MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.) VE ARPA (*Hordeum vulgare* L.) BİTKİLERİNDE KADMİYUM STRESİNE BAĞLI GENOTOKSİK ETKİLERİN BELİRLENMESİ

KARDELEN ÇILGIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Ana Bilim Dalı

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Salim SÜNER

EŞ-DANIŞMAN
Prof. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT

ISTANBUL, 2022

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.) VE ARPA (*Hordeum vulgare* L.) BİTKİLERİNDE KADMİYUM STRESİNE BAĞLI GENOTOKSİK ETKİLERİN BELİRLENMESİ

KARDELEN ÇILGIN

520119001

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Ana Bilim Dalı

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Salim SÜNER

EŞ-DANIŞMAN
Prof. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT

ISTANBUL, 2022

ÖNSÖZ / TEŞEKKÜR

Bana her konuda destek olan, yüksek lisans yapmam konusunda beni cesaretlendirip yıkıldığım her anda tekrar ayağa kalkmamı ve devam etmemi sağlayan değerli tez hocam Prof. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT'e,

İlk tez öğrencisi olmamın verdiği heyacanını ve grurunu yaşadığım, benimle titizlikle ilgilenen hocam Dr. Öğr. Üyesi Salim SÜNER'e,

Tezimin özellikle deney kısımlarında çok emeği geçen, ihtiyacım olan her anda yanımda olan sevgili Aslı HOCAOĞLU ÖZYİĞİT'e,

Kadmiyum akümülasyonlarının okunması için yardımcı olan İbrahim Ertuğrul YALÇIN' a,

Aklıma takılan sorularda yol gösteren Prof. Dr. Nüzhet Cenk SESAL, Bihter UÇAR, Dr. Öğr. Üyesi Barış GÖKALSIN, Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Emin URAS'a,

Bana her daim destek olan ve buralara gelmemi sağlayan başta Adnan ÇILGIN ve Zeynep ÇILGIN olmak üzere tüm aileme,

Tazimi yazdığım süre boyunca yanımda olarak bana moral veren ve yardım eden Berfin Naz AYDUK, Ekin Zehra METİN, Bilgesu ŞAMİLOĞLU, Asiye Şefika Sümeyye KAPUSUZ, Atakan İlyas YASAK, Kevser KÖKSAL YASAK'a teşekkür ederim.

Bu çalışma Marmara Üniversitesi BAPKO birimi tarafından bilimsel araştırma projesi olarak (FEN-2021-10285) desteklenmiştir ve bazı verileri aşağıdaki kongrede sunulmuştur.

S. Suner, A. Hocaoglu-Ozyigit, I. I. Ozyigit, D. Baktybekova, K. Cilgin, I. E. Yalcin, K. Chekirov, G. Kurmanbekova, Morphological, Physiological and Genotoxic Alterations Induced by Cadmium in Wheat (*Triticum aestivum* L.), II International Biology Congress, Bishkek, Kyrgyzstan, May 18-22, 2022, (Sözlü sunum)

K. Cilgin, A. Hocaoglu-Ozyigit, I. I. Ozyigit, A. Abakirova, S. Suner, I. E. Yalcin, K. Chekirov, G. Kurmanbekova, The Effects of Cadmium on some Growth Parameters, Physiology and Genotoxicity of Barley (*Hordeum vulgare* L.), II International Biology Congress, Bishkek, Kyrgyzstan, May 18-22, 2022, (Sözlü Sunum)

Temmuz, 2022 **Kardelen Çılgın**

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ / TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
ÖZET iv
ABSTRACT v
SEMBOLLER vi
KISALTMALAR viii
ŞEKİL LİSTESİ xii
TABLO LİSTESİ xv
1. GİRİŞ 1
1.1. Buğday ve Arpa Bitkilerinin Önemi 2
1.2. Bitkilerde Stres Faktörleri ve Etkileri 4
1.2.1. Ağır metaller 4
1.3. Genotoksik Etki (Genotoksisite) 9
1.4. Belirteçler (Markörler) 9
1.4.1. Moleküler belirteçler 10
2. MATERYAL VE YÖNTEM 15
2.1. Kullanılan Cihazlar 15
2.2. Kullanılan Kimyasal Listesi 16
2.3. Deney Bitkilerin Yetiştirilmesi, Örneklerin Hazırlanması ve Muhafaza Edilmesi 17
2.4. Büyüme ve Gelişme Parametrelerinin Ölçülmesi 21
2.5. Kimyasal Analiz 21
2.5.1. Hazırlık aşaması 21
2.5.2. Cd akümulasyonlarının tespiti 22
2.6. Genotoksisite Analizi 23
2.6.1. DNA izolasyonu 23
2.6.2. DNA saflığı ve konsantrasyonunun ölçümü 26
2.6.3. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) 27
2.6.4. Agaroz jel elektroforezi 28
2.7. Veri Analizi 29
3. BULGULAR VE TARTIŞMA 31

3.1. Yapraklardaki Cd Akümülasyon Değerleri 31
3.2. Cd Stresinin Büyüme ve Gelişme Parametreleri Üzerine Etkisine İlişkin Bulgular 32
3.2.1. Cd stresinin arpa bitkisinde büyüme ve gelişme parametreleri üzerine etkisi 32
3.2.2. Cd stresinin buğday bitkisinde büyüme ve gelişme parametreleri üzerine etkisi 35
3.3. Arpa ve Buğday Bitkilerinde Büyüme ve Gelişme Parametrelerinin Değerlendirilmesi 38
3.4. ISSR Primerleri Kullanılarak Elde Edilen Sonuçlar 43
3.4.1. Arpa bitkilerinde ISSR analiz sonuçları 44
3.4.2. Buğday bitkilerinde ISSR analiz sonuçları 49
3.4.3. ISSR primerleri kullanılarak yapılan PZR'den elde edilen sonuçların değerlendirilmesi 56
4. SONUÇLAR 62
KAYNAKLAR 63
ÖZGEÇMİŞ 85

ÖZET

BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.) VE ARPA (*Hordeum vulgare* L.) BİTKİLERİNDE KADMİYUM STRESİNE BAĞLI GENOTOKSİK ETKİLERİN BELİRLENMESİ

Ağır metal kirliliği günümüzün küresel ölçekli sorunlarındandır. Son dönemde yapılan çalışmalar Kırgızistan'da da ağır metal kirliliği yaşandığını ve kirliliğin özellikle kadmiyum (Cd) kirliliği şeklinde öne çıktığını göstermiştir. Bu sebeple mevcut çalışmada Kırgızistan'da yaygın olarak ekilen buğday (*Triticum aestivum* L. var. intensivnaya) ve arpa (*Hordeum vulgare* L. var. alta) varyetelerine ait tohumlar temin edilip *in vitro* koşullarda çimlendirilerek Cd'un bitkiler üzerindeki genotoksik etkileri araştırılmıştır. Çalışmada amaca uygun olarak, çimlendirilen buğday ve arpa bitkileri kontrol grubu ve deney grubu bitkiler (50, 100, 200 ve 400 µM Cd uygulanan) olmak üzere ayrılmıştır. Uygulanan Cd stres şartları, belirtilen konsantrasyonlarda $CdCl_2$ içeren Hoagland çözeltilerinin, bitkilere 1 ay boyunca günaşırı sıklıkta 20'şer ml hacimde verilmesiyle oluşturulmuştur. Hoagland içerisinde verilen Cd'un bitki yapraklarındaki akümülasyon değerleri ICP-OES cihazı kullanarak ölçülmüştür. Akümüle edilen Cd'un, araştırılan fizyolojik parametreler (yaprak uzunluğu, yaprak eni, yaprak yaş ve kuru ağırlıkları, yaprakta toplam klorofil miktarı) üzerindeki etkileri incelenmiştir. Ayrıca bitki yapraklarındaki genotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla, modifiye edilmiş CTAB yöntemi ile DNA izolasyonu yapılmış ve sonrasında farklı ISSR (Inter Simple Sequence Repeat-Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm) primerlerinin hedeflediği bölgeler PZR ile çoğaltılmıştır. PZR ile elde edilen amplikonlar sonrasında agaroz jel elektroforezi ile ortaya çıkan DNA bant profilleri kontrol grubu ile deney grubu karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Elde edilen bant profillerinden yola çıkarak Cd stresine maruz kalmış bitkilerin genomik kararlılık değeri (GKY-Genomic Templete Stability (GTS)) hesaplanmış ve söz konusu veriye dayalı olarak bitkilerin hangi stres seviyesine dayanıklı/duyarlı oldukları belirlenmiştir. Çalışma sonucunda ICP-OES ve DNA bant profil verileri birbirleriyle ilişkilendirilerek kadmiyumda doza bağlı genotoksik etkiler ortaya konmuştur.

Temmuz, 2022 **Kardelen Çılgın**

ABSTRACT

DETERMINATION OF GENOTOXIC EFFECTS OF CADMIUM STRESS IN WHEAT (*Triticum aestivum* L.) AND BARLEY (*Hordeum vulgare* L.)

Heavy metal pollution is one of the global scale problems of today. Recent studies have shown that heavy metal pollution is also experienced in Kyrgyzstan, and the pollution stands out especially cadmium (Cd) pollution. For this reason, in the present study, the genotoxic effects of Cd on plants were investigated by obtaining and *in vitro* germinating conditions wheat (*Triticum aestivum* L. var. intensivnaya) and barley (Hordeum vulgare L. var. alta) varieties widely planted in Kyrgyzstan. In accordance with the purpose of the study, germinated wheat and barley plants were divided into control group and experimental group plants (50, 100, 200 and 400 μM Cd applied).The applied Cd stress conditions were created by giving Hoagland solutions containing $CdCl_2$ at the specified concentrations to the plants, in 20 ml every other day for one month. The accumulation of Cd in plant leaves were measured using ICP-OES. The effects of accumulated Cd on the investigated physiological parameters (leaf length, leaf width, leaf fresh and dry weights, total chlorophyll content in the leaf) were investigated. Additionally, the genotoxic effects of accumulated cadmium on plant leaves, and DNA were isolated with the modified CTAB method. Then the regions targeted by different ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) primers were amplified by PCR. The DNA band profiles obtained by agarose gel electrophoresis after amplicons obtained by PCR were analyzed by comparing the control group with the experimental group. Based on the band profiles obtained, the genomic stability (Genomic Template Stability-GTS) of plants exposed to Cd stress was calculated and based on the data in question, it was determined to which stress level the plants were resistant/sensitive. As a result of the study, dose-related genotoxic effects of cadmium were revealed by correlating ICP-OES and DNA band profile data.

July, 2022 **Kardelen Çılgın**

SEMBOLLER

% : Yüzde

' : Dakika

± : Artı eksi

µg : Mikrogram

µl : Mikrolitre

cm : Santimetre

dk : Dakika

g : Gram

g cm^{-2} : Gram bölü santimetrekare

g L^{-1} : Gram bölü litre

kg : Kilogram

km : Kilometre

L : Litre

lux : Işık akısı

M : Molar

mg kg^{-1} : Miligram bölü kilogram

mg m^{-2} : Miligram bölü metrekare

ml : Mililitre

mM : Mili molar

mm : Milimetre

ng : Nanogram

ng µl^{-1} : Nanogram bölü mikro litre

^{o}C : Santigrat derece

pH : Hidrojen iyon konsantrasyonunun eksi logaritmik ifadesi

ppb : Milyarda bir

ppm : Milyonda bir

rpm : Dakikadaki devir sayısı

UV : Ultraviyole

v/v : Hacim bölü hacim

w/v : **A**ğırlık bölü hacim

µg kg^{-1} : Mikrogram bölü kilogram

µM : Mikro molar

KISALTMALAR

$^1O_2$ **:** Tekli oksijen

A **:** Adenin

ABA **:** Absisik asit

AFLP **:** Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizm

Ag-NP **:** Gümüş nanopartikül

Al **:** Alüminyum

APX **:** Askorbat peroksidaz

Ar **:** Argon

AsA **:** Askorbik asit

bç **:** Baz çifti

BR **:** Brassinosteroid

C **:** Sitozin

$Ca(NO_3)_2.4H_2O$ **:** Kalsiyum nitrat tetrahidrat

CAT **:** Katalaz

Cd **:** Kadmiyum

$CdCl_2$ **:** Kadmiyum klorür

CK **:** Sitokinin

Cl **:** Klor

CNV **:** Gen kopya sayısı varyasyonu

Co **:** Kobalt

CO_2 **:** Karbondioksit

Cr **:** Krom

CTAB **:** Cetyltrimethyl ammonium bromür

Cu : Bakır

$CuSo_4.5H_2O$: Bakır (II) sülfat pentahidrat

ddH_2O : Deiyonize su

DNA : Deoksiribonükleik Asit

dNTP : Deoksinükleotid

EDTA : Etilen diamin tetra asetik asit

Fe : Demir

$FeSO_4.7H_2O$: Demir (II) sülfat heptahidrat

G : Guanin

GA : Giberellik asit

GPX : Glutatyon peroksidaz

GSH : Glutatyon

GKY : Genomik kararlılık yüzdesi **(**Genomic template stability (GTS))

$H_2MoO_4.H_2O$: Molibdik asit monohidrat

H_2O_2 : Hidrojen peroksit

H_3BO_3 : Borik asit

Hg : Civa

HNO_3 : Nitrik asit

IAA : İndol-3-asetik asit

IARC : Uluslararası kanser araştırma ajansı

ICP - OES : İndüktif eşlenmiş plazma optik emisyon spektrometresi

ISSR : Basit sekans tekrarları arası polimorfizm

JA : Jasmonik asit

ka : Kuru ağırlık (dry weight)

KOH : Potasyum hidroksit

Mg : Magnezyum

$MgCl_2$: Magnezyum klorür

$MgSO_4.7H_2O$: Magnezyum sülfat heptahidrat

Mn : Mangan

$MnCl_2.4H_2O$: Mangan (II) klorür tetrahidrat

Mo : Molibden

MÖ : Milattan önce

NaCl : Sodyum klorür

$NH_4H_2PO_4$: Amonyum dihidrojen fosfat (ADP))

Ni : Nikel

NO : Nitrik oksit

O_2 : Oksijen

O_2^- : Süperoksit anyonu

OH^- : Hidroksil radikali

PA : Poliamin

Pb : Kurşun

PGR : Bitki büyüme düzenleyicileri

POD : Peroksidaz

PrxR : Peroksiredoksin

PTE : Potansiyel toksik elementler

PVP : Polivinilpirolidon

PZR : Polimeraz zincir reaksiyonu

RAPD : Rastgele çoğaltılan polimorfik DNA

RFLP : Sınırlama parçalarının uzunluk polimorfizmi

ROS : Reaktif oksijen türleri

SA : Salisilik asit

Se : Selenyum

SNP : Tek nükleotit polimorfizmi

SOD : Süperoksit dismutaz

SSR : Basit sekans tekrarları veya mikrosatetellitler

STS : Dizisi etiketlenmiş sekanslar

T : Timin

Taq : *Thermus aquaticus*

TBE : Tris base-borik asit-EDTA

TF : Transkripsiyon faktörü

Tm : Erime noktası

TMO : Toprak mahsülleri ofisi

V : Vanadyum

Zn : Çinko

ZnO-NP : Çinko nanapartikül

$ZnSO_4.7H_2O$: Çinko sülfat heptahidrat

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Dünya buğday üretimi ve ticareti (milyon ton) (TMO, 2021).……..…...3

Şekil 1.2. Dünya arpa üretimi ve ticareti (milyon ton) (TMO, 2021).……..…...3

Şekil 1.3. Moleküler belirteçlerin sınıflandırılması…….…....11

Şekil 1.4. Primerler ve örnek DNA arasındaki olası eşleşmeler. Not: (a) bağlantısız, (b) 3'-bağlantılı ve (c) 5' bağlantılı, (Reddy ve ark., 2002, düzenlenmiştir.)……...13

Şekil 2.1. Ekilen buğday ve arpanın Hoagland solüsyonu ile sulanması (BioRender.com'da hazırlanmıştır.)……18

Şekil 2.2. Bitkilere Cd stresi verilmesi (BioRender.com'da hazırlanmıştır)…….……...20

Şekil 2.3. ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer-Perkin Elmer Optima 7000 DV) cihazı……..….....22

Şekil 2.4. Sıvı azot varlığında bitki yapraklarının mekanik parçalanmasının sağlanması ……...……26

Şekil 2.5. Agaroz jel hazırlandıktan sonra PZR ürünlerinin jele yüklenmesi, elektroforez aşaması ve DNA bantlarının fotoğraflanması (BioRender.com'da hazırlanmıştır)..……29

Şekil 2.6. Agaroz jel elektroforezi öncesinde örneklerin yüklenmesi……..…….29

Şekil 3.1. Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi uygulanan arpa bitkilerinde yaprak ortalama uzunluğu (cm) değerlerinde izlenedeğişim……...33

Şekil 3.2. Uygulanan Cd stresinin şiddetine bağlı olarak arpa bitkilerinde yaprak ortalama eni (mm) değerlerinde izlenen değişim……...….....33

Şekil 3.3. Uygulanan Cd stresinin şiddetine bağlı olarak arpa bitkilerinde ortalalama yaprak yüzey alanı (cm^2) değerlerinde izlenen değişim…..…….....34

Şekil 3.4. Uygulanan Cd stresinin şiddetine bağlı olarak arpa bitkilerinde bitkilerinde yaprak yaş ve kuru ortalama ağırlık (g) değerlerinde izlenen değişim…….34

Şekil 3.5. Uygulanan Cd stresinin şiddetine bağlı olarak arpa bitkilerinin yapraklarında

ortalama toplam klorofil miktarlarında (mg m^{-2}) izlenen değişim…….……35

Şekil 3.6. Uygulanan Cd stresinin şiddetine bağlı olarak buğday (*Triticum aestivum* L.) bitkilerinde yaprak ortalama uzunluk (cm) değerlerinde izlenen değişim…….....36

Şekil 3.7. Uygulanan Cd stresinin şiddetine bağlı olarak buğday bitkilerinde yaprak ortalama eni (mm) değerlerinde izlenen değişim……..36

Şekil 3.8. Uygulanan Cd stresinin şiddetine bağlı olarak buğday bitkilerinde yaprak ortalama yüzey alanı (cm^2) değerlerinde izlenen değişim……...…....37

Şekil 3.9. Uygulanan Cd stresinin şiddetine bağlı olarak buğday bitkilerinde yaprak yaş ve kuru ağırlık (g) ortalama değerlerinde izlenen değişim…...…….37

Şekil 3.10. Uygulanan Cd stresinin şiddetine bağlı olarak buğday bitkilerinin yapraklarında ortalama toplam klorofil miktarlarında (mg m^{-2}) izlenen değişim……...……..38

Şekil 3.11. Arpa bitkilerinde ISSR-UBC835 primerlerinin kullanılmasıyla yapılan PZR reaksiyonları sonucunda çoğaltılan DNA bölgelerinin jel görüntüleri. Not: (a) bant yoğunluğunda artış, (b) bant yoğunluğunda azalış, (c) yeni bant oluşumu, (d) bant kaybı……..……...…...44

Şekil 3.12. Arpa bitkilerinde ISSR-UBC841 primerlerinin kullanılmasıyla yapılan PZR reaksiyonları sonucunda çoğaltılan DNA bölgelerinin jel görüntüleri. Not: (a) bant yoğunluğunda artış, (b) bant yoğunluğunda azalış, (c) yeni bant oluşumu, (d) bant kaybı..……...……...45

Şekil 3.13. Arpa bitkilerinde ISSR-UBC842 primerlerinin kullanılmasıyla yapılan PZR reaksiyonları sonucunda çoğaltılan DNA bölgelerinin jel görüntüleri. Not: (a) bant yoğunluğunda artış, (b) bant yoğunluğunda azalış, (c) yeni bant oluşumu, (d) bant kaybı..……...…...45

Şekil 3.14. Arpa örnekleri için hesaplanan genomik kararlılık yüzde değerleri…...……48

Şekil 3.15. Buğday bitkilerinde ISSR-UBC826 primerlerinin kullanılmasıyla yapılan PZR reaksiyonları sonucunda çoğaltılan DNA bölgelerinin jel görüntüleri. Not: (a) bant yoğunluğunda artış, (b) bant yoğunluğunda azalış, (c) yeni bant oluşumu, (d) bant

kaybı…….……...50

Şekil 3.16. Buğday bitkilerinde yapılan ISSR-UBC835 primerlerinin kullanılmasıyla yapılan PZR reaksiyonları sonucunda çoğaltılan DNA bölgelerinin jel görüntüleri. Not: (a) bant yoğunluğunda artış, (b) bant yoğunluğunda azalış, (c) yeni bant oluşumu, (d) bant kaybı.……..….50

Şekil 3.17. Buğday bitkilerinde ISSR- UBC842 primerlerinin kullanılmasıyla yapılan PZR reaksiyonları sonucunda çoğaltılan DNA bölgelerinin jel görüntüleri. Not: (a) bant yoğunluğunda artış, (b) bant yoğunluğunda azalış, (c) yeni bant oluşumu, (d) bant kaybı.……...……....51

Şekil 3.18. Buğday örnekleri için hesaplanan genomik kararlılık yüzde değerleri…....54

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Laboratuvarda kullanılan cihaz listesi……15

Tablo 2.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal listesi……...16

Tablo 2.3. Arpa ve buğday hakkında sistematik bilgi……..17

Tablo 2.4. Hoagland için gereken stok solüsyonlarının içeriği ve hazırlanışı (Hoagland ve Arnon, 1950)……...……18

Tablo 2.5. Hoagland çözeltisinin hazırlanışı (Hoagland ve Arnon, 1950)……...20

Tablo 2.6. CTAB stok çözeltisinin içeriği ve hazırlanışı……..23

Tablo 2.7. 24:1 Kloroform/Oktanol çözeltisinin içeriği ve hazırlanışı…….23

Tablo 2.8. Modifiye CTAB yöntemi ile genomik DNA izolasyonunun aşamaları (Şekiller BioRender.com'da hazırlanmıştır.)……..…...24

Tablo 2.9. PZR protokolü ve PZR döngü şartları…….27

Tablo 2.10. Çalışmada kullanılan primerlerin listesi……...28

Tablo 3.1. Buğday ve arpa yapraklarındaki kadmiyum (Cd) akümülasyon aralıkları…31

Tablo 3.2. Arpa bitkilerinin belirlenen büyüme ve gelişme parametrelerine ait sonuçları…….……..32

Tablo 3.3. Buğday bitkilerinin baz alınan büyüme ve gelişme parametrelerine ait sonuçları……...…35

Tablo 3.4. Arpa bitkisinin kontrol ve deney gruplarında ISSR (UBC835, UBC841 ve UBC842) primerleri kullanılarak elde edilen bantların büyüklükleri ve yoğunlukları.……..……..46

Tablo 3.5. Arpa bitkilerinde, ISSR (UBC835, UBC841 ve UBC842) primerleri kullanılarak kontrol grubunda elde edilen bantlara göre, deney gruplarında gözlenen bant değişiklikleri. Not: (+) bant yoğunluğundaki artış yüzdesi, (-) bant yoğunluğundaki azalış yüzdesi...……...…….……..47

Tablo 3.6. Buğday bitkisinin kontrol ve deney gruplarında ISSR (UBC826, UBC835 ve

UBC842) primerleri kullanılarak elde edilen bantların büyüklükleri ve yoğunlukları.……..…..51

Tablo 3.7. Buğday bitkilerinde, ISSR (UBC826, UBC835 ve UBC842) primerleri kullanılarak kontrol grubunda elde edilen bantlara göre, deney gruplarında gözlenen bant değişiklikleri....……...……...….…….52

1. GİRİŞ

İnsanların tarih öncesi dönemde avcı-toplayıcı toplumdan tarım toplumuna evrilmesi, beraberinde köklü sosyo-ekonomik değişimleri getirmiştir. Tarım devrimiyle beraber göçebe hayat tarzından yerleşik düzene geçen insan toplulukları yaşadıkları ekosistemi, önceki duruma göre çok daha fazla etkiler ve değiştirir hale gelmiştir.

18. yüzyılda İngiltere'den başlayarak dünyaya yayılan ve yeni sosyo-ekonomik değişimleri beraberinde getiren sanayi devrimi, kömür gibi farklı hammadde ve enerji kaynaklarının yoğun bir şekilde kullanılmasını gerektirmiştir. Sanayi devrimi sonrasında artan kentleşme tarımsal alanları sınırlandırmış, teknolojik gelişim ise endüstriyel üretimin yanında üretim sonucu oluşan atık miktarında da ciddi bir artışa sebep olmuştur. Sonuçta tarımsal alanlar zaman içerisinde giderek daha büyük miktarda ve daha fazla çeşitte kirleticilere maruz kalmıştır.

Kirlilik geçmişten günümüze insanlar ve diğer canlılar için büyük bir sorun oluşturmuş, sonuçta ekosistemlerin çökmesine, salgın hastalıklara ve tarih boyunca milyonlarca canlının ölümüne sebep olmuştur. Çevre kirliliğinin diğer bir etkisi de tarımda verim kayıplarına ve besin içeriklerinde olumsuz değişimlere sebep olmasıdır.

Çevre kirliliğinin bitkiler üzerindeki olumsuz etkileri morfolojik ve biyokimyasal düzeyde olabildiği gibi nükleik asitler düzeyinde (genotoksik) de gerçekleşebilmektedir. Genotoksik etkilerin oluşmasında ağır metal kirliliğinin önemli bir yere sahip olduğu bilinmektedir. Ağır metal kirliliği toprak, hava ve su habitatlarının üçünde de gözlenebilmektedir. Normal şartlarda pek çok toprak kirleticisi biyolojik ayrışma ile ortadan kaldırılabilirken ağır metaller, daha küçük moleküllere ayrışmadıkları için, bitki tarafından alındıktan sonra zararsız formlara dönüştürülemeden besin zincirine direkt olarak katılarak zincirin üst halkalarını da olumsuz etkilemektedir. Bu bağlamda ağır metallerin bitkilere verdikleri zararlar sadece kontaminasyona uğrayan bitkiler ile sınırlı kalmayıp, ağır metallerle kontamine bitkiler ile beslenen insan ve diğer canlıları da doğrudan ya da dolaylı olarak etkilemektedir. Sonuçta besin piramidinin üst basamaklarına doğru gidildikçe canlıların vücutlarında artan miktarlarda biriken ağır metaller, çeşitli sağlık sorunlarına sebep olmaktadır. Canlı öldükten sonra da madde döngüsüne tekrar katılan ağır metaller benzer süreçlerin yeniden yaşanmasına sebep

olmaktadır.

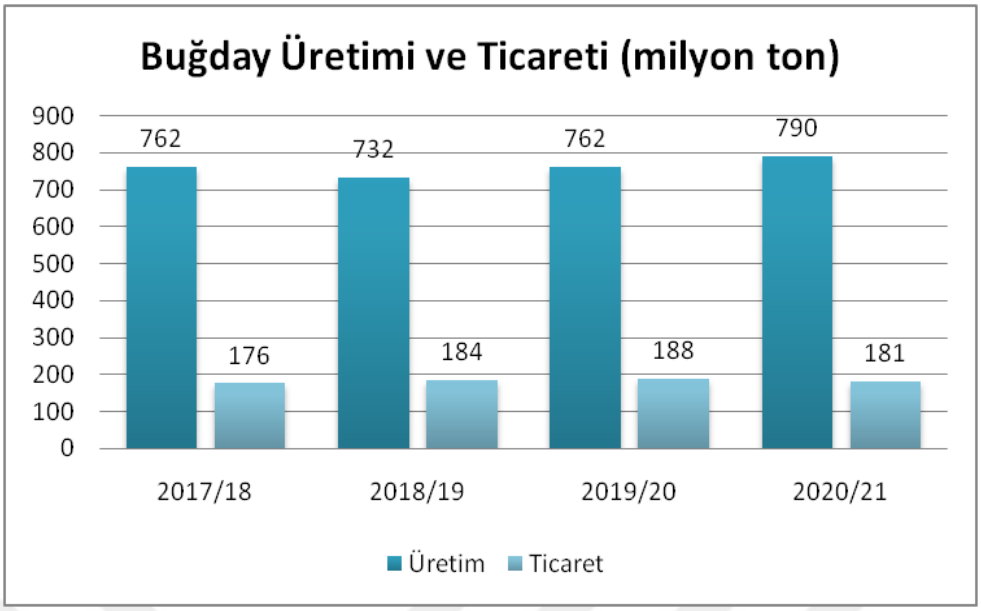
Buğday (*Triticum aestivum* L.) ve arpa (*Hordeum vulgare* L.) bitkileri gerek insanların beslenme ihtiyacını karşılamak amacıyla, gerekse hayvan yemi olarak üretilen ve tüketilen bitki türleridir ve dünya tahıl üretiminde en üst sıralarda yer almaktadır. Ancak dünya genelinde artmakta olan ağır metal kirliliği, belirtilen her iki bitkiyi ve bu bitkilerle beslenen canlıları olumsuz etkilemektedir.

1.1. Buğday ve Arpa Bitkilerinin Önemi

Tahıllar yaklaşık MÖ 17.000 yılından itibaren doğadan toplanmaya başlanmıştır (Tanno ve Willcox, 2006; Atar, 2017). Fakat günümüzde kültüre alınarak tüketilmektedir. Buğday ve arpa bitkileri tarımda önemli yer tutan ve tüketimde önemli paya sahip olan bitki türleridir. Buğday daha çok ekmeklik ve veya makarnalık türleri ile insan tüketiminde kullanılırken arpa, dünya genelinde hayvan yemi olarak daha çok tüketilmekte (üretimin %75'i); malt içeceği veya bira yapımında da kullanılabilmektedir (Üretimin %20'si). Mısır, Çin, Bereketli Hilal, Etiyopya, Asya ve Avrupa gibi dünyanın geniş bölgelerindeki birçok eski uygarlıkta önemli bir sürdürülebilir gıda tahılı olduğu kanıtlananan arpanın genele bakıldığında toplam arpa üretimi %10'dan daha az miktarda (son yıllarda yaklaşık %2'si doğrudan) insan tüketimde kullanılmakta olduğu görülmekte ve özellikle Asya ve Kuzey Afrika'daki bazı kültürler için hala önemli bir besin kaynağı olarak kaldığı bilinmektedir (Newman ve Newman, 2006)

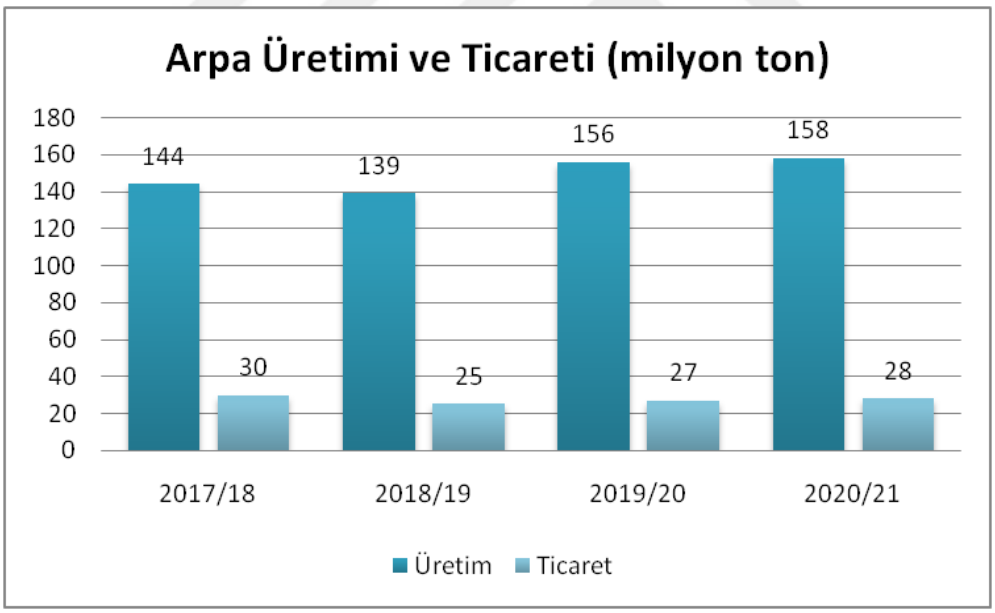
Buğday, dünyada ekim alanı en fazla olan ve dünya nüfusunun 1/3'ünün besinlerden aldığı kalorinin %50'den fazlasını, proteinin ise yaklaşık yarısını karşılayan stratejik bir bitki türüdür (Pordel ve ark., 2019).

Toprak Mahsülleri Ofisi (TMO)'nin 15 Mart 2021 tarihli Dünya Hububat ve Bakliyat Raporu'nda hububatların ekilişleri ve üretimleri değerlendirilmiştir. Rapora göre dünya genelinde buğday üretimi 2020/21 döneminde öncekine göre %1,4 artarak 773 milyon tona ulaşmıştır. Buğdaydaki bu artış ile elde edilen üretim değeri son birkaç yılda kaydedilmiş olan en yüksek üretim miktarına ulaşmıştır. Ayrıca gıda ve yem olarak tüketilen buğdayın tüketim miktarı da %2 oranında artış göstererek 756 milyon ton olmuştur. Üretimdeki artışın, ilerleyen yıllarda da artan talep ile beraber daha da yükseleceği öngörülmektedir.



Şekil 1.1. Dünya buğday üretimi ve ticareti (milyon ton) (TMO, 2021).

Aynı rapora (Dünya Hububat ve Bakliyat Raporu) göre, 2020/21 dönemi arpa üretimi önceki yıllara göre rekor seviyede artış gösterdiği bildirilmiştir (TMO, 2021).



Şekil 1.2. Dünya arpa üretimi ve ticareti (milyon ton) (TMO, 2021).

Dünya buğday ve arpa üretimi ve ticareti verileri **(Şekil 1.1 ve Şekil 1.2)** incelendiğinde, buğday daha fazla olmakla birlikte her iki bitki türünün de üretim ve ticarette önemli bir paya sahip olduğu görülmektedir.

1.2. Bitkilerde Stres Faktörleri ve Etkileri

Bitkiler sesil yaşamalarından dolayı çevresel şartların negatif etkilerinden gelişimlerini olumsuz yönde etkileyen durumlara direkt olarak maruz kalmaktadırlar. Bitkilerin gelişimini olumsuz etkileyen faktörlere "stres faktörü" adı verilmektedir (Buyuk, Soydam ve Aydın Aras; 2012). Bitkiler yaşamları boyunca çeşitli stres faktörleri ile karşı karşıya kalabilmektedirler. Bakteri, virüs ve mantar gibi patojen organizmalardan kaynaklanan enfeksiyonlar biyotik stres faktörleri; düşük sıcaklık, tuzluluk, kuraklık, su taşkını, oksidatif stres ve ağır metallere maruz kalma abiyotik stres faktörleri olarak adlandırılmaktadır (Teklic ve ark., 2021). Stres faktörlerinin özellikle bitkisel verimde önemli kayıplara sebep olduğu bilinmektedir (Gupta ve ark., 2020).

Stres faktörlerine karşı verilen tepki bitkinin türüne, adaptasyon ve tolerans yeteneğine bağlıdır (Yavas ve Ilker, 2020). Transkripsiyon faktörü (TF) genler, çeşitli strese maruz kalan bitkilerin minimum hasarla veya hiç hasar almadan metabolik ve fizyolojik faaliyetlerini devam ettirebilmeleri için regülasyon görevi yapmaktadırlar. Transkripsiyon faktörlerinden olan NPR geni, bitkilerde özellikle abiyotik strese karşı regülasyondan sorumludur (Açar ve Kaçar,2021).

1.2.1. Ağır metaller

Ağır metal terimi, 5 g/cm^3'ten daha fazla özkütleye sahip metaller için kullanılan bir ifadedir. Kadmiyum (Cd), nikel (Ni), demir (Fe), krom (Cr), bakır (Cu), civa (Hg) ve çinko (Zn) gibi 60'tan fazla ağır metal bulunmaktadır (Okcu ve ark., 2009). Ağır metaller, çevresel kirliliğe sebep olan ve toksisite etkisi yüksek kirleticiler olarak tanımlanmaktadırlar (Duffus, 2002). Ağır metaller düşük konsantrasyonda bile toksik etkilerini gösterebilmektedir (Yerli ve ark., 2020).

Çoğu ağır metal bitki gelişimi için esansiyel element olmadığından, toprakta bulunmamaları bitkilerde herhangi bir patolojiye sebep olmamaktadır. Aksine ağır metallerin toprakta bulunması, bitkiler tarafından toksik ağır metal alımı ve bitki bünyesinde birikiminin, bitkinin normal gelişiminin durduğu dönemlerde dahi devam etmesine ve zamanla toksik etkinin gözlenmesine sebep olmaktadır. Bu nedenle, ağır metaller için "potansiyel toksik elementler (PTE)" tanımı da kullanılmaktadır (Soydam Eker, 2020; Wei ve Cen, 2020; Fural ve Kukrer 2021). Ağır metallerin çoğu, bitkilerdeki

birikimleri sırasında kendilerine ait toksisite belirtileri yerine bir başka elementin belirtilerini, çoğunlukla eksikliğini, taklit etmektedir (Kalinbacak ve ark., 2012).

Hızlı endüstriyel gelişmenin sonucu olarak ortaya çıkan ağır metal kirliliğinin Çin'de tarım topraklarında %82,4 oranında kontaminasyona sebep olduğu tahmin edilmektedir (Zhao ve ark., 2015). Ağır metallerin çevreye yayılmasına sebep olan birçok etmen bulunmakla beraber bunlardan bazıları tarımda yoğun olarak kullanılan gübre, pestisit ve herbisitlerdir (Öktüren-Asri ve Sönmez, 2006; Yenial ve Bulut, 2019).

Toprakta bulunan her ağır metal bitkiye zarar vermemektedir. Örneğin topraktaki ağır metallerden olan çinko (Zn), mangan (Mn), kobalt (Co), bakır (Cu), nikel (Ni) ve Molibden (Mo) bitki gelişimi için esansiyel elementler arasındadır. Buna karşın alüminyum (Al), vanadyum (V), argon (Ar), civa (Hg), kurşun (Pb), selenyum (Se) ve kadmiyum (Cd) elementleri bitki için esansiyel elementler olmayıp bitkilerde toksik etkiye sebep olmaktadırlar (Acir ve Erdem, 2020).

Doğal olarak filtre edici özelliği sayesinde toprak, ağır metaller için son depolanma yeri olabilmektedir. Toprağın tamponlama kapasitesi de büyük önem taşımaktadır. Toprakta yeterli oranda negatif yük bulunmaması durumunda ağır metaller toprak çözeltisinde serbest halde bulunmakta, sonuçta toprakta yaşayan mikroorganizmalar ve bitki kökleri tarafından alınabilmektedir. Bunun dışında ağır metaller, toprakta yıkanarak yer altı suyuna da karışabilmektedir. Ağır metallerle kontamine olmuş yer altı suları ile sulanan bitkiler, bu bitkilerle beslenen hayvanlar ve insanların, vücutlarındaki ağır metal birikimine bağlı sağlık sorunları yaşadığı daha önce birçok çalışmada belirtilmiştir (Yıldız, 2001; Ozkutlu ve ark., 2009; Rizwan ve ark., 2012; ur Rehman ve ark., 2017; Korkmaz ve ark., 2017; Korkmaz ve ark., 2018; Acir ve Erdem, 2020).

Bitkilerin bünyelerine toksik özellik gösteren ağır metalleri almaları ve bunları dokularında yüksek konsantrasyonlarda biriktirmeleri sonucunda, bitkide artan total ağır metal yüküne bağlı olarak, vejetatif ve generatif organlarda zararlı etki göstermesine sebep olmaktadır (Gür ve ark., 2004; Dere, 2017).

Ağır metaller lipid peroksidasyonuna sebep olarak hücre membranının yapısını ve işleyişini bozabilmektedir (Luna ve ark. 1994). Bunun yanında elde edilecek ürün ve verim değerleri de olumsuz etkilenmektedir (Long ve ark. 2002). Dünya genelinde mahsul üretiminde önemli tehdit unsurlarından birisi tarım topraklarının ağır metallerle

kontaminasyonudur (Adrees ve ark., 2015a; Ali ve ark., 2015; Habiba ve ark., 2015; Rizwan ve ark., 2016a). Ağır metallerin bitki bünyesinde aşırı birikmesi, abiyotik stres faktörleri başlığında incelenmektedir ve tahmin edileceği üzere bitkilerde strese sebep olmaktadır (Farooq ve ark., 2008). Bitki yapraklarında ağır metal birikimi diğer abiyotik stres faktörlerinde de görüldüğü üzere dolaylı olarak fotosentezi azaltmakta ve stomaların işleyişini etkileyerek terleme miktarında değişikliğe sebep olmaktadır (Chandra ve Kang, 2016).

Ağır metal toksisitesine karşı bitkilerin gösterdikleri toleranslar elementin çeşidine, bitkinin türüne, strese maruz kalma süresine ve strese maruz kalan doku veya organın yapısına bağlı olarak değişmektedir (Stresty ve Madhava Rao, 1999).

Bitkilerin ağır metallere duyarlılığı veya dirençliliği birbiriyle ilişkili çeşitli fizyolojik ve moleküler mekanizmaların bir sonucudur: **(i)** Hücre dışı eksüdaların (salgı) ve hücre duvarı bileşenlerinin bağlanması yoluyla metallerin hücre içine alınması ve hücrede birikmesi; **(ii)** Sitoplazmadan ekstra-nükleer bölmelere, vakuoller dahil olmak üzere, ağır metallerin akışı; **(iii)** Organik asitler, amino asitler, fitoşelatinler ve metallotiyoneinler gibi çeşitli maddelerin hücre içindeki ağır metal iyonları ile kompleksleş oluşturması; **(iv)** Ozmolitler ve ozmoproteinlerin birikmesi ve antioksidan enzimlerin uyarılması; ve **(v)** Metabolik yolların yeterli işleyişine ve hasarlı hücre yapılarının hızlı onarımına izin vermek için bitki metabolizmasının aktivasyonu veya modifikasyonu (Cho ve ark., 2003; Chandra ve Kang, 2016).

1.2.1.1. Kadmiyum (Cd)

Kadmiyum (Cd) elementi 1817 yılında Alman araştırmacı Stromeyer tarafından keşfedilmiştir. Cd periyodik cetvelde II-B grubunda bulanan bir geçiş elementi olup periyodik cetvelin 48. elemanıdır. Cd küresel otoritelerce tanımlanan 126 çevre kirleticisi arasında yer almakta ve ağır metaller arasında suda çözünme özelliği en yüksek olanıdır (Kahvecioğlu, 2003). Cd en ekotoksik metallerden biri olmasının yanı sıra, insanların, bitkilerin ve hayvanların biyolojik süreçlerini olumsuz etkileyebilmektedir (Kabata-Pendias, 2011). Cd'un toprakta en çok bulunan ağır metallerden olduğu ve düşük konsantrasyonunda (0,001-0,1 ppm) bile toksisitesinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Singh ve ark., 2009; Wauna ve Oksimen, 2011).

Kimyasal maddeler, karsinojenik etki risklerine göre uluslararası kanser araştırma otoriteleri tarafından beş gruba ayırmıştır. Cd özellikle akciğer kanseri riski oluşturmakta ve insan için Karsinojenik Etkili Maddeler arasında Grup 1'de yer almaktadır (IARC, 2019; Shi ve ark., 2020).

Cd'un rapor edilmiş bilinen biyolojik bir fonksiyonu bulunmamaktadır. (Marschner, 2008). Bunun aksine, yapılan çalışmalar daha çok kadmiyumun sebep olduğu olumsuz biyolojik etkiler üzerinedir. Bu etkilerin ortaya çıkmasında öncelikle ele alınması gereken konu Cd'un toprağa bulaşma yollarıdır. Cd'un toprağa kontaminasyonu çeşitli yollarla olabilmektedir. Doğal olarak bulunmayan Cd'un topraklara girişi özellikle antropojenik kaynaklı olmakla beraber endüstriyel faaliyetler ve bu faaliyetler sonucunda ortaya çıkan sanayi atıkları, kimyasal gübreleme (özellikle tarımsal üretimde yaygın kullanım alanı edinen fosforlu gübreler), pestisit veya herbisit kullanımı, lağım atıkları, maden ocakları, fosil yakıt kullanımı bu yollardan birkaçıdır (Sondalina ve ark., 2001; Mataka ve ark., 2006; Liu ve ark., 2010a; Kılıç ve Korkmaz 2012; Rizwan ve ark., 2016; Yu et al., 2016).

Cd hareketli bir elementtir ve toprakta düşük konsantrasyonlarda bulunsa bile bitkiler tarafından kolayca emilerek dokularında birikebilmektedir (Hadi ve ark., 2014; Acir ve Erdem 2020). Bitkilerde yüksek miktarda biriken Cd sebebiyle bitkinin büyümesi azalmakta veya durmaktadır (Abu-Muriefah, 2008; Qureshi ve ark., 2010; Zheng ve ark., 2010). Cd toksisitesinin morfolojik özellikleri değiştirerek ve mitotik indeksi azaltarak bitki büyümesini ve gelişimini olumsuz yönde etkileyebileceği ve bunun da mahsul veriminde önemli bir azalmaya yol açabileceği bildirilmiştir (Wu ve ark., 2007; Souza ve ark., 2011; Tran ve Popova 2013).

Topraktaki Cd bitki kökleri tarafından alındıktan sonra iyon halinde gövde ve yapraklara taşınmaktadır. Bitkiler tarafından alınan Cd, bitki türüne göre değişiklik göstermekle birlikte, bitkilerin yenilebilir kısımlarına taşınabilir (Alexander ve ark., 2006).

Cd bitkilerde birçok fizyolojik değişikliğe sebep olmaktadır. Bu fizyolojik değişikler arasında, bitki bünyesindeki azot ve karbonhidrat metabolizmalarının aktivitesini değiştirmesi (Asri, Sonmez ve Çıtak, 2007), stomaların kapanmasına neden olarak terleme ile su kaybını azaltması ve klorofil sentezinde görevli olan enzimlerin inhibisyonuna sebep olarak klorofil biyosentezinin bozulması, hücre zarlarının geçirgenliğinin değişmesi yer almaktadır (Sheoran ve ark., 1990; Ouzounidou, 1995;

Prasad, 2005; Hocaoglu-Ozyigit ve Genc, 2020).

Ayrıca Cd kaynaklı, bitkilerde büyüme inhibisyonu, yaprak klorozu, mineral beslenme alımının dengesizliği, lipid peroksidasyonunun indüksiyonu, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi, hücresel hasar ve enzimatik aktivitelerin inhibisyonu gibi çeşitli bozukluklar da meydana gelebilmektedir (Pérez-Chaca ve ark. 2014; Chu ve ark., 2020). Bitkiler, bu etkilerin üstesinden gelmek ve çeşitli enzimlerin (süperoksit dismutaz, katalaz ve askorbat peroksidaz) yanı sıra glutatyon ve askorbat gibi temel metabolitlerin etkisiyle redoks dengesini sağlamak amacıyla hücresel bir antioksidan savunma sistemi kullanmaktadır (Loix ve ark. 2017). Cd'a yüksek seviyelerde maruz kalan bitkilerde ayrıca mitoz bozuklukları ve mutajenik etkiler görülebilmektedir (Al Khateeb ve Al-Qawasmeh 2014). Yüksek Cd seviyeleri, bitkilerin ölmelerine sebep olabilmektedir. (Ci ve ark., 2009; Rizwan ve ark., 2016b)

Cd bitkilerde toksisiteye neden olan bir ağır metal olarak ifade edilmektedir (Al Qurainy ve ark., 2017). Cd, toksik etkisi sonucunda biyoelementlerle (Zn, Cu, Fe, Mn, Se, Ca, Mg) etkileşime geçmektedir (Đukić-Ćosić ve ark., 2020). Cd kaynaklı DNA onarım inhibisyon mekanizması, fonksiyonel olmayan enzimin oluşumuyla sonuçlanan Zn parmak proteinleri ailesinde Zn'nin Cd ile değiştirilmesi yoluyla gerçekleşir (Tan ve ark. 2019). Cd'un P, K ve Mg gibi birçok elementin absorpsiyonunu, taşınmasını ve kullanımını engellediği kanıtlanmıştır (Das ve ark., 1997). Cd, toprakta bulunan mineraller üzerindeki etkileri sonucunda bitkiler tarafından minerallerin emilimini de değiştirebilmektedir (Moreno ve ark., 1999). Ayrıca kadmiyumun canlılardaki fazlalığının Ca, Fe, Cr, Zn gibi bazı elementlerin eksikliğine yol açtığı ve protein açısından yetersiz beslenmeye sebep olduğu bildirilmiştir (Bergeron ve Jumarge, 2006). Dokularında 3 mg kg^{-1}'dan fazla Cd içeren bitkileri düzenli olarak tüketen insanlarda Cd kaynaklı toksik etkiler görülebilmektedir (Alloway, 1995; Ozkutlu, 2021). Cd ile kontamine gıda, gıda zinciri yoluyla insanlara Cd girişinin ana kaynağıdır (Huang ve ark., 2008; Dai ve ark., 2012). Yüksek miktarda Cd biriktirebilen çeşitli gıda kaynakları ile beslenen insanlar vücutlarına aldıkları Cd sonucunda akciğer, böbrek ve karaciğer gibi organlarda çeşitli hastalıklara yakalanabilmekte ve Itai-Itai hastalığı dahil olmak üzere ciddi sağlık sorunlarına maruz kalmaktadırlar (Ohta ve ark., 2000; Inaba ve ark., 2005; Satarug ve ark., 2010; Liu ve ark., 2015) Cd toksisitesinin ayrıca prostat ve akciğer kanserine sebep olduğu görülmüştür (Person ve ark., 2013). İnsan üreme sistemi üzerine

yapılan bazı çalışmalarda, Cd'un plasenta için toksik olduğu ve plasentaya zarar vererek erken doğuma sebep olduğu görülmüştür (Erboga ve Kenter, 2016; Zhang ve ark., 2016; Geng ve Wang, 2019). Ayrıca memeli erkek üreme sistemiyle ilgili yapılan çalışmalarda testislerin de Cd toksisitesine karşı hassas olduğu ve sperm hareketi ile spermatogeneze negatif etkisi olduğu, kronik duruma geldiğinde ise erkeklerde kısırlığa sebep olduğu anlaşılmıştır (Acosta ve ark., 2016; Imafidon ve ark., 2016; Nna ve ark., 2017; Habib ve ark., 2019).

1.3. Genotoksik Etki (Genotoksisite)

Genotoksisite, bir fiziksel veya kimyasal ajanın DNA hasarını indükleme potansiyelini tanımlamaktadır (Deutschle ve ark. 2006). Kısaca, toksik maddelere maruz kalan canlıların genomlarında meydana gelen değişimler olarak ifade edilebilir. Genotoksik etki, çevresel etkenler veya kimyasallara belirli bir dozda maruz kalma sonucu meydana gelmektedir (Khanna ve Sharma, 2013). Genotoksisite alanında yapılan ilk çalışma X-ışınlarının *Drosophila'*da sebep olduğu mutasyonların saptandığı çalışmadır (Muller, 1927). Genotoksisite sonucunda genomik kararlılıkta değişimler meydana gelebilmektedir (Barlow ve ark., 2006; Factori ve ark., 2014).

Ağır metallerin sebep olabileceği genotoksik etkiler sonucunda DNA'da çift ve tek zincir kırıkları, mikronükleus oluşumu (MN), DNA onarım mekanizması bozuklukları, nükleotid düzeyinde kayıp veya eklenmeler, gen duplikasyonları, çerçeve kayması, fenotipik değişiklikler gibi durumlar ortaya çıkabilmektedir (Waisberg ve ark., 2003; Marple ve ark., 2004). Ayrıca, ağır metaller gibi genotoksik ajanlar, kansere yol açma potansiyeline sahiptir (Butterworth, 2006; Factori ve ark., 2014).

1.4. Belirteçler (Markörler)

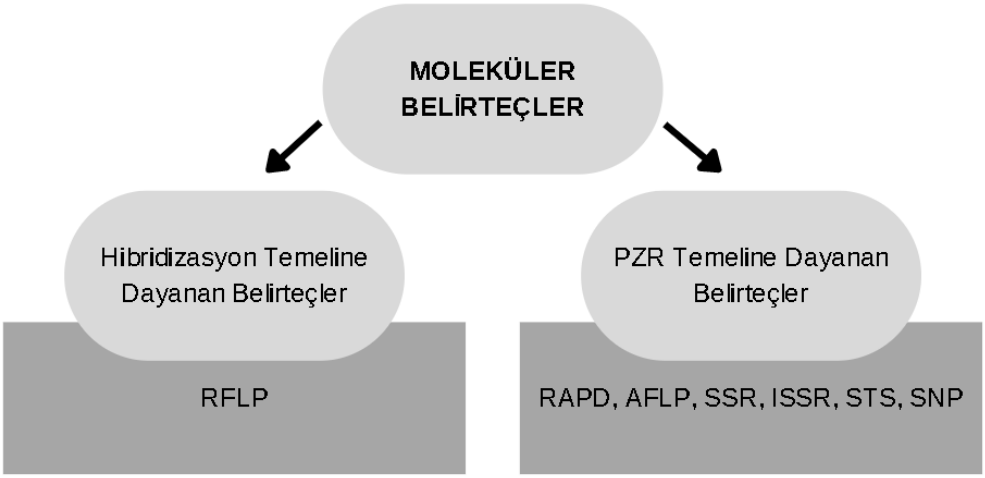
Belirteç sistemleri sayesinde bir genotipi diğerlerinden ayırmak mümkün olmaktadır. Genomun özgün bir bölgesini tanımlamak amacıyla birçok belirteç (markör) sistemi kullanılmaktadır (Liu ve ark., 1998). Moleküler çalışmalarda 4 farklı belirteç çeşidi bulunmaktadır. Bunlar: morfolojik, sitolojik (G, Q ve R bantları gibi), biyokimyasal ve DNA (moleküler veya genetik) belirteçlerdir (Baydar, 2020).

Aşağıda belirteç sistemleri hakkında bilgi verilmiştir (Liu ve ark., 1998; Ozsensoy ve Kurar, 2012; Baydar, 2020).

- **Morfolojik Belirteçler:** Genetik olarak bir ya da birkaç gen tarafından kontrol edilen fenolojik markörlerdir. Özgün karakterleri kodlayan genlerin kromozom üzerindeki yerlerinin tanınmasını sağlar ve gözlenmesi kolaydır. Bunun yanında allel sayıları nispeten az olmakla beraber kantitatif karakterlerle ilgili çalışmalarda sınırlıdır.
- **Sitolojik Belirteçler:** Kromozom boyutu, biçimi ve pozisyonu ile ilgili markörlerdir. Ayrıca bantlanma düzenlerindeki değişikliklerle de ilgilidir. Varyasyonları için ökromatin ve heterokromatin dağılımındaki farklılıklardan yararlanılmaktadır. Sitolojik markörlerden fiziksel haritalamalarda, kromozomunun normal veya mutasyonlu olmasının tespitinde ve bağlantı gruplarının tanımlanmasında kullanılmaktadır.
- **Biyokimyasal Belirteçler:** Farklı genler tarafından üretilen aynı enzimlerden, izoenzimler, veya depo proteinlerden yararlanılarak kullanılan genetik markör çeşididir. Proteinlerde polimorfizmin nispeten düşük olmasından kaynaklı fazla iş yükü ve uzun zaman gerektirir (Kurar, 2001). İzoenzimin genetik belirteç olarak kullanılabilmesinin ön koşulu da polimorfizm yaratmaktır.
- **Moleküler Belirteçler:** Genomda herhangi bir gen bölgesi ile ilişkili DNA fragmentleridir. Çevresel faktörlerden ve bitki gelişim evrelerinden etkilenmediği için oldukça güvenilirdir.

1.4.1. Moleküler belirteçler

Günümüze kadar çeşitli moleküler belirteç sınıfları geliştirilerek birçok amaç için kullanılmıştır. Moleküler belirteçler, *in vitro* bitki araştırmalarında sıklıkla yararlanılan bir araçlardır (Silva ve ark., 2007).



Şekil 1.3. Moleküler belirteçlerin sınıflandırılması

Hibridizasyon tekniği, Charles Sibley ve Jon Ahlquist tarafından geliştirilmiş ve ilk olarak kuş ve primatlarda filogenetik ağaçların sınıflandırılmasında kullanılmıştır. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism-Kesilen Parça Uzunluğu Polimorfizmi); Prob DNA adı verilen etiketlenmiş DNA parçasının bir başka DNA ile benzer nükleotit dizilerinin melezlenmesi işlemine dayanmaktadır. 4-6 nükleotit tanıma özelliği bulunan restriksiyon enzimleri ile belirlikli büyüklükte kesilen DNA elektroforez sonrasında büyüklüklere göre sıralandıktan sonra naylon filtrelere transfer edilir. Naylon filtrelerde radyoaktif ve radyoaktif olmayan uygulamalar yapılır. Prob DNA parçası ile filtre üzerindeki DNA parçasının aynı olması neticesinde prob DNA kendisi ile benzer diziye sahip olan parça üzerine yapışır. Filtreye X-ışını filmi uygulanarak otoradyogram ile polimorfizm gözlenir. RFLP belirteçleri yüksek polimorfizm göstermesi ve kodominant özelliklik taşıması, ayrıca tekrarlanabilirliğinin yüksek olması özellikleri sebebiyle tercih edilen bu metot için analizde yeterli DNA miktarının sağlanması zorunluluğu, iş yükünün fazlalığı, uzun zamanda gerçekleşmesi ve pahalı olması dezavantaj oluşturmaktadır (Baydar, 2020).

Karry Mullis tarafından 1985 yılında genomun özgün bölgelerinin *in vitro* koşullarda çoğaltılabilmesini sağlayan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) keşfinden sonra genetik çalışmalarda; polimorfik özellikleri, uygulama kolaylığı ve diğer belirteçrlere daha ekonomik olmasından dolayı PZR temelli DNA belirteç sistemleri genetik çalışmalarda daha yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Weber and May, 1989; Staub ve ark., 1996; Liu ve ark., 1998). Çok çeşitli PZR temelli moleküler belirteç çeşitleri bulunmakla

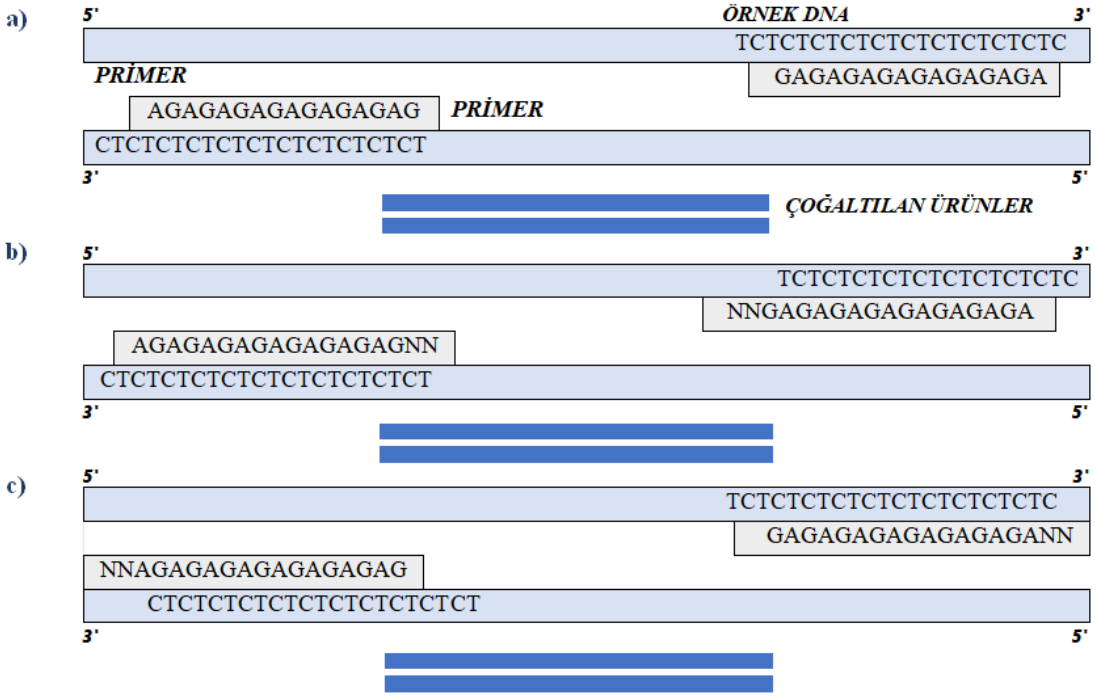
beraber en çok kullanılanlardan bazıları şunlardır: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA-Rastgele çoğaltılan Polimorfik DNA), AFLP (Amplified Frangment Length Polymorphism-Çoğalmış Parça Uzunluk Polimorfizmi), SSR (Simple Sequence Repeats- Basit Sekans Tekrarları veya Mikrosatetellitler), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat-Basit Sekans Tekrarları Arası Polimorfizm), STS (Sequence Tagged Sites-Dizisi Etiketlenmiş Sekanslar), SNP (Single Nucleotide Polymorhism-Tek Nükleotit Polimorfizmi).

1.4.1.1. PZR temeline dayanan belirteçler

DNA düzeyindeki gerçekleşen bazı değişiklikler sitolojik testlerle saptanamamaktadır (Khanna ve ark., 2013). DNA mutasyonları PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tabanlı moleküler belirteçler (RAPD, AFLP, ISSR gibi) kullanılarak belirlenebilir (Sorrentino ve ark., 2017). DNA'da meydana gelen mutasyonlar sonucunda DNA dizisinde ve/veya yapısında ortaya çıkan değişiklikler, PZR sırasında amplifikasyon işlemini doğrudan etkileyeceğinden, PZR sonrasında elektroforezde elde edilecek DNA bant profillerinde değişikliklere sebep olacaktır (Dogan ve ark., 2012; Ozyigit ve ark., 2016). DNA bant profillerinde saptanan değişiklikler ise, genotoksik etkinin değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Moleküler belirteçler ayrıca tahılların ıslah çalışmaları için kolaylıkla uygulanabilen araçlardandır (Vardar-Kanlıtepe ve ark., 2010).

1.4.1.1.1. ISSR primerleri

ISSR moleküler belirteçlerdendir. Moleküler belirteç yöntemleri DNA'daki polimorfik bölgelerin saptanması prensibine dayanmaktadır (Yorgancılar ve ark., 2016). ISSR, hızlı ve kolay uygulanabilen PZR temelli bir yöntemdir. ISSR tekniğinde, 16-25 baz çifti uzunluğundaki dinükleotit, trinükleotit, tetranükleotit veya pentanükleotit tekrarlanan tek çeşit primerin birbirine zıt yönlü ve aynı diziye sahip ISSR bölgelerine bağlanarak bu bölgeler arasında kalan dizinin PZR yardımı ile çoğaltılması sağlanır (Zietkiewicz ve ark., 1994; ve Koc, Filiz 2011; Wahabi ve Bukhari, 2014).



Şekil 1.4. Primerler ve örnek DNA arasındaki olası eşleşmeler. Not: (a) bağlantısız, (b) 3'-bağlantılı ve (c) 5' bağlantılı, (Reddy ve ark., 2002, düzenlenmiştir.).

ISSR tekniğinde primerler genellikle 3' ve 5' uçlarında bulunan mikrosatelit bölgelerine bağlanmaktadır. ISSR bölgeleri genomda farklı noktalarda çoklu kopyalar halinde bulunabilmektedir. Herhangi iki ISSR bölgesi arasındaki dizinin uzunluğu aynı birey içinde ve bireyler arasında değişiklik göstermektedir. Söz konusu farklı ISSR bölgelerinden PZR ile çoğaltılabilecek uzunlukta ara dizi içeren iki ISSR bölgesinin çoğaltılması sağlanmaktadır (Gupta ve ark., 1994; Zietkiewicz ve ark., 1994; Reddy ve ark., 2002). ISSR primerleri yardımı ile çoğaltılan bölgeler genlikle 200-2000 baz çifti uzunluğundadır (Filiz ve Koc, 2011).

PZR temelli diğer belirteçlerin ISSR'a göre bazı dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin RAPD markörleri daha düşük tekraralanbilirlik gösterirken; AFLP belirteçleri yüksek maliyet gerektirir. SSR markörleri ise primer sentezlenebilmesi için sekans bilgisine ihtiyaç duymaktadır (Zietkiewicz ve ark., 1994).

ISSR primerleri, diğer yöntemlerde kullanılan primerlerden daha uzun olduğu için güvenilirliği arttırmakla beraber genom bilgisine ihtiyaç duyulmadan primer dizaynı yapılabilmesine izin vermektedir (Bornet ve Branchard, 2001). DNA'nın mikrosatelit dizilerinde gözlenen varyasyon, diğer DNA kısımlarında gözlenenden önemli ölçüde

yüksektir. Strese sebep olan biyotik ve abiyotik faktörler, ISSR primerlerinin bağlanma bölgelerinde varyasyonu artırırken (Bajpai ve ark., 2015) bir anlamda aynı bölgeyi hedefleyecek şekilde tasarlanan ISSR primerlerinde de çeşitliliği beraberinde getirir.

ISSR primerleri, RAPD primerlerine kıyasla daha uzundur, daha yüksek sıcaklıklarda (45-60 °C) kalıp DNA zincirine bağlanma (annealing) özellliği gösterirler (Reddy ve ark. 2002). Böylelikle PZR şartlarının primer bağlanmasında özgüllüğü artırıcı yönde ayarlanmasını ifade eden "stringency" değerinin nispeten yüksek olması sağlanarak primerlerin DNA'da sadece hedef bölgelere özgül olarak bağlanması daha mümkün hale getirilir.

ISSR belirteçleri, yüksek polimorfik özellikleri nedeniyle, genetik çeşitlilik, genom haritalama, evrimsel biyoloji, filogenetik çalışmalar ve gen etiketleme ile ilgili araştırmalarda da avantajlar sağlamaktadır (Alhasnawi ve ark. 2015; Naik ve ark. 2017; Filiz ve ark. 2018; Sedat-Hosseini ve ark. 2019).

ISSR-PZR analizi, mutasyonel değişikliklerin, özellikle nokta mutasyonlarının araştırılması için kullanılabilmektedir. Bu analiz yöntemi, farklı habitatlardaki ağır metallerin sebep olduğu mutasyonları araştırmakta etkili bir araç olmanın yanında, kontamine olmuş ve olmamış örnekleri aynı anda ve nispeten kısa sürede ayırt etme imkânı sağladığından kirlilik çalışmalarında da sıklıkla tercih edilmektedir (Qi ve ark. 2006).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Cihazlar

Laboratuvar çalışmaları süresince kullanılan cihazların listesi aşağıda tablo olarak verilmiştir **(Tablo 2.1)**.

Tablo 2.1. Laboratuvarda kullanılan cihaz listesi.

Cihaz/Gereç	**Marka**	**Model**	**Ülke**
Hassas terazi	Shimadzu	BL220H	Japonya
Mikro pipet	Metter Toledo	Rainin	İsviçre
Kantitatif PZR Termal Döngü Cihazı	Esco Micro Pte. Ltd.	Aeris Thermal Cycler Model G96 PCR	Singapur
Derin Dondurucu	Esco Micro Pte. Ltd.	Lexicon II ULT -80°C	Singapur
Santrifüj	Sigma Laborzentrifugen GmbH	1-14K mikrosantrifüj	Almanya
Elektroforez Sistemi	Cleaver Scientific Ltd.	Power Supply CS-300V omniPAC MIDI	Birleşik Krallık
Mikrodalga Fırın	CEM	Mars 5	ABD
ICP-OES	Perkin Elmer	Optima 7000 dv	ABD
Vorteks	Wisd-Witeg Laboratory Equipments	WiseMix VM-10 vorteks	Almanya
Jel görüntüleme sistemi	Witeg Laboratory Equipments	WiseUV WUV-L20 UV-Transilluminator	Almanya
Klorofil metre	Opti-Sciences	CCM-200plus Chlorophyll Content Meter	ABD
Spektrofotometre	Mecasys Corp.,	OPTIZEN NANO Q	Güney Kore
Etüv	Elektro-mag	M6040P	Almanya
Su banyosu	Nüve	NB9	Türkiye

2.2. Kullanılan Kimyasal Listesi

Aşağıdaki tabloda laboratuvar deneylerinde kullanılan kimyasalların listesi verilmiştir **(Tablo 2.2)**.

Tablo 2.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal listesi.

Kimyasal	**Marka**
Tris-borate-EDTA 10X solution	FISHER SCIENTIFIC
100 bp DNA Ladder Ready to Load	SOLIS BIO DYNE
TAQ DNA Polymerase (FIREPol DNA Polymerase)	SOLIS BIO DYNE
20m M of each dNTP Mix	SOLIS BIO DYNE
TriTrack DNA Loading Dye (6X)	THERMO SCIENTIFIC
Agarose, Low -EEO/Multi-Purpose	FISHER SCIENTIFIC
Polyvinyl pyrrolidone	FISHER SCIENTIFIC
Ethidium bromide %1 Solution	FISHER SCIENTIFIC
Chloroform Gr For Analysis iso 2,5 L	MERCK
1- Octanol For Synthesis	MERCK
1M Tris-HCl (pH:8)	FISHER SCIENTIFIC
5M NaCl	FISHER SCIENTIFIC
CTAB	SIGMA
Potassium Hydroxide, Pellets	AFG BIOSCIENCE
Iron (II) Sulfate Heptahydrate; ACS Reagent	AFG BIOSCIENCE
Molybdic acid	ACROS
Copper (II) Sulfate Pentahydrate; ACS Reagent	AFG BIOSCIENCE
Zinc Sulfate Heptahydrate; ACS Reagent	AFG
Manganese (II) chloride, 97%	ACROS
Boric Acid; ACS Reagent	AFG BIOSCIENCE

Tablo 2.2. devam

Ammonium Dihydrogen Phosphate	AFG
Potassium nitrate	FISHER SCIENTIFIC
Calcium Nitrate Tetrahydrate Gr For Analysis Acs	MERCK
Magnesium Sulfate Heptahydrate; ACS Reagent	AFG
Nitric Acid 65% Gr for analysis iso	MERCK
Water Molecular Biology Grade, DNase-, RNase- and Protease-Free	FISHER SCIENTIFIC
Agarose gel loading dye (6X)	FISHER SCIENTIFIC
Ethylenediaminetetraacetic acid, di Na salt dihydrate (EDTA)	FISHER SCIENTIFIC

2.3. Deney Bitkilerin Yetiştirilmesi, Örneklerin Hazırlanması ve Muhafaza Edilmesi

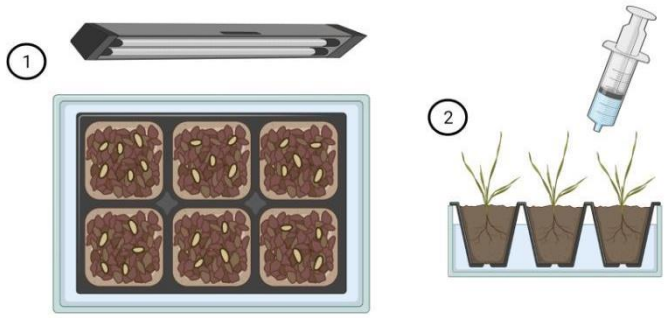
Yapılan çalışmada Arpa (*Hordeum vulgare* L. var. alta*)* ve Buğday *(Triticum aestivum* L. var. intensivnaya*)* bitkileri kullanılmıştır.

Kullanılan bitkilerin sistematik bilgileri **Tablo 2.3**'de verilmiştir.

Tablo 2.3. Arpa ve buğday hakkında sistematik bilgi.

Taksanomik Basamak	Arpa	Buğday
Regnum (Alem)	Plantae	Plantae
Divisio (Bölüm)	Liliopsida	Liliopsida
Classis (Sınıf)	Magnoliopsida	Magnoliopsida
Ordo (Takım)	Poales	Poales
Familia (Aile)	Poaceae	Poaceae
Sub Familia (Alt Aile)	Pooideae	Pooideae
Genus (Cins)	*Hordeum* L.	*Triticum* L.
Species (Tür)	*Hordeum vulgare* L.	*Triticum aestivum* L.
Varietas (Varyete)	intensivnaya	alta

Çalışmada kullanılan bitki çeşitlerine ait tohumlar "Kırgızistan Devlet Bitki Genetik Kaynakları Merkezi" nden temin edilmiştir. Çimlenme işlemi "Bitki İklimlendirme Odası"nda yapılmıştır. Ekilen tohumlar günaşırı **Tablo 2.5**'e göre hazırlanan Hoagland besleyici çözeltisi (Hoagland ve Arnon, 1950) ile sulanmıştır **(Şekil 2.1)**.



Şekil 2.1. Ekilen buğday ve arpanın Hoagland solüsyonu ile sulanması (BioRender.com'da hazırlanmıştır.).

Temin edilen tohumlar, bitki iklimlendirme odasında steril toprak bulunan viyollere ekilmiş ve çimlendirme 23 ±2 °C sıcaklıkta ve %55 ±5 nemlilikte; 4000-4200 lux arası ışık akısında 16 saat gündüz ve 8 saat gece fotoperiyodizmine göre kabinlere yerleştirilip yetiştirilmiştir. Sulama işlemi Hoagland besin çözeltisi ile yapılmıştır.

Aşağıda Hoagland çözeltisinin hazırlık aşamaları verilmiştir **(Tablo 2.4 ve Tablo 2.5)**.

Tablo 2.4. Hoagland için gereken stok solüsyonlarının içeriği ve hazırlanışı (Hoagland ve Arnon, 1950).

HOAGLAND STOK SOLÜSYONLARI	
1: Makro Besin Elementleri Stok Solüsyonu İçeriği ve Hazırlanışı	
Kimyasallar	**Miktar**
1) $NH_4H_2PO_4$ (Amonyum dihidrojen fosfat (ADP))	11,50 g
2) KNO_3 (Potasyum nitrat)	10,11 g
3) $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ (Kalsiyum nitrat tetrahidrat)	23,61 g
4) $MgSO_4.7H_2O$ (Magnezyum sülfat)	24,64 g
Hazırlanış: $NH_4H_2PO_4$, KNO_3, $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ ve $MgSO_4.7H_2O$ yukarıda belirtilen şekilde tartılarak her biri ddH_2O ile ayrı ayrı 100 ml'ye tamamlanır. Sonuçta her biri 1 M ve 100 ml olan 4 stok çözelti elde edilir.	

Tablo 2.4. devam

2: Mikro Besin Elementleri Stok Solüsyonu İçeriği ve Hazırlanışı

Kimyasalar	**Miktar (g/L)**
H_3BO_3 (Borik asit)	2.86 g
$MnCl_2.4H_2O$ (Mangan (II) Klorür tetrahidrat)	1.81 g
$ZnSO_4.7H_2O$ (Çinko sülfat heptahidrat)	0.22 g
$CuSO_4.5H_2O$ (Bakır (II) sülfat pentahidrat)	0.08 g
$H_2MoO_4.H_2O$ (Molibdik asit monohidrat) (Assaying 85% MoO_3)	0.02 g

Hazırlanış: Tartılan 5 mikro element verilen sıralama gözetilerek 900 ml içerisinde teker teker çözünmeleri sağlandıktan sonra şişedeki son hacim 1 L'ye yine ddH_2O kullanılarak tamamlanır.

3: Demir (FeEDTA) Stok Solüsyonu İçeriği ve Hazırlanışı

Kimyasallar	**Miktar**
EDTA (Etilen daimin tetra asetik asit-$C_{10}H_{16}N_2O_8$)	26,1 g
KOH	~19 g

3.1: 26.1 g EDTA, yaklaşık 19 g KOH içeren 286 ml ddH_2O içerisinde çözdürülür.

Kimyasallar	**Miktar**
$FeSO_4.7H_2O$ (demir (II) sülfat heptahidrat)	24.9 g

3.2: 24.9 $FeSO_4.7H_2O$, yaklaşık 500 ml ddH_2O içerisinde çözdürülür.

Hazırlanan iki çözeltinin birleştirilmesi: 3.2'de hazırlanan demir sülfat solüsyonu, 3.1'de hazırlanan potasyum EDTA solüsyon üzerine yavaş yavaş eklenir. Hazırlanan solüsyon gece boyunca karıştırılarak akvaryum pompası ile havalandırılır. pH yaklaşık 7.1'e yükseltilerek, çözeltinin şarap kırmızısı rengini alması sağlanır. Çok az çökelti meydana gelebilir. Son hacim 1 litreye tamamlanır.

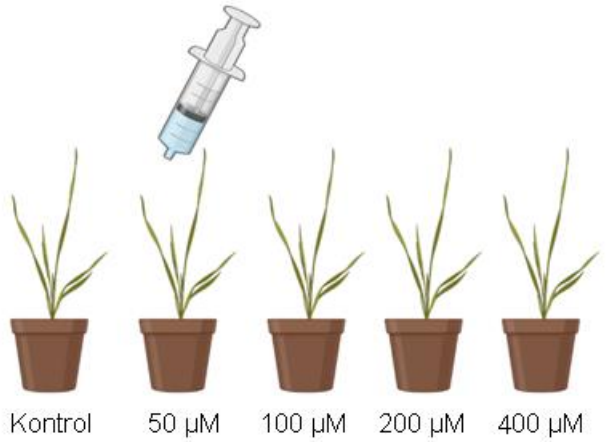
Saklama koşulları: Hoagland solüsyonu hazırlığı sırasında hazırlanan tüm stok çözeltiler alüminyum folyo kaplı (koyu) bir şişede +4 °C'de saklanır.

Hoagland solüsyonu, yukarıda açıklanan makro besin elementleri, mikro besin elementleri ve demir (FeEDTA) stok solüsyonlarının hazırlandıktan sonra aynı şişede karıştırılmalarıyla elde edilmektedir. **Tablo 2.5**'te Hoagland solüsyonu içeriği ve

hazırlanışı verilmiştir.

Tablo 2.5. Hoagland çözeltisinin hazırlanışı (Hoagland ve Arnon, 1950).

Hoagland Çözeltisinin Hazırlanışı
3 ara basamakta hazırlanan stok çözeltiler ayrı bir erlen içerisinde belirtilen hacimlerde karıştırılarak hazırlanır: ✓ **1 ml** 1 M $NH_4H_2P0_4$, ✓ **6 ml** 1 M KNO_3, ✓ **4 ml** 1 M $Ca(NO_3)_2$, ✓ **1 ml** 1 M $MgS0_4$ ile ✓ **0,25 ml** FeEDTA ✓ **1 ml** mikro besin elementleri balon jojeye eklenerek son hacim ddH_2O ile 1 litreye tamamlanarak Hoagland solüsyonu kullanıma hazır olarak elde edilmiştir.



Şekil 2.2. Bitkilere Cd stresi verilmesi (BioRender.com'da hazırlanmıştır).

Çimlenen bitkiler steril toprak saksılara alınarak 1 ay boyunca yetiştirilmiştir. Kontrol grubu da dahil olmak üzere toplam 5 farklı gruba ayrılan buğday ve arpa bitkilerine, önceden hazırlanan ve $CdCl_2$ içeren Hoagland çözeltisinin farklı konsantrasyonları (50-100-200-400 µM) deney grubundaki her bir saksı için 20 ml olacak şekilde uygulanmıştır. $CdCl_2$ ile muamele edilmeyen kontrol grubunda bulunan bitkiler ise yalnızca Hoagland solüsyonu ile 20 ml sulanmaya devam edilmiştir.

Cd'un bitkilere $CdCl_2$ formunda verilmesinin sebebi Cd'un çözünürlüğünün artırılarak

bitki tarafından alınması ve taşınmasını kolaylaştırmaktır. Dahlin ve arkadaşları (2016), klorürün (Cl^-) topraktaki Cd'u mobilize ederek buğday tarafından alımını artırabileceğini bildirmiştir.

Laboratuar şartlarında ekimi yapılan bitkilerin fidelerinin genç yaprakları 1 aylık sürenin sonunda hasat edilerek hassas tartıda 0,5-1,0 g olacak şekilde tartılmıştır. Tartılan örnekler alüminyum folyolara sarılıp etiketlendikten sonra DNA izolasyonunda kullanılmak üzere -80 ºC'de muhafaza edilmiştir.

2.4. Büyüme ve Gelişme Parametrelerinin Ölçülmesi

Hasat işleminden sonra, kontrol ve deney gruplarının (50-100-200-400 µM Cd uygulanmış) yaprak uzunlukları (cm) ve genişliği (mm) cetvel yardımı ile ölçülmüş ve ortalama değerler bulunmuştur. Ayrıca yaprak uzunluk ve genişliğinin ortalama değerleri kullanılarak yaprak yüzey alanı hesaplanmıştır. Kontrol grubu ve deney gruplarının yaprak yaş ağırlıkları hassas terazide tartılmıştır. Bir bitkinin susuz kütlesi olarak ifade edilen kuru ağırlıkları ise, yaprak örnekleri 80 °C etüvde 48 saat bekletildikten sonra yine hassas terazide tartılarak belirlenmiştir. Yaprak örneklerindeki toplam klorofil miktarı klorofil metre (CCM-200plus-Chlorophyll Content Meter) ile ölçülmüştür. Son olarak araştırılan parametrelere ilişkin elde edilen veriler kaydedilmiştir.

2.5. Kimyasal Analiz

Yaprakta Cd akümülasyon miktarlarının ölçümü Bahçeşehir Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'nda ICP-OES cihazı ile yapılmıştır.

2.5.1. Hazırlık aşaması

ICP-OES cihazında analiz edilecek örneklerin çözünmüş ve süzülmüş olması gerekmektedir. Bu sebeple Buğday (*Triticum aestivum* L. var. intensivnaya) ve Arpa (*Hordeum vulgare* L. var. alta) bitkilerinin yapraklarında Cd akümülasyon miktarlarının ölçümünden önce dokunun organik kısımlarının uzaklaştırılması ve kalan inorganik kısmın da çözelti haline getirilmesi gerekmektedir. ICP-OES cihazında analiz öncesinde örneklere uygulanan işlemler aşağıda basamaklar halinde sunulmuştur:

1. Hasat edilen bitkilerin yaprakları 48 saat boyunca +80 °C'de etüvde kurutulmuştur.
2. Etüvde kurutulan yapraklar öğütülerek 1,5 mm'lik bir elekten geçirilmiştir.
3. Örneklerden 0,2 g numune tartılmıştır.
4. Numuneler ayrı ayrı teflon tüplere yerleştirilerek üzerlerine 8 ml %65 nitrik asit (HNO_3) eklenmiştir.
5. Nitrik asitle muamele edilen örnekler bir mikrodalga fırın (CEM Mars 5) kullanılarak 160 °C'de yakılmıştır.
6. Yakılan numuneler Whatman filtre kağıdından süzülerek falkon tüplere alınmıştır.
7. Falkon tüplerde bulunan numuneler ultra saf su ile 50 ml'ye seyreltilmiştir.

2.5.2. Cd akümulasyonlarının tespiti



Şekil 2.3. ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer-Perkin Elmer Optima 7000 DV) cihazı.

ICP-OES (İndüktif Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektrometresi), sulu çözeltilerde çözünmüş halde bulunan elementlerin kantitatif tayinlerinde kullanılmaktadır. Cihaz sayesinde pek çok elementin nitel ve nicel analizi yapılabilmektedir. Cihazda yer alan plazma (argon (Ar)) tarafından uyarılan örneklerden atom ve iyonların üretilmesiyle, uyarılan örneklerde yer alan elementlerin özgün dalga boyları ve emisyon şiddetlerine bağlı olarak numune içindeki elementin konsantrasyonu belirlenebilmektedir.

Elde edilen 50 ml hacimde seyreltik numuneler ICP-OES cihazı kullanılarak analiz edilmiş ve sonuçta Cd akümülasyon miktarları belirlenmiştir.

2.6. Genotoksisite Analizi

Genotoksisite analizi aşamasında deney ve kontrol gruplarına ait bitki örneklerinin yapraklarından izole edilen total DNA, ISSR primerleri ile termal döngü cihazında çoğaltılarak jel elektroforezinde yürütülmüştür. Elektroforez işlemi sonrasında jelin görüntülenmesinden elde edilen DNA bant profillerine dayalı veri analizleri yapılmıştır.

2.6.1. DNA izolasyonu

DNA'yı saf ve degradasyona uğramadan maksimum miktarda elde etmek genetik analizler için oldukça önemlidir. Bu amaçla CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromür) izolasyon yöntemi kullanılmıştır (Somma ve Querci, 2004). CTAB yöntemi Doyle (1987) ve Doyle (1990)'a göre modifiye edilerek uygulanmıştır.

CTAB yöntemiyle DNA izolasyonuna başlanmadan önce aşağıdaki tablolarda **(Tablo 2.6 ve Tablo 2.7)** verilen iki çözeltinin ihtiyaç duyulan miktarda ve taze olarak hazırlanması gerekmektedir.

Tablo 2.6. CTAB stok çözeltisinin içeriği ve hazırlanışı.

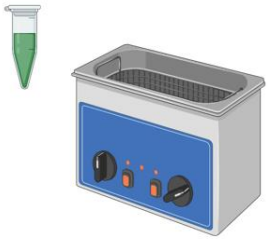
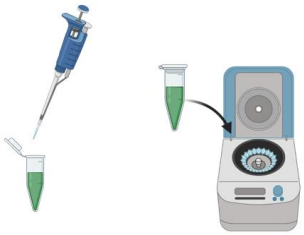
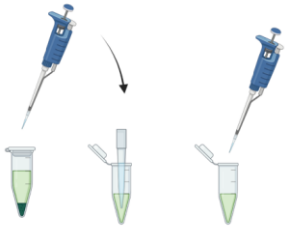
CTAB Stok Çözelti	
Kimyasallar	**Miktar**
CTAB	5 g
5M NaCl	70 ml
0.5 M EDTA	10 ml
1M Tris-HCl (pH:8)	25 ml
Hazırlanışı: Çözelti bileşenleri birbirleri üzerine eklenip karıştırılır ve son hacim 250 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanır.	

Tablo 2.7. 24:1 Kloroform/Oktanol çözeltisinin içeriği ve hazırlanışı.

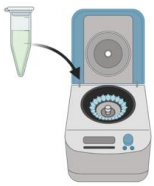
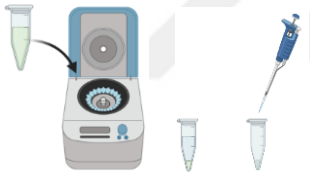
24:1 Kloroform/Oktanol	
Kimyasallar	**Miktar**
Kloroform	240 µl
Oktanol	10 µl
Hazırlanışı: 240 µl Kloroform üzerine 10 µl Oktanol eklenerek 24:1 (v/v)'lik Kloroform/Oktanol hazırlanır.	

Modifiye edilmiş CTAB yöntemi ile genomik DNA izolasyonunun aşamaları **Tablo 2.8**'de verilmiştir.

Tablo 2.8. Modifiye CTAB yöntemi ile genomik DNA izolasyonunun aşamaları (Şekiller BioRender.com'da hazırlanmıştır.).

CTAB YÖNTEMİYLE DNA İZOLASYONU	
	**1.** 2 ml (birey başına) CTAB stok solüsyonu ve 0,05 g (birey başına) PVP (Polivinilpirolidon) falkon tüplere eklenerek CTAB çalışma solüsyonu hazırlanır. Hazırlanan çalışma solüsyonu su banyosunda 65°C'de homojen hale gelene kadar bekletilir.
	**2.** Her bir bitki örneğinden 0,5 g tartılarak ayrı ayrı havanlara yerleştirilir. Mekanik parçalanmayı en ileri düzeyde başarabilmek ve bitki dokusunu toz hale getirebilmek için sıvı azot ile dondurularak havanda öğütme işlemi yapılır. Havanda bulunan örneklerin her birine CTAB çalışma solüsyonundan 2'şer ml eklenerek öğütme işlemine devam edilir. Sonuçta örneklerin parçalanması sağlanır.
	**3.** Parçalama işleminden sonra havandaki örnekler ayrı ayrı ependorf tüplere 1 ml hacimde eklenerek 65 °C'lik su banyosunda bir saat boyunca bekletilir. 1 saatin sonunda su banyosundan alınan örnekler oda sıcaklığına alınarak yaklaşık 10 dakika bekletilir.
	**4.** Örneklerin üzerine hazırlanan kloroform/oktanol karışımından 1'er hacim (yaklaşık 1 ml) eklenir. 13.000 rpm'de 15 dk boyunca santrifüj işlemi yapılır.
	**5.** Santrifüj işleminden sonra oluşan süpernatantın yaklaşık 500 µl'lik kısmı, yeni bir ependorfa aktarılır. Geride kalan pellet kısımı atılır. Yeni ependorfa alınan süpernatant kısmın üzerine eşit hacimde (500 µl) izopropanol, yarı hacimde (250 µl) NaCl eklenir.

Tablo 2.8. devam

	**6.** Hazırlanan örnekler -20°C'de 1 saat boyunca bekletilir. Daha sonra -20°C'den alınan örnekler 13.000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edilir.
	**7.** Santrifüj sonunda bu kez üst faz atılır. Pellet şeklinde bulunan DNA'nın üzerine 1 ml %75 (v/v)'lik etanol eklenir.
	**8.** Etanol eklenen ependorflar 13.000 rpm'de 3 dakika boyunca santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısım atılır.
	**9.** Son iki adım (7. ve 8.) iki kez daha tekrarlanır.
	**10.** En son uygulanan santrifüj işleminden sonra oluşan süpernatant atılır. Tüplerin ağzı bir gece boyunca açık bırakılarak etanolün uzaklaşması sağlanır.
	**11.** Etanolün buharlaşmasından sonra 100 µl RNAse Free Water, tüplerde bulanan genomik DNA'ların üzerine eklenir ve örnekler su banyosunda 37°C'de 1 saat bekletilerek PZR çalışması için uygun hale getirilir.



Şekil 2.4. Sıvı azot varlığında bitki yapraklarının mekanik parçalanmasının sağlanması.

2.6.2. DNA saflığı ve konsantrasyonunun ölçümü

DNA saflığı ve konsantrasyonunu belirlemek için her bir örnekten 1'er µl alınarak NANO Q spektrofotometre cihazıyla ölçüm yapılmıştır. PZR deneylerinde kullanılacak DNA örneklerinin saflıklarının 1,8-2,0 aralığında **(A260/A280)**, DNA konsantrasyonlarının ise 50-400 ng/µl aralığında olmasına dikkat edilmiştir.

Konsantrasyon ölçümlerinden hemen sonra nükleaz içermeyen ultra saf su, her bir örnekte DNA konsantrasyonun 50 ng/µl son konsantrasyon değerlerine ayarlanması amacıyla daha yoğun örnekler üzerine ilave dilmiştir. Örneğe eklenen su miktarı $\mathbf{C_1V_1=C_2V_2}$ formülüne göre hesaplanmıştır.

C_1: Orijinal DNA çözeltisi konsantrasyonu (ng/µl)

C_2: İstenilen DNA konsantrasyonu (50 ng/µl)

V_2: İstenilen seyreltik DNA hacmi (20 µl)

V_1: Orijinal DNA solüsyonundan alınması gereken hacim

Bu işlem sonrasında DNA örnekleri PZR aşamasında kullanıma hazır hale getirilmiştir.

2.6.3. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Hedef ISSR-DNA bölgelerinin, uygulanan Cd stresinden etkilenip etkilenmediklerinin elektroforez ortamında tespit edilebilmesi için öncelikle PZR ile DNA bölgelerinin çoğaltılması gerekmektedir.

$MgCl_2$, reaksiyon tamponu, dNTP karışımı, Taq polimeraz enzimi, kalıp DNA, ilgili primerler ve nükleaz içermeyen ultra saf su eklenerek PZR çözeltisi hazırlanmıştır. Ardından termal döngü cihazında ISSR primerlerinin hedeflediği bölgelerin çoğaltılması sağlanmıştır. PZR protokolü ve döngü şartları aşağıdaki tabloda verilmiştir **(Tablo 2.9).**

Tablo 2.9. PZR protokolü ve PZR döngü şartları.

PZR Protokolü		**PZR Döngü Şartları**			
PZR Bileşeni	**Miktar**				
Örnek DNA (50 ng/µl)	2 µl				
Buffer (10X)	3 µl	**Aşama**	**Sıcaklık**	**Süre**	
$MgCl_2$ (25 mM)	3 µl	**Ön-Denatürasyon**	95 °C	5'	
dNTP Mix (20 mM)	0,2 µl	**Denatürasyon**	95 °C	1'	**38**
Taq Polimeraz (5U/µl)	0,2 µl	**Bağlanma**	44 °C	1'	**Döngü**
Primer (10 mM)	1,5 µl	**Uzama**	72 °C	1'	
ddH_2O	10,1 µl	**Son-Uzama**	72 °C	7'	
Toplam Hacim	**20 µl**				

2.6.3.1. ISSR Primerleri ve Optimizasyonu

Literatürde farklı araştırma grupları tarafından kullanılmış farklı pek çok ISSR primeri bulunmaktadır. Bununla beraber var olan pek çok alternatif primer sekansından hangi primerlerin, kurguladığımız deneyde ve örneklerimizde tekrar edilebilir sonuçlar üreteceği yapılan optimizasyon deneyleriyle belirlenmiştir.

Çalışmada denenmiş olan ISSR primerlerinin listesi **Tablo 2.10**'da verilmiştir.

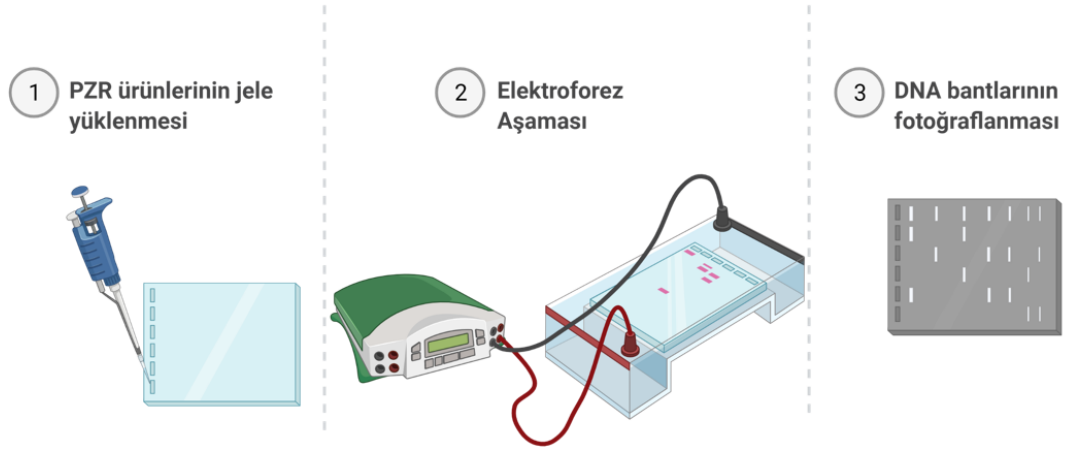
Tablo 2.10. Çalışmada kullanılan primerlerin listesi.

Primer Adı	Baz Dizilimi (5'–3')	Tm (°C)	Primer Bağlanma Sıcaklığı (°C)
UBC-808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	47.05	44
UBC-810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	44.64	44
UBC-811	GAG AGA GAG AGA GAG AAC	48.04	44
UBC-812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	44.64	44
UBC-814	CTC TCT CTC TCT CTC TA	44.64	44
UBC-815	CTC TCT CTC TCT CTC TG	47.05	44
UBC-822	TCT CTC TCT CTC TCT CA	44.64	44
UBC-826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	47.05	44
UBC-827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	47.05	44
UBC-834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	45.77-48.04	44
UBC-835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	48.04-50.32	44
UBC-840	CTC TCT CTC TCT CTC TTT	45.77	44
UBC-841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	48.04-50.32	44
UBC-842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	48.04-50.32	44
UBC-868	GAA GAA GAA GAA GAA GAA	41.21	36
UBC-876	GAT AGA TAG ACA GAC A	38.25	36

2.6.4. Agaroz jel elektroforezi

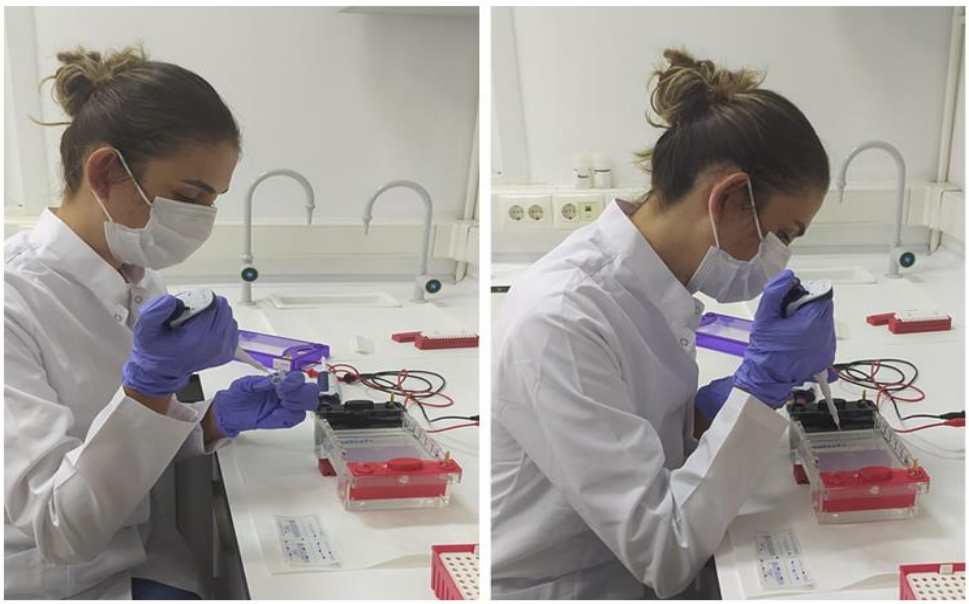
Termal döngü cihazında çoğaltılan örneklerin incelenebilmesi için %1,6 (w/v)'lık agaroz jel hazırlanarak elektroforez işlemi yapılmıştır. Çalışmada agaroz jeli hazırlamak üzere 250 ml 1X TBE (Tris Base, Boric Acid, EDTA) çözeltisi içerisine 4 g agaroz eklenerek mikrodalga fırında tamamen çözünene kadar kaynatılmış ve sonrasında yeterince soğuyan (yaklaşık 40 °C) çözeltiye 5 µl Etidiyum Bromür ilave edilmiştir.

Agaroz jel hazırlandıktan sonra izlenen adımlar **Şekil 2.5**'te gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Agaroz jel hazırlandıktan sonra PZR ürünlerinin jele yüklenmesi, elektroforez aşaması ve DNA bantlarının fotoğraflanması (BioRender.com'da hazırlanmıştır).

Hazırlanan jele yüklenen PZR ürünleri 90 voltta 100 dk boyunca yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen DNA bantları fotoğraflanarak kaydedilmiştir.



Şekil 2.6. Agaroz jel elektroforezi öncesinde örneklerin yüklenmesi.

2.7. Veri Analizi

Çalışmada kontrol grubu bitkilerine ilave olarak sırasıyla 50-100-200-400 µM konsantrasyonlarında $CdCl_2$ ile muamele edilen deney grubu bitkilerinden oluşan toplam 5 grup bitkideki Cd akümülasyon miktarları SPSS (11.5 for windows) programı ile Paired-Samples T-Test (Çift örnekli T test) uygulanarak istatistiksel olarak

değerlendirilmiştir.

ISSR bant profillerinin değerlendirilmesi GeneTools® (Syngene International) yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. DNA bantlarının incelenerek genomik kararlılık yüzdeleri (GKY-genomic template stability (GTS)) belirlenmesinde aşağıdaki formülden yararlanılmıştır (Liu ve ark. 2005):

$$(1 - a/n) \times 100$$

a: Cd ile muamele edilmiş örneklerdeki polimorfik bant sayısını gösterir.

n: Kontrol grubundaki tüm bantların sayısını gösterir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Cd'a maruz bırakılmış arpa ve buğday örnekleri ile kontrol grubunu oluşturan bitki örneklerinden elde edilen genomik DNA bant profillerine göre, uygulanan ağır metal stresinin genotoksik etkilerinin saptanabilmesi amacıyla ISSR primerlerinin hedeflediği bölgeler çoğaltılmış ve elde edilen sonuçlar analiz edilmiştir. Bu amaçla literatürde önceden bildirilmiş toplamda 16 farklı ISSR primeri denenmiştir **(Tablo 2.9)**. Test edilen ISSR primerlerinden UBC826, UBC835 ve UBC842 primerlerinin buğday; UBC835, UBC841 ve UBC842 primerlerinin de arpa için anlamlı ve tekrarlanabilir bantlar ürettiği görülmüştür. Çalışma boyunca elde edilen elektroforez bantları, bahsi geçen seçilmiş primerlerin, kontrol ve deney grubu (50, 100, 200 ve 400 µM Cd uygulanmış) örneklerininin kullanıldığı PZR işlemi sonrasında elde edilmiştir.

3.1. Yapraklardaki Cd Akümülasyon Değerleri

Tablo 3.1. Buğday ve arpa yapraklarındaki kadmiyum (Cd) akümülasyon aralıkları.

	Kadmiyum Akümülasyonları (µg kg^{-1} (ka))					
	0 µM	**50 µM**	**100 µM**	**200 µM**	**400 µM**	
Buğday *(Triticum aestivum* L.)	15,012	130,267	271,528	808,322	1088,672	**Min.**
	15,855	138,403	294,552	833,305	1122,339	**Maks.**
Arpa *(Hordeum vulgare* L.)	19,196	117,984	230,772	554,597	946,971	**Min.**
	21,707	121,629	253,206	616,938	1074,709	**Maks.**

Buğday bitkisi için kurulan ve 0 (kontrol), 50, 100, 200 ve 400 µM Cd gruplarının bulunduğu deneyden elde edilen yapraklardaki Cd akümülasyon aralıkları (µg kg^{-1}) sırasıyla: 15,012-15,855; 130,267-138,403; 271,528-294,552; 808,322-833,305; 1088,672-1122,339 olarak belirlenmiştir. Deney sonrasında yapraklarda ölçülen Cd miktarlarının, deney düzeneğine uyumlu olarak, uygulanan Cd konsantrasyonuna paralel olarak düzgün artış gösterdiği izlenmiştir.

Arpa bitkisi için kurulan ve 0 µM (kontrol), 50 µM, 100 µM, 200 µM ve 400 µM Cd gruplarının bulunduğu deneyden elde edilen yapraklardaki Cd akümülasyon aralıkları (µg

kg^{-1}) ise sırasıyla: 19,196-21,707; 117,984-121,629; 230,772-253,206; 554,597-616,938; 946,971-1074,709 olarak belirlenmiştir. Buğday'da olduğu gibi arpa bitkisinde de yapraklarda ölçülen Cd miktarları, deney düzeneğinden beklenecek şekilde, uygulanan Cd konsantrasyonunun artışına paralel olarak düzgün artış göstermiştir.

3.2. Cd Stresinin Büyüme ve Gelişme Parametreleri Üzerine Etkisine İlişkin Bulgular

Cd stresinin arpa ve buğday bitkilerinin büyüme ve gelişme parametrelerine olan etkilerinin belirlenmesinde ortalama yaprak uzunluğu, yaprak genişliği, yaprak yaş ve kuru ağırlıkları ve yaprak toplam klorofil miktarı değişkenleri baz alınmıştır.

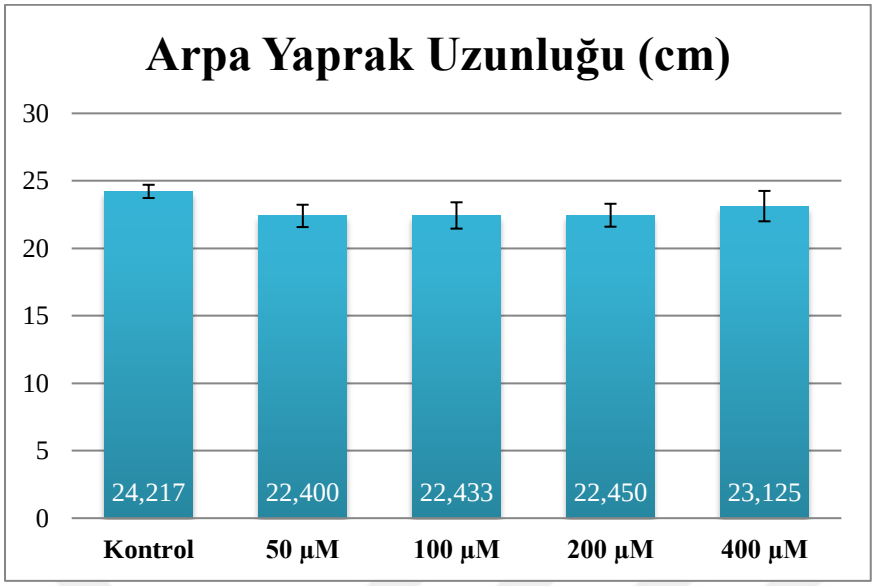
3.2.1. Cd stresinin arpa bitkisinde büyüme ve gelişme parametreleri üzerine etkisi

Arpa bitkisinin bu çalışmamızda baz alınan büyüme ve gelişme parametrelerine ilişkin ölçümlerinden elde edilen sonuçlar **Tablo 3.2**'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Arpa bitkilerinin belirlenen büyüme ve gelişme parametrelerine ait sonuçları.

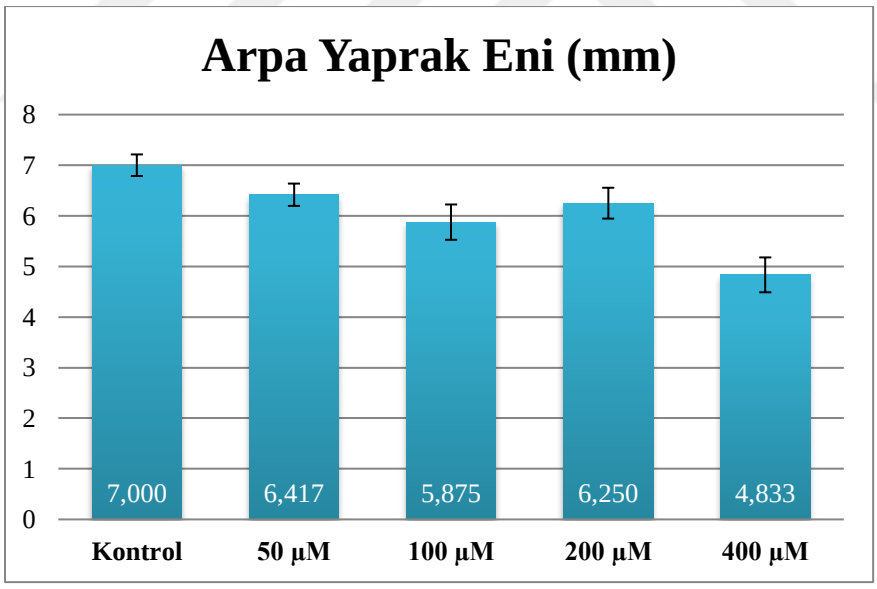
Parametreler	**Kontrol**	**50µM**	**100µM**	**200µM**	**400µM**
Yaprak uzunluğu (cm)	24,216	22,4	22,433	22,45	23,125
Yaprak genişliği (mm)	7	6,416	5,875	6,25	4,833
Yaprak yüzey alanı (cm^2)	13,578	11,44	10,524	11,384	8,820
Yaprak yaş ağırlığı (g)	0,186	0,184	0,146	0,155	0,135
Yaprak kuru ağırlığı (g)	0,026	0,025	0,021	0,020	0,019
Yaprak klorofili (mg m^{-2})	7,117	3,456	3,311	3,164	3,042

Arpa bitkisinin belirlenen büyüme ve gelişme parametrelerine ilişkin ölçümlerden elde edilen sonuçlar grafik şeklinde sunulmuştur **(Şekil 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 ve 3.5).**



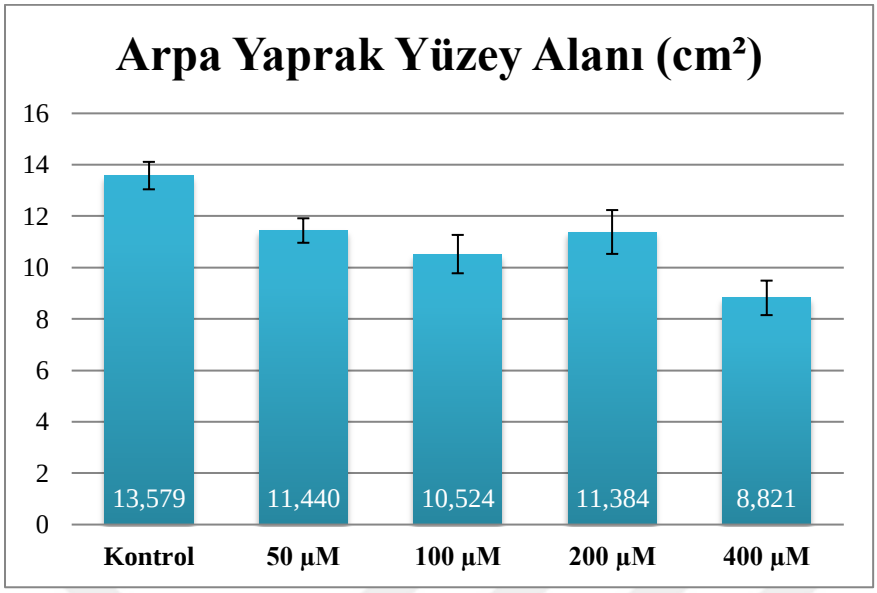
Şekil 3.1. Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi uygulanan arpa bitkilerinde yaprak ortalama uzunluğu (cm) değerlerinde islenen değişim.

Arpa bitksine uygulanan tüm Cd konsantrasyonlarında (50, 100, 200 ve 400 µM) yaprak ortalama uzunluğu (cm), kontrol grubuna kıyasla azalmıstır.



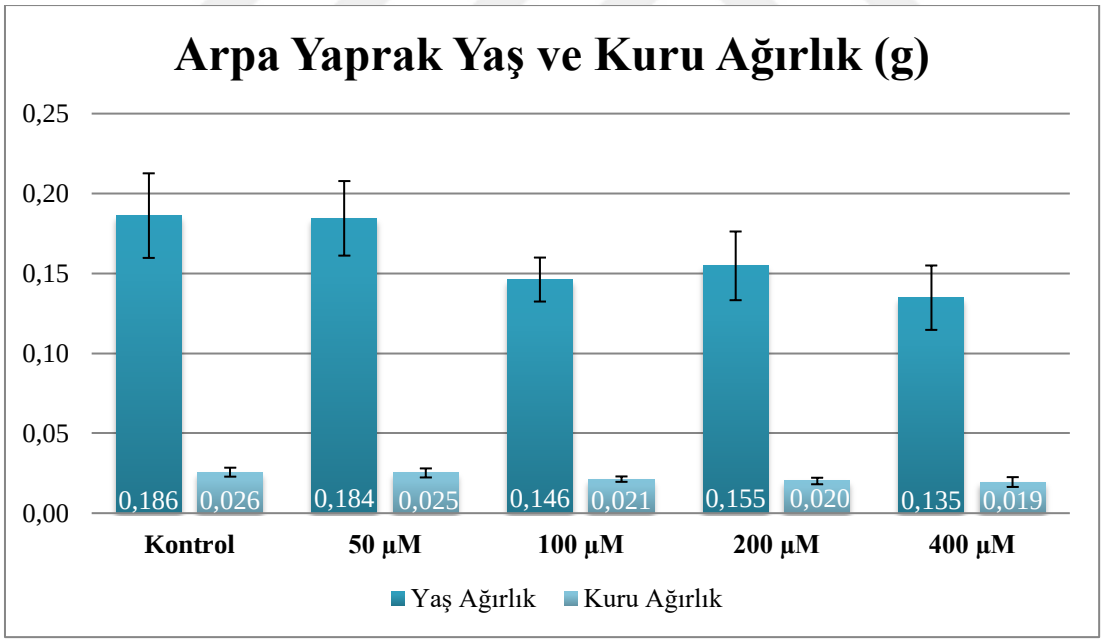
Şekil 3.2. Uygulanan Cd stresinin şiddetine bağlı olarak arpa bitkilerinde yaprak ortalama eni (mm) değerlerinde izlenen değişim.

Arpa bitkisine uygulanan tüm Cd konsantrasyonlarında (50, 100, 200 ve 400 µM) yaprak ortalama eni (mm), kontrol grubuna kıyasla azalmıştır.



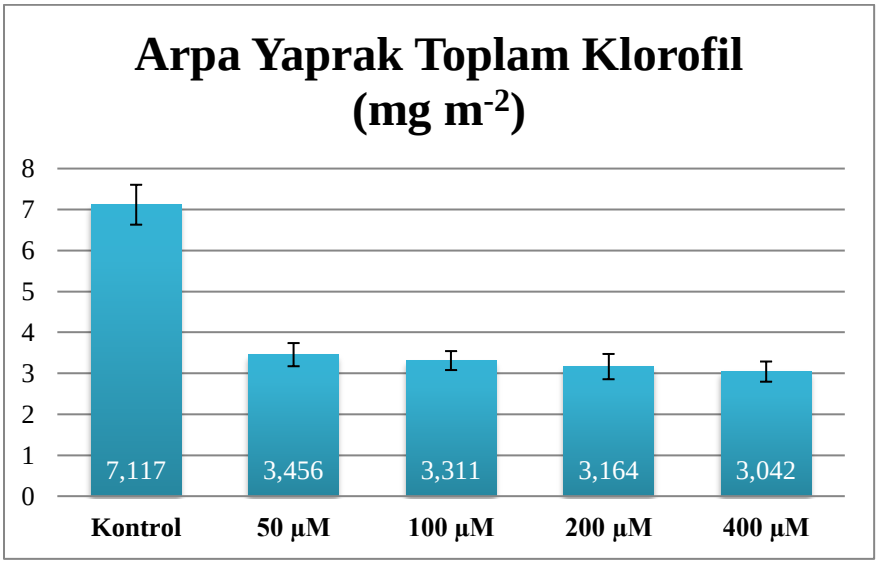
Şekil 3.3. Uygulanan Cd stresinin şiddetine bağlı olarak arpa bitkilerinde ortalalama yaprak yüzey alanı (cm^2) değerlerinde izlenen değişim.

Arpa bitksine uygulanan tüm Cd konsantrasyonlarında (50, 100, 200 ve 400 µM) ortalama yaprak yüzey alanı (cm^2), kontrol grubu bitkilerine kıyasla azalmıştır.



Şekil 3.4. Uygulanan Cd stresinin şiddetine bağlı olarak arpa bitkilerinde bitkilerinde yaprak yaş ve kuru ortalama ağırlık (g) değerlerinde izlenen değişim.

Arpa bitkisine uygulanan tüm Cd konsantrasyonlarında (50, 100, 200 ve 400 µM) yaprak yaş ve kuru ortalama ağırlıkları (g), kontrol grubu bitkilerine kıyasla azalmıştır.



Şekil 3.5. Uygulanan Cd stresinin şiddetine bağlı olarak arpa bitkilerinin yapraklarında ortalama toplam klorofil miktarlarında (mg m^{-2}) izlenen değişim.

Arpa bitkilerine uygulanan tüm Cd konsantrasyonlarında (50, 100, 200 ve 400 µM) yapraklardaki ortalama toplam klorofil miktarlarının (mg m^{-2}), kontrol grubu bitkilerine kıyasla ciddi miktarda (yaklaşık yarı yarıya) azaldığı gözlenmiştir.

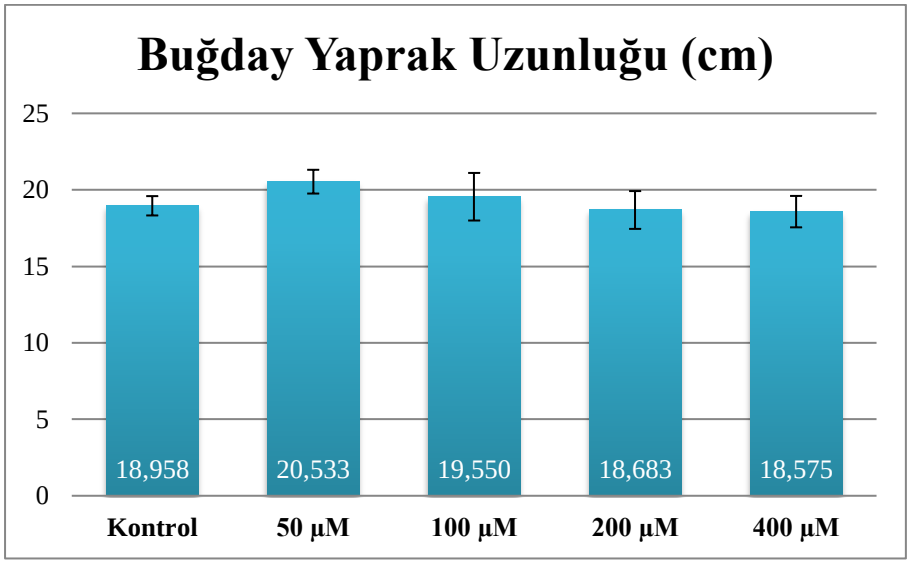
3.2.2. Cd stresinin buğday bitkisinde büyüme ve gelişme parametreleri üzerine etkisi

Buğday bitkisinin araştırmamızda baz alınan büyüme parametrelerine ait ölçümlerinden elde edilen sonuçlar **Tablo 3.3**'de verilmiştir.

Tablo 3.3. Buğday bitkilerinin baz alınan büyüme ve gelişme parametrelerine ait sonuçları.

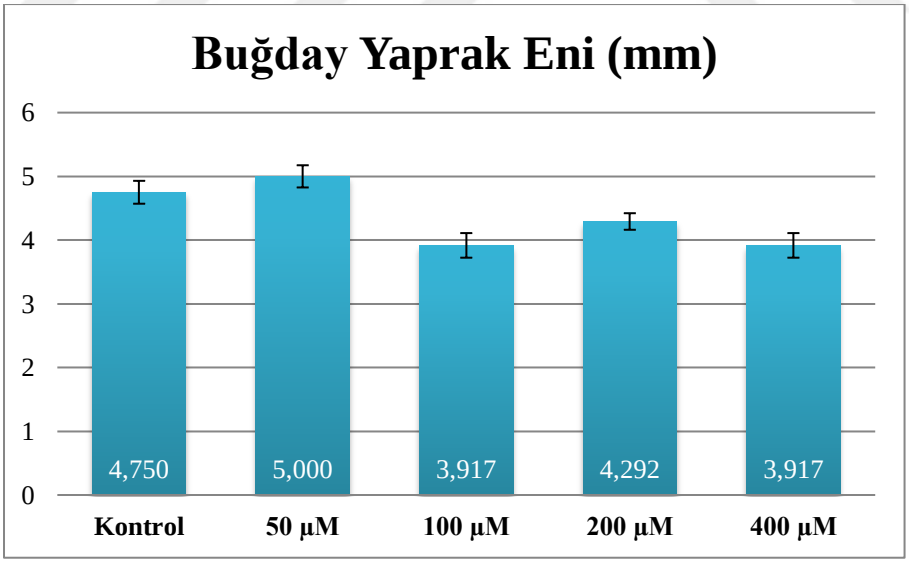
Parametreler	Kontrol	50µM	100µM	200µM	400µM
Yaprak uzunluğu (cm)	18,958	20,533	19,550	18,683	18,575
Yaprak genişliği (mm)	7,117	3,456	3,311	3,164	3,042
Yaprak yüzey alanı (cm^2)	7,173	8,215	5,912	6,422	5,887
Yaprak yaş ağırlığı (g)	0,343	0,388	0,256	0,256	0,209
Yaprak kuru ağırlığı (g)	0,055	0,067	0,044	0,045	0,034
Yaprak klorofili (mg m^{-2})	1,725	2,100	1,961	1,906	1,650

Buğday bitkisinin çalışmamızda baz alınan büyüme ve gelişme parametrelerine ait ölçümlerinden elde edilen sonuçlar grafik şeklinde sunulmuştur **(Şekil 3.6, 3.7, 3.8, 3.9 ve 3.10)**.



Şekil 3.6. Uygulanan Cd stresinin şiddetine bağlı olarak buğday bitkilerinde yaprak ortalama uzunluk (cm) değerlerinde izlenen değişim.

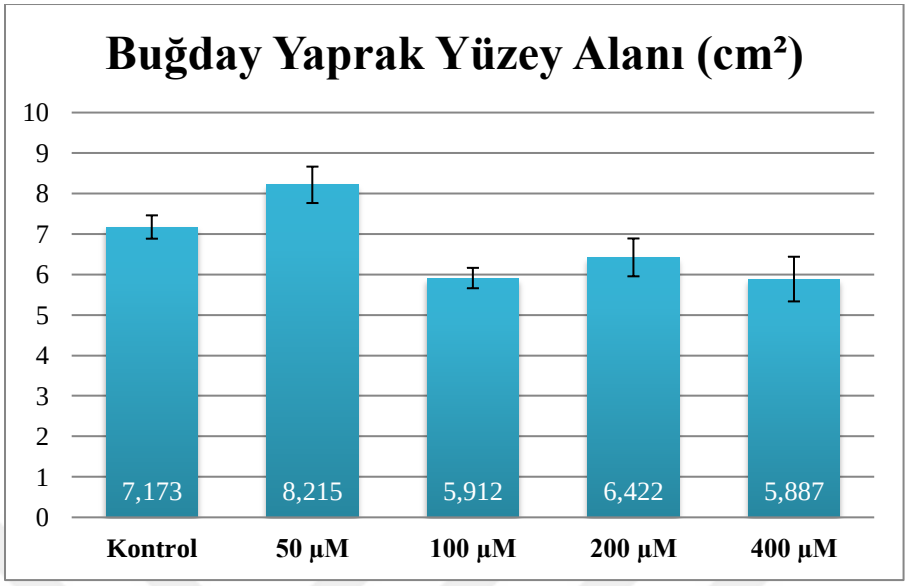
50 ve 100 µM Cd stresine maruz bırakılan buğday bitkisi örneklerinden elde edilen ortalama yaprak uzunluğu (cm) değerleri, kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olarak ölçülmüşken, 200 ve 400 µM Cd stresine maruz bırakılan bitkilerden elde edilen yaprak uzunluğu değerleri, kontrol grubu bitkilerine göre daha düşük olarak saptanmıştır.



Şekil 3.7. Uygulanan Cd stresinin şiddetine bağlı olarak buğday bitkilerinde yaprak ortalama eni (mm) değerlerinde izlenen değişim.

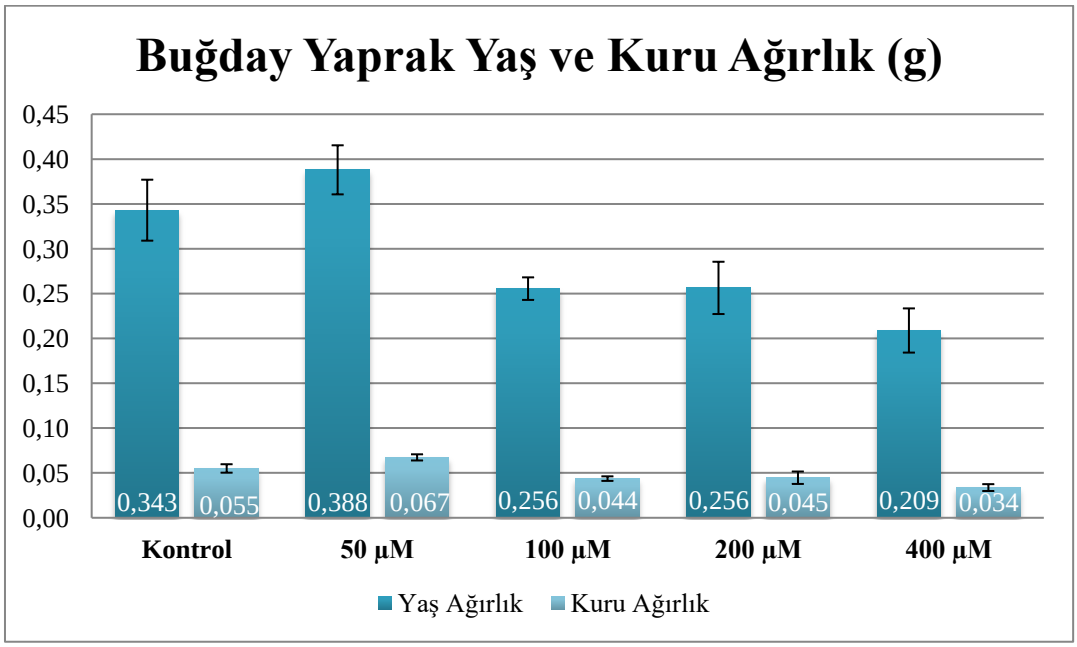
50 µM Cd stresine maruz bırakılan buğday bitkisi örneklerinden elde edilen yaprak ortalama eni (mm) kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bir değerde ölçülmüşken, 100, 200 ve 400 µM Cd stresine maruz bırakılan bitkilerden elde edilen yaprak eni değerleri,

kontrol grubu bitkilerine göre daha düşük olarak saptanmıştır.



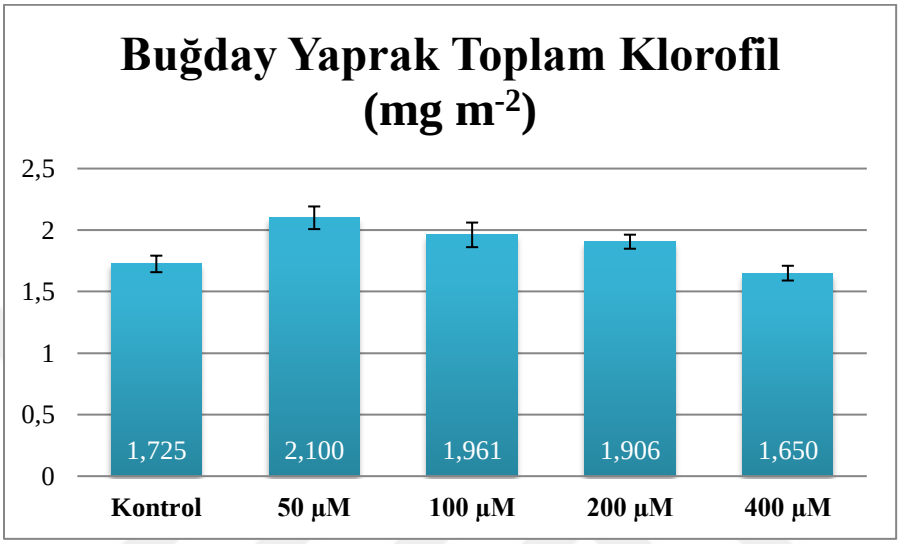
Şekil 3.8. Uygulanan Cd stresinin şiddetine bağlı olarak buğday bitkilerinde yaprak ortalama yüzey alanı (cm^2) değerlerinde izlenen değişim.

50 µM Cd stresine maruz bırakılan buğday bitkisi örneklerinden elde edilen ortalama yaprak yüzey alanı (cm^2) kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bir değerde hesaplanırken, deneydeki diğer tüm Cd konsantrasyonları için (100, 200 ve 400 µM) aynı değer, kontrol grubu bitkilerine göre daha düşük olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.9. Uygulanan Cd stresinin şiddetine bağlı olarak buğday bitkilerinde yaprak yaş ve kuru ağırlık (g) ortalama değerlerinde izlenen değişim.

50 µM Cd stresine maruz bırakılan buğday bitkisi örneklerinden elde edilen yaprak yaş ve kuru ortalama ağırlık (g) değerleri, kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olarak ölçülmüşken; deneydeki diğer tüm Cd konsantrasyonlarında (100, 200 ve 400 µM) elde edilen yaprak yaş ve kuru ağırlık (g) ortalama değerleri, kontrol grubu bitkilerine göre daha düşük olarak ölçülmüştür.



Şekil 3.10. Uygulanan Cd stresinin şiddetine bağlı olarak buğday bitkilerinin yapraklarında ortalama toplam klorofil miktarlarında (mg m^{-2}) izlenen değişim.

Buğday bitkilerinin yapraklarındaki toplam klorofil (mg m^{-2}) miktarı, kontrol ve deney grubu bitkileri karşılaştırıldığında, 400 µM Cd konsantrasyonu hariç diğer tüm konsantrasyonlarda (50, 100 ve 200 µM) toplam klorofil miktarının arttığı görülmektedir. En fazla toplam klorofil miktarı (2,100 mg m^{-2}) 50 µM Cd'a maruz bırakılan bitkilerde ölçülmüş ve uygulanan Cd konsantrasyonunun artışıyla beraber giderek azalmıştır.

3.3. Arpa ve Buğday Bitkilerinde Büyüme ve Gelişme Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Genel olarak incelendiğinde arpa bitkilerinin Cd'a maruz bırakılması sonucunda, kontrol bitkilerine kıyasla, yaprağa ait uzunluk, genişlik, yüzey alanı, yaş ağırlık ve kuru ağırlık parametrelerinin ortalama değerlerinde azalma görülmektedir. Buğday bitkilerinde ise kontrole kıyasla yaprak ortalama uzunluğunun 50 ve 100 µM Cd'a maruz bırakılan bitkilerde arttığı; fakat diğer konsantrasyonlarda (200 ve 400 µM) kontrole göre azaldığı görülmüştür. Yaprak genişliği, yüzey alanı, yaş ve kuru ağırlıkları parametrelerinin ortalama değerlerinde ise yalnızca 50 µM Cd konsantrasyonuna maruz bırakılan

bitkilerde kontrole kıyasla artış, diğer konsantrasyonlarda (100, 200 ve 400 µM) ise kontrole göre azalış gözlenmiştir.

Söz konusu parametrelere ait çalışmamızdan elde edilen sonuçların, genel olarak arpa bitkisi için önceden başka araştırmacılar tarafından elde edilmiş sonuçlar ile uyumlu olduğu görülmektedir. Çatav ve arkadaşlarına (2020) ait çalışmada bitkilere uygulanan Cd stresinin şiddeti arttıkça, buğday fidelerinin araştırılan tüm büyüme parametrelerinde birden, ileri düzeyde büyüme ve gelişim geriliğine işaret eden sonuçlar bildirilmiştir. Sridhar ve arkadaşları (2007), buğday bitkisinde kontrole kıyasla yaprak yaş ve kuru ağırlığında bir azalma olduğunu gözlemlemiş ve toprakta Cd varlığının bitki büyümesinin inhibisyonunda önemli bir etkisi olduğunu deneysel olarak göstermişlerdir. Cd'un soya fasulyesi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada da benzer sonuçlara ulaşılmış ve Cd'un soya fasülyesinde de bitki büyümesini olumsuz etkilediği gösterilmiştir (Sheirdil ve ark., 2012). Marul bitkisine Cd'un dört farklı dozunun (50, 100, 150, 200 µM) uygulandığı bir çalışmada ise, artan Cd konsantrasyonlarıyla beraber yaprak yaş ve kuru ağırlıklarında azalmalar olduğu bildirilmiştir (Aksu, 2019).

Bitkilerin büyüme ve gelişimi ile ilgili olarak araştırılan parametreler incelendiğinde kontrol grubu bitkilerine kıyasla deney grubu bitkilerinde gözlenen düşüşlerin tek bir nedenle bütünüyle açıklanması mümkün görünmemektedir. Bilindiği üzere, Cd toksisitesi bitkilerde birçok fizyolojik bozukluğa sebep olmaktadır. Bu fizyolojik bozukluklara fotosentez hızının düşmesi, antioksidan enzim aktivitelerinde azalmalar ve şekerler ile çözünür proteinlerin olumsuz etkilenmesi örnek olarak verilmektedir (Ci ve ark., 2009; Shafi ve ark., 2011; Wang ve ark., 2011; Li ve ark., 2015). Cd toksisitesinin bir diğer etkisi de bitkiler tarafından temel elementlerin alımı ve yer değiştirmesi üzerinedir (Yourtchi ve Bayat, 2013).

Bu bakımdan yaptığımız çalışmada büyüme ve gelişme parametrelerindeki düşüşün sebeplerinden birisinin de fotosentezin baskılanması olduğu düşünülmektedir. Literatürde yaprak net fotosentez hızında, stoma iletkenliğinde ve terleme hızında Cd'un doza ve zamana bağlı bir şekilde azalmaya neden olduğuna dair pek çok örnek bulunmaktadır (Khan ve ark., 2007; Ci ve ark., 2010a; Shafi ve ark., 2011; Li ve ark., 2015).

Abiyotik stres sonucunda, fotosentetik pigmentler ile çözünür durumdaki ve tilakoid zardaki proteinler olumsuz etkilenmektedir. Sonuçta elektron taşıma zinciri (ETS),

fotofosforilasyon ve CO_2 fiksasyon mekanizmaları etkilenmekte ve fotosentez süreci baskılanmaktadır. Bitki büyümesi fotosentezin inhibisyonuna bağlı olarak olumsuz etkilenmektedir (Yavas ve Ilker, 2020). Yapraklardaki ağır metal birikimi stomaların işleyişini de etkilemekte ve sonuçta fotosentez hızı da azalmaktadır. Ayrıca, ağır metallerin klorofil gibi fotosentetik pigmentlerin miktarında sebep olduğu düşüşe bağlı olarak dolaylı yoldan fotosentezi etkilemektedir. Bu özellikleriyle fotosentetik pigmentlerden stresi belirlemek için yararlanılmaktadır (Aggarwal ve ark. 2012).

Arpada toplam klorofil miktarını gösteren grafik **(Şekil 3.5)** incelendiğinde klorofil miktarının deney grubu bitkilerinde kontrol grubu bitkilerine göre yaklaşık yarı yarıya azaldığı gözlenmiştir. Bitki toplam klorofil miktarındaki azalma ve dolayısıyla fotosentez verimliliğindeki bu düşüşün, bitki büyümesi ve biyokütle üretimindeki genel düşüşten kısmen sorumlu olduğu sonucu çıkarılabilir.

Bitkilerde kuru ağırlığın yaklaşık %95'inin organik maddelerden %5'inin ise inorganik maddelerden oluştuğu göz önüne alınacak olursa, fotosentezdeki artışın kuru ağırlığı artırması beklenmektedir. Buğday bitkilerine 50 µM Cd uygulandığı durumda yapraklardaki kuru ağırlığın artması **(Şekil 3.9)**, yine yapraklardaki klorofil miktarının artmasının **(Şekil 3.10)** ve buna bağlı olarak fotosentezin hızlanmasının bir sonucu olarak ortaya çıkmış olabilir. Bu duruma zıt olarak yaprakta klorofil miktarında gözlenecek bir düşüş, arpa bitkilerinde saptandığı üzere **(Şekil 3.5)**, bitkilerin kuru ağırlıklarında saptanan azalmanın sebebi olabileceğini düşündürmektedir.

Buğday büyümesi ve biyokütlesindeki Cd kaynaklı artış ve azalışın, buğdaydaki fizyolojik ve moleküler düzeydeki farklı toksisite mekanizmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Buğdayda 100 ve 200 µM konsantrasyonlarda kuru ağırlığın **(Şekil 3.9)** klorofil miktarından **(Şekil 3.10)** bağımsız bir şekilde kontrole göre azalış göstermesinin olası sebepleri; oluşan organik maddelerin yaprakta birikmemesi, bitkinin kendini savunmak için bu organik maddelerden başka yolaklarda yararlanması, ortamda yeterli inorganik maddenin bulunmaması veya toplam klorofil miktarının yalnızca belli seviyeye kadar fotosentezi hızlandırıp sonradan bu hızın sabitlenmesi durumları sayılabilir. (Doğru, 2019)

Ağır metallerin konsantrasyonlarındaki artışla birlikte fotosentetik pigment miktarında artışa neden olduğu duruma, sera koşullarında yetiştirilen kavak melezleriyle yapılan

çalışma (Chandra ve Kang, 2016) örnek teşkil edebilir. Fakat ağır metallerin birkimine bağlı olarak, arpada tespit edilen şekilde klorofil miktarında bir azalmaya sebep olduğu literatürde daha sık bildirilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda, uygulanan Cd stresinin muz bitkisinde (El-Mahdy ve ark., 2021), soya fasulyesinde (Pérez Chaca ve ark., 2014), gözyaşı bitkisinde (Ozyigit ve ark., 2016) yapraktaki klorofil miktarında azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir. Bir başka çalışmada, bezelye (*Pisum sativum*) bitkisinde bakırın (Cu) yüksek konsantrasyonlarında (özellikle 700 mg/kg) ve Cd'un her konsantrasyonunda (0,34-0,7-1,4 ve 7 mg/kg) fotosentetik pigmentlerin düştüğü görülmüştür (Hattab ve ark. 2009). Ci ve arkadaşları (2010a) ve Chen ve arkadaşları (2014), Cd'un buğday yapraklarındaki fotosentetik pigmentlerin (klorofil a, klorofil b ve karotenoid) konsantrasyonlarında azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda kontrol bitkilerine kıyasla, Cd'a maruz kalan bitkilerde toplam klorofil miktarındaki düşüşün sebebinin Cd'un toksik etkisine bağlı olarak ortaya çıkan klorofil biyosentezi inhibisyonu olabilabileceği düşünülmüştür. Konuyla ilgili olarak Aravind ve Prasad (2005), Cd'un bitkilerde klorofil sentezini inhibe ettiğini ve kloroplastlardaki yapısal değişikliklere bağlı olarak klorofil miktarında azalmaya yol açtığını bildirmiştir.

Yaptığımız deneylerde buğday ve arpaya ait büyüme-gelişme parametrelerinin sonuçlarının birbirlerinden farklı olarak elde edilmesinin, yüksek olasılıkla iki bitki arasındaki tür farklılığından kaynaklandığı düşünülmüştür. Aynı türe ait bitkilerin farklı çeşit veya genotiplerinin bile aynı strese farklı cevaplar verebildiği bilinen bir gerçektir. Cd toksisitesine karşı bitkinin verdiği tepki buğdayın kendi içindeki çeşitlerinde bile farklılık göstermektedir. Örneğin buğdayda Cd toksisitesine karşı verilen tepki, farklı buğday varyeterinde bile değişiklik göstermektedir. Makarnalık buğdayın, ekmeklik buğdaya kıyasla, bünyesinde daha fazla Cd biriktirdiği gerçeği bunu kanıtlar niteliktedir (Gao ve ark., 2011a; Jafarnejadi ve ark., 2011; Erdem ve ark., 2012; Naeem ve ark.., 2016). Ci ve arkadaşları (2009), yaptıkları çalışmalarda buğdayın Cd'a toleranslı hatlarında, Cd'a duyarlı hatlarına kıyasla, bitkilerin Cd alımının ve translokasyonunun daha düşük olduğunu bildirmiştir. Aynı konuda yapılmış benzer çalışmalar da mevcuttur (Zhang ve ark., 2000, 2002; Khan ve ark., 2007). Fitotoksik Cd konsantrasyonlarının eşiği, diğer faktörlerle beraber, Cd stresin uygulandığı bitkinin genotiplerine, uygulanan Cd stresinin dozu ve süresine göre değişebilmektedir. Yaptığımız çalışmada buğdayda toplam klorofil miktarıyla beraber diğer büyüme parametrelerinin de benzer şekilde önce

artış sonra azalış göstermesinde uygulanan Cd dozunun da etkisinin olduğu akla getirilmektedir.

Buğdayda, Cd stresinin zararlı etkilerine karşı farklı tolerans mekanizmalarının olduğu bildirilmiştir (Ge ve ark., 2009; Chen ve ark., 2010). Buna göre çalışmamızda kullanılan buğday varyetesinde gözlenen kısmi dirençten de bu mekanizmalardan biri veya birden fazlası birlikte etkide bulunmuş olabilir. Söz konusu direnç mekanizmalarından biri antioksidan enzim aktivitelerinde meydana gelen artıştır (Mühling ve Läuchli, 2003; Khan ve ark., 2007; Chen ve ark., 2010; Poghosyan ve ark., 2014). Cd toksisitesinin bitkilerde oksidatif strese neden olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırdığı bilinmektedir (Lu ve ark., 2013; Chen ve ark., 2014; Poghosyan ve ark., 2014; Tauqeer ve ark., 2016). ROS üretiminin ana nedeni, kloroplastlarda ve mitokondride (Davidson ve Schiestl 2001), elektron taşıma zincirinin çok fazla indirgenmesiyle beraber CO_2 fiksasyonunun sınırlandırılması olduğu bilinmektedir. Bunun yanında, peroksizomlarda fotosolunum sırasında glikolat, glioksilik aside oksitlendiği zaman yine H_2O_2 üretilmektedir (Mittler ve ark., 2004). ROS üretiminin artması sonucunda bitki büyümesinde ve biyokütlede azalış meydana gelebilir (Ci ve ark., 2010a).

Cd stresi altındaki bitkiler, ROS'a karşı mücadelelerinde enzimatik ve enzimatik olmayan olmak üzere iki çeşit antioksidan içermektedir. Bunlardan askorbik asit (AsA) ve glutatyon (GSH) gibi antioksidanlar ile süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT) glutatyon peroksidaz (GPX) ve peroksiredoksin (PrxR) gibi ROS süpürücü enzimler gerek normal metabolizma sırasında gerekse stres şartlarında ROS detoksifikasyonu için ilk akla gelenlerdir (Takahashi ve Asada 1988; Apel ve Hirt 2004; Mittler ve ark., 2004; Dietz ve ark., 2006). Chen ve arkadaşları (2014), topraktaki Cd konsantrasyonlarının 10 mg kg^{-1}'e kadar artmasıyla buğday sürgünlerinde ve köklerinde SOD, CAT ve POD aktivitelerinin arttığını, yüksek Cd seviyeleri ile ise azaldığını bildirmişlerdir. Ayrıca Cd'a duyarlı ve toleranslı buğday bitki türleri ile yaptıkları çalışmalarda Ci ve ardaşları (2009), 24 gün boyunca 50 mM Cd stresine maruz bırakılan Cd'a duyarlı buğday hatlarında CAT aktivitesininin artış gösterdiğini, toleranslı hatlarda ise azaldığını göstermişlerdir.

Çalışmalar, buğdayın Cd stresi altında bitki büyüme düzenleyicilerinin [PGR'ler: salisilik asit (SA), giberellik asit (GA), askorbik asit (AsA), absisik asit (ABA), jasmonik asit

(JA), İndol-3-asetik asit (IAA), sitokininler (CK'ler), etilen, nitrik oksit (NO), brassinosteroidler (BR'ler) ve poliaminler (PA'lar) (Asgher ve ark., 2015)] üretimini artımak yoluyla fazla Cd'u tolere edebileceğini göstermiştir. Literatürde kontrole kıyasla Cd maruziyeti altındaki buğday bitkilerinde AsA konsantrasyonun (Riaz ve ark., 2014), SA sentezinin (Kovacs ve ark., 2014), prolin birikiminin (Tripathi ve ark., 2013) arttığı yönünde çalışmalar bulunmaktadır. Bitkilerdeki bu büyüme düzenleyicileri, bitkilerin kendileri tarafından üretilen ve büyüme ve gelişimlerini devam ettirebilmelerini sağlayan maddelerdir. Çalışmamamızda kullandığımız arpa bitkisinin büyüme ve gelişme parametrelerinde kontrole kıyasla azalmalar gözlenmiştir. Yukarıda sayılan durumlar göz önüne alındığında çalışmamızda kullandığımız arpanın Cd'a direncinin düşük olduğunu sonucuna varabiliriz. Bununla beraber buğday örneklerinde genel olarak deney grubuna ait bitkilerdeki büyüme ve gelişme değerlerinin başlangıçta kontrole göre yüksek seyrederken; daha yüksek Cd konsantrasyonlarında ise bu değerlerin kontrole göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Yukarıda bahsi geçen bitki bünyesinde meydana gelen enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlar da bu durumun sorumlusu olabilir. Buna göre buğday için, arpadan farklı olarak belirtilen büyüme düzenleyicileri aracılığıyla nispeten düşük Cd konsantrasyonlarında bu enzim ve antioksidanlarını artırarak ROS'larla savaşmış olduğu yorumu yapılabilir.

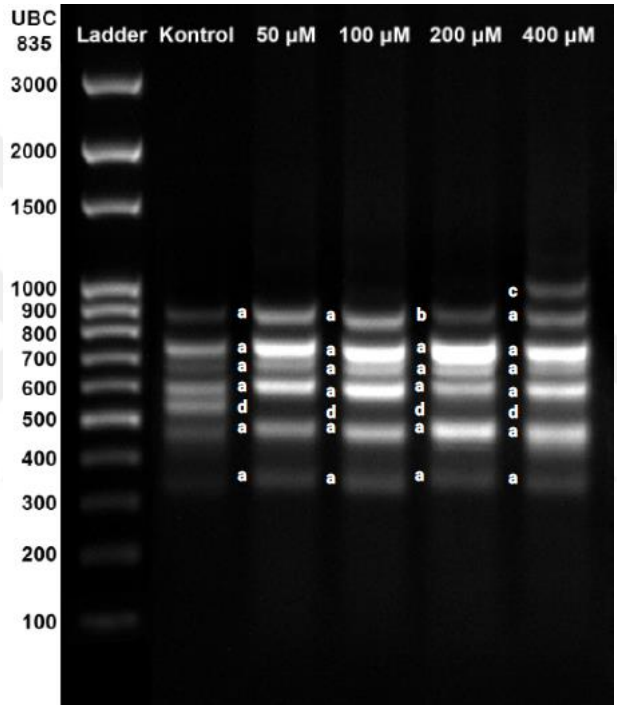
3.4. ISSR Primerleri Kullanılarak Elde Edilen Sonuçlar

Deneysel gözlemlerin morfofizyolojik düzeyde anlaşılmasına ve açıklanmasında ISSR primerleri kullanılarak yapılan moleküler analizler yardımcı olmaktadır (El-Mahdy ve ark., 2021). Bu nedenle, çalışmamızda, Cd stresi nedeniyle buğday ve arpa örneklerinde meydana gelebilecek genotoksik etkiler ISSR-PZR tekniği kullanılarak test edilmiştir. ISSR analizi, kontrol grubuna ait örneklerde PZR sonrasında elektroforezde gözlenen bantların değerlendirme ölçütü olarak kabul edilmesi esasına dayanmaktadır. Deney grubu örneklerinin ISSR bant profillerinde kontrol grubundan elde edilenlere kıyasla gözlenen farklılıklar; kontrol grubunda bulunan DNA bantlarının deney grubu örneklerinde saptanamaması, kontrol örneklerinde bulunmayan yeni DNA bantlarınının deney grubu örneklerinde saptanması ve her iki grubun örnekleri arasında ortak olan bantlara ait bant yoğunluklarındaki değişimdir. ISSR bant profillerinde gözlenen polimorfizmler ise, bir kontrol bandının kaybolmasını ve yeni bir bandın ortaya çıkması

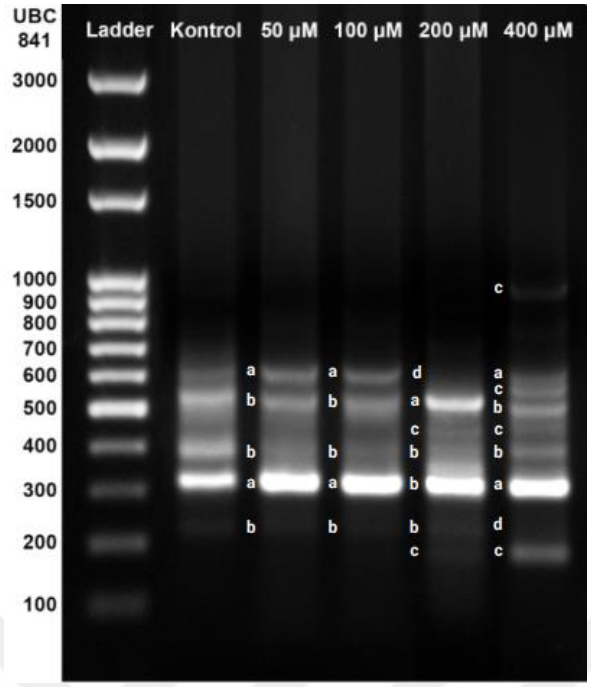
anlamına gelmektedir (Liu ve ark. 2005).

3.4.1. Arpa bitkilerinde ISSR analiz sonuçları

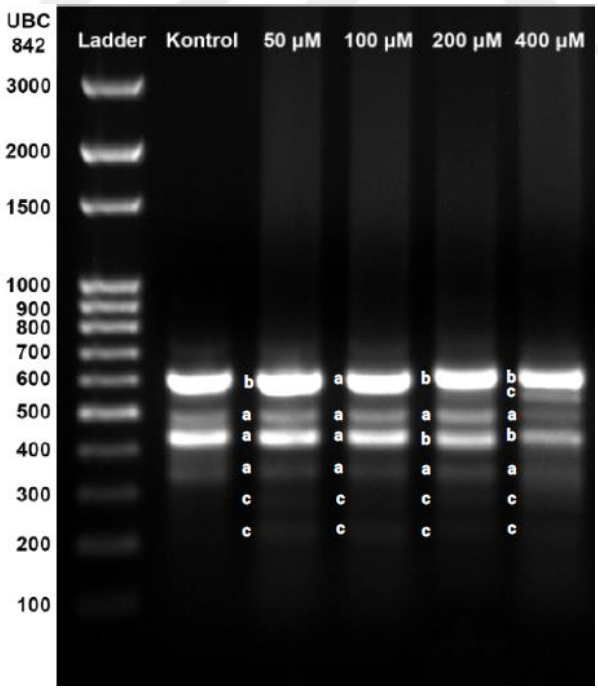
Arpa bitkilerinin DNA parmak izlerindeki varyasyonu, 3 ISSR primeri (UBC835, UBC841 ve UBC842) kullanarak belirlenmiştir. Arpa bitkileri için bu üç primer kullanılarak yapılan PZR reaksiyonları sonucunda çoğaltılan DNA bölgelerinin jel görüntüleri **Şekil 3.11, Şekil 3.12 ve Şekil 3.13**'te, DNA bant profillerinin analizi sonucunda elde edilen veriler ise **Tablo 3.4 ve Tablo 3.5**'de sunulmuştur.



Şekil 3.11. Arpa bitkilerinde ISSR-UBC835 primerlerinin kullanılmasıyla yapılan PZR reaksiyonları sonucunda çoğaltılan DNA bölgelerinin jel görüntüleri. Not: (a) bant yoğunluğunda artış, (b) bant yoğunluğunda azalış, (c) yeni bant oluşumu, (d) bant kaybı.



Şekil 3.12. Arpa bitkilerinde ISSR-UBC841 primerlerinin kullanılmasıyla yapılan PZR reaksiyonları sonucunda çoğaltılan DNA bölgelerinin jel görüntüleri. Not: (a) bant yoğunluğunda artış, (b) bant yoğunluğunda azalış, (c) yeni bant oluşumu, (d) bant kaybı.



Şekil 3.13. Arpa bitkilerinde ISSR-UBC842 primerlerinin kullanılmasıyla yapılan PZR reaksiyonları sonucunda çoğaltılan DNA bölgelerinin jel görüntüleri. Not: (a) bant yoğunluğunda artış, (b) bant yoğunluğunda azalış, (c) yeni bant oluşumu, (d) bant kaybı.

Tablo 3.4. Arpa bitkisinin kontrol ve deney gruplarında ISSR (UBC835, UBC841 ve UBC842) primerleri kullanılarak elde edilen bantların büyüklükleri (bç) ve yoğunlukları.

Primer Adı	Bant Büyüklüğü	Kontrol	50 µM Cd	100 µM Cd	200 µM Cd	400 µM Cd
UBC835	997	-	-	-	-	51,22
	874	43,30	86,40	83,05	42,86	65,59
	725	70,70	131,98	120,92	124,32	131,25
	666	27,39	32,78	35,38	27,63	33,80
	589	46,39	107,71	109,52	55,74	103,25
	540	43,26	-	-	-	-
	465	33,34	99,90	126,08	162,49	125,32
	336	30,07	42,25	44,33	34,93	34,33
UBC841	960	-	-	-	-	39,89
	632	35,25	42,24	41,52	-	35,39
	548	-	-	-	-	37,11
	527	55,33	51,01	54,23	78,79	45,88
	435	-	-	-	35,11	34,65
	391	61,11	34,92	34,93	34,67	42,72
	320	87,59	101,80	111,04	78,39	109,80
	223	36,68	34,68	34,70	36,01	-
	185	-	-	-	35,16	54,34
UBC842	605	179,56	174,10	181,82	166,40	128,50
	568	-	-	-	-	28,58
	503	28,85	34,60	37,53	48,41	31,40
	432	93,87	97,95	95,82	82,53	74,29
	348	28,19	32,61	31,01	37,30	30,86
	286	-	28,16	27,46	27,42	29,38
	227	-	31,89	31,69	29,21	27,61

Tablo 3.5. Arpa bitkilerinde, ISSR (UBC835, UBC841 ve UBC842) primerleri kullanılarak kontrol grubunda elde edilen bantlara göre, deney gruplarında gözlenen bant değişiklikleri. Not: (+) bant yoğunluğundaki artış yüzdesi, (-) bant yoğunluğundaki azalış yüzdesi.

Primer Adı	Bant Büyüklüğü	50 µM Cd	100 µM Cd	200 µM Cd	400 µM Cd
UBC835	997	-	-	-	Yeni bant
	874	99,55$^{(+)}$	91,82$^{(+)}$	1,02$^{(-)}$	51,48$^{(+)}$
	725	86,68$^{(+)}$	71,03$^{(+)}$	75,84$^{(+)}$	85,65$^{(+)}$
	666	19,67$^{(+)}$	29,15$^{(+)}$	0,88$^{(+)}$	23,38$^{(+)}$
	589	132,18$^{(+)}$	136,09$^{(+)}$	20,16$^{(+)}$	122,58$^{(+)}$
	540	Bant kaybı	Bant kaybı	Bant kaybı	Bant kaybı
	465	199,62$^{(+)}$	278,15$^{(+)}$	387,36$^{(+)}$	275,89$^{(+)}$
	336	40,53$^{(+)}$	47,46$^{(+)}$	16,17$^{(+)}$	14,20$^{(+)}$
UBC841	960	-	-	-	Yeni bant
	632	19,84$^{(+)}$	17,80$^{(+)}$	Bant kaybı	0,41$^{(+)}$
	548	-	-	-	Yeni bant
	527	7,80$^{(-)}$	1,98$^{(-)}$	42,40$^{(+)}$	17,08$^{(-)}$
	435	-	-	Yeni bant	Yeni bant
	391	42,86$^{(-)}$	42,85$^{(-)}$	43,27$^{(-)}$	30,10$^{(-)}$
	320	16,22$^{(+)}$	26,77$^{(+)}$	10,50$^{(-)}$	25,36$^{(+)}$
	223	5,45$^{(-)}$	5,40$^{(-)}$	1,83$^{(-)}$	Bant kaybı
	185	-	-	Yeni bant	Yeni bant
UBC842	605	3,04$^{(-)}$	1,26$^{(+)}$	7,33$^{(-)}$	28,43$^{(-)}$
	568	-	-	-	Yeni bant
	503	19,95$^{(+)}$	30,09$^{(+)}$	67,81$^{(+)}$	8,84$^{(+)}$
	432	4,35$^{(+)}$	2,08$^{(+)}$	12,08$^{(-)}$	20,85$^{(-)}$
	348	15,68$^{(+)}$	10,01$^{(+)}$	32,31$^{(+)}$	9,45$^{(+)}$
	286	Yeni bant	Yeni bant	Yeni bant	Yeni bant
	227	Yeni bant	Yeni bant	Yeni bant	Yeni bant

Arpa bitkisinde kontrol grubu örneklerinde UBC835 primeri ile elde edilen 540 bç'lik bölgedeki DNA bantlarının deney gruplarında kaybolduğu gözlenmiştir (**Tablo 3.4 ve**

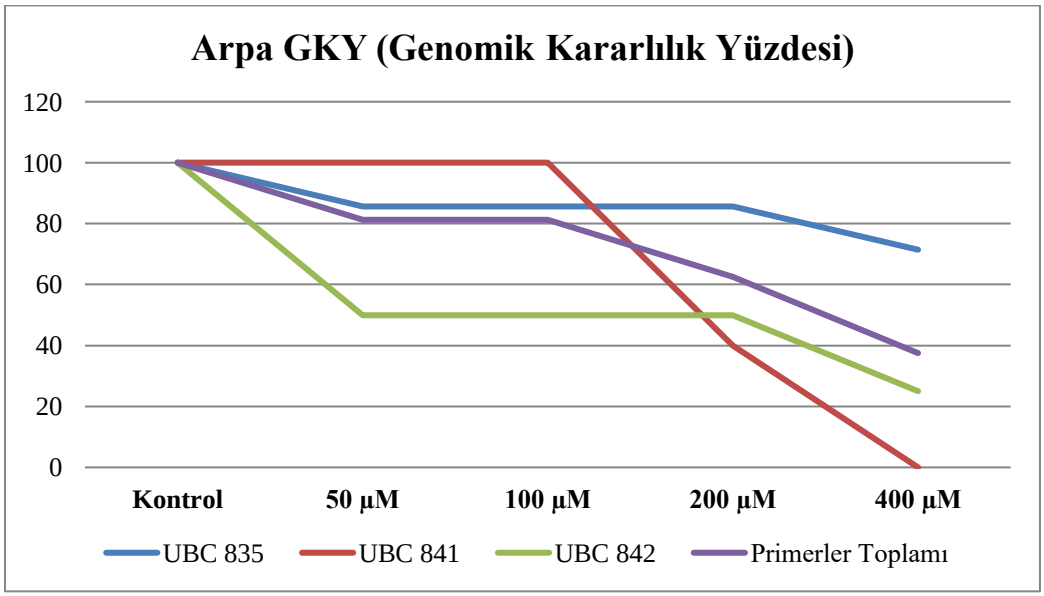
Tablo 3.5). Yine aynı primer (UBC835) ile 997 bç'lik bölgede 400 µM Cd konsantrasyonunda yeni bant oluşumu gözlenmiştir **(Tablo 3.4 ve Tablo 3.5)**.

UBC841 primeri ile elde edilen polimorfik bantlar, kontrolde 632 bç uzunlukta, 200 µM Cd konsantrasyonunda kaybolurken 400 µM Cd konsantrasyonunda yeni bant oluşumu (960 bç) görülmüştür **(Tablo 3.4 ve Tablo 3.5).** Ayrıca aynı primerin (UBC841) 223 bç uzunlukta elde edilen polimorfik bantlar 400 µM Cd konsantrasyonunda kaybolmuştur **(Tablo 3.4 ve Tablo 3.5)**.

Son olarak, UBC842 primeri ile elde edilen polimorfik bantlar, 227 ve 286 bç'lik bölgede 50 µM, 100 µM, 200 µM ve 400 µM Cd konsantrasyonlarında ve 223 bç'lik bölgede yalnızca 400 µM Cd konsantrasyonunda yeni bant oluşumu gözlenmiştir **(Tablo 3.4 ve Tablo 3.5)**. UBC842 primerinde bant kaybı görülmemektedir.

Uygulamalarda elde edilen amplikonların büyüklüğü en yüksek 997 bç (UBC835) iken, en düşük 185 bç (UBC841) olarak gözlenmiştir **(Tablo 3.4).** Ayrıca yeni bant olumşumları tüm primerlerde 400 µM Cd uygulanan örneklerde daha fazladır **(Tablo 3.5)**.

Arpa bitkilerinden elde edilen jel görüntülerindeki monomorfik ve polimorfik DNA bantları değerlendirilmiş ve genomik kararlılık yüzdeleri (GKY) her bir primer için ayrı ayrı hesaplanmıştır **(Şekil 3.14)**.



Şekil 3.14. Arpa örnekleri için hesaplanan genomik kararlılık yüzde değerleri.

Elde edilen sonuçlara göre bant profillerindeki GKY değerleri, kontrol ve deney grubu

(50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanmış) bitkileri için sırasıyla UBC835 primeri için: %100; %85,71; %85,71; %85,71; %71,43 olarak, UBC841 primeri için: %100; %100; %100; %40; %0 olarak, UBC842 primeri için: %100; %50; %50; %50; %25 olarak hesaplanmıştır. Her üç primer için hesaplanan ortalama GKY değeri ise kontrol ve deney grubu (50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanmış) bitkileri için sırasıyla: %100; %81,25; %81,25; %62,5; %37,5 olarak hesaplanmıştır.

UBC835 primeri kullanılarak elde edilen bant profillerine göre; 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarında kadmiyuma maruz kalan bitkilerin %85,71'lik genomik kararlık gösterdiği ve bu değerin 400 µM konsantrasyonda kadmiyuma maruz kalan bitkilerde %71,43'e düştüğü görülmektedir.

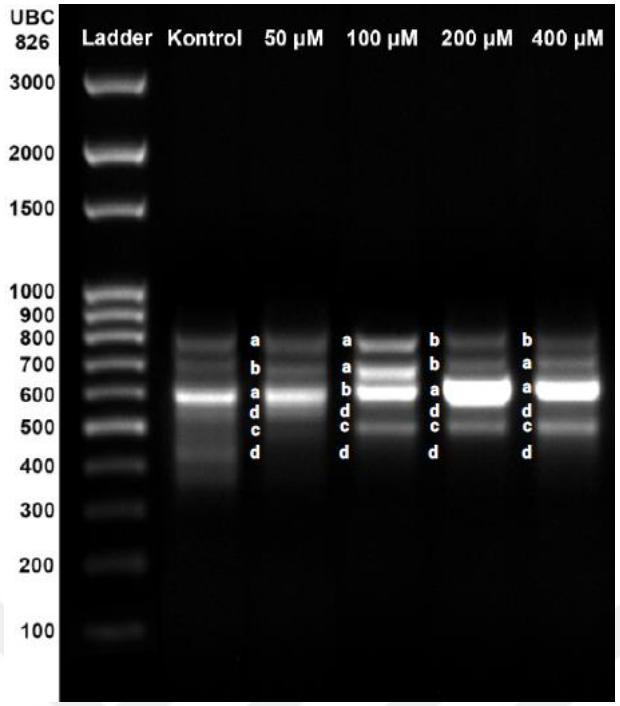
UBC841 primeri kullanılarak elde edilen bant profillerine bakıldığında 50 ve 100 µM kadmiyum kansantrasyonlarında kadmiyuma maruz bırakılan bitkilerde genomik kararlılığın korunduğu (%100), 200 µM kadmiyum konsantrasyonunda ise %40'a düştüğü ve 400 µM kadmiyum konsantrasyonunda ise %0'a kadar düştüğü görülmektedir.

UBC842 primeri kullanılarak elde edilen bant profillerinin GKY değerleri hesaplandığında 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarında kadmiyuma maruz kalan bitkilerde genomik kararlık oranının yarı yarıya azaldığı (%50), 400 µM kadmiyum konsantrasyonunda ise %25'e düştüğü görülmektedir.

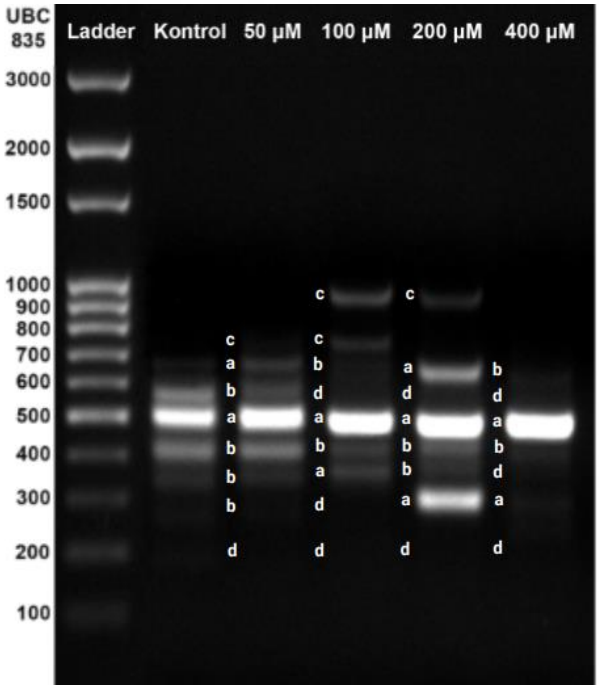
Çalışmada arpa bitkilerinde kullanılan tüm primerlerden (UBC835, UBC841 ve UBC842) elde edilen DNA bant profilleri değerlendirilerek GKY değeri hesaplandığında ise bu değerin 50 ve 100 µM kadmiyum konsantrasyonlarında %81,25 olduğu görülürken, sırası ile 200 µM konsantrasyonda %62,5 ve 400 µM konsantrasyonda ise %37,5'e düştüğü görülmektedir.

3.4.2. Buğday bitkilerinde ISSR analiz sonuçları

Buğday bitkilerinin DNA parmak izlerindeki varyasyonu, 3 ISSR primeri (UBC826, UBC835 ve UBC842) kullanarak belirlenmiştir. Buğday bitkileri için bu üç primer kullanılarak yapılan PZR reaksiyonları sonucunda çoğaltılan DNA bölgelerinin jel görüntüleri **Şekil 3.15, Şekil 3.16 ve Şekil 3.17**'de verilmiştir. DNA bant profillerinin analizi sonucunda elde edilen veriler ise **Tablo 3.6 ve Tablo 3.7**'de sunulmuştur.

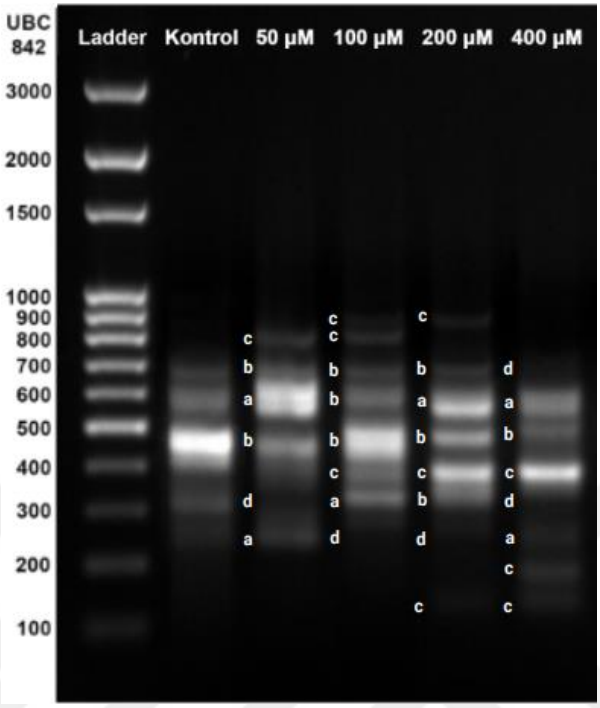


Şekil 3.15. Buğday bitkilerinde yapılan ISSR-UBC826 primerlerinin kullanılmasıyla yapılan PZR reaksiyonları sonucunda çoğaltılan DNA bölgelerinin jel görüntüleri. Not: (a) bant yoğunluğunda artış, (b) bant yoğunluğunda azalış, (c) yeni bant oluşumu, (d) bant kaybı.



Şekil 3.16. Buğday bitkilerinde yapılan ISSR-UBC835 primerlerinin kullanılmasıyla yapılan PZR reaksiyonları sonucunda çoğaltılan DNA bölgelerinin jel görüntüleri. Not:

(a) bant yoğunluğunda artış, (b) bant yoğunluğunda azalış, (c) yeni bant oluşumu, (d) bant kaybı



Şekil 3.17. Buğday bitkilerinde yapılan ISSR-UBC842 primerlerinin kullanılmasıyla yapılan PZR reaksiyonları sonucunda çoğaltılan DNA bölgelerinin jel görüntüleri. Not: (a) bant yoğunluğunda artış, (b) bant yoğunluğunda azalış, (c) yeni bant oluşumu, (d) bant kaybı

Tablo 3.6. Buğday bitkisinin kontrol ve deney gruplarında ISSR (UBC826, UBC835 ve UBC842) primerleri kullanılarak elde edilen bantların büyüklükleri (bç) ve yoğunlukları.

Primer Adı	Bant Büyüklüğü	Kontrol	50 µM Cd	100 µM Cd	200 µM Cd	400 µM Cd
UBC826	764	36,73	40,68	73,53	35,85	28,03
	691	28,77	27,65	53,69	26,86	28,34
	583	123,56	130,54	86,74	193,25	193,31
	541	26,71	-	-	-	-
	495	-	26,17	48,23	39,04	58,07
	431	30,02	-	-	-	-

Tablo 3.6 devam

	943	-	-	69,95	50,13	-
	754	-	27,58	38,45	-	-
	661	28,73	33,79	27,51	108,22	28,11
	558	29,64	28,35	-	-	-
UBC835	501	142,56	214,50	258,86	233,72	250,49
	408	66,31	64,32	36,73	27,33	27,46
	337	27,98	27,97	34,57	27,34	-
	260	28,60	28,36	-	177,88	32,46
	187	30,07	-	-	-	-
	880	-	-	25,85	33,13	-
	790	-	32,20	35,55	-	-
	667	27,06	26,51	26,37	26,41	-
	561	43,13	68,10	40,83	93,63	57,96
	458	108,49	65,64	80,31	61,28	29,08
UBC842	385	-	-	25,48	80,45	117,07
	314	35,34	-	35,92	25,49	-
	263	25,63	34,61	-	-	31,09
	185	-	-	-	-	35,57
	131	-	-	-	28,72	26,37

Tablo 3.7. Buğday bitkilerinde, ISSR (UBC826, UBC835 ve UBC842) primerleri kullanılarak kontrol grubunda elde edilen bantlara göre, deney gruplarında gözlenen bant değişiklikleri. Not: (+) bant yoğunluğundaki artış yüzdesi, (-) bant yoğunluğundaki azalış yüzdesi.

Primer Adı	**Bant Büyüklüğü**	**50 µM Cd**	**100 µM Cd**	**200 µM Cd**	**400 µM Cd**
	764	$10,75^{(+)}$	$100,17^{(+)}$	$2,41^{(-)}$	$23,70^{(-)}$
	691	$3,91^{(-)}$	$86,63^{(+)}$	$6,63^{(-)}$	$1,51^{(-)}$
UBC826	583	$5,65^{(+)}$	$29,80^{(-)}$	$56,41^{(+)}$	$56,46^{(+)}$
	541	Bant kaybı	Bant kaybı	Bant kaybı	Bant kaybı
	495	Yeni bant	Yeni bant	Yeni bant	Yeni bant
	431	Bant kaybı	Bant kaybı	Bant kaybı	Bant kaybı

Tablo 3.7 devam

	943	-	**Yeni bant**	**Yeni bant**	-
	754	Yeni bant	Yeni bant	-	-
	661	17,59$^{(+)}$	4,25$^{(-)}$	276,62$^{(+)}$	2,18$^{(-)}$
	558	4,35$^{(-)}$	Bant kaybı	Bant kaybı	Bant kaybı
UBC835	501	50,47$^{(+)}$	81,58$^{(+)}$	63,94$^{(+)}$	75,71$^{(+)}$
	408	2,99$^{(-)}$	44,61$^{(-)}$	58,78$^{(-)}$	58,59$^{(-)}$
	337	0,04$^{(-)}$	23,54$^{(+)}$	2,30$^{(-)}$	Bant kaybı
	260	0,84$^{(-)}$	Bant kaybı	522,04$^{(+)}$	13,53$^{(+)}$
	187	Bant kaybı	Bant kaybı	Bant kaybı	Bant kaybı
	880	-	Yeni bant	Yeni bant	-
	790	Yeni bant	Yeni bant	-	-
	667	2,03$^{(-)}$	2,55$^{(-)}$	2,40$^{(-)}$	Bant kaybı
	561	57,89$^{(+)}$	5,33$^{(-)}$	117,09$^{(+)}$	34,38$^{(+)}$
	458	39,50$^{(-)}$	25,97$^{(-)}$	43,51$^{(-)}$	73,20$^{(-)}$
UBC842	385	-	Yeni bant	Yeni bant	Yeni bant
	314	Bant kaybı	1,65$^{(+)}$	27,87$^{(-)}$	Bant kaybı
	263	35,03$^{(+)}$	Bant kaybı	Bant kaybı	21,30$^{(+)}$
	185	-	-	-	Yeni bant
	131	-	-	Yeni bant	Yeni bant

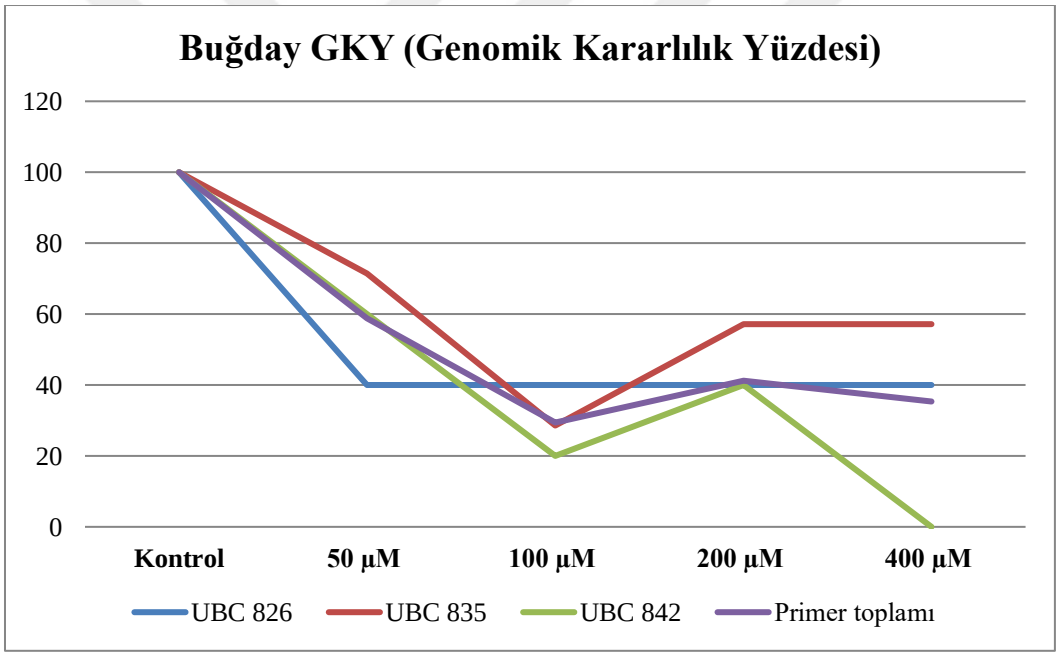
Buğday bitkisinde Primer UBC826 ile elde edilen polimorfik bantlar incelendiğinde tüm Cd konsantrasyonlarında benzer profil sergiledikleri görülmektedir. Sadece kontrolde mevcut bantlar (431 ve 541 bç) görülmesinin yanında, kontrolde olmayıp diğer tüm Cd konsantrasyonlarında (50, 100, 200 ve 400 µM) yetiştirilen bitkilerden alınan numunelerde yeni oluşan (495 bç) bantlar mevcuttur **(Tablo 3.6 ve Tablo 3.7)**.

Primer UBC835 ile elde edilen polimorfik bantlar, kontrolde 187 ve 495 bç'lik bölgede 50, 100, 200 ve 400 µM Cd konsantrasyonlarında, 558 bç'lik bölgede 100 µM, 200 µM ve 400 µM Cd konsantrasyonlarında, 260 bç'lik bölgede ise yalnızca 100 µM Cd konsantrasyonunda kaybolmuştur **(Tablo 3.6 ve Tablo 3.7).** Ayrıca aynı primerin (UBC835) 754 bç'lik bölgesinde 50 µM ve 100 µM Cd konsantrasyonlarında, 943 bç'lik bölgesinde ise 100 µM ve 200 µM konsantrasyonlarında yeni bant oluşumu gözlenmiştir **(Tablo 3.6 ve Tablo 3.7)**.

Son olarak, UBC842 primeri ile elde edilen polimorfik bantlar, 880 bç'lik 100 µM ve 200 µM, 790 bç'lik bölgede 50 µM ve 100 µM, 385 bç'lik bölgede 100 µM, 200 µM ve 400 µM, 185 bç'lik bölgede yalnızca 400 µM ve 131 bç'lik bölgede 200 µM ve 400 µM Cd konsantrasyonlarında yeni DNA bantları ortaya çıkmıştır (Tablo 3.6 ve Tablo 3.7). Bant kaybı ise 314 bç'lik bölgede 50 µM ve 400 µM, ayrıca 263 bç'lik bölgede100 µM ve 200 µM Cd konsantrasyonlarında meydana gelmiştir **(Tablo 3.6 ve Tablo 3.7)**.

Uygulamalarda elde edilen amplikonların büyüklüğü en yüksek 943 bç (UBC835) iken, en düşük 131 bç (UBC842) olarak gözlenmiştir **(Tablo 3.4).**

Buğday bitkilerinden elde edilen jel görüntülerindeki monomorfik ve polimorfik DNA bantları değerlendirilmiş ve genomik kararlılık yüzdeleri (GKY) her bir primer için ayrı ayrı hesaplanmıştır **(Şekil 3.18)**.



Şekil 3.18. Buğday örnekleri için hesaplanan genomik kararlılık yüzde değerleri.

Elde edilen sonuçlara göre bant profillerindeki GKY değerleri kontrol ve deney grubu (50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanmış) bitkiler için sırasıyla UBC826 primeri için: %100; %40; %40; %40; %40 olarak, UBC835 primeri için: %100; %71,43; %28,57; %51,14; %51,14 olarak, UBC842 primeri için: %100; %60; %20; %40; %20 olarak hesaplanmıştır. Her üç primer için hesaplanan ortama GKY değeri ise kontrol ve deney grubu (50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanmış) bitkiler için sırasıyla: %100; %58,82; %29,41; %41,18; %41,18 olarak hesaplanmıştır.

UBC826 primeri kullanılarak elde edilen bant profillerine göre GKY değerinin tüm deney grubundaki (50, 100, 200 ve 400 µM Cd uygulanmış) bitkilerde %40 oranında genomik kararlık gösterdiği görülmüştür. Ayrıca primerin aynı bölgelerinde bant kaybı (841-831 bç'lik bölgelerde) ve yeni bant oluşumları (495 bç'lik bölgede) görülmektedir **(Tablo 3.6 ve Tablo 3.7)**.

UBC835 primeri kullanılarak elde edilen bant profillerine göre 50 ve 100 µM kansantrasyonlarında kadmiyuma maruz bırakılan bitkilerde GKY dalgalanma göstermekle birlikte, kontrole göre düşmüştür. 200 ve 400 µM Cd'a maruz bırakılan bitkilerde genomik karalılık aynı oranda hesaplanmıştır (%51,14). Her iki Cd konsantrasyonu (200 ve 400 µM) sonucunda da 558 ve 187 bç'lik bölgede bant kaybı görülürken, 200 µM Cd konsantrasyonunda 943 bç'lik bölgede yeni bant, 400 µM'da ise 337 bç'lik bölgede bant kaybı meydana gelmesi genomik kararlılığın daha düşük olmasına sebep olmuştur **(Tablo 3.6 ve Tablo 3.7)**. Kontrol grubu hariç deney grupları incelendiğinde, en düşük GKY değeri %28,57 ile 100 µM ve en yüksek GKY ise %71,43 ile 50 µM Cd konsantrasyonlarında görülmektedir.

UBC842 primeri kullanılarak elde edilen bant profillerine göre en düşük GKY değeri 400 µM Cd konsantrasyonlarında (%0), daha sonra 100 µM Cd konsantrasyonunda (%20), ve en yüksek GKY değerinin 50 µM (%60) Cd konsantrasyonunda ortaya çıktığı görülmektedir. 200 µM Cd konsantrasyonunda ise GKY değeri %40'tır. UBC835 primerinde olduğu gibi UBC842 primerinde de GKY dalgalanma göstermekle birlikte, kontrole göre düşmüştür. Ayrıca UBC842 primerinde bant kaybının yeni bant oluşumuna baskın geldiği ve bu nedenle genomik kararsızlığa sebep olan baskın unsurun bant kaybı olduğu görülmüştür **(Tablo 3.6 ve Tablo 3.7)**.

Toplamla üç primerin (UBC826, UBC835 ve UBC842) bant profillerine bakılarak hesaplanan en yüksek GKY değerinin %58,82 ile 50µM Cd konsantrasyonunda, en düşük GKY değerinin ise %29,41 ile 100 µM kadmiyum konsantrasyonlarında olduğu görülmektedir. 200 µM Cd konsantrasyonundaki GKY %41,18 iken bu değer 400 µM Cd konsantrasyonunda %35,29'e düşmüştür.

3.4.3. ISSR primerleri kullanılarak yapılan PZR'den elde edilen sonuçların değerlendirilmesi

Çalışmamızın bir amacı da, arpa ve buğday bitkilerine farklı konsantrasyonlarda uygulanan Cd'un bitkilerdeki olası genotoksik etkilerinin belirlenmesidir. Deney grubu bitkilerden elde edilen DNA bant profilleri kontrol grubu bitkilerden elde edilenlerle kıyaslandığında belirlenecek değişiklikler uygulanan stresin genotoksik etkileri hakkında bizlere bilgi verecektir (Argelia ve Concepcion 2004; Bajpai ve ark., 2015).

Bant yoğunluklarında fark edilen artış veya azalışlar, bant profillerinde gözlenebilecek olası anomalilerdendir. Genotoksik etkiye bağlı olarak ortaya çıkabilecek bu türde anomalilerin sebeplerinden birisi ilgili gene ait kopya sayısının artırılması olabilmektedir (Bazzicalupo ve ark., 2019; Bazzicalupo ve ark., 2020; Paape ve ark., 2020). Gerek büyüme ve gelişmedeki bazı süreçlerde, gerekse kanser gibi istenmeyen hücresel süreçlerle savaşta, istenilen genin kopya sayısının artırılabildiği bilinmektedir. Buna göre hücre, çok yüksek düzeyde ihtiyaç duyduğu bir gen ürününü (RNA veya protein) kısa zamanda bol miktarda üretebilmek amacıyla, yani bazı genlere ait gen ifadelerinin artırılması adına belli bir süreliğine ilgili genin kopya sayısı yüzlerce ve hatta binlerce kat artırılabilmektedir (Bazzicalupo ve ark., 2019; Bazzicalupo ve ark., 2020; Paape ve ark., 2020). Bilinen bir diğer husus da PZR işleminde çoğaltılmak istenen DNA (veya RNA) kalıbının başlangıçtaki kopya sayısı ne kadar çoksa, PZR sonucunda elde edilecek ürün miktarı o kadar çok ve buna bağlı olarak elektroforezde gözlenecek bant da o denli yoğun ve hatta kalın olacaktır. Bu bilgilerden hareketle herhangi bir molekül büyüklüğünde yer alan ve kontrole kıyasla DNA bantlarının yoğunluğunda meydana gelen artış DNA'nın o bölgesinde bulunan genin kopya sayısının artmasının bir sonucu olabilir. Parelel olarak DNA bant yoğunluğundaki azalış ise, o gen bölgesinin kopya sayısında Cd etkisinde oluşan DNA kırıklarına bağlı gen kopyası kaybı sonucu olarak ortaya çıkmış olabilir. Ağır metallere adaptasyonun hem allelik farklılaşma (allelic diversification) hem de gen kopya sayısı varyasyonu ile meydana gelebildiği bilinmektedir. Buna göre, toleranslı ve toleranssız bireylerde birbirinden farklı adaptif alleller (Talke ve ark., 2006; Laporte ve ark., 2016) ve/veya adaptif allel kopya sayısında farklılık (Schrider ve ark., 2010), yoluyla meydana geldiği bilinmektedir. Türler arasındaki gen kopya sayısı farklılığı hem genom boyutuna hem de fenotipik varyasyona önemli ölçüde katkıda bulunan bir genetik

polimorfizm biçimidir (Suryawanshi ve ark., 2016). Ağır metallere toleransın oluşması sırasında sıklıkla saptanan ve birbirinden farklı mekanizmalarla ilgisi bulunan çok sayıda ve birbirinden farklı genetik varyasyonun saptanması, ağır metal toleransının oluşmasına küçük küçük etkilerle katkıda bulunan çok sayıda allelin bulunduğunu ve kontaminasyona karşı koymak için bitkilerde farklı stratejilerin varlığını göstermektedir (Bazzicalupo ve ark., 2019).

Gözlenen çok sayıda genetik varyasyondan biri olan gen kopya sayısı varyasyonunun (Copy Number Variation-CNV), *Noccaea caerulescens* bitkisinin popülasyonlarında kadmiyum toleransı (Craciun ve ark., 2012), ve *Arabidopsis halleri* popülasyonlarında ise çinko ve kadmiyum toleransının gelişmesinden sorumlu olduğu (Talke ve ark., 2006) bildirilmiştir. Spesifik bir arpa varyetesinde bor (Sutton ve ark. 2007), mısırda alüminyum (Maron ve ark., 2013), *A. halleri* bitkisinde ise tür genelinde ağır metal toleransı (Hanikenne ve ark., 2013; Hanikenne ve ark., 2008), gen kopya sayısının artırılması yoluyla elde edildiği bildirilmiş toksik elementlere tolerans örnekleridir. *Arabidopsis thaliana* ve *Zea mays* bitkilerinden elde edilen popülasyon ölçekli genomik verilere göre, yapısal mutasyonların genom plastisitesine, diğer bir deyişle transpozon element içeriklerinin yüksekliğine, katkısı ile alakalı yüksek miktarda gen kopya sayısı varyasyonu tanımlanmıştır (Swanson-Wagner ve ark., 2010; Santuari ve ark., 2010). Bazzicalupo ve arkadaşları (2019)'nın *Suillus luteus* mantarında yaptıkları çalışmalar, sadece ilgili bölgedeki mantarın adaptasyon geliştirmesinden sorumlu hem allelik hem de kopya sayısı varyasyonlarını ortaya koymuştur. Söz konusu genetik varyasyonlar yoluyla ortaya çıkan birçok genetik varyantın, mantarın ağır metal kirliliğine karşı tolerans geliştirmesini sağladığını göstermiştir. Mantarın kazandığı bu ağır metal toleransında genlerin ve yolakların kombine etkileri sonucunda, ağır metalleri hücre dışına geri pompalama, depolama, immobilizasyon ve ROS türevlerinin detoksifikasyonu gibi birbirinden farklı tolerans stratejilerinin ortaya çıkarak "metal homeostazı"na katkı sağladıkları anlaşılmıştır.

Bitkilerin hücrelerinde normal fizyolojik koşullar altında ROS ve onlarla etkileşime geçen antioksidanlar arasında karşılıklı denge hali söz konusudur. Buna göre hücrede süperoksit radikallerinin birikmesi ya da endojen savunma sistemlerinin yetersiz kalması durumunda denge, ROS lehine bozulur ve sonuçta "oksidatif stres" durumu ortaya çıkar (Ighodaro ve ark., 2018; Bhatti ve ark., 2022). Serbest radikal oluşumunun bir sonucu

olarak, hücrelerde biriken serbest radikallere karşı sürekli enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlar gerçekleşir (Halliwell, 1994).

Optimal büyüme koşulları altında ROS, esas olarak kloroplast, mitokondri ve peroksizom gibi organellerde düşük seviyelerde üretilmektedir. Ancak stres koşullarında üretim hızları artan hidroksil radikalleri (OH^{-}), hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonları (O_2^{-}) ve tekli oksijen ($^1O_2$) gibi bazı ROS türevleri proteinlerde, DNA'da ve lipidlerde oksidatif hasara yol açmaktadır (Apel ve Hirt 2004). Kısacası ROS'lar hücre ölümü sonucunu beraberinde getirebilen metabolik ve sinyal yolaklarını ve ilave olarak hücresel membranların özelliklerini etkileyen toksik moleküllerdir (Gill ve Tuteja, 2010). Yüksek Cd konsantrasyonlarının, ayrıca proteinlerde yapısal değişikliklere yol açtığı ve bazı genlerin aktivitelerini engellediği bildirilmiştir (Cebeci ve ark., 2008; Hou ve Tang., 2019). Cd stresi altındaki buğday yapraklarında, Cd toleransında yer alan ve biyokimyasal reaksiyonlarda önemli roller oynayabilecek proteinlerin mevcut olduğu bildirilmiştir (Ge ve ark., 2009). Ayrıca Wang ve ark. (2011), esas olarak Cd detoksifikasyon ve antioksidan işlemlerde yer alan proteinlerin buğday bitkilerinde Cd stresinden dolayı artırdığını bildirmiştir.

Oksidaitif hasar sonucunda meydana gelen malondialdehit, membrandaki lipidlerin oksidatif hasarını gösteren molekül, DNA yapısındaki bazlarla reaksiyona girerek mutajenik etkiye sebep olur. Hidroksil radikalleri, DNA bazlarında oksidatif hasar meydana gelmesine veya DNA zincirlerinin kopmasına yol açar. Hidroksil'in DNA ile etkileşime girmesinin kanser oluşumunda da önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Valko ve ark., 2005; Valko ve ark., 2006; Jomova ve Valko, 2011; Maya-Mendoza ve ark., 2015)

Cd'un ROS üretimini teşvik etme yoluyla yanlış eşleşme onarımı, nükleotid eksizyon onarımı ve baz eksizyon onarımı gibi DNA onarım sistemlerini etkileyerek genotoksik bir etki gösterebileceği öne sürülmüştür (Bertin ve Averbeck 2006). Risso-de Faverney ve ark. (2001), Lin ve ark. (2007) ve Çatav ve ark. (2020), Cd maruziyetinden kaynaklanan aşırı ROS üretiminin, sırasıyla, gökkuşağı alabalığı, baklagiller ve buğday fidelerinde genotoksik etkinin oluşumunda rol oynayabileceğini bildirmişlerdir.

ROS türevlerinin bitki hücrelerinden uzaklaştırılmalarında çeşitli bileşikler rol alır. Bunlar arasında ağır metalleri bağlama/şelatlama rolleriyle iyi bilinen fenolik bileşikler, askorbik asit, tokoferol, glutatyon ve karotenoidleri içeren enzimatik olmayan antioksidan savunma

sistemleri en çok bilinenlerdir (Maleki ve ark. 2017).

Süperoksit dismutaz (SOD) ise ROS ve süperoksit anyon radikallerine karşı en önemli antioksidan savunma sistemi olarak bilinmektedir (Shah ve ark., 2001). SOD, bir süperoksit radikalini O_2 molekülüne yükseltgerken; diğer bir süperoksit radikalinin ise daha az reaktif bir molekül olan hidrojen perokside (H_2O_2) indirgenmesini katalizler (Afonso ve ark., 2007). Irfan ve arkadaşları (2014), Cd kaynaklı oksidatif hasar meydana geldiğinde SOD'un, ilk savunma hattı olarak süperoksit radikalini O_2 ve H_2O_2'ye dönüşümünü katalizlediğini bildirmişlerdir. Literatürde ROS'ların aşırı üretimlerinin buğday ve diğer bitkilerdeki başlıca Cd toksisite mekanizması olduğuna dair pek çok araştırma bulunmaktadır (Dey ve ark., 2007; Chen ve ark., 2010; Gajewska ve SkŁodowska, 2010; Wang ve ark., 2011; Lu ve ark., 2013).

GKY, deney grubuna ait bitki örneklerinin, kontrol grubuna ait bant profiline olan benzerliğinin oransal olarak ifadesidir ve mutajen etkinin bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir. GKY değeri, doğrudan DNA değişikliğinin derecesi, DNA onarımı ve replikasyonunun yeterliliği ile ilgilidir. Artan baz çifti, mutasyon sıklığı gibi yapı varyasyonları genomik kararsızlığa sebep olmaktadır (Savva, 2000; Osman ve ark., 2020).

Deneylerimizdeki verilere dayalı olarak hesaplanan genomik kararsızlık, deney sırasında bitki hücrelerinde gerçekleşmiş bulunan farklı olaylarla ilişkilendirilebilir. Kadmiyumun doğrudan DNA'ya bağlanarak mutasyona sebep olmaktan çok etkisini ROS türleri üzerinden gösterdiğine dair pek çok bulgu mevcuttur (Miller ve ark., 2010). Buna göre stresle ilişkili olarak artan reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu hem kromozomal hem de gen düzeyindeki mutasyonlar ve buna bağlı olarak ortaya çıkan ISSR bant profili değişiklikleri bu durumu en iyi açıklayabilecek model olarak önümüzde durmaktadır. ISSR bant profillerinde GKY değerindeki azalmanın sebebinin DNA'daki hasar düzeyi, DNA replikasyonu ve DNA onarım mekanizmalarındaki eksikliklerle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Pessoa ve ark., 2015). DNA'da meydana gelen nokta mutasyonları sonucunda belirgin bir bant kaybının gözlenebileceği ifade edilmiştir (Bajpai ve ark., 2015). Bant kaybı ise, yeni bant oluşumunda olduğu gibi, GKY değerinin daha düşük hesaplanmasına sebep olan iki olaydan biridir.

Ağır metallerin varlığında büyüyen bitkilerde GKY oranının, uygulanan ağır metal

dozuna bağlı olarak giderek düştüğü bildirilmiştir (Gjorgieva ve ark., 2012; Sorrentino ve ark., 2017). Bunun yanında, sahip oldukları bazı özel mekanizmalar sayesinde ağır metalleri diğer bitkilere kıyasla yüksek konsantrasyonlarda akümüle eden ve bu durumdan belli bir değere kadar etkilenmeyen ya da az etkilenen hiperakümülatör bitkilerde ise yüksek konsantrasyonlardaki ağır metal uygulamalarında bile genomik kararlılık değerinin yüksek olduğu gözlenmiştir (Ozyigit ve ark., 2021). Genomik kararlılık, DNA hasarının boyutu ve DNA onarım ve replikasyonunun etkinliği ile doğrudan ilişkili olduğundan, bir kirletici tarafından indüklenen yüksek DNA hasarı seviyeleri, DNA onarım mekanizmalarını tamamen inhibe edebilmektedir (Sorrentino, 2017).

Çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar genel olarak incelendiğinde, arpa ve buğday bitkilerine artan konsantrasyonlarda uygulanan kadmiyum stresi sonucunda GKY değerinin azaldığı görülmüştür. Önceki çalışmalar, domates bitkisinde 80 ppm'e kadar uygulanan gümüş nanopartiküllerinin (Ag-NP) (Cekic ve ark., 2017) ve bakla bitkisinde 50 ppm'e kadar uygulanan çinko oksit nanopartiküllerinin (ZnO-NP) (Mahmoud, 2019) artan konsantrasyonu ile GKY değerinin düştüğünü göstermiştir. Çatav ve arkadaşları (2020), artan Cd konsantrasyonları ile (250, 500 ve 1000 µM) buğday fidelerinin genomik kararlılıklarının önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir. Vanadyum (V) ağır metalinin buğday genomu üzerinde genotoksik etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmaya göre vanadyumun, ISSR profillerinde farklı polimorfik bantlara sebep olarak GKY değerinde düşüklüğe sebep olduğu ve bunun sebebinin de vanadyumun genotoksik etkilerinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Bakir ve Agar, 2020). Ayrıca, vanadyumun hücre bölünmesini önleyici (antiproliferatif) aktivitesinin, yine vanadyumun DNA hasarını indükleyici ve genotoksik etkilerinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Usende ve ark., 2018). Vanadyuma ait bu bilgiden hareketle kadmiyum kaynaklı genotoksik etki sonucu ortaya çıkan DNA hasarının da aynı şekilde antiproliferatif aktivite etkisi taşıdığı varsayımında bulunulabilir. Ancak bir Cd hiperakümülatörü su bitkisi olan su mercimeği (*Lemna minör* L.) ile yapılan bir çalışmada yüksek konsantrasyonlu Cd ve Ni uygulamalarında bile GKY değerinin yüksek olduğu gözlenmiştir (Ozyigit ve ark., 2021). Genotoksisitenin sonuçlarından biri olan hücre ölümü de GKY değerini etkilemektedir. Genel olarak toksik madde konsantrasyonu arttığında GKY değerinde düşüş gözlenmesine karşın, toksik madde konsantrasyonuna bağlı olarak ortaya çıkan hücre

ölümü durumunda, söz konusu hücre bütünlüğü bozulduğundan ve/veya DNA'sı kısmen ya da tamamen programlanmış hücre ölümü ile sindirildiğinden, PZR'de bu hücreye ait DNA'nın kullanılması sonuçların güvenilirliğini olumsuz etkileyebilecektir (Atienzar ve ark., 1999). Çalışmamızda buğday bitkisindeki 200 µM Cd uygulamasında UBC835 ve UBC842 primerinde GKY'nin düşmesi ve 200 µM Cd uygulamasında artması DNA izolasyonunda kullandığımız dokulardaki bazı hücrelerin ölü olabileceklerinin GKY değerine yansıması olduğu düşünülmektedir.

4. SONUÇLAR

Sonuç olarak, Cd toksisitesine bağlı olarak yaprak total klorofil değerinin azalması ve fotosentezin inhibisyonu, yeni moleküllerin sentezlenmesindeki azalmalar ve bunun bitki yaş ve kuru ağırlık değerlerine yansıması, bitki su alımındaki olumsuzluklar gibi fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerde meydana gelen farklılıklar neticesinde çalıştığımız her iki bitki türünde de bitki büyüme ve gelişmesi sınırlı kalmış ve biyokütle azalmıştır. Bununla birlikte, bitki örneklerimizin Cd toksisitesine karşı verdikleri tepkiler, uygulanan Cd stresinin şiddetine ve bitkinin genotipine göre değişiklik göstermiştir. Bu durum literatürdeki benzer çalışmalar ile de uyum göstermektedir.

Bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda Cd uygulanan bitkilerde ölçülen morfolojik ve fizyolojik parametreler ile ISSR markörlerinden elde edilen bulgular birbirlerini destekler niteliktedir. Elde edilen sonuçlar, Cd'un artan konsantrasyonlarına bağlı olarak buğday (*Triticum aestivum* L.) ve arpa (*Hordeum vulgare* L.) bitkileri üzerindeki genotoksik etkilerini bizlere göstermiştir. ISSR primerleri kullanılarak elde edilen DNA bant profillerindeki değişiklikler, kontrol grubu bitkilerde olmayan yeni bantların ortaya çıkması ve/veya kaybolması ve bant yoğunluklarındaki değişiklikler şeklinde görülmekle birlikte; DNA'da meydana gelen kırıkların ve diğer mutasyonların daha spesifik bir şekilde tanımlanması ve etkilenen bölgelerin tanımlanması için, örnekler üzerinde sekans analizlerinin yapılması veya FISH gibi dizi spesifik DNA problarının kullanılacağı bir deneyin kurgulanması da tavsiye edilebilir. Artan Cd konsantrasyonu ile DNA'ya ait GKY değeri arasında göze çarpan ters orantılı değişim, çevresel toksisitenin araştırılmasında ISSR analizinin etkinliğini desteklemektedir. DNA bant profillerinden elde edilen polimorfik bantlara dayalı olarak yapılan hesaplamalar Cd'un buğday ve arpa bitkilerindeki genotoksik etkisini doğrulamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Abu-Muriefah, S. S. (2008). Growth parameters and elemental status of cucumber (*Cucumus sativus*) seedlings in response to cadmium accumulation. *International Journal of Agriculture and Biology*, *10*(3), 261-266.

2. Acir, Y. & Erdem, H. (2020). Biochar uygulamalarının ekmeklik buğdayın kadmiyum (Cd) alımına etkisi. *Akademik Ziraat Dergisi*, *9*(2), 327-336.

3. Acir, Y., & Erdem, H. (2020). Biochar uygulamalarının ekmeklik buğdayın kadmiyum (Cd) alımına etkisi. *Akademik Ziraat Dergisi*, 9(2), 327-336.

4. Acosta, I. B., Junior, A. S. V., e Silva, E. F., Cardoso, T. F., Caldas, J. S., Jardim, R. D., Corcini, C. D. (2016). Effects of exposure to cadmium in sperm cells of zebrafish, *Danio rerio*. *Toxicology Reports*, 3, 696- 700.

5. Açar, E., & Kaçar, Y. A. (2021). CRISPR/Cas9 Technology and Applications in Plants. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, *9*(1), 1-6.

6. Adrees, M., Ali, S., Rizwan, M., Zia-ur-Rehman, M., Ibrahim, M., Abbas, F., Farid, M., Qayyum, M. K. & Irshad, M. K. (2015). Mechanisms of silicon-mediated alleviation of heavy metal toxicity in plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *119*, 186-197.

7. Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., & Lomri, A. (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint bone spine*, *74*(4), 324-329.

8. Aggarwal, B. B., Gupta, S. C., & Kim, J. H. (2012). Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *119*(3), 651-665.

9. Ahmad, I., Naeem, M., & Khan, N. A. (2009). Effects of cadmium stress upon activities of antioxidative enzymes, photosynthetic rate, and production of phytochelatins in leaves and chloroplasts of wheat cultivars differing in yield potential. *Photosynthetica*, *47*(1), 146-151.

10. Aksu, G. (2019). Kadmiyum ile kirli alanlarda bitki besin elementlerinin alınımı üzerine indol asetik asitin etkisi. *Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Dergisi*, *7*(2), 80-85.

11. Al Khateeb, W., & Al-Qwasemeh, H. (2014). Cadmium, copper and zinc toxicity effects on growth, proline content and genetic stability of *Solanum nigrum* L., a crop wild relative for tomato; comparative study. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *20*(1), 31-39.

12. Alexander, P.D., Alloway, B.J. ve Dourado, A.M. (2006). Genotypic variations in the accumulation of Cd, Cu, Pb and Zn exhibited by six commonly grown vegetables. *Environ. Pollut*, *144*,736–745.

13. Alhasnawi, A. N., Kadhimi, A. A., Isahak, A., Ashraf, M. F., Doni, F., Mohamad, A., Zain, C. M. (2015). Application of inter simple sequence repeat (ISSR) for detecting genetic analysis in rice (*Oryza sativa* L.). *J Pure Appl Microbiol*, 9(2), 1091–1101.

14. Ali, S., Bharwana, S. A., Rizwan, M., Farid, M., Kanwal, S., Ali, Q., ... & Khan, M. D. (2015). Fulvic acid mediates chromium (Cr) tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) through lowering of Cr uptake and improved antioxidant defense system. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(14), 10601-10609.

15. Alloway, B. J. (1995). The origins of heavy metals in soils. *Heavy metals in soils*, 38-57.

16. Almuwayhi, M. A. (2021). Effect of cadmium on the molecular and morpho-physiological traits of Pisum sativum L. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *35*(1), 1374-1384.

17. Al-Qurainy, F., Khan, S., Tarroum, M., Nadeem, M., Alansi, S., & Alshameri, A. (2017). Biochemical and genetical responses of *Phoenix dactylifera* L. to cadmium stress. *BioMed research international*, *2017*.

18. Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signaling transduction. *Annual review of plant biology*, *55*, 373.

19. Aravind, P. & Prasad M. N. V. (2005) Cadmium-zinc interactions in a hydroponic system using *Ceratophyllum demersum* L.: adaptive ecophysiology, biochemistry and molecular toxicology. *Braz J Plant Physiol*. 17(1):3–20.

20. Argelia C, Concepcian B (2004) In vitro assessment of DNA damage after short- and long-term exposure to benzo[a]pyreneusing RAPD and the RTG-2 fish cell line. *Mutation Res* 552:141–151

21. Arslan, E. (2020). Putrescine in herbicide stress protection: modulate the genomic instability and DNA methylation changes in wheat. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (19), 442-448.

22. Asri, F. Ö., & Sönmez, S. (2006). Ağır Metal Toksisitesinin Bitki Metabolizması Üzerine Etkileri. *Derim*, *23*(2), 36-45.

23. Asri, F. Ö., Sönmez, S., & Çıtak, S. (2007). Kadmiyumun çevre ve insan sağliği üzerine etkileri. *Derim*, *24*(1), 32-39.

24. Atart, B. (2017). Gıdamız buğdayın, geçmişten geleceğe yolculuğu. *Yalvaç Akademi Dergisi*, *2*(1), 1-12.

25. Atienzar, F.A., Conradi, M., Evenden, A.J., Jha, A.N. & Depledge, M.H. (1999). Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: comparison of genomic template stability with key fitness parameters in Daphnia magna exposed to benzo[a]pyrene. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18, 2275-2282.

26. Bajpai, R., Shukla, V., Singh, N., Rana, T. S., & Upreti, D. K. (2015). Physiological and genetic effects of chromium (+ VI) on toxitolerant lichen species, Pyxine cocoes. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(5), 3727-3738.

27. Bakir, O., & Agar, G. (2020). Ameliorating effect of boric acid against vanadium toxicity in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Arabian Journal for Science and Engineering*, *45*(1), 113-120.

28. Barlow, S., Renwick, A. G., Kleiner, J., Bridges, J. W., Busk, L., Dybing, E., ... & Würtzen, G. (2006). Risk assessment of substances that are both genotoxic and carcinogenic: Report of an International Conference organized by EFSA and WHO with support of ILSI Europe. *Food and chemical toxicology*, *44*(10), 1636-1650.

29. Baydar, H., (2020). Bitki Genetiği ve Islahı, 1. Basım, Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık Tic. Ltd. Şti, Ankara.

30. Bazzicalupo, A. L., Ruytinx, J., Ke, Y. H., Coninx, L., Colpaert, J. V., Nguyen, N. H., Vilgalys, R. & Branco, S. (2019). Incipient local adaptation in a fungus: evolution of heavy metal tolerance through allelic and copy-number variation. *BioRxiv*, 832089.

31. Bazzicalupo, A. L., Ruytinx, J., Ke, Y. H., Coninx, L., Colpaert, J. V., Nguyen, N. H., Vilgalys, R. & Branco, S. (2020). Fungal heavy metal adaptation through single nucleotide polymorphisms and copy-number variation. *Molecular Ecology*, 29(21), 4157-4169.

32. Bergeron, P. M., Jumarge, C. (2006). Characterization of cadmium uptake in human intestinal crypt cells HIEC in relation to inorganic metal speciation. *Toxicology*, 219 (1-3), 156-166.

33. Bertin, G. & Averbeck, D. (2006) Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* 88:1549–1559

34. Bhatti, J. S., Sehrawat, A., Mishra, J., Sidhu, I. S., Navik, U., Khullar, N., Kumar, S., Bhatti G. K. & Reddy, P. H. (2022). Oxidative stress in the pathophysiology of type 2 diabetes and related complications: Current therapeutics strategies and future perspectives. *Free Radical Biology and Medicine*, 184, 114-134.

35. Bornet, B. & Branchard, M., (2001). Nonanchored inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Mol Biol Reporter* 19, 209–215.

36. Butterworth, A. S., Higgins, J. P., & Pharoah, P. (2006). Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis. *European journal of cancer*, *42*(2), 216-227.

37. Cailin, G. E., Ding, Y., Wang, Z., Wan, D., Wang, Y., Shang, Q., & Luo, S., (2009). Responses of wheat seedlings to cadmium, mercury and trichlorobenzene stresses. *Journal of Environmental Sciences*, *21*(6), 806-813.

38. Cebeci, O., Kokturk, B., Ergen, N., Ozturk, L., Cakmak, I., & Budak, H. (2008). Differential expression of wheat transcriptomes in response to varying cadmium concentrations. *Biologia Plantarum*, *52*(4), 703-708.

39. Chen, C. H., Zhou, Q. X., Cai, Z., & Wang, Y. Y. (2010). Effects of soil polycyclic musk and cadmium on pollutant uptake and biochemical responses of wheat (*Triticum aestivum*). *Archives of environmental contamination and toxicology*, *59*(4), 564-573.

40. Chen, C., Zhou, Q., & Cai, Z. (2014). Effect of soil HHCB on cadmium accumulation and phytotoxicity in wheat seedlings. *Ecotoxicology*, *23*(10), 1996-

2004.

41. Cho, M., Chardonnens, A. N., & Dietz, K. J. (2003). Differential heavy metal tolerance of Arabidopsis halleri and Arabidopsis thaliana: a leaf slice test. *New Phytologist*, *158*(2), 287-293.

42. Chu, B., Qu, Y., He, X., Hao, Y., Yang, C., Yang, Y., Hu, D., Wang, F. & Qian, Z. (2020). ROS-responsive camptothecin prodrug nanoparticles for on-demand drug Release and combination of chemotherapy and photodynamic therapy. *Advanced Functional Materials*, *30*(52), 2005918.

43. Ci, D., Jiang, D., Dai, T., Jing, Q., & Cao, W. (2009). Effects of cadmium on plant growth and physiological traits in contrast wheat recombinant inbred lines differing in cadmium tolerance. *Chemosphere*, *77*(11), 1620-1625.

44. Ci, D., Jiang, D., Wollenweber, B., Dai, T., Jing, Q., & Cao, W. (2010). Cadmium stress in wheat seedlings: growth, cadmium accumulation and photosynthesis. *Acta Physiologiae Plantarum*, *32*(2), 365-373.

45. Craciun, A. R., Meyer, C. L., Chen, J., Roosens, N., De Groodt, R., Hilson, P., & Verbruggen, N. (2012). Variation in HMA4 gene copy number and expression among Noccaea caerulescens populations presenting different levels of Cd tolerance and accumulation. *Journal of Experimental Botany*, *63*(11), 4179-4189.

46. Çatav, Ş. S., Genç, T. O., Oktay, M. K., Küçükakyüz, K. (2020) Cadmium Toxicity in Wheat: Impacts on Element Contents, Antioxidant Enzyme Activities, Oxidative Stress, and Genotoxicity. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,* 104, 71–77.

47. Çekiç, F. Ö., Ekinci, S., İnal, M. S., & Özakça, D. (2017). Silver nanoparticles induced genotoxicity and oxidative stress in tomato plants. *Turkish Journal of Biology*, *41*(5), 700-707.

48. Dahlin, A. S., Eriksson, J., Campbell, C. D., & Öborn, I. (2016). Soil amendment affects Cd uptake by wheat—are we underestimating the risks from chloride inputs?. *Science of the Total Environment*, *554*, 349-357.

49. Dai, X. P., Feng, L., Ma, X. W., & Zhang, Y. M. (2012). Concentration level of heavy metals in wheat grains and the health risk assessment to local inhabitants from Baiyin, Gansu, China. In *Advanced Materials Research, 518*, 951-956.

50. Das, P., Samantaray, S., & Rout, G. R. (1997). Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environmental pollution*, *98*(1), 29-36.

51. Davidson, J. F., & Schiestl, R. H. (2001). Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in Saccharomyces cerevisiae. *Molecular and cellular biology*, *21*(24), 8483-8489.

52. Dere, S., & Akcin, T. A. (2017). Anatomical and micromorphological properties of some *Tanacetum* L. (*Asteraceae*) taxa from Turkey and their systematic implications. *Acta Botanica Croatica*, *76*(2), 138-145.

53. Dere, S., & Akcin, T. A. (2017). Anatomical and micromorphological properties of some *Tanacetum* L. (*Asteraceae*) taxa from Turkey and their systematic implications. *Acta Botanica Croatica*, *76*(2), 138-145.

54. Deutschle T, Porkert U, Reiter R, Keck T, Riechelmann H (2006) In vitro genotoxicity and cytotoxicity of benzalkonium chloride. Toxicol In Vitro 20, 1472–1477

55. Dey, S. K., Dey, J., Patra, S., & Pothal, D. (2007). Changes in the antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in wheat seedlings exposed to cadmium and lead stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *19*, 53-60.

56. Dietz, K. J., Jacob, S., Oelze, M. L., Laxa, M., Tognetti, V., de Miranda, S. M. N., Baier, M. & Finkemeier, I. (2006). The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *Journal of experimental botany*, *57*(8), 1697-1709.

57. Dogan, C. S., Erdem, D., Mesut, P., Merve, A., Sema, A., Iffet, B., & Afig, B. (2012). A novel splice site mutation of the beta subunit gene of epithelial sodium channel (ENaC) in one Turkish patient with a systemic form of pseudohypoaldosteronism type 1. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, *25*(9-10), 1035-1039.

58. Doğru, A. (2019). Bazı Arpa Genotiplerinde Kurşun Toleransının Klorofil A Floresansı ile Değerlendirilmesi. *Bartın University International Journal of Natural and Applied Sciences*, 2(2), 228-238.

59. Doyle, J. J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.

60. Doyle, J. J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12, 13-15.

61. Duffus, J .H. (2002). Heavy metals: a meaningless term (IUPAC Technical report). *Pure Appl Chem.* 74(5), 793-807.

62. Duffus, J. H. (2002). " Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure and applied chemistry*, *74*(5), 793-807.

63. Đukić-Ćosić, D., Baralić, K., Javorac, D., Djordjevic, A. B., & Bulat, Z. (2020). An overview of molecular mechanisms in cadmium toxicity. *Current Opinion in Toxicology*, *19*, 56-62.

64. El-Mahdy, M. T., Abdel-Wahab, D. A., & Youssef, M. (2021). In vitro morpho-physiological performance and DNA stability of banana under cadmium and drought stresses. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *57*(3), 460-469.

65. Erboga, M., Kanter, M. (2016). Effect of cadmium on trophoblast cell proliferation and apoptosis in different gestation periods of rat placenta. *Biological Trace Element Research*, 169(2), 285-293.

66. Erdem, H., Tosun, Y. K., & Ozturk, M. (2012). Effect of cadmium-zinc interactions on growth and Cd-Zn concentration in durum and bread wheats. *Fresenius Environ Bull*, *21*(5), 1046-51.

67. Factori, R., Leles, S. M., Novakowski, G. C., Rocha, C. L. S. C., & Thomaz, S. M. (2014). Toxicity and genotoxicity of water and sediment from streams on dotted duckweed (Landoltia punctata). *Brazilian Journal of Biology*, *74*, 769-778.

68. Farooq, M., Aziz, T., Basra, S. M. A., Wahid, A., Khaliq, A., Cheema, M. A. (2008). Exploring the Role of Calcium to Improve Chilling Tolerance in Hybrid Maize. *Journal of Agronomy and Crop Science, 194*(5), 350-359.

69. Filiz, E., Koc, İ. (2011). Bitki Biyoteknolojisinde Moleküler Markörler. *GOÜ, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 28(2), 207-214.

70. Filiz, E., Uras, M. E., Ozyigit I. I., Sen, U., Gungor, H. (2018). Genetic diversity and phylogenetic analyses of Turkish rice varieties revealed by ISSR markers and chloroplast trnL-F region. *Fresen Environ Bull,* 27(12): 8351–8358.

71. Fural, Ş., & Kükrer, S. (2021). Sulak alanlarda potansiyel toksik element (PTE) kaynaklı bölgesel ekolojik risk araştırmalarında kullanılan analitik metotlar. *Türk Coğrafya Dergisi*, (77), 211-222.

72. Gajewska, E., & SkŁodowska, M. (2010). Differential effect of equal copper,

cadmium and nickel concentration on biochemical reactions in wheat seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 73*(5), 996-1003.

73. Gao, X., Mohr, R. M., McLaren, D. L., & Grant, C. A. (2011). Grain cadmium and zinc concentrations in wheat as affected by genotypic variation and potassium chloride fertilization. *Field Crops Research, 122*(2), 95-103.

74. Geng, H. X., Wang, L. (2019). Cadmium: toxic effects on placental and embryonic development. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 67, 102-107.

75. Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry, 48*(12), 909-930.

76. Gjorgieva, D., Kadifkova-Panovska, T., Mitrev, S., Kovacevik, B., Kostadinovska, E., Baceva, K., Stafilov, T. (2012). Assessment of the genotoxicity of heavy metals in Phaseolus vulgaris L. as a model plant system by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. *J. Environ. Sci. Health A* 47, 366e373.

77. Groppa, M. D., Rosales, E. P., Iannone, M. F., & Benavides, M. P. (2008). Nitric oxide, polyamines and Cd-induced phytotoxicity in wheat roots. *Phytochemistry*, *69*(14), 2609-2615.

78. Gupta, M., Chyi, Y. S., Romero-Severson, J., Owen, J. L., (1994). Amplification of DNA markers from evalutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor. Appl. Genetics, 89*, 998-1006.

79. Gupta, P. K., Balyan, H. S., Sharma, S., & Kumar, R. (2020). Genetics of yield, abiotic stress tolerance and biofortification in wheat (Triticum aestivum L.). *Theoretical and Applied Genetics, 133*(5), 1569-1602.

80. Gür, F., Tümen, F., & Erdem, M. (2004). Cr (VI) Reduction in aqueous solutions by siderite. *Journal of Hazardous Materials*, B113, 217–222

81. Habib, R., Wahdan, S. A., Gad, A. M., Azab, S. S. (2019). Infliximab abrogates cadmium-induced testicular damage and spermiotoxicity via enhancement of steroidogenesis and suppression of inflammation and apoptosis mediators. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 182, 109-398.

82. Habiba, U., Ali, S., Farid, M., Shakoor, M. B., Rizwan, M., Ibrahim, M., Abbasi, G. H., Hayat, T & Ali, B. (2015). EDTA enhanced plant growth, antioxidant defense system, and phytoextraction of copper by Brassica napus

L. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(2), 1534-1544.

83. Hadi, F., Ali, N., & Ahmad, A. (2014). Enhanced phytoremediation of cadmium-contaminated soil by Parthenium hysterophorus plant: effect of gibberellic acid (GA3) and synthetic chelator, alone and in combinations. *Bioremediation journal*, *18*(1), 46-55.

84. Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition reviews*, *52*(8), 253-265.

85. Hanikenne, M., Kroymann, J., Trampczynska, A., Bernal, M., Motte, P., Clemens, S., & Krämer, U. (2013). Hard selective sweep and ectopic gene conversion in a gene cluster affording environmental adaptation. *PLoS genetics*, *9*(8), e1003707.

86. Hanikenne, M., Talke, I. N., Haydon, M. J., Lanz, C., Nolte, A., Motte, P., Kroymann, J., Weigel, D. & Krämer, U. (2008). Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4. *Nature*, *453*(7193), 391-395.

87. Hattab, S., Dridi, B., Chouba, L., Kheder, M. B., & Bousetta, H. (2009). Photosynthesis and growth responses of pea *Pisum sativum* L. under heavy metals stress. *Journal of Environmental Sciences*, *21*(11), 1552-1556.

88. Hoagland, D. R., Arnon, D. I., (1950). The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil. *California Agricultural Experiment Station*, Berkeley.

89. Hocaoglu-Ozyigit, A., Genc, B. N., (2020). Cadmium in plants, humans and the environment. *Frontiers in Life Sciences and Related Technologies*, 1(1), 12-21.

90. Hou, X., Tan, L., & Tang, S. F. (2019). Molecular mechanism study on the interactions of cadmium (II) ions with Arabidopsis thaliana glutathione transferase Phi8. Spectrochimica Acta Part A: *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 216, 411-417.

91. Huang, M., Zhou, S., Sun, B., & Zhao, Q. (2008). Heavy metals in wheat grain: assessment of potential health risk for inhabitants in Kunshan, China. *Science of the Total Environment*, *405*(1-3), 54-61.

92. Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*, *54*(4), 287-293.

93. Imafidon, C. E., Olatoye, T. R., Bamidele, F. S., Ojo, O. E., Ademoye, K. A. (2016). Cadmium-induced testicular toxicity, oxidative stress and histopathology in Wistar rats: sustained effects of polyphenol-rich extract of Vernonia amygdalina (Del.) leaf. *Journal of Interdisciplinary Histopathology*, 4(3), 54-62.

94. Inaba, T., Kobayashi, E., Suwazono, Y., Uetani, M., Oishi, M., Nakagawa, H., Nogawa, K. (2005). Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai–itai disease. *Toxicol. Lett*. 159, 192–201.

95. International Agency for Research on Cancer. Report of the Advisory Group to Recommend Priorities for IARC Monographs during 2020–2024; 25–27 March, 2019. Lyon: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, in press.

96. Irfan, M., Ahmad, A., & Hayat, S. (2014). Effect of cadmium on the growth and antioxidant enzymes in two varieties of Brassica juncea. *Saudi journal of biological sciences*, *21*(2), 125-131.

97. Jafarnejadi, A. R., Homaee, M., Sayyad, G., & Bybordi, M. (2011). Large scale spatial variability of accumulated cadmium in the wheat farm grains. *Soil and Sediment Contamination*, *20*(1), 98-113.

98. Jin, Y. H., Clark, A. B., Slebos, R. J., Al-Refai, H., Taylor, J. A., Kunkel, T. A., Resnick, M. A. & Gordenin D. A. (2003) Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nat Genet, 34,* 326–329

99. Jomova, K., & Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, *283*(2-3), 65-87.

100. Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., & Timur, S. (2003). Metallerin çevresel etkileri-I. Metalurji dergisi, 136, 47-53.

101. Kalınbacak, K., Yurdakul, İ., & Gedikoğlu, İ. (2012). Determination of Toxicity Limits of Cadmium for Wheat and Comparison of Some Extraction Methods. *Toprak Su Dergisi*, *1*(1), 28-37.

102. Khan, N. A., Samiullah, Singh, S., & Nazar, R. (2007). Activities of antioxidative enzymes, sulphur assimilation, photosynthetic activity and growth of wheat (*Triticum aestivum*) cultivars differing in yield potential under cadmium stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, *193*(6), 435-444.

103. Khanna, A., Khanna, M., & Manjari, M. (2013). Cytomorphological patterns in the diagnosis of tuberculous lymphadenitis. *International Journal of Medical and Dental Sciences*, 182-188.

104. Khanna, N. & Sharma, S. (2013). "Allium cepa root chromosomal aberration assay: a review". IJPBR, 1,105–119.

105. Kılıç, R. & Korkmaz, K. (2012). Kimyasal Gübrelerin Tarım Topraklarında Artık Etkileri. Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi, 5(2), 87-90.

106. Korkmaz, K., Ertürk, Ö., Ayvaz, M. Ç., Özcan, M. M., Akgün, M., Kirli, A., & Alver, D. O. (2018). Effect of cadmium application on antimicrobial, antioxidant and total phenolic content of basil genotypes. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, *52*(4), S108-S114.

107. Korkmaz, K., Kara, S. M., Özkutlu, F., Akgün, M., & Coşge Şenkal, B. (2017). Profile of heavy metal and nutrient elements in some sideritis species. *Int J Pharm*, *51*, 209-212.

108. Kovács, V., Gondor, O. K., Szalai, G., Darkó, É., Majláth, I., Janda, T., & Pál, M. (2014). Synthesis and role of salicylic acid in wheat varieties with different levels of cadmium tolerance. *Journal of hazardous materials*, *280*, 12-19.

109. Kurar, E. (2001). *Comparative physical and linkage mapping of bovine chromosome 24 with human chromosome 18*. The University of Wisconsin-Madison.

110. Laporte, M., Pavey, S. A., Rougeux, C., Pierron, F., Lauzent, M., Budzinski, H., Geneste, E., Couture, P., Baudrimont, M. & Bernatchez, L. (2016). RAD sequencing reveals within-generation polygenic selection in response to anthropogenic organic and metal contamination in North Atlantic Eels. *Molecular ecology*, *25*(1), 219-237.

111. Li, Y., Chen, Z., Xu, S., Zhang, L., Hou, W., & Yu, N. (2015). Effect of Combined Pollution of Cd and B [a] P on Photosynthesis and Chlorophyll Fluorescence Characteristics of Wheat. *Polish Journal of Environmental Studies*, *24*(1).

112. Lin A, Zhang X, Chen M, Cao Q (2007) Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. *J Environ Sci* 19:596–602

113. Lin, R., Wang, X., Luo, Y., Du, W., Guo, H., & Yin, D. (2007). Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings

(Triticum aestivum L.). *Chemosphere*, *69*(1), 89-98.

114. Liu, C.P., Luo, C.L., Gao, Y., Li, F.B., Lin, L.W., Wu, C.A., Li, X.D. (2010a). Arsenic contamination and potential health risk implications at an abandoned tungsten mine, southern China. *Environ. Pollut.* 158, 820–826.

115. Liu, Q., Li, M. Z., Leibham, D., Cortez, D., & Elledge, S. J. (1998). The univector plasmid-fusion system, a method for rapid construction of recombinant DNA without restriction enzymes. *Current biology*, *8*(24), 1300-S1.

116. Liu, R., & Lal, R. (2015). Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Science of the total environment*, *514*, 131-139.

117. Liu, Y., Xiao, T., Baveye, P. C., Zhu, J., Ning, Z., & Li, H. (2015). Potential health risk in areas with high naturally-occurring cadmium background in southwestern China. *Ecotoxicology and environmental safety*, *112*, 122-131.

118. Loix, C., Huybrechts, M., Vangronsveld, J., Gielen, M., Keunen, E. & Cuypers, A. (2017) Reciprocal interactions between cadmium- induced cell wall responses and oxidative stress in plants. *Front Plant Sci* 8, 1867.

119. Long, X. X., Yang, X. E., & Ni, W. Z. (2002). Current situation and prospect on the remediation of soils contaminated by heavy metals. *Ying Yong Sheng tai xue bao= The Journal of Applied Ecology*, *13*(6), 757-762.

120. Luna, C. M., Gonzalez, C. A. & Trippi, V. S. (1994). Oxidative damage caused by excess of copper in oat leaves. *Plant Cell Physiology 3(1),* 11-15.

121. Mahmoud, H. (2019). Molecular and cytogenetic assessment of zinc nanoparticles on *Vicia faba* plant cells. *The Egyptian Journal of Experimental Biology (Botany), 15*(1), 39-39.

122. Maleki, M., Ghorbanpour, M., & Kariman, K. (2017). Physiological and antioxidative responses of medicinal plants exposed to heavy metals stress. *Plant Gene*, *11*, 247-254.

123. Maron, L. G., Guimarães, C. T., Kirst, M., Albert, P. S., Birchler, J. A., Bradbury, P. J., Bucker, E. S., Coluccio, A. E., Danilova, T. V., Kudrna, D., Magalhaes, J. V., Piñeros, M. A, Schatz, M. C., Wing, R. A. & Kochian, L. V. (2013). Aluminum tolerance in maize is associated with higher MATE1 gene copy number. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(13), 5241-5246.

124. Marple, T., Li, H., & Hasty, P. (2004). A genotoxic screen: rapid analysis of cellular dose–response to a wide range of agents that either damage DNA or alter genome maintenance pathways. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *554*(1-2), 253-266.

125. Marschner, H., (2008). Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, Second Edition. London.

126. Mataka, L. M., Henry, E. M. T., Masamba, W. R. L. & Sajidu, S. M. (2006). Lead remediation of contaminated water using Moringa stenopetala sp., and Moringa oleifera sp., seed powder. *Inter. J. Envir. Sci. & Tech*, *3*(2):131-139

127. Maya-Mendoza, A., Ostrakova, J., Kosar, M., Hall, A., Duskova, P., Mistrik, M., Merchut-Maya, J. M. Hodny., Z., Bartkova, J., Christensen., C. & Bartek, J. (2015). Myc and Ras oncogenes engage different energy metabolism programs and evoke distinct patterns of oxidative and DNA replication stress. *Molecular oncology*, *9*(3), 601-616.

128. Meharg, A. (2011). Trace Elements in Soils and Plants. 4th edition. By A. Kabata-Pendias. Boca Raton, FL, USA: CRC Press/Taylor & Francis Group (2010), pp. 548, US$159.95. ISBN 9781420093681. *Experimental Agriculture*, *47*(4), 739-739.

129. Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., & Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, cell & environment*, *33*(4), 453-467.

130. Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*, *9*(10), 490-498.

131. Moreno, J. L., Hernández, T., & Garcia, C. (1999). Effects of a cadmium-contaminated sewage sludge compost on dynamics of organic matter and microbial activity in an arid soil. *Biology and Fertility of Soils*, *28*(3), 230-237.

132. Mühling, K. H., & Läuchli, A. (2003). Interaction of NaCl and Cd stress on compartmentation pattern of cations, antioxidant enzymes and proteins in leaves of two wheat genotypes differing in salt tolerance. *Plant and Soil*, *253*(1), 219-231.

133. Müller, A. (1927). An X-ray investigation of certain long-chain compounds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, *114*(768), 542-561.

134. Naeem, A., Saifullah, Rehman, M. Z. U., Akhtar, T., Ok, Y. S., & Rengel, Z. (2016). Genetic variation in cadmium accumulation and tolerance among wheat cultivars at the seedling stage. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, *47*(5), 554-562.

135. Naik, A., Prajapat, P., Krishnamurthy, R., Pathak, J. M. (2017). Assessment of genetic diversity in Costus pictus accessions based on RAPD and ISSR markers. *3 Biotech*, 7(1), 70–82.

136. Newman, C. W., & Newman, R. K. (2006). A brief history of barley foods. *Cereal foods world*, *51*(1), 4-7.

137. Nna, V. U., Ujah, G. A., Mohamed, M., Etim, K. B., Igba, B. O., Augustine, E. R., Osim, E. E. (2017). Cadmium chloride-induced testicular toxicity in male wistar rats; prophylactic effect of quercetin, and assessment of testicular recovery following cadmium chloride withdrawal. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 109-123.

138. Ohta H et all. (2000) Relationship between Renal Dysfunction and Bone Metabolism Disorder in Male Rats after Long-term Oral Quantitative Cad- mium Administration, *Industrial Health*. 38: 339-55.

139. Okcu, M., Tozlu, E., Kumlay, A. M., & Pehluvan, M. (2009). The effects of heavy metals on plants. *Alinteri Zirai Bilimler Dergisi*, *17*, 14-26.

140. Osman, S. A., Salama, D. M., Abd El-Aziz, M. E., Shaaban, E. A., & Abd Elwahed, M. S. (2020). The influence of MoO3-NPs on agro-morphological criteria, genomic stability of DNA, biochemical assay, and production of common dry bean (Phaseolus vulgaris L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, *151*, 77-87.

141. Ouzounidou, G. (1995). Cu-ions mediated changes in growth, chlorophyll and other ion contents in a Cu-tolerant Koeleria splendens. *Biologia Plantarum* 37, 71-79

142. Ozkutlu, F. (2021). Kadmiyum (Cd) ve NaCl Uygulamalarının Brokolide (*Brassica oleracea* var. italica) Kuru Madde Miktarı ve Besin Elementi İçeriğine Etkisi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 8* (1), 77-8.

143. Ozyigit I. I., Yilmaz, S., Dogan, I., Sakcali M. S., Tombuloglu, G. & Demir, G. (2016). Detection of physiological and genotoxic damages reflecting toxicity in kalanchoe clones. *Global Nest J.*, *18*(1), 223–232.

144. Ozyigit, I. I., Arda, L., Yalcin, B., Yalcin, I. E., Ucar, B., & Hocaoglu-Ozyigit, A. (2021). *Lemna minor*, a hyperaccumulator shows elevated levels of Cd accumulation and genomic template stability in binary application of Cd and Ni: a physiological and genetic approach. *International Journal of Phytoremediation, 23*(12), 1255-1269.

145. Ozyigit, I. I., Dogan, I., Igdelioglu, S., Filiz, E., Karadeniz, S., & Uzunova, Z. (2016). Screening of damage induced by lead (Pb) in rye (*Secale cereale* L.)–a genetic and physiological approach. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *30*(3), 489-496.

146. Özkutlu, F. Kadmiyum (Cd) ve NaCl Uygulamalarının Brokolide (*Brassica oleracea* var. italica) Kuru Madde Miktarı ve Besin Elementi İçeriğine Etkisi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, *8*(1), 77-84.

147. Özkutlu, F., Turan, M., Korkmaz, K., & Huang, Y. M. (2009). Assessment of heavy metal accumulation in the soils and hazelnut plant (Corylus avellena L.) from Black Sea Coastal Region of Turkey. *Asian Journal of Chemistry*, *21*(6), 4371-4388.

148. Özsensoy, Y., & Kurar, E. (2012). Markör Sistemleri ve Genetik Karakterizasyon Çalismalarinda Kullanimlari/Marker Systems and Applications in Genetic Characterization Studies. *Journal of Cell and Molecular Biology*, *10*(2), 11.

149. Paape, T., Akiyama, R., Cereghetti, T., Onda, Y., Hirao, A. S., Kenta, T., & Shimizu, K. K. (2020). Experimental and field data support range expansion in an allopolyploid Arabidopsis owing to parental legacy of heavy metal hyperaccumulation. *Frontiers in genetics, 11*, 565854.

150. Pérez-Chaca, M.V., Rodríguez-Serrano, M., Molina, A.S., Pedranzani, H.E., Zirulnik, F., Sandalio, L.M., Romero-Puertas, M.C. (2014). Cadmium induces two waves of reactive oxygen species in *Glycine max* (L.) roots. *Plant Cell Environ. 37*, 1672–1687.

151. Person, R. J., Tokar, E. J., Xu, Y., Orihuela, R., Ngalame, N. N. O., Waalkes, M. P. (2013). Chronic cadmium exposure in vitro induces cancer cell characteristics in human lung cells. *Toxicology and Ap-plied Pharmacology*, *273*(2), 281-288.

152. Pessoa, J. C., Etcheverry, S., & Gambino, D. (2015). Vanadium compounds in medicine. *Coordination Chemistry Reviews*, *301*, 24-48.

153. Poghosyan, G. H., Mukhaelyan, Z. H., & Vardevanyan, P. H. (2014). Influence of cadmium ions on growth and antioxidant system activity of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences*, *2*(10), 371.

154. Pordel, F., Pour, A. H., & Çakmaşçı, R. (2019). Buğdayda (*Triticum aestivum* L.) Erken Alüminyum Stresine Karşı Bakteri Uygulamalarının Etkileri. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, *50*(1), 57-65.).

155. Prasad, M. N. V. (2005). Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environmental and Experimental Botany 35*, 525–545

156. Qi, X. M., Li, P. J., Wan, L. I. U., & Xie, L. J. (2006). Multiple biomarkers response in maize (*Zea mays* L.) during exposure to copper. *Journal of Environmental Sciences*, *18*(6), 1182-1188.

157. Qureshi, M. I., D'Amici, G. M., Fagioni, M., Rinalducci, S., & Zolla, L. (2010). Iron stabilizes thylakoid protein–pigment complexes in Indian mustard during Cd-phytoremediation as revealed by BN-SDS-PAGE and ESI-MS/MS. *Journal of Plant Physiology*, *167*(10), 761-770.

158. Reddy, M.P., Sarla, N. & Siddiq, A., (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding *Euphytica* 128, 9–17.

159. Riaz, S., Iqbal, M., Hussain, I., Rasheed, R., Arslan, M., Mahmood, A. S., Younas, M. & Iqbal, M. Z. (2014). Chronic cadmium induced oxidative stress not the DNA fragmentation modulates growth in spring wheat (*Triticum aestivum*). *International Journal of Agriculture and Biology*, *16*(4), 789–794.

160. Risso-de Faverney, C., Devaux, A., Lafaurie, M., Girard, J. P., Bailly, B. & Rahmani, R. (2001) Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygene species. *Aquat Toxicol, 53*, 65–76

161. Rizwan, M., Ali, S., Abbas, T., Zia-ur-Rehman, M., Hannan, F., Keller, C., Al-Wabel, M. I. & Ok, Y. S. (2016). Cadmium minimization in wheat: a critical review. *Ecotoxicol. Environ. Saf. 130*, 43–53.

162. Rizwan, M., Ali, S., Adrees, M., Rizvi, H., Zia-ur-Rehman, M., Hannan, F., Farooq-Qayyum, M. & Ok, Y. S. (2016). Cadmium stress in rice: toxic effects, tolerance mechanisms, and management: a critical review. *Environmental Science*

and Pollution Research, *23*(18), 17859-17879.

163. Rizwan, M., Meunier, J. D., Davidian, J. C., Pokrovsky, O. S., Bovet, N., & Keller, C. (2016). Silicon alleviates Cd stress of wheat seedlings (*Triticum turgidum* L. cv. Claudio) grown in hydroponics. *Environmental Science and Pollution Research*, *23*(2), 1414-1427.

164. Rizwan, M., Meunier, J. D., Miche, H., & Keller, C. (2012). Effect of silicon on reducing cadmium toxicity in durum wheat (*Triticum turgidum* L. cv. Claudio W.) grown in a soil with aged contamination. *Journal of hazardous materials*, *209*, 326-334.

165. Sadat-Hosseini, M., Vahdati, K., Leslie & C. A. (2019). Germination of Persian walnut somatic embryos and evaluation of their genetic stability by ISSR fingerprinting and flow cytometry. *Horts*, 54(9), 1576–1580.

166. Sandalio, L. M., Dalurzo, H. C., Gómez, M., Puertas-Romero, M. C. & del Rio, L.A., (2001). Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany, 52* (362), 2115-2126.

167. Santuari, L., Pradervand, S., Amiguet-Vercher, A. M., Thomas, J., Dorcey, E., Harshman, K., Xenarios, I., Juenger, T. E. & Hardtke, C. S. (2010). Substantial deletion overlap among divergent Arabidopsis genomes revealed by intersection of short reads and tiling arrays. *Genome biology*, *11*(1), 1-8.

168. Satarug, S., Garrett, S. H., Sens, M. A. & Sens, D. A. (2010). Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environ. Health Persp. 118*, 182–190.

169. Savva, D. (2000). The use of arbitrarily primed PCR (AP-PCR) fingerprinting to detect exposure to genotoxic chemicals. *Ecotoxicology*, *9*(5), 341-353.

170. Saydam Eker, Ç. (2020). Distinct contamination indices for evaluating potentially toxic element levels in stream sediments: a case study of the Harşit Stream (NE Turkey). *Arabian Journal of Geosciences*, *13*(22), 1-18.

171. Schrider, D. R., & Hahn, M. W. (2010). Gene copy-number polymorphism in nature. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *277*(1698), 3213-3221.

172. Shafi, M., Bakht, J., Razuddin, Hayat, Y., & Zhang, G. P. (2011). Genotypic difference in the inhibition of photosynthesis and chlorophyll fluorescence by

salinity and cadmium stresses in wheat. *Journal of plant nutrition*, *34*(3), 315-323.

173. Shah, K., Kumar, R. G., Verma, S., & Dubey, R. S. (2001). Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science*, *161*(6), 1135-1144.

174. Sheirdil, R. A., Bashir, K., Hayat, R., & Akhtar, M. S. (2012). Effect of cadmium on soybean (*Glycine max* L) growth and nitrogen fixation. *African Journal of Biotechnology*, *11*(8), 1886-1891.

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

176. Shi, G., Lu, H., Liu, H., Lou, L., Zhang, P., Song, G., Zhou, H. & Ma, H. (2020). Sulfate application decreases translocation of arsenic and cadmium within wheat (*Triticum aestivum* L.) plant. *Science of The Total Environment, 713*, 136665.

177. Silva, E. M., Souza, J. N. S., Rogez, H., Rees, J. F., & Larondelle, Y. (2007). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food chemistry, 101*(3), 1012-1018.

178. Singh, A., Sharma, R. K., Agrawal, M., Marshall, F. (2009). Effects of wastewater irrigation on physicochemical properties of soil and availability of heavy metals in soil and vegetables. *Communications in Soil Science and Plant Analysis, 40*(21-22), 3469-3490.

179. Somma, M. & Querci, M. (2004). The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. In: Querchi M. J., Jermini, M., Van den Eede, G., Training course on the analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms (user manual), European Commission (EU), Joint Research Centre (JRC), Section 6.

180. Sorrentino, M. C., Capozzi, F., Giordano S. & Spagnuolo, V. (2017). Genotoxic effect of Pb and Cd on in vitro cultures of Sphagnum palustre: An evaluation by ISSR markers. *Chemosphere*, 181, 208-215

181. Souza, V. L., de Almeida, A. A. F., Lima, S. G., de M Cascardo, J. C., da C Silva, D., Mangabeira, P. A., & Gomes, F. P. (2011). Morphophysiological responses and programmed cell death induced by cadmium in *Genipa americana* L. (Rubiaceae). *Biometals*, *24*(1), 59-71.

182. Sridhar, B. B. M., Han, F. X., Diehl, S. V., Monts, D. L., & Su, Y. (2007). Effects of Zn and Cd accumulation on structural and physiological characteristics of barley plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *19*, 15-22.

183. Staub, J. E., Serquen, F. C., & Gupta, M. (1996). Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience*, *31*(5), 729-741.

184. Stresty, T.V.S., Madhava Rao & K.V. (1999), "Ultrastructural alterations in response to zinc and nickel stress in the root cell of pigeonpea, 3-13.

185. Suryawanshi, V., Talke, I. N., Weber, M., Eils, R., Brors, B., Clemens, S., & Krämer, U. (2016). Between-species differences in gene copy number are enriched among functions critical for adaptive evolution in Arabidopsis halleri. *BMC genomics*, *17*(13), 43-64.

186. Sutton, T., Baumann, U., Hayes, J., Collins, N. C., Shi, B. J., Schnurbusch, T., Hay, A., Mayo, G., Pallotta, M., Tester, M. & Langridge, P. (2007). Boron-toxicity tolerance in barley arising from efflux transporter amplification. *Science*, *318*(5855), 1446-1449.

187. Swanson-Wagner, R. A., Eichten, S. R., Kumari, S., Tiffin, P., Stein, J. C., Ware, D., & Springer, N. M. (2010). Pervasive gene content variation and copy number variation in maize and its undomesticated progenitor. *Genome research*, *20*(12), 1689-1699.

188. Takahashi, M., & Asada, K. (1988). Superoxide production in aprotic interior of chloroplast thylakoids. *Archives of biochemistry and biophysics*, *267*(2), 714-722.

189. Talke, I. N., Hanikenne, M., & Krämer, U. (2006). Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant physiology*, *142*(1), 148-167.

190. Tan, H. W., Liang, Z. L., Yao, Y., Wu, D. D., Mo, H. Y., Gu, J., Chiu, C. F., Xu, Y. M. & Lau, A. T. (2019). Lasting DNA damage and aberrant DNA repair gene expression profile are associated with post-chronic cadmium exposure in human bronchial epithelial cells. *Cells*, *8*(8), 842.

191. Tanno, K. I., & Willcox, G. (2006). The origins of cultivation of *Cicer arietinum* L. and *Vicia faba* L.: early finds from Tell el-Kerkh, north-west Syria, late 10th millennium BP. *Vegetation History and Archaeobotany*, *15*(3), 197-204.

192. Tauqeer, H. M., Ali, S., Rizwan, M., Ali, Q., Saeed, R., Iftikhar, U., Ahmad, R., Farid, M. & Abbasi, G. H. (2016). Phytoremediation of heavy metals by *Alternanthera bettzickiana*: growth and physiological response. *Ecotoxicology and environmental safety*, *126*, 138-146.

193. Teklić, T., Parađiković, N., Špoljarević, M., Zeljković, S., Lončarić, Z., & Lisjak, M. (2021). Linking abiotic stress, plant metabolites, biostimulants and functional food. *Annals of Applied Biology*, *178*(2), 169-191.

194. Toprak Mahsülleri Ofisi. (2021) Dünya Hububat ve Bakliyat Raporu https://www.tmo.gov.tr/bilgi-merkezi/dunya-hububat-ve-bakliyat-raporu, 15 Mart 2021

195. Tran, T. A., & Popova, L. P. (2013). Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. *Turkish journal of Botany*, *37*(1), 1-13.

196. Tripathi, B. N., Singh, V., Ezaki, B., Sharma, V., & Gaur, J. P. (2013). Mechanism of Cu-and Cd-induced proline hyperaccumulation in *Triticum aestivum* (wheat). *Journal of plant growth regulation*, *32*(4), 799-808.

197. ur Rehman, M. Z., Rizwan, M., Ali, S., Ok, Y. S., Ishaque, W., Nawaz, M. F., Akmal, F. & Waqar, M. (2017). Remediation of heavy metal contaminated soils by using *Solanum nigrum*: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*, *143*, 236-248.

198. Usende, I. L., Alimba, C. G., Emikpe, B. O., Bakare, A. A., & Olopade, J. O. (2018). Intraperitoneal sodium metavanadate exposure induced severe clinicopathological alterations, hepato-renal toxicity and cytogenotoxicity in African giant rats (Cricetomys gambianus, Waterhouse, 1840). *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(26), 26383-26393.

199. Valko, M. M. H. C. M., Morris, H., & Cronin, M. T. D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry*, *12*(10), 1161-1208.

200. Valko, M., Rhodes, C. J. B., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, *160*(1), 1-40.

201. Vardar-Kanlıtepe, Ç., Aras, S., & Cansaran-Duman, D. (2010). Application of the molecular marker and gene transfer in plant breeding. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, *67*(1), 33-43.

202. Wahabi, M. S., & Bukhari, N. A. (2014). Inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis to molecular characteristic determination of *Heliotropium digynum* in Saudi Arabia. *International Journal*, *2*(10), 902-906.

203. Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., Beyersmann, D. (2003) Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology, 192*, 95-117.

204. Wang, Y., Qian, Y., Hu, H., Xu, Y., & Zhang, H. (2011). Comparative proteomic analysis of Cd-responsive proteins in wheat roots. *Acta physiologiae plantarum*, *33*(2), 349-357.

205. Weber, J. L., & May, P. E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American journal of human genetics*, *44*(3), 388.

206. Wei, J., & Cen, K. (2020). Assessment of human health risk based on characteristics of potential toxic elements (PTEs) contents in foods sold in Beijing, China. *Science of The Total Environment*, *703*, 134747.

207. Wu, S. M., Shih, M. J., & Ho, Y. C. (2007). Toxicological stress response and cadmium distribution in hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) upon cadmium exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *145*(2), 218-226.

208. Wuana, R. A. & Okieimen E. F. (2011). Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. International Scholarly Research Network ISRN Ecology. 1-20.

209. Yavaş, İ., & İlker, E. (2020). Çevresel Stres Koşullarına Maruz Kalan Bitkilerde Fotosentez ve Fitohormon Seviyelerindeki Değişiklikler. *Bahri Dağdaş Bitkisel Araştırma Dergisi*, *9*(2), 295-311.

210. Yenial, Ü., & Bulut, G. (2019). Atık Sulardan Ağır Metallerin Kömür Yıkama Atıkları Kullanarak Uzaklaştırılması. *Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, *8*(1), 326-335.

211. Yerli, C., Cakmakcı, T., Sahin, U. & Tufenkci, S. (2020). Ağır Metallerin Toprak, Bitki, Su ve İnsan Sağlığına Etkileri. *Türk Doğa ve Fen Dergisi, 2020 Ekim TDFD Özel Sayısı,* 103-114.

212. Yıldız, N. (2001). Toprak Kirletici Bazı Ağır Metallerin (Zn, Cu, Cd, Pb, Co ve Ni) Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 32*(2), 207-213.

213. Yorgancılar, M., Yakisir, E. & Tanur-Erkoyuncu, M. (2016). Moleküler Markörlerin Bitki Islahında Kullanımı. *Bahri Dağdaş Bitkisel Araştırma Dergisi, 4* (2), 1-12.

214. Yourtchi, M. S., & Bayat, H. R. (2013). Effect of cadmium toxicity on growth, cadmium accumulation and macronutrient content of durum wheat (Dena CV.). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences (IJACS)*, *6*(15), 1099-1103.

215. Yu, H.Y., Ding, X., Li, F., Wang, X., Zhang, S., Yi, J., Liu, C., Xu, X. & Wang, Q. (2016). The avail- abilities of arsenic and cadmium in rice paddy fields from a mining area: the role of soil extractable and plant silicon. *Environ. Pollut. 215*, 258–265.

216. Zhang, G., Fukami, M., & Sekimoto, H. (2000). Genotypic differences in effects of cadmium on growth and nutrient compositions in wheat. *Journal of Plant Nutrition*, *23*(9), 1337-1350.

217. Zhang, G., Fukami, M., & Sekimoto, H. (2002). Influence of cadmium on mineral concentrations and yield components in wheat genotypes differing in Cd tolerance at seedling stage. *Field Crops Research*, *77*(2-3), 93-98.

218. Zhang, X., Xu, Z., Lin, F., Wang, F., Ye, D. & Huang, Y. (2016). Increased oxidative DNA damage in placenta contributes to cadmium induced preeclamptic conditions in rat. *Biological Trace Element Research, 170*(1), 119-127.

219. Zhao, F. J., Ma, Y., Zhu, Y. G., Tang, Z., & McGrath, S. P. (2015). Soil contamination in China: current status and mitigation strategies. *Environmental science & technology*, *49*(2), 750-759.

220. Zheng, G., Lv, H. P., Gao, S., & Wang, S. R. (2010). Effects of cadmium on growth and antioxidant responses in *Glycyrrhiza uralensis* seedlings. *Plant, Soil and Environment*, *56*(11), 508-515.

221. Zietkiewicz, E., Rafalski, J.A. & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics, 20*, 176–183.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Kardelen Çılgın

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim

Derece	Program	Okul Adı	Mezuniyet Tarihi
Ön Lisans	Tarım Teknolojileri	Anadolu Üniversitesi	2021
Lisans	Biyoloji	Anadolu Üniversitesi	2019
Ön Lisans	Laborantlık ve Veteriner Sağlık	Marmara Üniversitesi	2019
Lise	Bakalorya	Prof. Dr. Mümtaz Turhan Sosyal Bilimler Lisesi	2014

Deneyimler

Tarih	Kurum	Pozisyon
Şubat 2021-Mayıs 2022 (2021-2022 Akademik Yılı Bahar Dönemi)	Adnan Menderes Üniversitesi Turizm Fakültesi	Flora ve Fauna Dersi-Öğretim Elemanı
20 Eylül-20 Kasım 2021	Justus Liebig Üniversitesi Botanik Araştırma Grubu	Erasmus Stajeri
Temmuz-Ağustos 2019	Zoom Veteriner Kliniği	Veteriner Sağlık Teknikerliği Stajeri
Eylül 2017-Haziran 2018 (2017-2018 Akademik Yılı)	Marmara Üniversitesi Doğa Bitkileri ve Su Ürünleri Araştırma Laboratuvarı	Kısmi Zamanlı Öğrenci

Bilimsel Çalışmalar

S. Suner, A. Hocaoglu-Ozyigit, I. I. Ozyigit, D. Baktybekova, **K. Cilgin,** I. E. Yalcin, K. Chekirov, G. Kurmanbekova, Morphological, Physiological and Genotoxic Alterations Induced by Cadmium in Wheat (*Triticum aestivum* L.), II International Biology Congress, Bishkek, Kyrgyzstan, May 18-22, 2022, (Oral Presentation)

K. Cilgin, A. Hocaoglu-Ozyigit, I. I. Ozyigit, A. Abakirova, S. Suner, I. E. Yalcin, K.

Chekirov, G. Kurmanbekova, The Effects of Cadmium on some Growth Parameters, Physiology and Genotoxicity of Barley (*Hordeum vulgare* L.), II International Biology Congress, Bishkek, Kyrgyzstan, May 18-22, 2022, (Oral Presentation)

F. Tabanli, I. I. Ozyigit, Z. Z. Gokce, **K. Cilgin**, G. M. Aygun, Assessment of Cd Induced Genotoxic Damage in *Ludwigia glandulosa* Walter Using RAPD Analysis, Ecology 2017, International Symposium, Kayseri, Turkey, May 11-13, 2017, (Poster Presentation)

A. Kaval, E. A. Cakir, I. I. Ozyigit, F. Vardar, I. E. Yalcin, A. N. Atalay, **K. Cilgin**, Farklı Konsantrasyonlarda AlCl3 Uygulanmış Gözyaşı Bitkisi (*Bryophyllum daigremontianum*) Klonlarında Mineral Beslenme Durumunun Araştırılması, 23. Ulusal Biyoloji Kongresi, Gaziantep, 5-9 Eylül, 2016, (Poster Sunum)

N. Caglayan, I. I. Ozyigit, A. Ozturk, N. Ozturk, S. Karadeniz, R. Vatansever, I. E. Yalcin, **K. Cilgin,** G. Demir, Endemik Bir Bitki Olan *Astragalus mitchelianus* BOISS.'in Kaz Dağları Populasyonlarının Mineral Besin Dağılım Özellikleri, 23. Ulusal Biyoloji Kongresi, Gaziantep, 5-9 Eylül, 2016, (Poster Sunum)