tespit edilememiştir. İstatistiksel olarak en yüksek H_2O_2 birikimine 48 saatlik 50,100 ve 200 μM Cd uygulamasında tespit edilmiştir ve bu 3 uygulama konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak bir fark tespit edilememiştir.

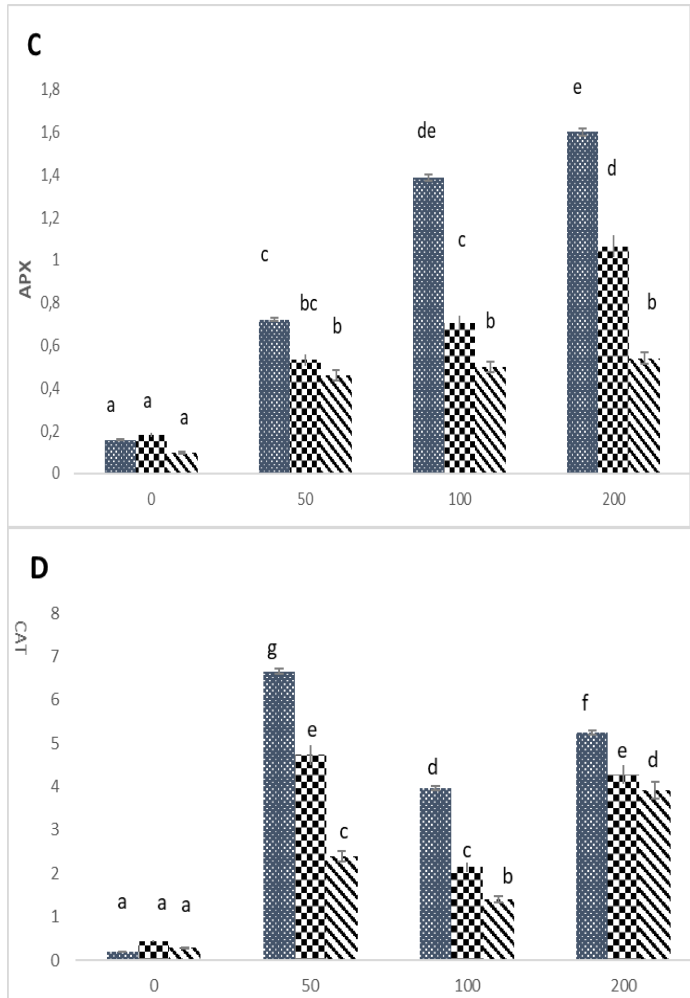


3.3. Antioksidan stres ile ilişkili genlerin ifade düzeylerinin incelenmesi

Antioksidan sistem elemanları olan MT ekspresyonu en yüksek 48 saat 50 μM uygulamada meydana gelmiş daha sonraki uygulamalarda ekspresyon seviyesinde azalma eğilimi görülmüştür. İstatistiksel olarak bakıldığında 48 saatlik 50 μM ve 12 saatlik 50μM arasında bir fark bulunamamıştır. (Fig 2A)($p < 0.05$)

Cu-Zn/SOD ekspresyonlarına bakıldığı zaman en yüksek ekspresyon seviyesine 12 saat 50μM konsantrasyonda rastlanırken daha sonraki uygulama konsantrasyonları ve sürelerinde ekspresyon seviyesinde her ne kadar kontrol grubundan yüksek ekprese edilmiş olsada kendi içinde istatistiksel olarak anlamlı bir tespit edilmemiştir. (Fig 2 B) ($p < 0.05$).





APX ekspresyonlarında meydana gelen değişime bakıldığında ise en yüksek ekspresyon seviyesine 12 saatlik 200 μ M uygulamasında rastlanmıştır. Daha sonra artan maruziyet süresine bağlı olarak ekspresyon seviyesinde azalma meydana gelmiştir. Ancak söz konusu azalma MT ve Cu/Zn SOD ekspresyon seviyelerindeki kadar belirgin bir şekilde gerçekleşmemiştir (Fig 2C) $P < 0.05$).

CAT enziminde en yüksek ekspresyon seviyesine 50 μ M 12 saat uygulamasında rastlanmıştır. Ancak diğer uygulama süre ve konsantrasyonlarında kontrole göre oldukça yüksek bir ekspresyon seviyesi gözlemlenmiştir. Her ne kadar ekspresyon seviyesinde bir azalma eğilimi gösterilmiş olsa da CAT ekspresyonu bütün konsantrasyonlarda devam etmiştir (Fig 2D)($p < 0.05$).

4. Tartışma

Metalotiyoninler (MT'ler) hücrelerdeki ana geçiş metal iyonu bağlayıcı proteinlerdir (Hassinen et al. 2011) Ayrıca, MT'lerin hem metal şaperonlama hem de ROT süpürme görevinde işlev gördüğü öne sürülmüştür (Wang et al. 2010). Tamas ve arkadaşlarının arpa bitkisi köklerinde Cd etkisini araştırdıkları çalışmada; bitki köklerinde Cd konsantrasyonu arttıkça *MT* ifade seviyesinin de arttığı tespit edilmiştir (Tamás et al. 2008). Jain ve arkadaşları, selenyum maruziyetindeki şeker kamışı bitkisi ile yaptıkları çalışmada, *MT* geninin tüm konsantrasyonlarda kontrole göre yüksek seviyede eksprese edildiğini tespit etmişlerdir. Ancak *MT* ekspresyon seviyesinin belli bir konsantrasyona kadar arttığını, belli bir konsantrasyondan sonra ise azaldığını tespit etmişlerdir (Jain et al. 2015). Tombuloğlu ve arkadaşlarının domates bitkisinde bor elementinin etkisi üzerine yaptıkları çalışmada, bitkinin kök ve sürgün kısımlarında *MT* gen ifade seviyesinin belli bir konsantrasyona kadar arttığını, belli bir konsantrasyondan sonra ise azaldığını tespit etmişlerdir (Tombuloğlu et al. 2012). Souguir ve arkadaşları, bakla (*Vicia faba*) bitkisinde farklı süre ve konsantrasyonlarda Cd maruziyeti sonucu stres alakalı bazı genlerin mRNA birikimi üzerine çalışmışlardır. Sonuçta, 12 saatlik süre sonunda *MT* gen ifadesinde artış fakat süre uzadığında ise azalış tespit etmişlerdir (Souguir et al. 2013).

Bizim çalışmamızda da; *MT* ifadesi tüm uygulama süre ve konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre daha yüksek seviyede tespit edilmiştir. Fakat, *MT2* ifade seviyesi 50 µM Cd uygulamasına kadar artmış, daha sonra ise azalma trendine girmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmanın sonuçları da, *MT* geni ile ilgili yapılmış olan çalışmaların sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.

Cu-Zn/SOD enzimi hücrede çekirdek ve sitoplazmada bulunmaktadır ve hücreyi ROT'un zararlı etkilerinden korumada, savunmanın ilk basamağında yer almaktadır. SOD ifade düzeyi, daha önce yapılan çalışmalarda belirtildiği gibi abiyotik stres koşulları altında artmaktadır. SOD ifade düzeyinin artması, hücrede O₂⁻ radikalinin biriktiğinin ve H₂O₂ miktarının da arttığının bir kanıtı sayılmaktadır. Bu durum SOD enziminin fazla miktardaki O₂⁻ radikalini uzaklaştırarak stres durumunda bitkinin direncini arttırdığını göstermektedir (Liochev and Fridovich 2007). Faralli ve arkadaşlarının ısı şoku ve tuzluluk stresinin arpa bitkisinin gelişimi üzerine etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, Cu/Zn-SOD ifade düzeyinin stres etmenlerine bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir [82]. Dixit ve arkadaşlarının bezelye bitkisine Cd uyguladığı bir çalışmada; bitki yapraklarındaki SOD ifade düzeyinin tüm Cd uygulamalarında belli bir süreye kadar arttığını, belli bir süreden sonra ise azaldığını saptamışlardır (Dixit et al. 2001). Dai ve arkadaşları, kanola bitkisine farklı konsantrasyonlarda tuz stresi uygulamışlardır. Çalışma sonucunda SOD ifade seviyesinin 200 mmol L⁻¹ konsantrasyona kadar arttığını, 250 ve 300 mmol L⁻¹ konsantrasyonlarda ise azaldığını tespit etmişlerdir (Dai et al. 2009). Tuz stresi altında pirinç bitkileri ile çalışmış olan Rossatto ve

arkadaşları; SOD ekspresyonunun 15 günlük maruziyete kadar kontrole göre arttığını fakat 20 günlük maruziyetten sonra azaldığını tespit etmişlerdir (Rossatto et al. 2017). Literatürdeki çalışmalara benzer olarak çalışmamızda da, SOD ifade düzeyi 50 µM Cd uygulamasına kadar artmış ve bununla birlikte 12. saat 50 µM Cd uygulamasında en yüksek seviyeye ulaşmış fakat konsantrasyon miktarı arttıkça tüm uygulama sürelerinde SOD ifade düzeyinde azalma gerçekleşmiştir. Uzayan maruziyet sonucunda tespit edilen ekspresyon düzeyleri her ne kadar kontrole göre yüksek düzeyde eksprese edilmiş olsa da kendi arasındaki ekspresyon düzeylerinde istatistiksel bir fark tespit edilememiştir. Bu durum bitkinin stres ile karşılaştığı ilk zamanlarda savunma mekanizmasının devreye girişi ile ifadede dereceli bir artış olduğunu, bitkinin stresi tolere edemediği seviyeye gelindiğinde ise ifadede azalış olduğunu göstermektedir.

Rout ve Sahoo, *Withania somnifera* bitkisine değişik oranlarda Cu stresi uygulamışlardır. Çalışma sonucunda, bitkinin yaprak dokularında belirlenen *CAT* ekspresyonunun 50 µM Cu uygulamasına kadar arttığını fakat 100 ve 200 µM Cu uygulamalarında azaldığını tespit etmişlerdir (Rout and Sahoo 2013). Cantarello ve arkadaşları, çalışmalarında *CAT* ifade seviyesinin 48 saatlik stres uygulamasında arttığını, 56 ve 72 saatlik sürelerde ise azaldığını tespit etmişlerdir (Cantarello et al. 2005). Kar, nohut bitkisine değişen süre ve konsantrasyonlarda Cd uygulamıştır. Çalışma sonucunda, *CAT* geninin 24 saatlik uygulama sonucunda yüksek seviyede eksprese edildiğini, 48 saatlik uygulama sonucunda ise ekspresyon seviyesinde diğer antioksidan ilişkili gen ekspresyonlarına meydana gelen azalmaya oranla belirgin bir azalma olmadığını ve eksprese edilmeye devam edildiğini bulmuştur (Kar 2018). Ayrıca, Rossatto ve arkadaşlarının, pirinç bitkilerine tuz stresi uyguladığı çalışmada, *CAT* ekspresyonu tüm uygulama sürelerinde kontrole göre yüksek seviyede tespit edilmiş ve uygulama süresi uzadıkça ekspresyon seviyesinin de artış gösterdiği belirtilmiştir (Rossatto et al. 2017). Souguir ve arkadaşlarının çalışmasında da, Cd uygulanan pirinç fidelerinde, artan konsantrasyona ve uzayan süreye bağlı olarak *CAT* ifade seviyesinin arttığı tespit edilmiştir (Souguir et al. 2013). Luna ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında artan H₂O₂ miktarı *CAT* enziminin sınırlanmasında esansiyel bir element olduğunu vurgulamışlardır (Luna et al. 2005). Bu çalışmanın aksine bizim bulgularımızda *CAT* ekspresyonu artan H₂O₂ konsantrasyonlarından etkilenmemiş ve eksprese edilmeye devam etmiştir.

Luo ve ark. perennial ryegrass bitkisini farklı süre ve konsantrasyonda Cd ağır metale maruz bırakmışlar ilk 24 saatlik Cd uygulamasında *APX* ekspresyonunun yukarı doğru düzenlendiğini bulmuşlardır. ancak uzayan konsantrasyonlara bağlı olarak ekspresyon seviyesinde düşüş olduğunu bildirmişlerdir (Luo et al. 2011) Bir çok farklı çalışmada çeşitli ağır metallere maruziyet sonucu bitkilerde *APX* transkripsiyonunun uyarıldığı bildirilmiştir.

Cuypers ve ark. *Arabidopsis thaliana* birkisinde Cu stresinin APX2 mRNA sında artış olduğunu tespit etmişlerdir (Tony et al. 2010). APX gen ekspresyonu kursunla muamale edilen *Lathyrus sativus* L. bitkisinde de artış göstermiştir (Brunet et al. 2009). Bizim çalışmamızda literatüre paralel şekilde APX ekspresyonu en yüksek H₂O₂ akümülayonu olan konsantrasyonda oldukça belirgin bir düşüş sergilemiştir.

Baxter ve arkadaşları, erken dönemlerde ROT metabolizması üzerine yapılan araştırmaların, ROT'un potansiyel toksisitesine ve farklı ROT temizleme mekanizmalarına odaklanırken daha yeni çalışmaların ROT'un sinyal molekülleri olarak oynadığı role odaklandığını belirtmişlerdir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda, reaktif oksijen türlerinin tahmin edilenden daha az zararlı olduğu vurgulanmıştır (Del Río 2015; Farnese et al. 2016; Gupta et al. 2016). Choudhury ve arkadaşları, ROT'un bazı genlerin ekspresyonunu etkilediğini ve ROT'un streslerin düzenlenmesinde bir biyolojik sinyal olarak hareket ettiğini ifade etmişlerdir. Bitkilerde birincil ROT olarak kabul edilen O₂⁻ and H₂O₂'nin bitkinin büyüme ve gelişmesinde çeşitli fonksiyonları düzenleyen ikincil haberciler olarak görev gördüklerini vurgulamışlardır (Choudhury et al. 2017). Apel ve Hirt, sinyal iletiminin, (1)ROT sensörlerinin aktif hale gelerek, (2) sinyal yolları bileşenlerinin doğrudan ROT tarafından oksitlenerek (3) ROT'un, transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini değiştirerek 3 farklı şekilde gen ekspresyonunu etkileyebileceğini belirtmişlerdir (Apel and Hirt 2004). Gill ve Tuteja yapmış oldukları çalışmalarında, H₂O₂'lerin uzun ömürlü olması ve membranlar arası geçirgenliğinin yüksek olması nedeniyle, ROT aracılığıyla üretilen sinyaller için, ROT'un ikincil bir haberci olarak kabul edilmeye başlandığını belirtmişlerdir. Ayrıca, ROT'un çok çeşitli fizyolojik işlemlerde kilit bir düzenleyici olarak görev gördüğünü ifade etmişlerdir (Gill and Tuteja 2010). Laloi ve arkadaşları, biyotik ve abiyotik stresler tarafından tetiklenen H₂O₂ konsantrasyonundaki artışların genellikle farklı mekanizmalara dayandırıldığını ve H₂O₂'nin bir sinyal görevi gördüğünü vurgulamışlardır (Laloi et al. 2004). Kar, nohut bitki köklerini Cd'ye maruz bırakmış, antioksidan gen ekspresyonlarının H₂O₂ ile ilişkili olduğunu belirtmiştir. Belli bir düzeyde H₂O₂ miktarının, genlerin yüksek seviyede eksprese edilmesini sağlarken artan H₂O₂ konsantrasyonuna bağlı olarak gen ekspresyon seviyelerinde ciddi bir düşüş olduğunu vurgulamıştır (Kar 2018).

5. Sonuç

Son yıllarda bilim adamlarının hidrojen peroksitin bir sinyal molekülü olarak rolünü belirlemesi amacı ile yapmış olduğu çalışmalar, H₂O₂'nin bitkilerde sinyal iletim ağlarındaki konumunu belirleyerek, hem dış biyotik ile hem de abiyotik uyaranlar arasındaki iletişim ve gelişimsel olarak düzenlenmiş işlemlerin kontrolü için gerekli olduğunu göstermiştir. Bu

çalışmada H₂O₂'nin sinyalizasyon etkisi ile ilgili literatüre katkıda bulunmaya çalışılmıştır. Çalışmamızın bulguları daha sonraki “oksidatif sinyalizasyon” başlığı ile yapılacak çalışmalara katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

6. Kaynakça

- Ahmad P (2014) Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling.
- Apel K, Hirt H (2004) REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373–399. doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701
- Azarabadi S, Abdollahi H, Torabi M, et al (2017) ROS generation, oxidative burst and dynamic expression profiles of ROS-scavenging enzymes of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) in response to *Erwinia amylovora* in pear (*Pyrus communis* L.). *Eur J Plant Pathol* 147:279–294. doi: 10.1007/s10658-016-1000-0
- Baxter A, Mittler R, Suzuki N (2014) ROS as key players in plant stress signalling. *J Exp Bot* 65:1229–1240. doi: 10.1093/jxb/ert375
- Boyer JS (1982) Plant productivity and environment. *Science* 218:443–448. doi: 10.1126/science.218.4571.443
- Brunet J, Varrault G, Zuily-Fodil Y, Repellin A (2009) Accumulation of lead in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) plants triggers systemic variation in gene expression in the shoots. *Chemosphere*. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.07.058
- Cantarello C, Volpe V, Azzolin C, Berteà CM (2005) Modulation of enzyme activities and expression of genes related to primary and secondary metabolism in response to UV-B stress in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *J Plant Interact*. doi: 10.1080/17429140600831581
- Choudhury FK, Rivero RM, Blumwald E, Mittler R (2017) Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant J* 90:856–867. doi: 10.1111/tpj.13299
- Cuypers A, Hendrix S, Amaral dos Reis R, et al (2016) Hydrogen Peroxide, Signaling in Disguise during Metal Phytotoxicity. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2016.00470
- Dai Q lin, Chen C, Feng B, et al (2009) Effects of different NaCl concentration on the antioxidant enzymes in oilseed rape (*Brassica napus* L.) seedlings. *Plant Growth Regul*. doi: 10.1007/s10725-009-9402-z
- Del Río LA (2015) ROS and RNS in plant physiology: An overview. *J Exp Bot* 66:2827–2837. doi: 10.1093/jxb/erv099
- Dempsey DA, Klessig DF (1994) Salicylic acid, active oxygen species and systemic acquired resistance in plants. *Trends Cell Biol*. doi: 10.1016/0962-8924(94)90235-6
- Dixit V, Pandey V, Shyam R (2001) Differential antioxidative responses to cadmium in roots

- and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *J Exp Bot.* doi: 10.1093/jexbot/52.358.1101
- Farnese FS, Menezes-Silva PE, Gusman GS, Oliveira JA (2016) When Bad Guys Become Good Ones: The Key Role of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in the Plant Responses to Abiotic Stress. *Front Plant Sci* 7:471. doi: 10.3389/fpls.2016.00471
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48:909–930. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- Gupta K, Sengupta A, Chakraborty M, Gupta B (2016) Hydrogen Peroxide and Polyamines Act as Double Edged Swords in Plant Abiotic Stress Responses. *Front Plant Sci* 7:1343. doi: 10.3389/fpls.2016.01343
- Hassinen VH, Tervahauta AI, Schat H, Kärenlampi SO (2011) Plant metallothioneins - metal chelators with ROS scavenging activity? *Plant Biol.*
- Hodges DM, Delong JM, Forney CF, et al (1999) the Thiobarbituric Anthocyanin for Estimating Lipid Peroxidation in Plant Tissues Containing and Other Interfering. 207:604–611. doi: 10.1007/s004250050524
- Hossain MA, Bhattacharjee S, Armin S-M, et al (2015) Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. *Front Plant Sci* 6:1–19. doi: 10.3389/fpls.2015.00420
- Jain R, Verma R, Singh A, et al (2015) Influence of selenium on metallothionein gene expression and physiological characteristics of sugarcane plants. *Plant Growth Regul.* doi: 10.1007/s10725-015-0042-1
- Junglee S, Urban L, Sallanon H, Lopez-lauri F (2014) Optimized Assay for Hydrogen Peroxide Determination in Plant Tissue Using Potassium Iodide. *Am J Anal Chem* 5:730–736. doi: 10.4236/ajac.2014.511081
- Kar M (2018) Determination of the expression level of stress-related genes in *Cicer arietinum* root cell under Cd stress and the relationship to H₂O₂ concentrations. *Ecotoxicology* 27:1087–1094. doi: 10.1007/s10646-018-1961-1
- Karpinski S, Reynolds H, Karpinska B, et al (1999) Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* (80-). doi: 10.1126/science.284.5414.654
- Khan MN, Mobin M, Abbas ZK, et al (2017) Role of nanomaterials in plants under challenging environments. *Plant Physiol Biochem* 110:194–209. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.05.038

- Laloi C, Apel K, Danon A (2004) Reactive oxygen signalling: The latest news. *Curr. Opin. Plant Biol.*
- Liochev SI, Fridovich I (2007) The effects of superoxide dismutase on H₂O₂ formation. *Free Radic. Biol. Med.*
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} Method. *Methods* 25:402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Luna CM, Pastori GM, Driscoll S, et al (2005) Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *J Exp Bot* 56:417–423. doi: 10.1093/jxb/eri039
- Luo H, Li H, Zhang X, Fu J (2011) Antioxidant responses and gene expression in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) under cadmium stress. *Ecotoxicology* 20:770–778. doi: 10.1007/s10646-011-0628-y
- Rossatto T, do Amaral MN, Benitez LC, et al (2017) Gene expression and activity of antioxidant enzymes in rice plants, cv. BRS AG, under saline stress. *Physiol Mol Biol Plants* 23:865–875. doi: 10.1007/s12298-017-0467-2
- Rout JR, Sahoo SL (2013) Antioxidant enzyme gene expression in response to copper stress in *Withania somnifera* L. *Plant Growth Regul* 71:95–99. doi: 10.1007/s10725-013-9806-7
- Souguir D, El Ferjani E, Ledoigt G, Goupil P (2013) Transcript accumulation of stress-related genes in *Vicia faba* roots under a short exposure to cadmium. *Plant Biosyst - An Int J Deal with all Asp Plant Biol* 3504:1–9. doi: 10.1080/11263504.2013.822432
- Suzuki N, Miller G, Salazar C, et al (2013) Temporal-Spatial Interaction between Reactive Oxygen Species and Abscisic Acid Regulates Rapid Systemic Acclimation in Plants. *Plant Cell*. doi: 10.1105/tpc.113.114595
- Tamás L, Dudíková J, Ďurčeková K, et al (2008) Alterations of the gene expression, lipid peroxidation, proline and thiol content along the barley root exposed to cadmium. *J Plant Physiol* 165:1193–1203. doi: 10.1016/j.jplph.2007.08.013
- Tombuloglu H, Semizoglu N, Sakcali S, Kecec G (2012) Boron induced expression of some stress-related genes in tomato. *Chemosphere* 86:433–438. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.09.035
- Tony R, Suzy VS, Kelly O, et al (2010) The cellular redox state as a modulator in cadmium and copper responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *J Plant Physiol* 168:309–316. doi: 10.1016/j.jplph.2010.07.010

- Vanderauwera S, Hoerberichts FA, Breusegem F Van (2009) Hydrogen Peroxide-Responsive Genes in Stress Acclimation and Cell Death. In: Reactive Oxygen Species in Plant Signaling: Springer. pp 149–164
- Wang L, Yang L, Yang F, et al (2010) Involvements of H₂O₂ and metallothionein in NO-mediated tomato tolerance to copper toxicity. *J Plant Physiol* 167:1298–1306. doi: 10.1016/j.jplph.2010.04.007
- Zimmermann P, Heinlein C, Orendi G, Zentgraf U (2006) Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant, Cell Environ* 29:1049–1060. doi: 10.1111/j.1365-3040.2005.01459.x

EKLER

Tablo 1. Mali Bilanço ve Açıklamaları

	Makine Teçhizat	Sarf Malzemesi	Hizmet Alımı	Toplam, TL
Onaylanan	2870,00	21192,50	5850	29912
Kullanılan	2.870,00	20550,85	4572,30	27692,65
Kalan	0	941,65	1277,70	2219,35