

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**SELENYUMUN *Arabidopsis thaliana*' NİN
FOTOSENTEZ VE ANTİOKSİDAN SAVUNMA
SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gönül DÜNDAR

Tez Danışmanı : Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.01.00

Sunuş Tarihi : 16.09.2015

Bornova-İZMİR

2015

Gönül DÜNDAR tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak sunulan “Selenyumun *Arabidopsis thaliana*’nın Fotosentez ve Antioksidan Savunma Mekanizması Üzerine Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 16.09.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. İsmail TÜRKAN	
Üye	: Doç. Dr. Hediye SEKMEN ESEN	
Raportör Üye	: Doç. Dr. Çağlar KARAKAYA	

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Selenyumun *Arabidopsis thaliana*’nın Fotosentez ve Antioksidan Savunma Mekanizması Üzerine Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

16 / 09 / 2015

Gönül DÜNDAR

ÖZET**SELENYUMUN *Arabidopsis thaliana*' NIN FOTOSENTEZ VE
ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DÜNDAR, Gönül

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

Eylül 2015, 61 sayfa

Bitkiler soğuk, kuraklık, aşırı ışık, su, tuz ve ağır metaller gibi çeşitli abiyotik stres koşullarına morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler olmak üzere çeşitli adaptasyon mekanizmaları geliştirerek dayanıklılık göstermeye ve bu stresi savuşturmaya çalışmaktadır. Yapılan birçok çalışmada, reaktif oksijen türlerinin (ROS) regülasyonu ve antioksidanlar, ağır metallerin (HM) alımı ve translokasyonu, ağır metal türlerindeki değişiklikler ve sonucunda hücre membranı ve kloroplast yapısının yeniden inşası, fotosentetik sistemin onarılması gibi çeşitli mekanizmalarda Selenyum' un rol oynadığı işaret edilmiştir. Ancak optimal dozun ayarlanması, etkinin pozitif veya negatif yönde olması açısından büyük önem teşkil eder.

Selenyumun düşük konsantrasyonlarda bitki büyümesini teşvik ederken, yüksek konsantrasyonlarda pro-oksidan olarak davranır ve bitkide oksidatif hasara sebep olur. Bu bilgiler ışığında Selenyumun *Arabidopsis thaliana*' nın fotosentez ve antioksidan savunma sistemi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Materyal olarak yabani tür *Arabidopsis thaliana* Col. kullanılmıştır. Sterilizasyonu gerçekleştirilen tohumlar hidroponik kültür ortamına ekilmiştir. On iki günlük bitkilere selenat ve selenit uygulanmasının ardından bitkilerin hasatı gerçekleştirilmiştir. Hasat edilen bitkilerin sürgünlerindeki ROS (H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$) miktarları belirlenmiştir. Ayrıca antioksidan enzimlerin [süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POX), askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon redüktaz (GR)] aktiviteleri spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmiş, ayrıca CO_2 asimilasyonu, PSI- PSII etkinliği tayinleri gerçekleştirilmiştir. Selenyum uygulanan *Arabidopsis thaliana* Col. bitkilerinin SOD, CAT, POX ve APX antioksidant enzim aktivitelerinin farklı dozajlardaki selenat ve selenit uygulamasıyla belirgin oranda değiştiği belirlenmiştir. Benzer etki her grubunun hücre membran lipidlerindeki peroksidasyonda da gözlenmiştir. Bu çalışmayla selenyuma maruz bırakılan

bitkilerin fotosentez mekanizmasında sebep olduğu değişimler ve ROS seviyeleri ve antioksidan savunma sistemi üzerine selenyumun etkileri ortaya konmuştur.

Anahtar Sözcükler: *Arabidopsis thaliana*, Selenyum, Selenat, Selenit, Antioksidan savunma metabolizması, Fotosentez.

ABSTRACT

Investigation of Selenium effects on *Arabidopsis thaliana*' s Photosynthesis and Antioxidant Defence System

DÜNDAR, Gönül

MSc in Biology

Supervisor: Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

September 2015, 61 pages

Plants exhibit various adaptation mechanisms in morphological, physiological, biochemical and molecular levels to cope with abiotic stress conditions such as cold, drought, excessive light, water, salt and heavy metals. In several studies it was indicated that Se plays roles in the reactive oxygen species (ROS) and antioxidants regulation, uptake and translocation of heavy metals, changing the heavy metal species which result in reconstruction of cell membrane and chloroplast structure and maintenance of photosynthetic system. However it is important to determine the optimum Se dosage because it can affect plants both positively and negatively in a dosage dependent manner.

Whilst Se promotes the plant growth at low concentrations, at high concentrations it acts as a pro-oxidant and can cause oxidative damage to the plant. In light of this knowledge, effects of selenium on antioxidant defense system and photosynthesis was investigated in *Arabidopsis thaliana*. Wild type *Arabidopsis thaliana Col.* seeds were surface sterilized and were grown under hydroponic conditions. 15-day-old seedlings are treated with selenate and selenite for seven days and they were harvested. The amount of ROS (H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$) was assayed from harvested plants. Further, antioxidant enzymes (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), ascorbate peroxidase (APX) ve glutathione reductase (GR)) activity and CO_2 assimilation, PSI- PSII efficiency assays were carried out. Selenate and selenite treated *Arabidopsis thaliana Col.* plants exhibited different SOD, CAT, POX and APX antioxidant activity in the different dosages. Similar effects also observed on the cell membrane lipid peroxidation in all groups. To sum up, in this thesis the effects of selenium on photosynthesis mechanism and antioxidant defense system was performed.

Keywords; *Arabidopsis thaliana*, Selenium, Selenate, Selenite, Antioxidant metabolism, Photosynthesis.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü öğrenimim ve tez çalışmalarım boyunca engin bilgisi, deneyimi yanında sevgisini, ilgi ve alakasını hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. İsmail TÜRKAN' a, laboratuvar çalışmalarım ve ders dönemimde engin bilgilerinden yararlandığım hocalarım, Sayın Doç. Dr. A. Hediye SEKMEN ESEN'e, Sayın Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR ve Sayın Doç. Dr. Melike BOR' a, ayrıca desteklerinden ötürü Doç. Dr. Çağlar KARAKAYA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım da bilgileri, laboratuvar deneyimleri ve paylaşımcı tavırlarıyla beni cesaretlendiren, desteğini her zaman hissettiğim Dr. Rengin ÖZGÜR UZİLDAY' a, Dr. Barış UZİLDAY' a, laboratuvara ilk başladığım günden beri desteklerini esirgemeyen Uzm. Tolga YALÇINKAYA'ya, tez çalışmalarım boyunca verdikleri desteklerden ötürü sevgili arkadaşlarım Uzm. Turgut Yiğit AKYOL ile Uzm. Azime GÖKÇE'ye, Alpay PELVAN' a Elif EKEROĞLU' na, aramıza yeni katılan Çağlar CANDAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Öğrenim yaşamım boyunca beni her yönden destekleyen, eğitimimi her şeyden önde tutan ve bu konuda verdiğim kararlarda arkamda duran babam Muhlis DÜNDAR'a, abilerim Hayrullah DÜNDAR, Muhsin DÜNDAR ve Tahsin DÜNDAR' a, ayrıca hayatımda önemli yere sahip olan ve İzmir' e geldiğim günden beri özlemini çektiğim babaannem Dilber DÜNDAR' a ve beni İzmir' deki eğitimim boyunca destekleyen dayılarım, yengelerim ve kuzenlerime teşekkür ederim. Tüm eğitim hayatım boyunca velim olan ve beni her zaman önceliklerinin arasında tutan halam Hacer YILDIZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1 Selenyum	2
1.2 Bitkilerde Selenyum Alınımı ve Translokasyonu	12
1.3 Metabolik Süreç	13
1.4. Se hücre yapı ve fonksiyonlarını yapılandırması	22
2. MATERYAL VE METOD	24
2.1 Bitki Materyali ve Deneme Planlaması	24
2.1.1 Tohum sterilizasyonu	24
2.1.2 Büyüme koşulları ve Stres Uygulamaları	24

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.2 Fizyolojik Parametreler	25
2.2.1 Büyüme Parametreleri	25
2.2.2 Bağıl Büyüme Hızı (RGR)	25
2.2.3 Bağıl Su İçeriği (RWC)	25
2.2.4 Yaprak Su Kaybı	25
2.2.3 Osmotik Potansiyel (ψ_{Π})	26
2.3 Biyokimyasal Parametreler	26
2.3.1 Lipit Peroksidasyonu	26
2.3.2 H ₂ O ₂ miktarı	26
2.3.4 Antioksidan Enzimlerin İzoenzim Tayini	29
2.4 Klorofil Floresansı	30
3. BULGULAR	31
3.1 Fizyolojik Parametreler	31
3.1.1 Nisbi Büyüme Parametreleri ve Nisbi Su İçeriği (RWC)	31

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1.2 Yaprak Su Kaybı	34
3.2 Biyokimyasal Parametreler.....	34
3.2.1 H ₂ O ₂ miktarı	34
3.2.2 Lipit peroksidasyonu	35
3.2.3 Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi	35
3.2.4 Askorbat Peroksidaz (APX) Enzim Aktivitesi	36
3.2.5 Glutasyon Redüktaz (GR) Enzim Aktivitesi.....	37
3.2.6 GSH Miktarı	38
3.2.7 Peroksidaz (POX) Enzim Aktivitesi.....	39
3.2.8 Hücre Duvarı Peroksidaz (HD POX) Enzim Aktivitesi	40
3.2.9 MDHAR Enzim Aktivitesi	41
3.2.10 DHAR Enzim Aktivitesi.....	42
3.2.11 SOD izoenzim tayini	43
3.3 Klorofil Floresansı	44
4. TARTIŞMA.....	46
5. SONUÇLAR.....	50
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	51

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
ÖZGEÇMİŞ	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Selenatın kimyasal yapısı	3
1.2 Selenitin kimyasal yapısı	3
1.3 Bitki Se asimilasyonunda öngörülen model.	16
2.1 7 gün boyunca, selenat ve selenite maruz bırakılan 22 günlük <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkileri.....	25
3.1 Selenyum uygulaması yapılan <i>Arabidopsis thaliana col.</i> gövde uzunluğu farklılıkları.	31
3.2 Selenyum uygulaması yapılan <i>Arabidopsis thaliana col.</i> kök uzunluğu farklılıkları.	32
3.3 Selenyum uygulaması yapılan <i>Arabidopsis thaliana col.</i> gövde ağırlığı farklılıkları	32
3.4 Selenyum uygulaması yapılan <i>Arabidopsis thaliana col.</i> kök ağırlığı farklılıkları.	33
3.5 Selenyum uygulaması yapılan <i>Arabidopsis thaliana col.</i> gövdelerindeki nisbi su içeriği farklılıkları	34
3.6 Selenyum uygulaması yapılan <i>Arabidopsis thaliana col.</i> gövdelerindeki yaprak su kaybı farklılıkları.....	34
3.7 Selenyum uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana col.</i> sürgünlerinde H ₂ O ₂ miktarı üzerine etkisi	35
3.8 Selenyum uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana col.</i> sürgünlerinde TBARS miktarı üzerine etkisi	36
3.9 Selenyum uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana col.</i> sürgünlerinde APOX enzimi aktivitesi üzerine etkisi	37
3.10 Selenyum uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana col.</i> sürgünlerinde CAT enzimi aktivitesi üzerine etkisi.	38
3.11 Selenyum uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana col.</i> sürgünlerinde GR enzimi aktivitesi üzerine etkisi	39
3.12 Selenyum uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana col.</i> sürgünlerinde GSH miktarı üzerine etkisi.	40
3.13 Selenyum uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana col.</i> sürgünlerinde POX enzim aktivitesi üzerine etkisi	Hata! Yer işareti tanımlanmamış. 1

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.14 Selenyum uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana</i> col. sürgünlerinde hücre duvarı POX enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	42
3.15 Selenyum uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana</i> col. sürgünlerinde MDHAR enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	43
3.16 Selenyum uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana</i> col. sürgünlerinde DHAR enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	44
3.17 Selenyum uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana</i> col. sürgünlerinde SOD enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	45
3.18 Selenyum uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana</i> col. sürgünlerinde PSII maksimal kuantum verimi (Fv/Fm) üzerine etkisi.....	46
3.19 Selenyum uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana</i> col. sürgünlerinde potasniyel fotosentez kapasitesi (Fv/Fo) üzerine etkisi.....	46

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ROS	Reaktif oksijen türleri
Se	Selenyum
SeCys	Selenosistein
SeMet	Selenometiyonin
DMS _e	Dimetilselenid
DMDSe	Dimetildiselenide
SMT	Selenosistein Metil Transferaz
GSH	Glutasyon
GP _x	Glutasyon Peroksidaz
SOD	Süperoksit dismutaz
POX	Peroksidaz
CAT	Katalaz
APOX	Askorbat peroksidaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
DNPH	Dinitrofenilhidrazin
PMSF	Fenilmetansülfanilklorid
DTT	Ditiyotretiyol
DW	Dry weight
<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
ψ _{II}	Yaprak su potansiyeli

1. GİRİŞ

Selenyum (Se) kimyasal olarak Sülfür (S) ile benzerlik gösteren, hayvanlar, insanlar ve bir çok diğer canlı için esansiyel olan bir mikroelementtir (Fu et al. 2002). Normal koşullarda toprakta düşük seviyelerde bulunurken, selenifer denilen topraklarda 100 mg.kg^{-1} düzeylerine kadar çıkabilir (Beath et al. 1939a, b). Hala aksi ispatlanmasa da yüksek bitkilerin evrimsel süreç sırasında selenyum metabolizmasını kaybettiği düşünülmektedir (Zhang ve Gladyshev 2009) ancak yine de düşük düzeylerde bitki büyümesini uyardığı gözlenmiştir (Pilon-Smits 2009). Yani esansiyel olmasa da selenyumun yüksek bitkilere uygulanmasının faydalı olduğu görülmüştür. Canlılarda selenyumun önem teşkil etmesinin başlıca nedeni selenoprotein adı verilen selenosistein (SeCys) ve selenometiyonin (SeMet) yapıların aktif kısımlarında yer almasıdır (Zhang ve Gladyshev 2009). Genelde yapılarında SeCys ve SeMet içeren glutatyon peroksidaz ve tioredoksin redüktaz gibi proteinler serbest radikallerin süpürülmesini içeren çeşitli redoks fonksiyonlarına sahiptirler.

Selenyumun, bitkiler için faydalı olduğu ancak 1957 yılında keşfedilmiştir. Ve o zamana kadar toksik element olarak değerlendirilmiştir (Schwarz and Foltz, 1957). Esansiyel element oluşunun keşfedilmesinin ardından bir çok ülkede beslenmede selenyum eksikliğinin yaygın problem olduğu ve bu eksikliğin direkt olarak insan sağlığı ve 40' dan fazla hastalıkla bağlantılı olduğu bulunmuştur. (Tapiero et al., 2003; Cox and Bastiaans, 2007). Ayrıca, bitkilerde soğukluk, kuraklık, aşırı ışık, su, tuz ve ağır metaller gibi çeşitli abiyotik stres koşullarında indüklendiği gösterilmiştir. Fakat stres koşulları altında birbiriyle ilişkili olan mekanizmalar hala aydınlatılamamıştır. Yapılan bir çok çalışmada, reaktif oksijen türlerinin (ROS) regülasyonu ve antioksidanlar, ağır metallerin (HM) alımı ve translokasyonu, ağır metal türlerindeki değişiklikler sonucunda hücre membranı ve kloroplast yapısının yeniden inşası, fotosentetik sistemin onarılması gibi çeşitli mekanizmalarda selenyumun rol oynadığı işaret edilmiştir. Ancak optimal dozun ayarlanması mekanizmalardaki rolün pozitif ve ya negatif yönde olması bağlamında büyük önem teşkil etmektedir. Bitkiye düşük konsantrasyonda selenyum uygulaması büyümeyi ve çevresel stres etkilerinin azaltılmasını uyarırken, yüksek konsantrasyonlarda pro-oksidan olarak davranmasına ve bitkide hasara sebep olur.

Selenyumun canlıdaki yararlı ve toksik doz aralığı oldukça dardır ve selenyum eksikliği ile toksisitesinin her ikisi de dünya genelinde yaygın bir

problemdir. Selenyum eksikliği, yani toprakta selenyum düzeyinin az olduğu alanlar, Avrupa, Çin, Kuzey Amerika, Avustralya, Yeni Zellanda ve Kuzey Afrika’ da görülmektedir (Sors et al. 2005). Selenyum toksisitesine ise, topraktaki doğal selenyum seviyesinin oldukça yüksek olduğu alanlar, Çin, Hindistan ve ABD gibi ülkelerde sık karşılaşılmaktadır. Buyüzden, selenyuma karşı bitkilerin verdiği fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler tepkilerin anlaşılması ve stres koşullarında kültür bitkilerinin performanslarının kararlı hale getirilmesi, gelecekte besin güvenliğinin sağlanması açısından büyük önem taşımaktadır.

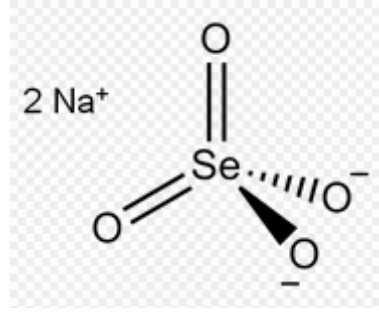
Se uygulanmış bitkilerle yapılan çalışmalar da, ryegrass (çalı otu) (Hartikainen et al.200) , marul (Xue et al. 2001) ve soya fasulyesi (Djanaguiraman et al. 2005), Se antioksidatif etkisi gelişmiş, GSH-Px, SOD aktivitesi ve azaltılmış lipid peroksidasyonu ile ilişkili bulunmuştur.

Uzun yıllardır çalışılmasına rağmen stres yanıtlarına olan etkinliği ve mekanizması aydınlatılamadığından bu çalışmada Selenyum’ un *Arabidopsis thaliana* sürgünlerinde, fotosentez ve antioksidan savunma sistemi üzerine etkileri araştırılacaktır.

1.1 Selenyum

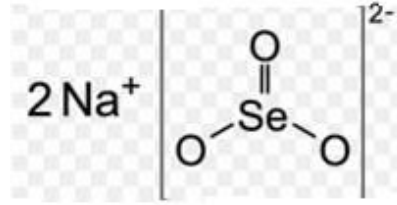
Selenyum normal koşullarda 0.01-2 ppm arasında değişen oranlarda toprakta bulunan iz elementlerden biridir. Ağırlıklı olarak selenat, selenit ve organik selenyum bileşenleri formunda bulunmaktadır.

Doğada bulunan iz element selenyum, bitkilerin alabileceği ana form olan, selenat (+6) ve selenit (+4) isminde iki inorganik oksidize forma sahiptir. Sodyum selenat, katı halde bulunan, 188.94 g/mol molekül ağırlığına sahip ve suda çözünebilir olan selenyum formudur (Mackison et al., 1981). Selenyumun oksidasyon seviyesinin en yüksek olduğu (+6) form olduğundan alkalik ve diğer oksidize koşullar altında stabilitesini koruyabilmektedir. Aynı zamanda bazik sularda en yaygın bulunan formdur.



Şekil 1.1 Selenatın kimyasal yapısı

Sodyum selenit de yine katı halde bulunan, 172.9 g/mol moleküler ağırlığa sahip ve suda çözülebilir formdadır (Mackison et al., 1981) . +4 oksidasyon seviyesinde ve doğal olarak ortaya çıkmaktadır.



Şekil 1.2 Selenitin kimyasal yapısı

Inorganik selenyum formları bitkilerdeki absorpsiyon ve mobilite özelliklerine göre farklılaşır; selenat sürgünlere daha kolay taşınırken, selenit daha çok bitki köklerinde birikme eğilimi gösterir (Zhang et al. 2003). Bu yüzden bazı biofortifikasyon programlarında selenat daha fazla tercih edilmektedir (Rios et al. 2008).

Bitkiler doğal koşullar altında sergiledikleri absorbans kapasitelerindeki farklılıklara göre

- (i) Genelde 25 µg Se/g (DW) daha az içerenler “Non-akümülatör”
- (ii) 25 ile 1000 µg Se/g (DW) arasında asimile edebilenler “İndikatör”
- (iii) Birkaç bin Se/g (DW) konsantrasyonlarını biriktirebilen “Akümülatör” olarak sınıflandırılmıştır (Broadley et al. 2006; Brown and Shrift 1982; White et al. 2004)

Se gibi ağır mikro elementin bitkilerdeki artışının diğer bir çok mikronutrientdeki gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışına sebep olduğu belirlenmiştir. Hücrede reaktif oksijen türleri oluşumu şu aşamalarda gerçekleşir;

dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron içeren O₂ molekülü serbest radikaldır ve farklı orbitallerdeki elektronların spinleri de aynı yönde bulunmaktadır. Bu spin yetersizliğinden dolayı O₂ tek seferde sadece bir elektron kabul edebilir ve sonucunda hücreler için toksik özellikteki reaktif oksijen türleri (ROS) oluşur. ROS molekülleri ayrıca kloroplast, mitokondri ve peroksizom gibi farklı hücresel kısımların çeşitli metabolik yollarında yan ürün olarak sürekli oluşmaktadır (del Rio *et al.*, 2006; Navrot *et al.*, 2007). Fotosentez esnasında kloroplastlarda açığa çıkan oksijenin fotosistemlerde taşınan elektronları kabul etmesi neticesinde süperoksit radikalleri (O₂^{•-}) oluşabilir. Hücre denge koşullarında ROS molekülleri çeşitli antioksidan savunma mekanizmaları tarafından süpürülmektedir (Foyer and Noctor, 2005). ROS başlıca süperoksit anyonu (O₂^{•-}), hidrojen peroksit (H₂O₂), serbest hidroksil radikali (OH[•]), singlet oksijen (¹O₂), metil radikali (CH₃[•]) ve lipid peroksidasyon serbest radikallerinden (LOO[•], ROO[•]) oluşmaktadır. ROS oluşumundan sonra kendiliğinden ve ya enzim-ilişkili (SOD) olarak O₂^{•-}'nin H₂O₂'ye dismutasyonu veya sonradan H₂O₂ ile birlikte hidroksil radikallerini (OH[•]) oluşturacak olan Fe³⁺ (ya da Cu²⁺)'ten Fe²⁺ (Cu⁺) oluşum reaksiyonu bitkideki bir seri elektron transfer prosesiyle birlikte indüklenir. Bu radikaller yüksek oranda aktiftir ve hüce membranını etkiler. Ayrıca proteinlerin, karbohidratların, lipidlerin ve DNA'nın hasarına yol açarak hücre ölümlerine neden olmaktadır. ROS molekülleri nükleik asitlerin zarar görmesine, proteinlerin oksidasyonuna ve lipid peroksidasyonuna yol açması birçok hücresel fonksiyonu etkileyebilir (Foyer and Noctor, 2005). ROS moleküllerinin zarar verici veya koruyucu ya da sinyal faktörleri olarak davranmaları, ROS üretimi ile süpürümü arasında sağlanan hassas dengeye bağlı olmaktadır (Gratao *et al.*, 2005). Hücredeki dengenin bozulması neticesinde artan ROS üretimi bitkiler için tehlike arz etmesinin yanı sıra, stres-yanıt ve savunma yollarının aktivasyonunu sağlayan bir sinyal molekül olarak da işlev görmektedir (Mittler., 2002). Düşük miktarlarda bulunan ROS molekülleri savunma genlerini ve adaptif yanıtları indüklerken, yüksek konsantrasyonlarda ise hücre ölümleri başlamaktadır. Bu sebeple hücrede ROS seviyeleri sıkı bir şekilde denetlenmelidir. Stres faktörleri tarafından uyarılan ROS birikimi süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPX), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon-S-transferaz (GST) ve katalaz (CAT) gibi çeşitli süpürücülerin görev aldığı enzimatik antioksidan sistem ve askorbat (ASH), indirgenmiş glutatyon (GSH), α-tokoferoller, karotenoidler ve flavonoidler gibi enzimatik olmayan düşük moleküler metabolitler tarafından engellenmektedir (Mittler *et al.*, 2004; Gill *et al.*, 2011). Bahsedilen tüm bu antioksidanlar neredeyse tüm hücresel bölmelerde mevcuttur ve bu da hücrenin hayatta kalabilmesi açısından ROS detoksifikasyonunun öneminin çok büyük

olduğunu gösterir niteliktedir (Gill *et al.*, 2011). Normal büyüme koşulları altında peroksizom, mitokondri ve kloroplast gibi organellerde düşük seviyelerde üretilen ROS'un stres boyunca üretim hızı önemli ölçüde artar (Miller, 2009).

ROS toksisitesi bitkilerde detoksifikasyon mekanizmalarının varlığını ortaya koymuştur. Bununla beraber gelişmeyi ve fizyolojik cevapları düzenlemede ROS'un sinyal olarak görev yaptıkları bilinmektedir. Aşırı üretimleri ise hücresel bileşenlere ve zarlara zarar vermektedir. ROS oluşumu ve nötralizasyonu arasındaki iyi ayarlanmış denge ile biyomoleküllerin stresten etkilenmeleri minimumda kalabilir. ROS'ların uzaklaştırılması için antioksidantsistemler kullanılmakta, ancak oksidanların aşırı oluşumuna bağlı olarak denge bozulduğundan oksidatif stres meydana gelmektedir (Smirnoff, 1998, Mittler *et al.*, 2011).

ROS veya oksidatif stres ürünleri ile proteinlerin kovalent modifikasyonu sonucu protein oksidasyonu meydana gelir. Proteinler, hücrede okside moleküllerin %68'ini oluşturarak, ROS'un hücredeki en büyük hedefi olarak görülmektedir. ROS tarafından protein oksidasyonunun prensipleri, hidroksil radikalının ($\cdot\text{OH}$), süperoksit anyonunun ($\text{O}_2^{\cdot-}$) veya bunların karışımı ile iyonize radyasyona maruz bırakılmış proteinlerde oluşan reaksiyon ürünlerinin karakterizasyonu bilim adamları tarafından gösterilmeye çalışılmıştır (Schuessler and Schilling, 1984). Bu çalışmaların sonucu olarak, protein modifikasyonu, $\cdot\text{OH}$ radikalının reaksiyonlarıyla başladığı belirlenmiştir. Ancak oksidasyon prosesinin devamı, O_2 ve $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'nin katılımıyla ve süperoksit radikalının protonlanmış formu olan $\text{OH}_2^{\cdot}$ (Perhidroksil radikali) katkısıyla da gerçekleşir. Sonuç olarak ROS'lar proteinlerdeki aminoasit yan zincirlerinin oksidasyonuna yol açarken, protein-protein çapraz bağları oluşur, protein fragmentasyonuna yol açan proteinlerin oksidasyonuna sebep olurlar. Doymamış bağ ve sülfür içeren aminoasitlerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin, sistein gibi elektronca zengin aminoasitlere sahip proteinler radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Protein karbonil gibi belirteçler *in vivo* protein oksidasyonu derecesini gösteren araçlar olarak kullanılmaktadır. Protein karbonil oluşumuna yol açan sekonder modifikasyon reaksiyonları; proteinlerin karbonhidrat ve lipit oksidasyon ürünleriyle olan reaksiyonlarını içermektedir. Lipit peroksidasyonu sırasında oluşan aldehitler (4-hidroksi-2-nonenal, malondialdehit), indirgen şekerler veya bu şekerlerin oksidasyon ürünlerinin proteinlerdeki lizin ile reaksiyonu sonucu oluşan reaktif karbonil türevleri

(ketoaminler, ketoal-dehitler, deoksiozonlar) protein yapısına karbonil gruplarının katılmasına yol açar (Berlett and Stadtman, 1997).

Oksidatif protein hasarı sonucunda, agregasyon ile fragmentasyonda artış ve proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarının değişiklikleri ile proteolize yatkınlık ve protein fonksiyonlarının kaybı söz konusu olabilmektedir (Stadtman and Levine, 2000).

Oksidatif stres hücrel bir cevaptır bu cevap sadece modifiye proteinlerin birikimine neden olan pasif bir cevap değildir. Protein seviyelerindeki değişim; post-translasyonel modifikasyonların kontrolü ve proteinlerin oksidatif hasarı sonucu, karmaşık hücrel cevapları içerir (Rabilloud et al., 2005).

Daha önce pirinç (*Oryza sativa L.*) ile yapılmış proteomik bir çalışmada, düşük konsantrasyondaki selenyumun fotosentezi arttırdığı gözlenmiştir. Sorghum (süpürge darısı) ile yapılan bir çalışma da ise, fotosentez , stomal iletkenlik ve transpirasyon oranında artma gözlenmiştir (Djanaguiraman et al., 2010). Strese maruz kalmış bitkilerdeki bu değişimin sebebi Se uygulamasının hemen ardından azalan ROS seviyeleri, antioksidanların reaktivasyonu, hasarlı kloroplast yapılarının onarımı ve GSH ve SH-benzeri maddeler gibi vital metabolit üretiminin artışı olabileceği düşünülmektedir. Ancak aşırı Se bitkilerde fotosentez mekanizmasına zarar verebilir.

1.2. Se Optimal Dozajlarda ROS Seviyesini Düşürür

Se dolaylı ve ya direk olarak antioksidanları regüle ederek, ROS' ların üretimini ve süpürülmesini kontrol edebilir. Bitki hücrelerinde, normal koşullar altında ROS miktarı düşük seviyelerde tutulur, örneğin kloroplastlarda $240 \mu\text{M s}^{-1} \text{O}_2^-$ ve $0.5 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ düzeylerinden aşağıda tutulmaya çalışılır. Fakat stres durumlarına yanıt olarak $240\text{-}270 \mu\text{M s}^{-1} \text{O}_2^-$ ve $5\text{-}15 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ düzeylerine kadar artar (Mittler, 2002). Çeşitli çevresel streslere maruz kalmış bitkilere iz miktarda Se uygulaması ile aşırı ROS üretimi indirgenebilmektedir. Cartes ve ark (2010) karaçayır bitki kökleriyle yaptıkları çalışmalarında Al tarafından indüklenmiş oksidatif stresin O_2^- 'in H_2O_2 ' ye dismutasyonunun selenit yardımıyla hızlandırılması sonucu ortadan kaldırıldığı gözlemlenmiştir. Mroczek-Zdyrska ve Wojcik (2011) düşük dozajlarda selenyumun ($1.5 \mu\text{M Na}_2\text{SeO}_3$), Pb stresine maruz kalmış *Vicia*

faba köklerindeki O_2^- seviyesini düşürdüğünü görmüşlerdir. Cd stresi altındaki kırmızı deniz alginde $50 \mu M$ $Se(Na_2SeO_3)$ uygulamasının ROS birikimini önlemesiyle toksisitenin azaltıldığı gözlemlenmiştir (Kumar ve ark., 2012). Se uygulanmasının ardından ROS seviyelerinin azaltıldığı bu ve buna benzer bir çok deneme de ortaya konmuştur. Uygun dozajlarda Se uygulanmasının ardından O_2^- seviyesinin azalması ile ilgili ortaya üç muhtemel mekanizma sürülmüştür. Bunlardan ilki, SOD enziminin yardımı olmadan O_2^- 'nin H_2O_2 'ye kendiliğinden dismutasyonu (Hartikainen ve ark., 2000; Cartes ve ark., 2010), ikinci olarak Se bileşenleri tarafından direk olarak O_2^- ve $OH^\cdot$ 'ın süpürülmesi (Xue ve ark., 1993) ve son olarak da antioksidan enzimlerinin regülasyonudur. Ancak, Xue ve ark., 1993 in vitro denemelerinde Se bileşenleri tarafından H_2O_2 'in doğrudan süpürülemediği fakat serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonunun elemine edilebildiğini gözlemlemişlerdir. Yukarıda bahsedildiği gibi başka araştırmacılar tarafından düşük dozajlardaki selenyumun stres altında olmayan kolza fidelerinde (Filek ve ark., 2008) ve deniz kırmızı alginde (Kumar ve ark., 2012) H_2O_2 seviyesini indirgemede kısıtlı etkiye sahip oldukları bulunmuştur. İlginç bir biçimde denemelerde bitkiler strese mazur bırakılmışsa, H_2O_2 seviyesi uygun Se dozajının uygulanmasının ardından belirgin bir biçimde azaltılmıştır. Bu durumun muhtemelen antioksidan enzimlerin, özellikle H_2O_2 süpürülmesinde yer alanlar (GSH-Px gibi), yeniden aktivasyonun Se tarafından uyarılması ile gerçekleştirildiği düşünülmektedir.

1.3 Aşırı Se, ROS birikimini tetikler

Şimdiye kadar yapılmış olan çalışmalarda Se' nin bitkilerdeki rolü tam olarak aydınlatılmamasına rağmen (Tamaoki ve ark., 2008; Freeman ve ark., 2010; Mroczek-Zdyrska ve Mojcik., 2011), aşırı Se uygulamasının bitkilerde şiddetli ROS birikimine sebep olduğu rapor edilmiştir. Yüksek dozajlarda Se ardından ROS üretimindeki artışın kısmen GSH, tiyoller (-SH), ferrodoksinler (Fd_{red}) ve ya NADPH gibi Se' nin asimilasyonunda yer alan bileşenlerin seviyelerindeki dengesizliklerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Eğer bu maddeler Se asimilasyonu ve ROS söndürülmesine yetecek miktarlarda değilse, Se ilavesinin ROS yanmasına ve bitki büyümesinin inhibisyonuna sebep olabilir. Örneğin, $50 \mu M$ Pb stresine maruz bırakılmış *Vicia faba* köklerine $1.5 \mu M$ Se eklenmesinin hücre iletkenliğini ve total -SH içeriğini arttırdığı gözlemlenmiştir

(Mroczek-Zdyrska ve Wojcik, 2011). Se' ye karşı verilen yanıtlar, uygulanan selenyum formuna da bağlı olarak değişebilmektedir. Paciolla ve ark., (2011) selenit uygulanmış *Senecio scandens L.* yaprak disklerinde belirgin olarak H₂O₂ artışı ile karşılaşırken, aynı dozda selenat uygulandığında hiçbir artış gözlemlenmemiştir. Farklı Se formlarına verilen bu farklı ROS yanıtlarının kaynağı, Se indirgenme basamağındaki sınırlamalarla açıklanabilir. Selenata maruz kalan bitkilerde (*Brassica oleracea* avr. *Botrytis L.*, *Brassica juncea L.*, *Beta vulgaris L.* ve *Oryza sativa L.*) Se alındıktan sonra bitkinin yukarı kısımlarına transfer edildiği ve selenat formunda muhafaza edildiği bildirilmiştir. Ancak selenit uygulandığında, alınan Se genel olarak köklerde biriktirilir ve L-selenometiyonin (SeMet) ya da SeMet benzeri türlere dönüştürülür (Zayed ve ark., 1998). Selenitin, SeMet benzeri türlere dönüşümü için yüksek bir indirgeyici potansiyele ihtiyaç vardır, bu da ROS söndürülmesinde aksaklıklara sebep olur.

1.4 ROS indirgenmesinde antioksidan yanıtlar

1.4.1 GSH-Px enzimi

Stres altındaki bitkilere Se uygulandıktan sonra antioksidan seviyesi veya aktivitesini değiştirerek ROS düzeyi regüle edilir. Bitkilerde, GSH-Px güçlü bir H₂O₂ ve lipithidroperoksit süpürücüsüdür. Bu işlemi GSH yardımıyla gerçekleştirir. GSH-Px' in çeşitli çevresel streslere maruz kalmış bitkilerde Se uygulanmasının ardından kapsamlı ve güçlü bir şekilde aktive edilmesi sebebiyle anahtar enzim olabileceğine inanılmaktadır. *Chlamydomonas* hücrelerinde Se yokluğunda, ortamdaki H₂O₂ 'in APX ve CAT enzimleri tarafından söndürüldüğü, ancak Se varlığında bu görevi öncelikli olarak GSH-Px' in üstlendiği görülmüştür (Takeda ve ark., 1997). Hartikainen ve ark. (2000) değişik seviyelerde Se' ye maruz bırakılan genç ve olgun Ryegrass fidelerinin GSH-Px aktivitelerinde belirgin bir artış olduğunu rapor etmişlerdir. GSH-Px enziminin çeşitli streslere maruz kalan ve Se uygulanmış birçok bitkide de, Cd stresi altındaki kanola fideleri (Filek ve ark., 2008), tuz stresindeki (Hasanuzzaman ve ark., 2011) ve kuraklık stresindeki (Hasanuzzaman ve Fujita, 2011), Cd stresi altındaki kırmızı deniz algı (Kumar ve ark., 2012), Pb stresi altındaki *Vicia faba L.* köklerinde (Mroczek-Zdyrska ve Wojcik, 2011), senesensli marul (Xue ve ark., 2001) ve soya fasulyesinde (Djanaguiraman ve ark., 2005), desikasyon stresli gümüş

akçaağaç tohumlarında (Pukacka ve ark., 2011) ve yüksek sıcaklık stresi altındaki süpürge darısı tanelerinde (Djanaguiraman ve ark., 2010), GSH-Px aktivasyonu gözlemlenmiştir. Se varlığına yanıt olarak GSH-Px enzim aktivitesindeki artışın bitkilerdeki oksidatif strese yanıtta bu enzimin özel bir role sahip olduğunu işaret eder.

1.4.2 SOD Enzimi

Çevresel stres altındaki bitkilere Se uygulamasının ardından meydana gelen SOD yanıtları oldukça karmaşıktır. Literatür taramasının sonucunda oluşturulan bilgiler ışığında Se uygulamasından sonra SOD enzimi aktivitesini başlıca üç faktörün etkilediği düşünülmektedir.

Birinci faktör stresin düzeyidir. Düşük stres düzeylerinde, bitki antioksidatif kapasitesi normal büyümeyi teşvik edecek şekilde olmalıdır. ROS üretimi ve söndürülmesi antioksidanlar tarafından iyi kontrol edilebilmeli, bu sayede singlet oksijenin kendiliğinden indigenir ve daha az SOD ihtiyacı oluşur (Hartikainen ve ark., 2000). Ancak şiddetli strese maruz kalan bitkilerde yüksek düzeyde ROS oluşumu gözlenir ve SOD aktivitesine ihtiyaç duyulur. Hartikainen ve ark. (2000) kara çayır bitkileriyle yaptıkları bir çalışmada Se ilavesinin ardından genç olanlarda azalmış, yaşlı olanlarda (senesens stresi) ise artmış SOD enzim aktivitesiyle karşılaşmışlardır. Benzer sonuçlar Xue ve ark. (2001) marul ile yaptıkları denemede de gözlenmiştir. Birçok yazar, Al stresi altındaki kara çayır bitkileri (Cartes ve ark., 2010), ışık stresindeki patates (Seppanen ve ark., 2003), Se stresindeki *Pteris vittata* L. (Feng ve Wei, 2012), senesens stresindeki soya fasulyesi (Djanaguiraman ve ark., 2005), UV-B stresindeki buğday fideleri (Yao ve ark., 2010ab), su kıtlığı stresindeki *Trifolium repens* L. (Wang, 2011), Cd stresi altındaki deniz kırmızı algi (Kumar ve ark., 2012) ve As- stresi altındaki maş fasulyesi (Malik ve ark., 2012) ve yüksek sıcaklık stresi altındaki süpürge darısı taneleri (Djanaguiraman ve ark., 2010) gibi çeşitli streslere maruz kalmış bitkilere Se ilavesinin ardından SOD aktivitesinde artmış gözlemlenmişlerdir.

Selenyuma maruz bırakılmış bitkilerdeki SOD aktivitesini etkileyen ikinci faktör ise uygulanan Se dozajıdır. Örneğin, Cartes ve ark. (2010) kara çayır bitkisi ile yaptıkları denemede 0.2 mM Al maruz bırakılan bitkilere 2µM konsantrasyonunda uygulanan Se sonucunda SOD aktivitelerinin belirgin oranda

azaldığını, 10 μM Se uygulandığında ise belirgin olarak arttığını gözlemlemiştir. Bu artışın Se' nin yarattığı toksisite sonucu aşırı O_2^- oluşumundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Feng ve Wei (2012) Se akümülatörü *Pteris vittata* L. ile yaptığı bir çalışmada düşük Se düzeylerinde ($\leq 2 \text{ mg L}^{-1}$) SOD aktivitesinin inhibe edildiğini, yüksek Se düzeylerinde ($\geq 5 \text{ mg L}^{-1}$) ise arttığını göstermiştir.

Son olarak, SOD enzimi kofaktörlerinin (Fe, Mn, Cu ve Zn) konsantrasyonlarındaki değişimlerden dolayı farklı yanıtlar ortaya çıkar. Örneğin ışık stresine maruz kalmış patates bitkilerinde, 0.3 mg Se L^{-1} (H_2SeO_3) ilavesinin ardından kloroplastlardaki CuZn-SOD transkript yüksek oranda ifade edilirken, mitokondrideki Mn-SOD transkript seviyelerinde belirgin bir değişim gözlenmez (Seppanen ve ark., 2003).

1.4.3 Diğer antioksidanlar

Bitkilerdeki çevresel stresin yol açtığı zararları azaltmak için Se kullanıldığında GSH-Px ve SOD enzimine ilaveten CAT, POD, GR, GPX ve APX antioksidan enzimleri ve AsA ve tokoferol gibi düşük moleküler ağırlıklı bileşikler de görev alır. Bu antioksidanlar büyük oranda H_2O_2 ' nin süpürülmesinden sorumludur. Çoğunlukla peroksizomlarda lokalize olan CAT enziminin aşırı ROS' un ortadan kaldırılmasından sorumlu olduğu düşünür iken, APX' in ROS ince modülasyonu için gerekli sinyal maddesi olarak fonksiyon aldığına inanılır (Mittler, 2002). Stres altındaki bitkilerde, Se' nin özellikle bu iki enzimi, özellikle de CAT, yeniden etkinleştirdiği gözlemlenmiştir (Yao ve ark., 2009; Djanaguiraman ve ark., 2010; Yao ve ark., 2010ab; Hasanuzzaman ve ark., 2011; Yao ve ark., 2011; Malik ve ark., 2012). Bu yüzden bu iki enzimin aktivitelerindeki artışın, aşırı ROS ile ilişkili olduğunu söylemek yanlış olmayacaktır.

H_2O_2 ve O_2^- diğer reaktif oksijen türlerine kıyasla daha az toksiktir, esasen bunların metal bağımlı Haber-Weiss ya da Fenton reaksiyonlarıyla yüksek düzeyde reaktif olan $\text{OH}^\cdot$ üretmeleri tehlike arz etmektedir. $\text{OH}^\cdot$ herhangi bir biyolojik molekülle reaksiyona girebilme potansiyeli yüzünden en güçlü oksitleyici türdür (Mittler, 2002). Ancak şimdiye kadar Se uygulanmasının ardından $\text{OH}^\cdot$ seviyelerindeki değişim ile ilgili bir bilgi mevcut değildir. Aşırı $\text{OH}^\cdot$ üretimini engellemek için denge durumundaki H_2O_2 ve O_2^- düzeylerini korumak

gereklidir. Bunu sağlamak için de, bitkilerdeki SOD ve APX ya da CAT aktiviteleri arasındaki dengeyi sağlamak oldukça önemlidir.

Yüksek düzeydeki ROS' un süpürülmesinde AsA ve GSH' ın yüksek indirgeyici gücünü sürdürmek gerekmektedir (Mittler, 2002). Bunun için yüksek seviyede GR, monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) ve NADPH gereklidir (Mittler, 2002). Çünkü organik Se üretiminde gerekli olan GSH içeriğini arttırabilir, dolayısıyla AsA, GR, MDHAR, DHAR seviyelerinde de artış beklenir.

1.5 S, GSH ve diğer sülfidril bileşenlerinin hayati rolleri

Daha önce yapılan çalışmalarda GSH' ın Selenosistein (SeCys), Selenometiyonin (SeMet) ve Se-içeren proteinleri oluşturmak için doğrudan Se ile reaksiyona girdiği yayınlanmıştır (Terry et al., 2000). ROS, sülfhidril grupları (GSH gibi) tarafından gerçekleştirilen selenit indirgenme prosesi boyunca oluşturulur. Akümülatör olmayan bitkilerde, Se-içeren proteinleri oluşturabilmek için Se ile S substitüsyonu, Se toksisitesindeki temel mekanizmalardandır (Terry ve ark., 2000). Plazma membranında bulunan sülfat transporterlarından alınımında selenat ve sülfat arasındaki rekabet yüzünden, sülfat genellikle selenat alınımında antagonistik davranış sergiler. Buna dayanarak pratikte sülfatın aşırı selenatın meydana getirdiği toksisiteyi zayıflatması beklenir. Bazen, bitkideki S konsantrasyonu, Se seviyelerinin arttırılması ile yükseltilebilmektedir (Zhang ve ark., 2007; Tamaoki ve ark., 2008; Freeman ve ark., 2010).

Bu yüzden, stres altında olan bitkilere, Se ilave edilirse, Se asimilasyonunda ihtiyacı karşılamak ve ROS söndürülmesini gerçekleştirmek için, daha fazla GSH ve ya non-protein tiyoller sentezlemek gerekeceğinden, S miktarının arttırılmasına ihtiyaç duyulur. Birçok çalışmanın sonuçları da dolaylı yollardan bu kanıyı destekler. Kumar ve ark., 2012; Hasanuzzaman ve ark., 2011; Hasanuzzaman ve Fujita, 2011; Malik ve ark., 2012 gibi araştırmacıların yaptıkları çeşitli çalışmalarda, stres altındaki bitki türlerinde Se uygulamasının ardından GSH, non-protein tiyoller, metallotiyonin, fitoşelatin ve tiyollerin miktarlarında artış gözlemlemişlerdir. Ancak bazı durumlarda da, Se ilavesinin ardından S alınımının inhibe edildiği görülmüştür. Örneğin Zembala ve ark. (2010) kolza fidelerine normal koşullar altında 2 μ M Se (Na_2SeO_4) ilavesinden

sonra S alınıminin arttığını, fakat Cd stresine maruz bırakıldıktan sonra uygulandığında hem S hem de Cd oranının azaldığını görmüşlerdir. Bluemlein ve ark (2009) fitoşelatinler (PCs) için As ve Se arasındaki rekabetin *Thunbergia alata*'nın hücrel arseniti detoksifiye edebilme kabiliyetini azalttığını söylemişlerdir. Ayrıca serbest tiyol (-SH) ve fitoşelatin miktarlarının yeterli olmadığı durumlarda Se ilavesinin stresi savuşturacağına daha da arttıracığını iddia etmişlerdir. Bu nedenle, Se tarafından bitkilerdeki hasarın restorasyonunun önemli derecede S ve türevleriyle (GSH, -SH, MT (metallotiyonin), ve PCs) ilişkili olduğu sonucu çıkarılmıştır. Dahası in vitro denemede, -SH miktarının azaldığı durumlarda ağırlıklı olarak H₂O₂, yüksek olduğu durumlarda ise O₂⁻ üretildiği görülmüştür (Kramer ve Ames, 1988). Kumar (2012), Hasanuzzaman (2011), Malik (2012)'de yaptıkları çalışmalarında benzer şekilde Se uygulanmasından sonraki -SH artışının O₂⁻ yanmasıyla paralel olduğunu söylemiştir.

Tamaoki ve ark., 2008 tarafından yapılan çalışmalarda *Arabidopsis thaliana*'daki Se direnç mekanizması, artmış olan S alınımi ve redüksiyonu ile ilişkili bulunmuştur. Ek olarak, GSH ve diğer artmış sülfhidril bileşenleri de Se toleransında önemli rollere sahiptirler. Freeman ve ark., 2010, *Stanleya pinnata* (*Brassicaceae*)'da Se toleransının artmış AsA, GSH, total S miktarı ve non-protein -SH ile yakından ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Se stresine maruz kalmış üç buğday genotipinde, kontrol grubundaki buğdaylara göre daha fazla GSH sentezlenmiştir (Łabanowska et al., 2012). Bu yüzden stres altındaki bitkiler GSH, total S, -SH seviyeleri arasındaki dengeyi sağlama becerisini kaybederse, Se ilavesi bu bitkileri daha da kötü etkileyecektir.

2. Bitkilerde Selenyum Alınımi Ve Translokasyonu

Bitkiler topraktan selenyumu kökleri yardımıyla ağırlıklı olarak selenat, ayrıca selenit ve organik selenyum bileşikleri formunda olarak kolayca almaktadırlar (Virupaksha et al. 1966; Shrift and Ulrich 1969; Martin et al. 1971; Asher et al. 1977; White et al. 2004). Selenyum alınımi miktarı ve hangi formda alınacağı pH ve sülfat ile fosfat varlığı gibi rizosfer koşullarının yanında toprakta selenyumun hangi kimyasal formda ve konsantrasyonda bulunmasına da bağlıdır (Hurd-Karrer 1937; Bell et al. 1992; Blaylock and James 1994; Dhillon and Dhillon 2003).

Aerobik topraklarda, hem selenat hem de selenit ortamın redoks potansiyeli ve pH'ına göre baskın form olarak bulunabilir. Termodinamik hesaplamalar alkaline ve iyi havalandırılmış topraklarda ($pe + pH > 15$) selenat, pH' ı asidikten nötrale değişen ($7.5 < pe + pH < 15$) drenajı yüksek mineralli topraklarda ise selenit baskın formda olması gerektiğini göstermiştir (Elrashidi et al., 1987).

Bitkiler tarafından selenatın alınımla mekanizması çok çalışılmış konulardan biridir. Farklı bitki türleri sülfat-selenat arasında farklı seçicilik gösterir ve selenat bitki kökleri tarafından yüksek afinite sülfat transporterlarıyla alınır (Bell et al., 1992; Terry et al., 2000; White et al., 2004; Sors et al., 2005). Kök korteksi, uç ve lateralinde yüksek oranda ifade edilen, yüksek afinite transporter genlerinden *AtSultr1;2* geninde lezyonlara sahip *Arabidopsis thaliana* ile yapılan bir çalışmada selenat, mutantların izolasyonunda belirleyici olarak kullanılmıştır (Shibagaki et al., 2002). Bunların aksine bitkilerde selenitin alınımla mekanizmasıyla ilgili bilinenler oldukça azdır. Terry et al. (2000) selenitin membran transporterlarıyla herhangi bir ilişkisi olmadığına kanaat getirmiştir ve bitki köklerinde pasif difüzyonla alındığı ileri sürülmüştür (Shrift & Ulrich, 1969; Arvy 1993). Ancak yapılan bir çok çalışma da selenitin bitkiler tarafından alınımla oranının selenat ile aynı hatta daha fazla bile olabileceğini göstermiştir (Arvy, 1993; Hopper & Parker, 1999; Zhang et al., 2003). Ayrıca uzun süreli hidroponik denemelerde fosfat varlığıyla bitkiye selenit alınımla bastırılmıştır (Broyer et al., 1972b; Hopper & Parker, 1999). Bu sonuçlar selenit alınımla sadece basit difüzyonla açıklayabilmek için yeterli değildir.

2.1 Metabolik Süreç

Bitkilerin inorganik selenyum formunu topraktan kökler yardımıyla alınımla takiben sülfat asimilasyon yolağındaki enzimler yardımıyla organik form olan selenometiyonin (SeMet), selenosistein (SeCys) ve diğer organik S bileşenlerine dönüşümü gerçekleştirilmektedir. Bu işlemler hem kökte hem sürgünde gerçekleştirilebilmektedir. Ancak sürgünde daha yaygın olduğu düşünülür. Selenoaminoasitler proteinlerin yapısına rastgele katıldıklarında, Met ve Cys yer değiştirir ve bu proteinlerin fonksiyonlarını kaybetmesine yani toksisiteye neden olur (Stadtman 1990). Bir çok bitki toksisiteden kaçınmak için SeMet' i uçucu form olan dimetilselenide (DMSe) metabolize edebilir (Terry et al., 2000). Bitkilerdeki diğer bir potansiyel Se detoksifikasyon mekanizması ise

SeCys' in elemental Se ve alanine parçalanmasıdır (Van Hoewyk et al., 2005). Uçucu forma dönüştürme (volatilizasyon) ve SeCys indirgenmesinin her ikisi de S metabolizmasında yer alan enzimlerin kullanılmasıyla gerçekleştirilmektedir (Şekil 1.3 Terry et al., 2000; Van Hoewyk et al. 2007).

Bitkilerin genel olarak selenyumu gelişigüzel metabolize etmelerine ek olarak bazı bitkiler Se ve S analogları arasındaki farkı ayırd edebilmektedir bu yüzden Se-özgü metabolizmaya sahip oldukları söylenebilir. Bu bitkiler çok etkili Se detoksifikasyon mekanizmalarından olan SeCys' ini metillenerek metil-SeCys' e dönüşümünü spesifik olarak gerçekleştirebilir. Mekanizma sonucu oluşan metil-SeCys proteinlerin yapısına katılamaz (Neuhierl and Böck 1996). Metilasyon süreci SeCys metil transferaz (SMT) adı verilen enzim tarafından gerçekleştirilir. Sülfür seven bitkiler olarak bilinen brokoli (*Brassica oleracea* taksonunda SMT enzimi (Lyi et al., 2005), *Allium* türlerinin çoğunda ise metil-SeCys (Ge et al. 1996) bulunmuştur. Bu türler hiperakümülatörler değildir fakat yüksek seviyelerde sülfat alabildikleri ve hatırı sayılır düzeyde Se biriktirebildikleri için bazen Se akümülatörleri olarak anılırlar.

Se biriktirenleri diğer türlerden ayıran genel özellikler;

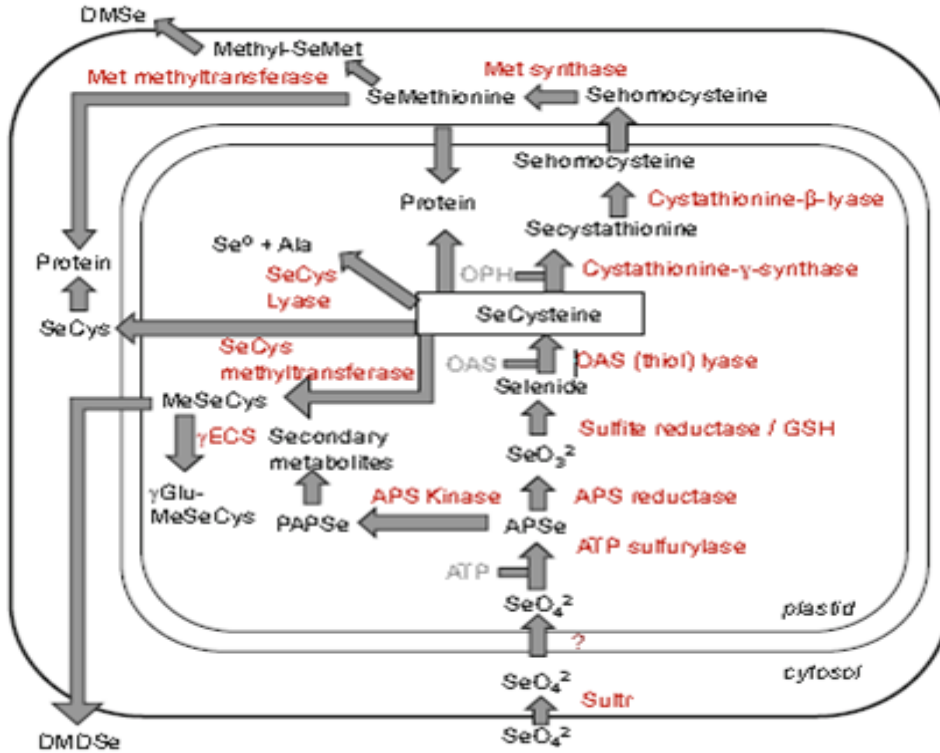
- ~100 kat daha fazla Se miktarı ve dokularında yüksek Se/S oranı (Lauchli 1993)
- Çoğu bitki inorganik Se biriktirirken, onlar metil-SeCys ve selenocystathionine gibi organik formadaki Se' u biriktirirler (Anderson 1993)
- Diğer bitkilerden farklı olarak Se' u spesifik olarak doku ve organlara dağıtırlar. Biriktirmeyenlere kıyasla Se' u kökten sürgüne transloke ederler. Aynı zamanda yaşlı yapraklardan Se' u genç yapraklar ve polen, ovül gibi verimli organlara geri taşırlar (Quinn et al. 2011a,b).
- Hiperakümülatörler yapraklardaki selenyumun çoğunu yaprak tüyleri ve epidermal hücrelerinin vakuollerinde biriktirirler (Freeman et al. 2006a, 2010).
- *Arabidopsis thaliana* ve *Brassica juncea* gibi biriktirmeyen türler ise selenyumunun çoğunu selenat formunda vasküler demetlerinde biriktirir. Ayrıca selenyumu floral kısımlar yerine yapraklarda bulundurlar (Van Hoewyk et al. 2005; Freeman et al. 2006a; Quinn et al. 2011a).

- İlginç olarak hiperakümülatörlerde Se alınımlı sülfat tarafından inhibe edilmez, bu da selenat transporterlarına sahip olabileceği ihtimalini işaret eder.
- Hiperakümülatörlerde Se düzeyi baharın erken evrelerinde S seviyesi ise yazın ortalarında artarken, Se biriktirmeyen türlerde her ikisi de yazın ortasında artış gösterir (Galeas et al. 2007).

2.1.1 Selenat redüksiyonu ve asimilasyonu

2.1.1.1 ATP sülfürilaz

Selenatın yapraklara taşındıktan sonra direk olarak kloroplastlara alındığına dair deneysel veriler mevcut olmasa da, sülfat asimilasyonu ağırlıklı olarak plastidlerde çalışılmıştır (Rotte and Leustek 2000). Bir takım belirtiler sonucu aynı durumun selenat için de geçerli olabileceğini düşünmüşlerdir. ATP sülfürilaz (ATP: sülfat adenil transferaz) bitkilerdeki sülfat asimilasyonunun ilk basamağındaki enzimdir (Leustek et al., 1994). In vitro çalışmalarda ATP sülfürilazın selenatı APSe' ye (Adenozin 5'-fosfoselenat) aktiveleştirme kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu enzim ATP yardımıyla sülfat ve selenatı Adenozin 5'-fosfosülfat (APS) ve Adenozin 5'-fosfoselenata (APSe) katalizler (Shaw and Anderson 1974; Murillo and Leustek 1995). APSe stabil değildir ve in vitro koşullarda hızlıca AMP selenata ayrışır. Bu reaksiyona selenozis denir ve ATP sülfürilaz aktivitesinin tayininde belirleyici olarak kullanılır (Renosta et al., 1993). *Shizosaccharomyces pombe* 'nin ATP sülfürilaz genindeki null mutasyonu sonucunda artmış selenat toleransı ve 10 kat daha fazla Se akümüülasyonu gözlenmiştir (Banszky et al., 2003; Raspor et al., 2003). Bu selenata dirençli mutantlar, düşük ATP sülfürilaz aktivitesi sonucunda azalan sülfat ya da selenat indirgeme göstererek, akümüülasyonda ATP sülfürilazın rolünün önemini göstermişlerdir. Ayrıca, verilere bakılarak ATP sülfürilaz aktivitesi olmadığında, potansiyel olarak toksik olan organo-selenyum bileşikleri minimize edilerek hücrenin tolere edebileceği düzeylerde kalacağı ileri sürülmüştür.



Şekil 1.3 Bitki Se asimilasyonunda öngörülen model. Enzimler kırmızı, metabolitler siyah ya da gri ile gösterilmiştir. Sultr sulfate/selenate transporter, APSe adenosine phosphoselenate, PAPSe phospho adenosine phosphoselenate, OAS O-acetylserine, OPH O-phosphohomoserine, SeCys selenocysteine, (Se)Met (seleno)methionine, Ala alanine, MeSeCys methyl-SeCys, gGlu MeSeCys g-glutamyl MeSeCys, gECS g-glutamylcysteine synthetase, GSH glutathione, DMSe dimethylselenide, DMDSe dimethyldiselenide

Büyüme ortamında sülfat ve selenat arasındaki rekabet sülfat starvasyon yolağını tetikleyerek sülfat transporterlarının aktive olmasını dolayısıyla daha fazla selenat akümülayonuyla sonuçlanmasını sağlar. Bitkilerdeki selenat akümülayonu ve toleransında ATP süfürilazın aşırı ifadesinin etkileri kapsamlı çalışılmıştır. Transgenik hardal ile yapılan denemede *A.thaliana*' da ATP süfürilazın 4 izoformunu kodlayan gen APS1 aşırı ifade edildiğinde, 2 kat daha fazla GSH(glutatyon) birikimi, 2-3 kat yapraklarda total Se akümülayonunu ve total Se indirgenmesinde % 50 artış görülmüştür (Pilon-Smits et al., 2005). *A. thaliana*' da da aynı gen aşırı ifade edildiğinde bu artışlar olmuş, fakat selenat birikimi ve toleransında azalma gözlemlenmiştir. Dahası, *A.thaliana* APS1 geninin bütün kültür hücrelerinde aşırı ifade edilmesi sonucunda selenat toleransında belirgin bir değişiklik olmamıştır (Hatzfeld et al. 1998).

Se hiperakümülatörü *Neptunia amplexicaulis*' ten izole edilen ATP süfürilazın APSe ve 3'-fosfoadenozin 5'-fosfo sülfatı (PAPS) katalize edebildiğini fakat PAPS'yi edemediğini göstermiştir (Burnell, 1981). Hiperakümülatör ve non-akümülatör bitkilerden izole edilen ATP süfürilaz

enzimlerinin kinetik özelliklerinin (Show and Anderson, 1974) ve in vitro ATP sülfürlaz katalitik kapasitesinin çok farklı olmadığı gözlemlenmiştir (Sars et al., 2005). Yapılan çalışmalar, ATP sülfürlazın yüksek oranda aktive olmasının selenat akümülayonu ve toleransıyla ilişkili olmadığını, en azından *Se* hiperakümülatörlerinde veya *A. thaliana* ve tütünde aşırı ifade edildiğinde, fakat selenatı da sülfatla aynı şekilde aktifleştirebildiğini işaret eder.

2.1.1.2 APS redüktaz

APS redüktaz, bitkilerde APS'nin sülfite indirgenmesindeki ilk katalizasyonunu gerçekleştirir, ve bu enzimin sülfat asimilasyonunun kontrolündeki esansiyel aktifleştirici enzim olduğu düşünülür (Setya et. al., 1996; Suter et. al., 2000). S yoksunluğu, Cd uygulaması ve oksidatif stres durumunda APS redüktaz transkript seviyesi ve enzimatik aktivitesi sıkı şekilde düzenlenir (Murayama-Nakshita et. al., 2003; Heiss et. al., 1999; Lee and Leustek 1999, Bick et. al., 2001).

İn vitro çalışmalarda APSe glutatyon tarafından enzimatik olmayan yollardan indirgenebilirken *E.coli*'de bu indirgeyici basamak sadece enzimler tarafından gerçekleştirilebilir (Muller et. al., 1997). Ek olarak, sülfatın APS yönünde aktivasyonu için ATP sülfürlaz reaksiyonunun ürünleri APS ve pirofosfat hızlıca metabolize olmalıdır. Bu yüzden ATP sülfürlazın denge reaksiyonun tersi yöne olan APS redüktaz bitkiler için esansiyeldir (Saito, 2004). *Pseudomonas aeruginosa* APS redüktazın (PaAPR) *A. thaliana*' da yapısal ekspresyonu sonucunda S'nin indirgenmiş inorganik ve anorganik formlarının birikimi artmış bu da sülfat indirgeme kapasitesini yükseltmiştir (Tsakraklides et. al., 2002). Bitkilere selenat uygulandığında, % 65-79 oranında total Se redüksiyonunda artış gözlenmiştir, bu artış APR'nin bitkilerde APSe'yi indirgeme kapasitesine sahip olduğunu işaret eder (Sars et. al., 2005). APSe selenite indirgendikten sonra, bir sonraki selenide dönüştürme basamağı glutatyon tarafından enzimatik olmayan reaksiyonlar ile gerçekleşir (Ng and Anderson 1978). Hsieh ve Ganther (1975) glutatyon, selenit ve indirgenmiş trifosfopridin nükleotidini üretilen sistemi içeren anaerobik sistemde hidrojen selenidin glutatyon redüktaz tarafından katalizlendiğini görmüşlerdir. Başka bir denemede ise SeCys'nin in vitro sentezini sadece OAS, selenit, Cys sentaz, glutatyon redüktaz, glutatyon ve NADPH varlığında başarabilmişlerdir. Bu denemelerde sadece glutatyonun seleniti non-enzimatik olarak indirgenmesi yoluyla selenit elde edilebildiği görülmüştür (Ng and Anderson, 1978). Veriler selenit

redüksiyonunun sülfid redüktaz (sülfidi: sülfide indirger) enzimine ihtiyaç duymadığını işaret eder. Selenitin enzimatik olmayan indirgenmesi De Souza tarafından ortaya atılmış olan selenata göre selenitin selenoaminoasitlere neden daha kolay indirgendiğini açıklar.

2.1.1.3 Cys sentaz

Cys üretimindeki son metabolik adım serinasetiltransferaz (SAT) ve O-asetilserin tiyol-liyaz (OAS-TL) enzimleri tarafından katalizlenir. SAT, serin ve asetil-CoA'dan OAS oluşumunu katalizler. Daha sonra OAS-TL, Cys oluşturmak üzere sülfidi OAS ile asimile eder. Bitki ve bakterilerde Serinasetiltransferaz ve OAS-TL birleşerek Cys sentaz denilen kompleksi oluşturur (Kredich 1992). Cys biyosentezinde SAT reaksiyonu, Cys tarafından SAT'ın sıkı şekilde kontrolünden dolayı anahtar metabolik düzenleyici olarak düşünülür (Noji et. al., 1998).

Ng and Anderson (1978), Se hiperakümülatörlerinden saflaştırılan Cys sentazların non-akümülatör bitkilerden elde edilenlerle aynı katalitik kapasiteye sahip olduğunu göstermişlerdir. Ancak, selenid tarafından Cys sentezi ve sülfid tarafından SeCys sentezi inhibisyonu gözlenmesi, enzim için selenid ve sülfidin rekabet içinde olduğunu işaret eder. Bu nedenle, SeCys üretimi için selenidin asimilasyonunu, sülfidin Cys'e katılımını takip eder. (ya da tam tersi) Ancak bu sonuçlar aynı zamanda Cys sentaz kompleksinin selenat ve selenitin SeCys'ye asimilasyonunda herhangi bir sınırlama yaratmadığını iddia eder.

2.1.2 SeCys'den SeMet Metabolizması

2.1.2.1 Cystathionin- γ - sentaz

Cys/SeCys (yüksek oranda MetlSeMet oluşturmak üzere Cystathionine/SeCysth ve homosistein/Sehocys aracılığıyla) biyosentetik yolağına girebilir (Lauchli, 1993). Cystathionin- γ -sentaz (CGS) enzimi O-fosfohomoserinin, SeCys ile yoğunlaşarak Secystathionin (Secysth) oluşturmasını katalizler. Ispanak ile yapılan çalışmada bu enzimin SeCys'ne Cys'ten daha fazla afinite gösterdiği görülmüştür (Dawson and Anderson 1988). Secysth bazı Se hiperakümülatör ve non-akümülatörlerde bulunabilir (Martin et. al., 1971). Se hiperakümülatör bitki *Stenleya pinnata*'nın total organik Se'sinin % 17'ye kadarını SeCysth formuna konsantre ettiği görülmüştür (Shrift, 1965). Kotrebai ve ark (2000) yaptıkları denemede Se hiperakümülatör bitki *Astragalus*

praelongus'un ise ekstrakte edilebilir total Se oranının % 65'ini SeCystH formunda tuttuğunu HPLC-ICP_MS analizi ile göstermişlerdir.

2.1.2.2 Cystatyonin- β -liyaz ve metiyonin sentaz

CystH- β -liyaz SecystH' den SeHocys' nin kesilmesini katalizler. Bu enziminde sülfat asimilasyon yolağında da bulunan metabolik basamaklardaki enzimlerden olduğu bulunmuştur. Hesse ve ark'ların (2004) yaptıkları derlemede Met biyosentezinin son adımındaki Met sentaz enzimi sitozelde lokalize olur. Homosisteinin metilasyonu ile elde edilen de novo Met sentezinin kloroplastta gerçekleştiği düşünülse, *A. thaliana* kloroplastlarında daha az aktif olan izoformlar elde edilmiştir. (Ravanel et al 2004). Bitkilerde Metiyonin sentaz enzimi Met oluştururken donör olarak N⁵ metiltetrahidrofolatı kullanır. Önceden de bahsedildiği gibi, Se hiperakümülatör bitkilerde çok düşük seviyelerde sentezlense de (Burnell, 1981), SeMet selenyuma hassas olan bitkilerde bulunan baş aminoasittir (Brown and Shrift, 1982).

Se hiperakümülatörleri tarafından kullanılan mekanizmalardan biri olan SeMet den Se uzaklaştırıldığında, dolayısıyla Se protein üretiminden de uzaklaşır, protein üretimine katılmayan MeSe-Cys, GGMeSeCys, SecystH gibi Se-aminoasitlerin birikimine yol açtığı öne sürülebilir. Daha sonraki çalışmalarda bu durum örneklendirilmiştir, bazı Se hiperakümülatörler SeMet' e maruz bırakıldığında spesifik olmayan selenoprotein üretimini minimize edebilme kapasitesine kavuşmuşlardır. Bunu aldığı SeMet' i MeSeCys, SeHocys ve Se-metilselenometiyonine (MeSeMet) metabolize ederek gerçekleştirir. Non-akümülatörler ise öncelikli olarak MeSeMet ve selenopeptid üretmeyi tercih eder. (virupaksha et al 1966)

2.1.3 SeMet den köklenen uçucu Se bileşikleri

SeMet sentezlendikten sonra metillenebilir ve non akümülatör bitkilerde ana uçucu Se form olan dimetilselenide (DMSe) dönüştürülebilir (Levis et al. 1974). DMSe üretimindeki ilk kararlı basamak, SeMet' in S-adenosyl-L-metiyonin: L-metiyonin s-metiltransferaz (MMT) ile metilasyonu sonucunda MeSeMet oluşturulmasını kapsar. *A.thaliana* TDNA knockout mutantlarındaki MMT eksikliğinden dolayı yalnızca % 6-13 civarında uçucu Se formları üretilebilmiş. Dahası ortama MeSeMet eklendikten sonra DMSe volatilazasyonu onarılmıştır.

Se sürecindekine benzer olarak MMT aynı zamanda bileşerek SMM(s-metiltmetiyonin) oluşumunu katalizler (Pimenta, 1998). SMM nin dimetilsülfide (DMS) dönüşümü S-metiltmetiyonin hidrolaz tarafından katalizlenir, bu enzim aynı zamanda SeMM (Se-metilselenometiyonin) DMSye dönüşümünde de yer alır. DMSe üretimi için alternatif yolak, SeMMnin ara ürün olan dimetilselenoniyopropiyanota (DMSeP) dönüşümü sırasında gerçekleşir.

2.1.4 MeSeCys den kökenlene uçucu Se bileşikleri

Bitkiler Se' yi MeSeCys' i okside edip devamında metilleyerek DMSe' ye dönüştürmesiyle uçucu formu elde edebilir. Kabaktan elde edilen Cys sülfoksit liyaz enzimiyle MeCysSO oksidasyonu katalizlenerek in vitro metantiyol üretilmiştir.

Bu enzimin varlığı *Brassica* ve *Allium* türlerinde de gösterilmiştir. Bu türlerde bulunması, metonselonid üretiminde ve DMSe nin oluşturulmasında etkili olabileceğini düşündürmüştür.

Selenosistein metiltransferaz

Se-hiperakümülatör bitkilerinin belirleyici özelliklerinden birisi, yapısal bir form olan S-metilsisteini (MeCys) yüksek miktarda biriktirebilme yeteneğine sahip olmalarıdır (Sors et al., 2005). Söz konusu bitkiler selenata maruz bırakıldıklarında ayrıca MeSeCys de biriktirebilme yeteneğine sahiptirler. Bu bağlamda MeCys ve MeSeCys biyosentezlerinin ortak bir yolak aracılığıyla yürütüldüğü öne sürülebilir (Shrift, 1969). Selenosistein metiltransferaz (SMT) SeCys'nin metilasyonunu katalizleyerek MeSeCys'nin oluşumuna aracılık eden enzimdir ve *A. bisulcatus*'tan klonlanmıştır (Accession No. AJ131433; Neuhierl and Bock, 1996). In vitro'da söz konusu enzim SeCys'ye Cys'den daha fazla afinite göstermiştir (Neuhierl and Bock, 2002). Bununla birlikte, SMT'nin aşırı ifade edildiği transgenik *A. thaliana*'da hem MeSeCys hem de MeCys sentezi saptanmıştır, yani in vivo'da söz konusu enzim hem SeCys'yi hem de Cys'yi metile edebilmektedir (Ellis et al., 2004). SMT proteini, homosisteinin, selenohomosisteinin ve SeCys'nin metilasyonunu katalizlediği gösterilmiş olan *E. coli*'den yagD'ye % 40'ın üzerinde benzerlik göstermektedir (Neuhierl et al., 1999). Benzer şekilde, *A. bisulcatus* SMT amino asit dizisi için veri tabanı karşılaştırmaları sonucunda enzimin *A. thaliana* ve *O. sativa*'daki homosistein S-metiltransferaz (HMT, EC 2.1.1.10) enzimine sırasıyla % 70 ve % 65 benzer

olduğu belirlenmiştir. Aslında *A. thaliana*'dan HMT kodlayan cDNA'lar yagD *E. coli* mutantlarının fonksiyonel komplementasyonu aracılığıyla klonlanmıştır (Ranocha et al., 2000). HMT enzimi SMM'yi metil donörü olarak kullanarak Met'ten homosistein sentezlenmesini katalizlemektedir. Sonuç olarak, tüm bu bulgulara göre SMT ve HMT'nin benzer yapı ve fonksiyona sahip oldukları, Cys ve homosisteini metilleyebildikleri ve Se izologları spesifitelerinin farklılık gösterdiği söylenebilir.

SMT'nin *A. thaliana*'da yapısal ifadesi MeSeCys, MeCys ve bunların türevleri GGMeSeCys/GGMeCys üretimine neden olmuştur (Ellis et al., 2004; LeDuc et al., 2004). Buna göre, daha önce Neuhierl ve Bock (1996)'un da öne sürdüğü gibi, *Astragalus*'ta SMT hem MeCys hem de MeSeCys'nin biyosentezinden sorumlu olduğu söylenebilir. Se hiperakümülatörü *A. bisulcatus* genç sürgün dokularında, biriktirdiği Se'nin % 90'ından fazlasını MeSeCys'ye metabolize etmektedir (Pickering et al., 2000; 2003). Daha önceki raporlarda, akümülatör olmayan bir *Astragalus* cinsi *A. vásei*'nin seleniti MeSeCys'ye metabolize edebildiği fakat sülfatı MeCys'ye dönüştürme yeteneğinden yoksun olduğu bildirilmiştir (Shrift, 1969). Bu bulguya göre belki de SMT'nin SeCys'ye özgü bir potansiyeli olduğunu ileri sürülebilir. Neuhierl ve Bock (1996)'un hipotezine göre SMT'nin SeCys'yi Cys'ye tercih etmesi, enzimin hiperakümülatörlerdeki SeCys'ye olan yüksek afinitesi dolayısıyla SeCys'yi metilleme kapasitesinin artması ve protein havuzuna spesifik olmayan katılımının etkin bir şekilde düşmesiyle açıklanabilir. Bununla birlikte, söz konusu hiperakümülatörler yüksek miktarlarda MeCys de içermektedirler, yani söz konusu spesifite planta'da bulunmuyor olabilir. Farklı Se biriktirme kapasitelerine sahip sekiz *Astragalus* türünde SMT aktivitesinin Se hiperakümüülasyonu sıklıkla bir şekilde korelasyon gösterdiği bulunmuştur (Sors et al., 2005). Bununla birlikte SMT aktivitesi tek başına selenat aracılığıyla oluşan Se hiperakümüülasyonunu açıklayamaz çünkü *A. thaliana*'da SMT'nin aşırı ifadesi selenit maruziyeti sonucunda Se asimilasyonu ve toleransını artırırken, aynı etkinin selenat maruziyeti sonucunda görülmediği belirlenmiştir (Ellis et al., 2004). Buna göre metabolik ve enzimatik etkileşimler ve bölmelendirme gibi başka faktörlerin SMT'nin Se hiperakümüülasyonundaki fonksiyonunda kritik bir role sahip olduğu öne sürülebilir. Dahası MeSeCys ve MeCys biyosentezi aracılığıyla Se ve S'nin etkin bir şekilde azaltılması *Astragalus* hiperakümülatörlerinin Se birikimini S'ye tercih etmelerini açıklayamamaktadır (Bell et al., 1992) çünkü *A. thaliana*'da SMT'nin aşırı ifadesinin hem MeCys hem de MeSeCys biyosentezlerini katalizlediği düşünülmektedir (Ellis et al., 2004).

3. Se hücre yapı ve fonksiyonlarını yeniden yapılandırması

3.1.Hücre membran yapısı ve hücre bütünlüğünün yenilenmesi

Ortama Se eklenmesinin ardından hidrojen peroksit ve singlet oksijen seviyeleri düşürülerek bitki hücre membranı lipidlerinin hasarının kısıtlanması, ROS reaksiyon zincirindeki bir aksaklığa sebep olunmasıyla gerçekleştiği ileri sürülür. Optimal Se dozajlarının kullanılmasının, stres altında bulunan bitkilerdeki MDA (lipit peroksidasyonun boyunu gösterir) akümüasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Zembala ve ark., 2010). Filek ve ark. (2010) Cd stresi uyguladıkları kolza fidelerinde, kloroplast iç zarlarının degradasyona uğradığını görmüşler. Ancak 2µM Se uygulanmasının ardından kloroplast ince yapıları yeniden inşa edilmiş, tilakoid ve stromların yapısı yeniden düzenlenmiş, kloroplast boyutu, hücre membran lipidlerinin doymamışlık oranı ve akışkanlığı artmıştır. Bir önceki çalışmalarında da, Cd stresine maruz bırakılmış buğdayda, Se ile galoktolipitlerin doymamışlık derecesini regüle edebildiğini ve bu sayede plastid zarı lipid ve yağ asidi kompozisyonlarını yeniden inşa edebildiğini gözlemlemişlerdi. Tüm bu sonuçlar yola çıkarak Cd stresinin oluşturduğu stresin Se tarafından detoksifikasyonun iki mekanizmadan dolayı olabileceğini ileri sürmüşlerdir: (1) Ortama eklenen Se, membran enzimlerini yeniden aktifleştirir ve kloroplast fonksiyonlarında önemli olan metabolitlerin taşınımını düzenler. (2) Se, Cd ile yarışarak zarf membran proteinlerindeki sistein gruplarının tiyollerini ile spesifik bağlanma gösterir (Filek ve ark.,2009). Selenyuma yanıt olarak hücre membranını integrasyonundaki gelişme sonucu, çevresel strese maruz kalmış bitkilerin zarlarında meydana gelen elektrolit sızıntılarının azaltılmasını sağlar (Seppanen ve ark.,2003; Pukacha ve ark.,2011; Malik ve ark., 2012; Zembala ve ark., 2010).

3.2. Fotosentez fonksiyonlarının iyileştirilmesi

Bitkiler çevresel streslere maruz kaldıklarında, kloroplastları zarar görür bu da fotosentezin bozulmasıyla sonuçlanır. Ancak uygun miktarda Se eklenmesi bir şekilde kloroplastlardaki hasarı azaltır ve kloroplast içeriğini artırır (Filek ve ark., 2009; Hawrylak-Nowak, 2009; Chu ve ark., 2010; Wang, 2011; Yao ve ark., 2011; Malik ve ark., 2012).

Proteomik analizler vasıtasıyla, Wang ve ark., 2012' de pirinç fidelerinde yaptıkları araştırmalarda düşük dozajlarda Se uygulanmasının fark edilebilir biçimde fotosentez hızını arttırdığını ortaya koydu. Buna ek olarak, süpürge

darısında Se uygulanmasının ardından fotosentetik hızda, stomal iletkenlik ve transpirasyon oranının arttığı gösterilmiştir (Djanaguiraman ve ark., 2010). Se uygulanmasının ardından stres altındaki bitkilerde fotosentez sisteminin yeniden yapılandırılmasının sebebi düşürülmüş ROS seviyeleri, antioksidanların yeniden aktifleştirilmesi, hasarlı kloroplast yapılarının yenilenmesi ve diğer önemli metabolit seviyelerinin (GSH ve –SH gibi maddeler) yükselmesi ile yakından ilişkili olabilir.

Ancak aşırı Se bitkilerdeki fotosentez hasarını şiddetlendirebilir. Yüksek Se seviyeleri fotosentez aparatına zarar vererek fotosentezi inhibe eder ve bunun sonucunda aşırı nişasta üretimi görülür (Vítová ve ark., 2011; Wang ve ark., 2012). Buğdayın 3 farklı genotipinde yapılan çalışmada aşırı Se’ nin anten sistemler (ABS/CS) tarafından absorblanan ışık enerjisini azalttığını, uyarım enerji akımını (TRo/CS), PS2 boyunca elektronların transferi (ETo/CS), antenlerden reaksiyon merkezine enerji transfer etkinliği, bu merkezlerin dışı, PS2’ deki elektron transferlerinin kuantum alanı ve fotokimyasal reaksiyonların aktif merkezlerinin yoğunluğunu azalttığı ve evrilen O₂ merkezini bozduğu görülmüştür (Łabanowska ve ark., 2012).

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Bitki Materyali Ve Deneme Planlaması

2.1.1 Tohum sterilizasyonu

Arabidopsis thaliana yaban tip Columbia (col-0) ekotipine ait bitkilerin tohumları 1 dk. %70 etanol' de yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Devamında 5 defa steril deiyonize su ile yıkanmıştır. Sonrasında 10 dk. boyunca % 4 sodyum hipoklorit çözeltisi ile yüzey sterilizasyonuna maruz bırakılmıştır. Ardından 5 kez steril deiyonize su ile yıkanmıştır.

2.1.2. Büyüme koşulları ve stres uygulamaları

Tohum ekimi ve bitki büyümesi için yarım kuvvet hoagland çözeltisi hazırlanarak hidrofonic ortam elde edilmiştir (Hoagland and Arnon, 1950). Her birinde 54 adet tohum yetiştirilebilen platformlarda ekilen bitki tohumları üç günlük sürede çimlenmiştir.

Çimlenme sonrasında on bir gün boyunca hidrofonic ortamda 16/8 saat (aydınlık/karanlık) foto periyotta, 25 °C sıcaklıkta, % 60-70 nem içeren ortamda led ışık yardımı ile büyütülmüştür. On bir günlük bitkilere uygulanma yapılmıştır. Uygulamada bitkiler gruplandırılmış ve 5 farklı bitki grup oluşturulmuştur. Kontrol bitki gruplarına yarım kuvvet hoagland, selenyuma maruz bırakılan 4 bitki grubuna ise 10 µM selenat, 10 µM selenit, 30 µM selenat ve 30 µM selenit içeren yarım kuvvet hoagland uygulanmıştır. Selenyum uygulaması 7 gün boyunca devam etmiştir ve toplamda üç haftalık bitkiler hasat edilmişlerdir. Hasat sonrası elde edilen örnekler analizler için - 80°C dolapta depolanmıştır.



Şekil 2.1. 7 gün boyunca, selenat ve selenite maruz bırakılan 22 günlük *Arabidopsis thaliana* bitkileri

2.2. Fizyolojik Parametreler

2.2.1. Büyüme parametreleri

Selenit ve selenat uygulaması sonrasında 6 gün uygulama yapılmış olan bitkilerin her birinden rastgele 4 adet bitki seçilmiş ve bu bitkilerin gövdeleri ve köklerinin boyları ölçülmüş ve yaş ağırlıkları belirlenmiştir.

2.2.2. Bağıl büyüme hızı (RGR)

Selenit ve selenat uygulaması sonrasında 6 gün uygulama yapılmış olan bitkilerden her bir gruptan rastgele 4 adet bitki seçilmiş ve bu bitkilerin gövdeleri ve köklerinin yaş ağırlıkları belirlenmiştir. Yaş ağırlığı belirlenen bu örnekler 70 °C’de 72 saat etüvde bekletilmiş ve sonrasında kuru ağırlıkları da ölçülmüştür.

2.2.3. Bağıl su içeriği (RWC)

Selenit ve selenat uygulanan 6 günlük bitkilerin her bir grubundan yaklaşık olarak eş boyutlarda yaprak örnekleri alınmış ve yaş ağırlıkları ölçülmüştür, sonrasında yapraklar 6 saat boyunca deiyonize su bulunan petrilerde bekletilerek turgorlu hale gelmeleri sağlanmıştır. 6 saatlik sürenin sonunda yapraklar tartılmış ve turgorlu ağırlıkları belirlenmiştir. Tartılan yaprak örnekleri 70 °C’de 72 saat etüvde kurutulmuştur. Bu süre sonunda yaprakların kuru ağırlıkları ölçülmüştür. Son olarak tüm guruplara ait yaprak örneklerinin bağıl su içeriği aşağıdaki formüle göre % olarak hesaplanmıştır.

Bağıl su içeriği (%) = [(Yaş ağırlık – Kuru ağırlık) / (Turgorlu ağırlık – Kuru ağırlık)] x 100

2.2.4. Yaprak su kaybı

Stomatal iletkenlik indikatörü olan yaprak su kaybı miktarını saptamak için her bir bitki gurubundan birbirine benzer rastgele üç yaprak seçilmiş ve ağırlıkları belirlenmiştir. Sonrasında bitkiler 0 dk, 10 dk, 20 dk ve 30 dk’lar olmak üzere ağırlıkları ölçülmüştür. Süre aralıkları boyunca bitkiler bitki büyüme odasında bekletilmişlerdir. Belirlenen bitki ağırlıklarının ortalaması hesaplanarak yaprak su kaybı miktarı belirlenmiştir.

2.2.5 Ozmotik potansiyel (ψ_{π})

Wescor Vapro 5520 ozmotik potansiyel ölçüm cihazı kullanılarak yaprak su potansiyelinin ölçümü yapılmıştır. Hasat sırasında, her gruptan örnekler ayrı ayrı 1,5 ml' lik bir ependorflarda cam baget yardımıyla ezilmiştir ve örnekler 10000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatanttan her bir okuma için 10 μ l alınmıştır. MPa cinsinden su potansiyeli, elde edilen ozmotik potansiyel verilerini Santa-Cruz *et al.* (2002)' ye göre $2,408 \times 10^{-3}$ katsayısı ile çarpılarak hesaplaması yapılmıştır.

2.3. Biyokimyasal Parametreler

2.3.1. Lipit peroksidasyonu

Madhava Rao ve Sresty (2000)' e göre yapraklardaki lipit peroksidasyonu, malondialdehit (MDA) içeriği belirlenerek ölçülmüştür. Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA' nın miktarını belirlenmek için thiobarbiturik asit (TBA) reaksiyonu kullanılmıştır. MDA konsantrasyonu 532 nm ve 600 nm' de ölçülen absorbans değerlerine göre hesaplanmıştır. 600 nm' de ölçülen absorbans spesifik olmayan turbiditedir ve 532 nm' de ölçülen absorbanstan çıkartılarak gerçek MDA miktarı belirlenir. MDA miktarı hesaplanırken ekstinksiyon katsayısı $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak kullanılmıştır.

2.3.2. H_2O_2 miktarı

Cheeseman (2006)' ya göre H_2O_2 miktarı bazı değişikliklerle ölçülmüştür. Standart H_2O_2 analizinde 100 μM sorbitol, 250 μM ferrous amonyum sülfat ve 100 μM xilenol orange, 25 mM H_2SO_4 içinde çözölmektedir. Bu yöntemde ferrous amonium sulphate/xilenol orange (FOX) tamponuna %1 etanol (EtOH) eklenerek hazırlanmıştır. Kullanılacak olan örnekler sıvı azot içinde muhafaza edilmiştir. Eğer örnekler, -80°C veya -20°C derecede saklanırsa H_2O_2 miktarında 1 haftada % 60' a varan kayıplar gözlenebilmektedir (Cheeseman, 2006). 0,1 g yaprak örneği soğuk aseton(-20°C) ile hazırlanmış 25 mM H_2SO_4 ile homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar 4000 g' de 4°C ' de 5 dk. boyunca santrifüjlenmiştir. Oluşan süpernatanttan 50 μ l örnek alınıp üzerine 1 ml eFOX tamponu ilave edilmiştir. Elde edilen karışım 30 dakika bekletildikten sonra 550 ve 800 nm dalga boyunda ölçölür ve ölçülen absorbansların farkı alınarak belirlenir.

2.3.3. Antioksidan enzim ekstraksiyonu ve aktivite analizleri

Bu aşamadaki işlemlerin tümü proteaz aktivitesini minimum seviyede tutmak amacıyla +4 °C' de gerçekleştirilmiştir. Protein ve enzim ekstraktlarının hazırlanması için 0,1 gr yaprak örnekleri ilk olarak 0,5 ml ekstraksiyon tamponu ile (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 0,1 mM etilendaimin tetra asetik asit (EDTA), 0,2% (v/v) Triton-X100, 1 mM fenilmetilsulfonil florid (PMSF) ve %2 (w/v) PVPP) homojenize edilmiştir. Askorbat peroksidaz aktivitesi analizi için ise ayrıca homojenizasyon tamponuna 5 mM askorbik asit eklenmiştir. Ardından homojenizasyonu yapılan örnekler 14000 g' de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonrası ise elde edilen süpernatantlar protein miktarı ve enzim aktivitesi belirlenmede kullanılmıştır.

2.3.3.1 Katalaz (CAT) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Bergmeyer (1970)' e göre H_2O_2 ' nin süpürülmesinin 240 nm' deki absorbansda yol açtığı azalmanın izlenmesi ile katalaz (CAT (EC 1.11.1.6)) aktivitesinin ölçüm gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı 0.1 mM EDTA ve %3 H_2O_2 içeren 50 mM sodyum fosfat (pH 7,0) tamponudur. Enzimin, 1 mg total protein başına dakikada süpürdüğü μ mol H_2O_2 miktarının, 1 U (μ mol H_2O_2 mg protein-1 min-1) olarak hesaplaması yapılmıştır.

2.3.3.2 Askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Askorbat peroksidaz (APX (EC 1.11.1.11)) aktivitesi Nakano ve Asada (1981)' e göre belirlenmiştir. Ölçüm, askorbatın oksitlenmesi ile ilişkili olarak 290 nm' deki absorbansın azalmasının izlenmesine dayanmaktadır. Reaksiyon karışımı 0,1 mM EDTA, 0,1 mM H_2O_2 ve 0,5 mM Askorbat içeren 50 mM potasyum fosfat tamponudur (pH 7,0). Oksitlenen askorbat miktarı, ekstinksiyon katsayısı $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak hesaplanmıştır. Enzimin, 1 mg total protein başına dakikada oksitlediği askorbat miktarı, 1 U (μ mol askorbat mg protein-1 min-1) olarak tespit edilmiştir.

2.3.3.3 Glutatyon redüktaz (GR) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Foyer ve Halliwell (1976)' ya göre Glutatyon redüktaz (GR (EC 1.6.4.2)) aktivitesi belirlenmiştir. GSSG' yi redüklemek için GR tarafından oksitlenen

NADPH' ın izlenmesine dayanan bir yöntemdir. Reaksiyon karışımı 0,5 mM GSSG, 0,12 mM NADPH içeren 25 mM sodyum fosfat (pH 7.8) tamponundan oluşur. NADPH oksidasyonu 340 nm' de izlenmiştir. Oksitlenen NADPH miktarı ekstinksiyon katsayısı $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak belirlenmiştir. Enzimin, 1 mg total protein başına dakikada oksitlediği NADPH miktarı, 1 U ($\mu\text{mol NADPH mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$) olarak belirlenmiştir.

2.3.3.4 GSH miktarı tayini

GSH içeriği Queval and Noctor (2007)' e göre tayin edilmiştir. Ekstraksiyon 4°C' de gerçekleştirilmiştir. 0.1 g yaprak örneği sıvıt azot ile toz haline getirilip 0.2M HCl ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyondan sonra 16 000 g' de 10dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant (0.5 ml) yaklaşık 0.4 ml 0.2 M NaOH ve 50 μl 0.2 M NaH_2PO_4 (pH 5.6) varlığında nötralize edilmiştir. Glutasyon içeriği 340 nm' de enzim döngü testi kullanılarak belirlenmiştir.

2.3.4. Antioksidan enzimlerin izoenzim tayini

Denaturasyona sebep olmayan koşullarda (SDS içermeyen) yaprak örneklerinden elde edilen protein ekstraktları poliakrilamid jel elektroforezinde (Native-PAGE) ayrılmış ve belirlenmek istenen enzimlere özel boya solüsyonlarıyla boyanmıştır. Örneklerin hazırlanmasında, aktivite analizlerinde kullanılan ekstraksiyon prosedürü kullanılmıştır. Laemmli (1970)'e göre Native-PAGE, SDS kullanılmadan yapılmıştır. Jeller Vilbert Lourmat jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiş ve bant yoğunluklarının analizi Bio-Capt yazılımı kullanılarak yapılmıştır.

2.3.4.1 Süperoksit dismutaz (SOD) izoenzim tayini

Örnekler % 12.5' lik ayırma (separating) ve %4' lük hizalama (stacking) jelinde elektroforetik ayırımına maruz bırakılmıştır. Her bir kuyucuğa yapraklar için 75 μg protein yüklenmiştir. SOD boyaması, riboflavin ve nitrobluetetrazolium (NBT) boyası kullanılarak Beauchamp ve Fridovich'e (1971) göre belirlenmiştir. Riboflavin ışıkla birlikte süperoksit anyonu ($\text{O}_2^{\cdot-}$) üretme özelliğine sahiptir, üretilen $\text{O}_2^{\cdot-}$ NBT' yi oksitleyerek mavi-mor renkte formazan oluşumuna sebep olmaktadır. Boyamanın prensibine göre jel üzerinde SOD lokalize olmuş bölgelerde NBT oksitlenmesinin inhibisyonu sonucu beyaz bantlar oluşması sağlanmıştır. Jeller 45 dk boyunca karanlıkta boya solüsyonları ile

bekletildikten sonra ışık altında çalkalanarak bantların meydana gelmesi sağlanmıştır.

2.4 Klorofil Floresans

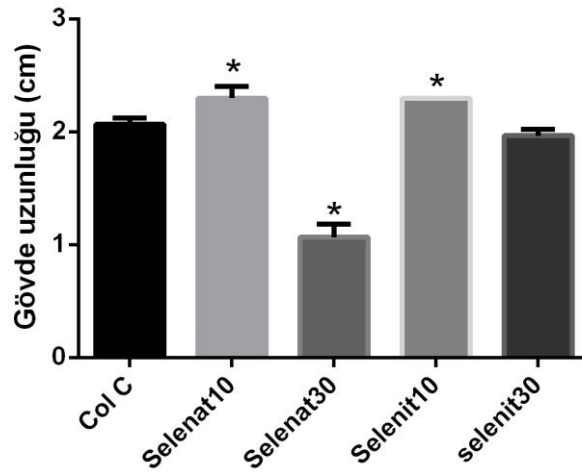
Hansatech marka klorofil floresans cihazı kullanılarak F_v/F_m (PSII' nin maksimum verimi) ölçümleri alınmıştır. Ölçümlerden önce yapraklar cihaz ile birlikte gelen klipslerin yardımı ile 30 dk. boyunca karanlığa alıştırılmış ve ardından ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR

3.1 Fizyolojik Parametreler

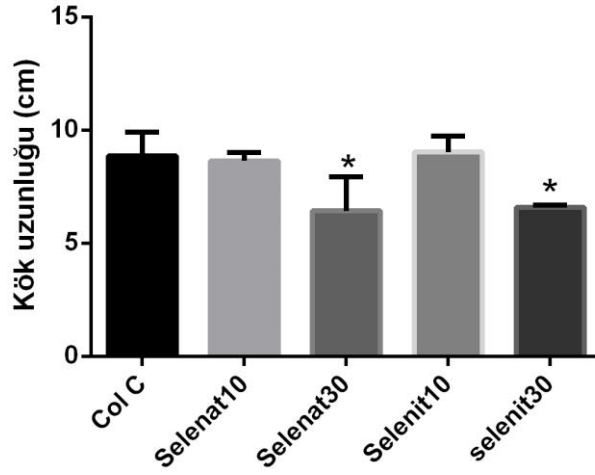
3.1.1 Nisbi büyüme parametreleri ve nisbi su içeriği (RWC)

Selenyum uygulaması yapılan *Arabidopsis thaliana* col. sürgünleri kontrol sürgünlerinin gövde uzunlukları karşılaştırıldığında 10 μ M selenat ve 10 μ M selenit uygulanan gruplarda % 11,2 artış gözlenirken, 30 μ M selenat uygulanan grupta % 48,39 azalma ve 30 μ M selenit uygulanan grupta % 4,84 azalma gözlenmiştir. Selenat uygulanan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında 30 μ M selenat grubunda 10 μ M selenat grubuna oranla % 53,62 azalma, 30 μ M selenit grubunda 10 μ M selenit grubuna oranla ise % 14,5 azalma gözlenmiştir (şekil 3.1).



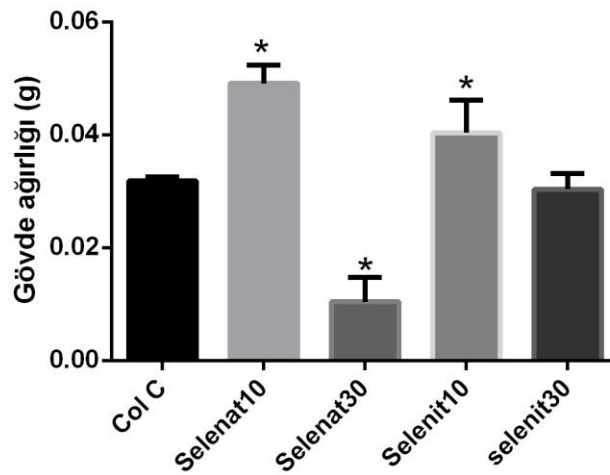
Şekil 3.1 Selenyum uygulaması yapılan *Arabidopsis thaliana* col. gövde uzunluğu farklılıkları. ‘*’ istatistiksel farklılıkları işaret eder($p < 0.05$)

Kök uzunluklarına bakıldığında ise; 10 μ M selenat uygulanan grupta %2,25 azalma 30 μ M selenat uygulanan gruplarda % 27,3 azalma, 10 μ M selenit uygulanan grupta % 2,07 artma ve 30 μ M selenit uygulanan grupta % 25,42 azalma gözlenmiştir. Selenat uygulanan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında 30 μ M selenat grubunda 10 μ M selenat grubuna oranla % 25,62 azalma, 30 μ M selenit grubunda 10 μ M selenit grubuna oranla ise % 26,94 azalma gözlenmiştir (şekil 3.2).



Şekil 3.2 Selenyum uygulaması yapılan *Arabidopsis thaliana col.* kök uzunluğu farklılıkları. ‘*’ istatistiksel farklılıkları işaret eder ($p < 0.05$)

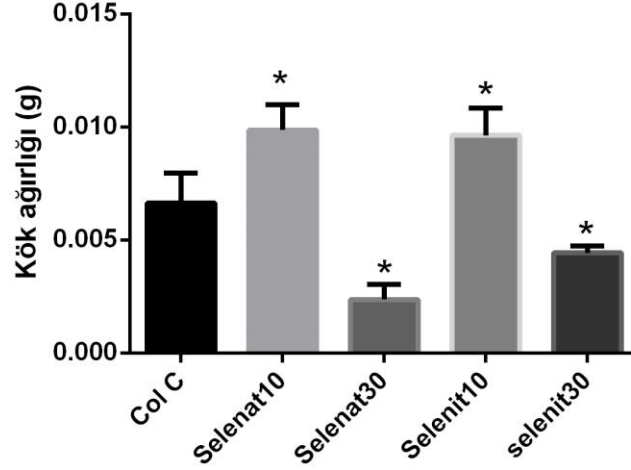
Gövde ağırlıkları karşılaştırmasında; 10 μ M selenat uygulanan sürgün ağırlığında % 54,08 artış, 30 μ M selenat uygulanan gruplarda % 67,26 azalma, 10 μ M selenit uygulanan grupta % 26,67 artma ve 30 μ M selenit uygulanan grupta % 4,71 azalma gözlenmiştir. Selenat uygulanan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında 30 μ M selenat grubunda 10 μ M selenat grubuna oranla % 78,75 azalma, 30 μ M selenit grubunda 10 μ M selenit grubuna oranla ise % 24,77 azalma gözlenmiştir (şekil 3.3).



Şekil 3.3 Selenyum uygulaması yapılan *Arabidopsis thaliana col.* gövde ağırlığı farklılıkları. ‘*’ istatistiksel farklılıkları işaret eder ($p < 0.05$)

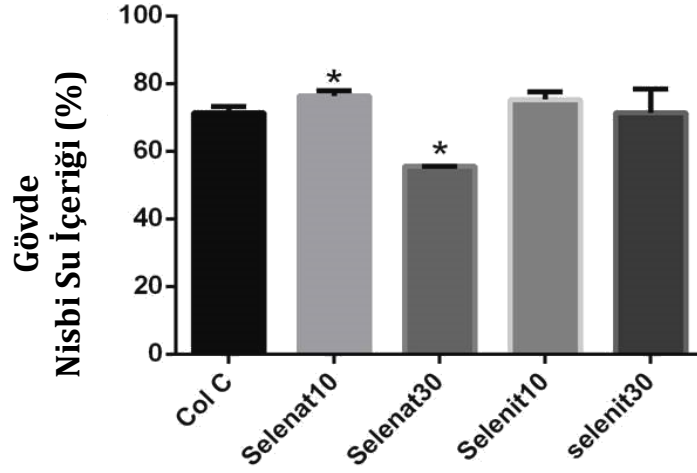
Kök ağırlıkları karşılaştırmasında; 10 μ M selenat uygulananların kök ağırlığında % 56,78 artış, 30 μ M selenat uygulananlarda % 64,32 azalma, 10 μ M

selenit uygulanan grupta % 45,23 artma ve 30 μ M selenit uygulanan grupta % 33,16 azalma gözlenmiştir. Selenat uygulanan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında 30 μ M selenat grubunda 10 μ M selenat grubuna oranla % 77,24 azalma, 30 μ M selenit grubunda 10 μ M selenit grubuna oranla ise % 53,98 azalma gözlenmiştir(şekil 3.4).



Şekil 3.4 Selenyum uygulaması yapılan *Arabidopsis thaliana col.* kök ağırlığı farklılıkları. ‘**’ istatistiksel farklılıkları işaret eder(p < 0.05)

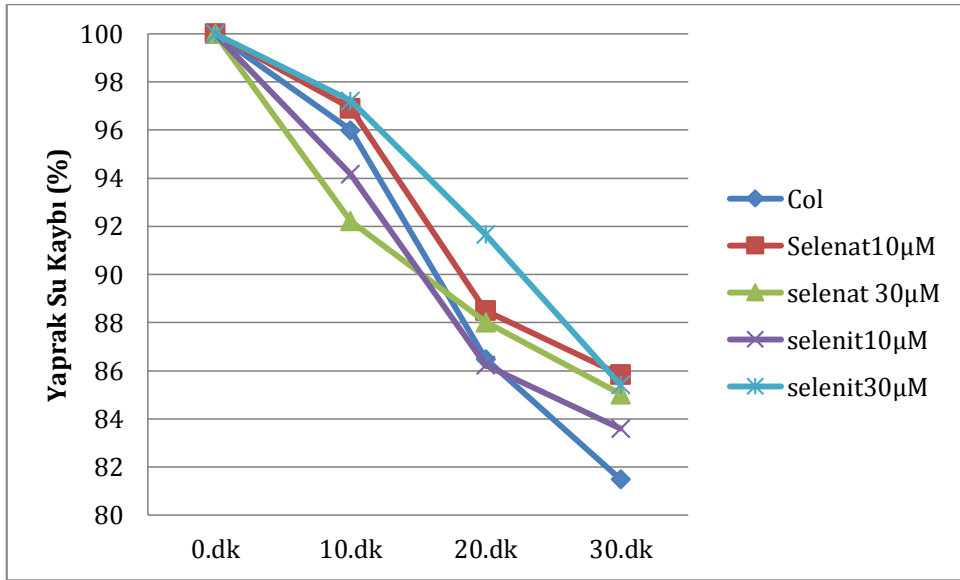
Arabidopsis sürgünlerinde kontrol grubu ile selenyum uygulanan grupların RGR değerleri karşılaştırıldığında 10 μ M selenat grubunda % 6,87 artış, 30 μ M selenat % 25,05 azalma gözlenirken, 10 μ M selenit grubunda % 5,29 artış ve 30 μ M selenit grubunda %0,12 azalma gözlenmiştir. Selenat uygulanan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında 30 μ M selenat grubunda 10 μ M selenat grubuna göre % 29,87 azalma gözlenirken, 30 μ M selenit uygulanan grup 10 μ M selenit uygulanan gruba göre % 5 azalma gözlenmiştir (şekil 3.5).



Şekil 3.5. Selenyum uygulaması yapılan *Arabidopsis thaliana col.* gövdelerindeki nisbi su içeriği farklılıkları. “*” istatistiksel farklılıkları işaret eder ($p < 0.05$)

3.1.2 Yaprak su kaybı

Arabidopsis sürgünlerinde kontrol grubu ile selenyum uygulanan grupların yaprak su kaybı miktarları 0.dakikalarıyla karşılaştırıldığında kontrol grubunda 10. dakika % 4 azalma 20.dakikada % 13,5 azalma 30.dakikada ise % 18,5 azalma gözlenir.



Şekil 3.6 Selenyum uygulaması yapılan *Arabidopsis thaliana col.* yaprak su kaybı farklılıkları.

10µM selenat grubunda 10. dakikada % 3,09 azalma 20 dakikada % 11,5 azalma 30. dakikada ise % 14,16 gözlenir. 30µM selenat grubunda 10.

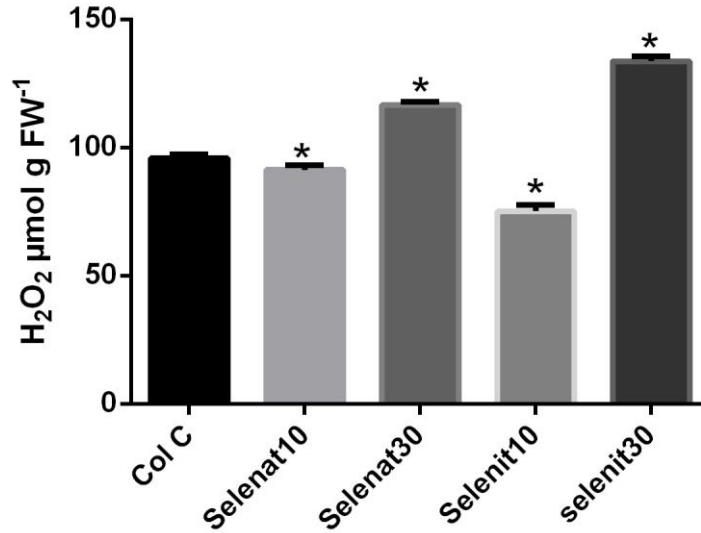
dakikada % 7,78 azalma 20. dakikada % 11,92 azalma 30. dakikada % 14,97 azalma gözlenir. 10 μ M selenit grubunda ise 10. dakikada % 5,82 azalma 20. dakikada % 13,76 azalma 30. dakikada % 16,4 azalma görülürken ve 30 μ M selenit grubunda ise 10. dakikada % 2,78 azalma 20. dakikada % 8,33 azalma 30. dakikada ise % 14,58 azalma gözlenmiştir (şekil 3.6).

3.2 Biyokimyasal Parametreler

3.2.1 H₂O₂ miktarı

Sürgünlerde H₂O₂ miktarı kontrol grupları ile selenyum uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında 10 μ M selenat grubunda % 4.2 azalma, 30 μ M selenat grubunda %21.6 artma, 10 μ M selenit grubunda % 23.53 azalma ve 30 μ M selenit grubunda % 39.37 artış gözlenmiştir.

Selenat uygulanan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında 30 μ M selenat grubunda 10 μ M selenat grubuna göre % 26.93 artma gözlenirken, 30 μ M selenat grubunda 10 μ M selenat grubuna göre % 82.26 artış gözlenmiştir.



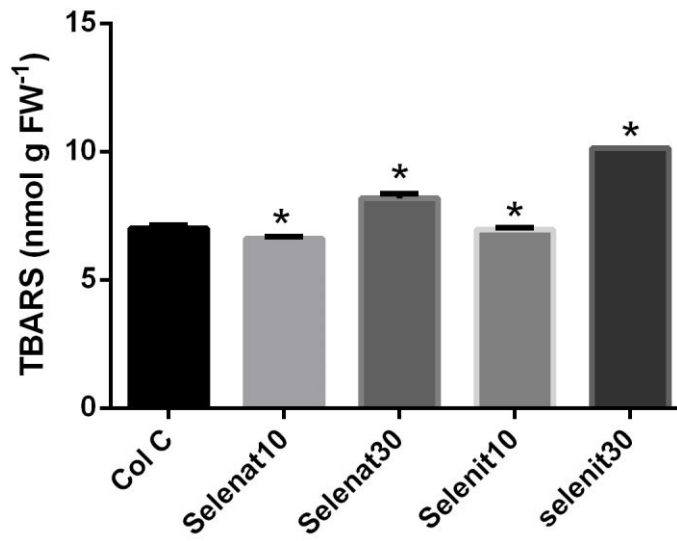
Şekil 3.7 Selenyum uygulamasının *Arabidopsis thaliana* Col. sürgünlerinde H₂O₂ miktarı üzerine etkisi. “*” istatistiksel olarak farklılıkları simgeler (p<0.05).

3.2.2 Lipit peroksidasyonu

Sürgünlerde TBARS miktarları, kontrol grupları ile karşılaştırıldıklarında 10 μ M selenat grubunda % 5.74 azalma, 30 μ M

selenat grubunda %15.82 artma, 10 μ M selenit grubunda % 0.83 azalma ve 30 μ M selenit grubunda % 44.14 artış gözlenmiştir.

Selenat uygulanan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında 30 μ M selenat grubunda 10 μ M selenat grubuna göre % 22.87 artma gözlenirken, 30 μ M selenat grubunda 10 μ M selenat grubuna göre % 44.14 artış gözlenmiştir.

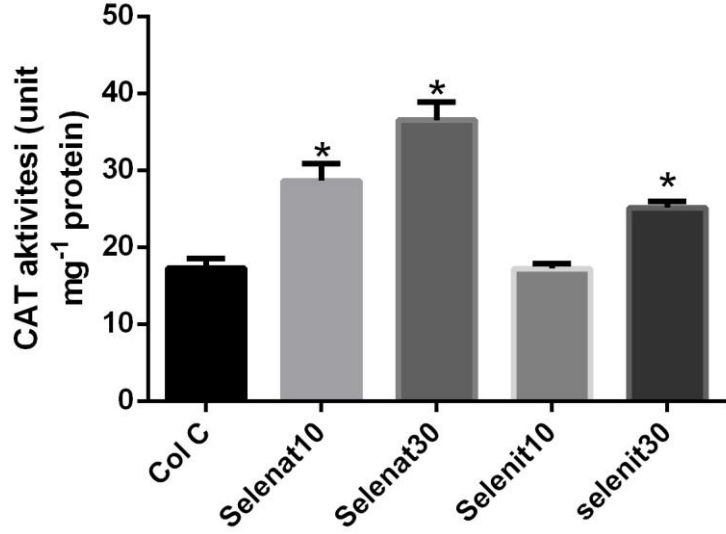


Şekil 3.8 Selenyum uygulamasının *Arabidopsis thaliana col.* sürgünlerinde TBARS miktarı üzerine etkisi. ‘*’ istatistiksel olarak farklılıkları simgeler ($p < 0.05$).

3.2.3 CAT enzim aktivitesi

Selenyum uygulanan gruplar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında 10 μ M selenat, 30 μ M selenat ve 30 μ M selenit gruplarında sırasıyla % 59.05, % 110.74 ve % 45.01 oranında artış gözlenirken, 10 μ M selenit grubunda belirgin bir farklılık gözlenmemiştir.

Selenyum uygulanan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında selenat konsantrasyonu 30 μ M yükseltildiğinde 10 μ M selenata oranla % 32.5 artış gözlenmiş, selenit konsantrasyonu 30 μ M yükseltildiğinde ise 10 μ M selenite oranla % 45.95 artmıştır (şekil 3.9).

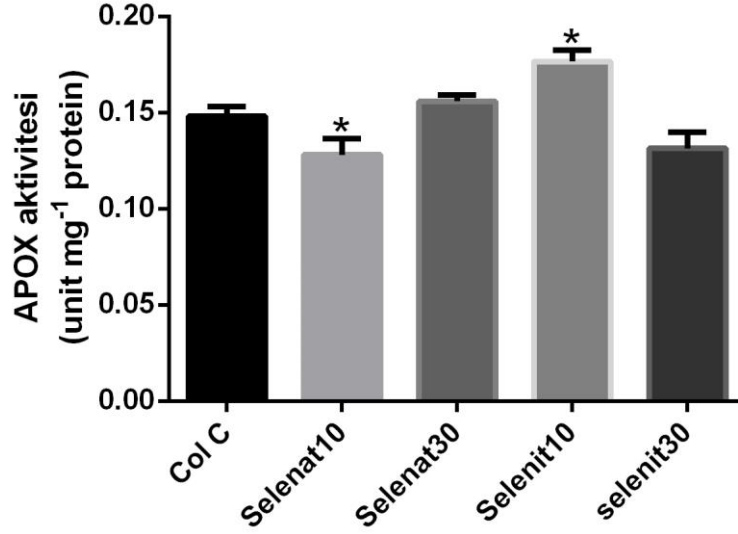


Şekil 3.9 Selenyum uygulamasının *Arabidopsis thaliana col.* sürgünlerinde CAT enzimi aktivitesi üzerine etkisi. ‘*’ istatistiksel olarak farklılıkları simgeler ($p < 0.05$).

3.2.4 APX enzim aktivitesi

Selenyum uygulanan gruplar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında 10µM selenat ve 30µM selenit gruplarında sırasıyla % 14.82 ve % 11.42 oranında azalma gözlenirken, 30µM selenat ve 10µM selenit gruplarında ise sırasıyla % 5.13 ve % 19.07 oranında artış gözlenmiştir.

Selenyum uygulanan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında selenat konsantrasyonu 30µM yükseltildiğinde 10µM selenata oranla % 21.77 artış gözlenirken, selenit konsantrasyonu 30µM yükseltildiğinde ise 10µM selenite oranla % 25.6 artış gözlemlenmiştir (şekil 3.10).

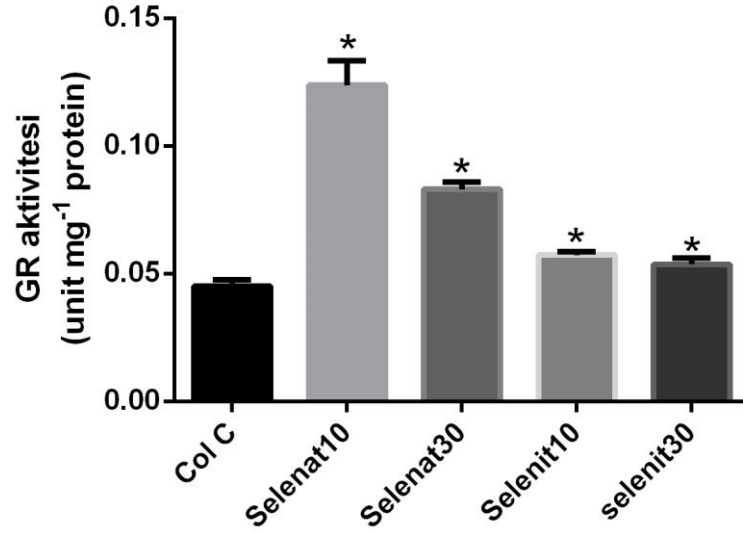


Şekil 3.10 Selenyum uygulamasının *Arabidopsis thaliana col.* sürgünlerinde CAT enzimi aktivitesi üzerine etkisi. ‘*’ istatistiksel olarak farklılıkları simgeler ($p < 0.05$).

3.2.5 GR enzim aktivitesi

Selenyum uygulanan gruplar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında 10µM selenat, 30µM selenat, 10µM selenit ve 30µM selenit gruplarında sırasıyla % 184.89, % 85.66, % 26.83 ve % 19.01 oranında artış gözlenmiştir.

Selenyum uygulanan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında 30µM selenat konsantrasyonu 10µM selenata oranla % 34,83 azalma gözlenirken, 10µM selenit konsantrasyonu 30µM yükseltildiğinde ise % 6,16 azalma gözlemlenmiştir (şekil 3.10).

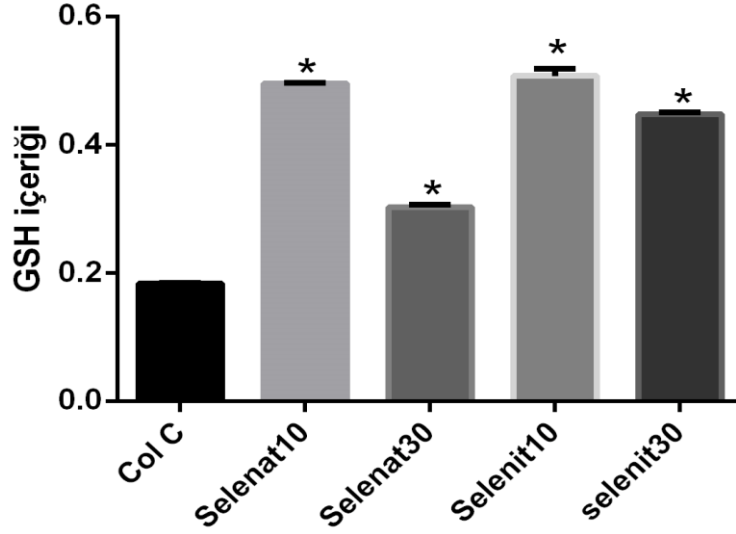


Şekil 3.11 Selenyum uygulamasının *Arabidopsis thaliana col.* sürgünlerinde GR enzimi aktivitesi üzerine etkisi. ‘*’ istatistiksel olarak farklılıkları simgeler ($p < 0.05$).

3.2.6 GSH miktarı

Selenyum uygulanan gruplar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında 10µM selenat, 30µM selenat, 10µM selenit ve 30µM selenit gruplarında sırasıyla % 169.77, % 65.57, % 180.06 ve % 142.58 oranında artış gözlenmiştir.

Selenyum uygulanan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında 30µM selenat konsantrasyonu 10µM selenata oranla % 38.63 azalma gözlenirken, 10µM selenit konsantrasyonu 30µM yükseltildiğinde ise % 13.38 azalma gözlemlenmiştir (şekil 3.11).

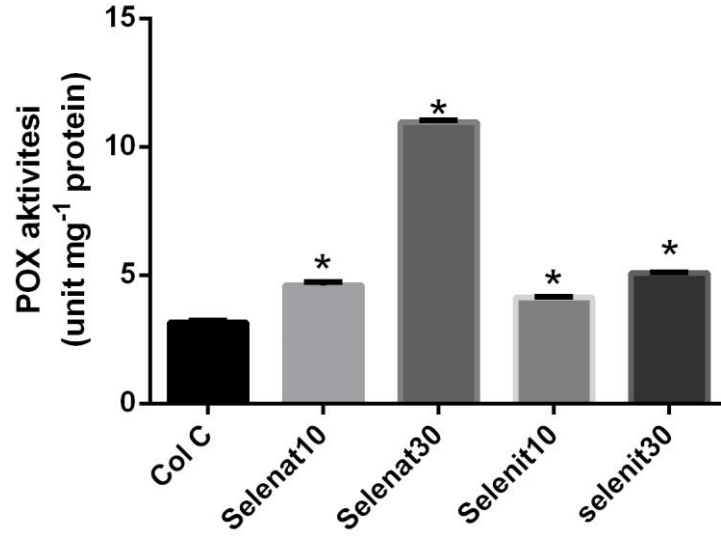


Şekil 3.12 Selenyum uygulamasının *Arabidopsis thaliana col.* sürgünlerinde GSH miktarı üzerine etkisi. ‘*’ istatistiksel olarak farklılıkları simgeler ($p < 0.05$).

3.2.7 POX enzim aktivitesi

Selenyum uygulanan gruplar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında 10 μ M selenat, 30 μ M selenat, 10 μ M selenit ve 30 μ M selenit gruplarında sırasıyla % 46.06, % 240.52, % 30.71 ve % 61.54 oranında artış gözlenmiştir.

Selenyum uygulanan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında 30 μ M selenat konsantrasyonu 10 μ M selenata oranla % 137.93 artma gözlenirken, 10 μ M selenit konsantrasyonu 30 μ M yükseltildiğinde ise % 23.58 artma gözlemlenmiştir (şekil 3.12).

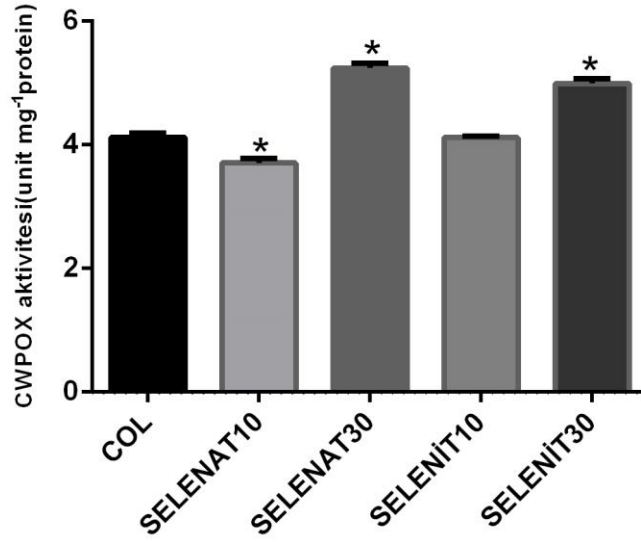


Şekil 3.13 Selenyum uygulamasının *Arabidopsis thaliana col.* sürgünlerinde POX enzim aktivitesi üzerine etkisi. ‘*’ istatistiksel olarak farklılıkları simgeler ($p<0.05$).

3.2.8 Hücre duvarı POX enzim aktivitesi

Selenyum uygulanan gruplar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında 10 μ M selenat ve 10 μ M selenit sırasıyla % 10.77 ve % 0.93 oranında azalma gözlenirken 30 μ M selenat ve 30 μ M selenit gruplarında sırasıyla % 29.8 ve % 85.94 oranında artış gözlenmiştir.

Selenat ve selenit konsantrasyonunda meydana gelen artış hücre duvarı POX enzim aktivitesini belirgin oranda arttırmıştır. 30 μ M selenit uygulaması CWPOX’ u % 21,24 arttırırken selenat uygulaması % 41,39 arttırmıştır (şekil 3.13).

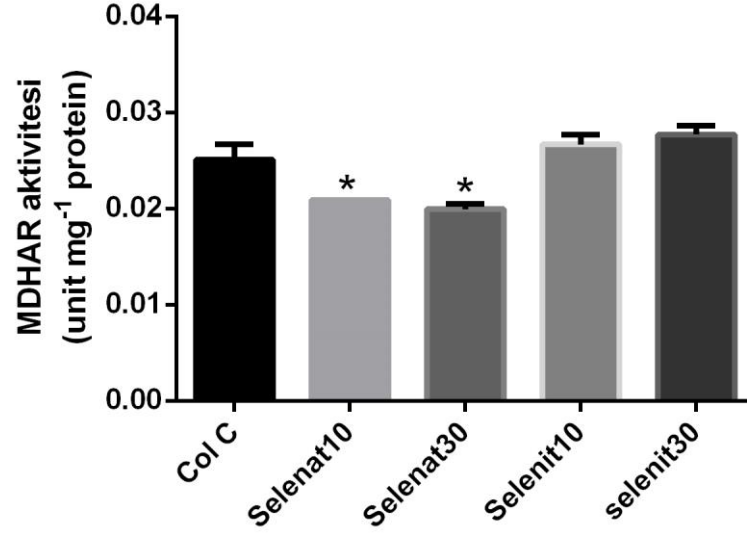


Şekil 3.14 Selenyum uygulamasının *Arabidopsis thaliana col.* sürgünlerinde hücre duvarı POX enzim aktivitesi üzerine etkisi. ‘*’ istatistiksel olarak farklılıkları simgeler ($p < 0.05$).

3.2.9. MDHAR enzim aktivitesi

Selenyum uygulanan gruplar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında SOD enzim aktivitesinde 10 μ M selenat, 30 μ M selenat, ve 30 μ M selenit gruplarında sırasıyla % 16.68, % 20.56 ve % 10.30 oranında artış gözlenmiş, 10 μ M selenit grubunda ise kontrole oranla belirgin bir değişim gözlenmemiştir.

Selenyum uygulanan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında 30 μ M selenat konsantrasyonu 10 μ M selenata oranla % 4.65 artma gözlenirken, 10 μ M selenit konsantrasyonu 30 μ M yükseltildiğinde ise % 3.81’ luk bir azalma gözlemlenmiştir (şekil 3.15).



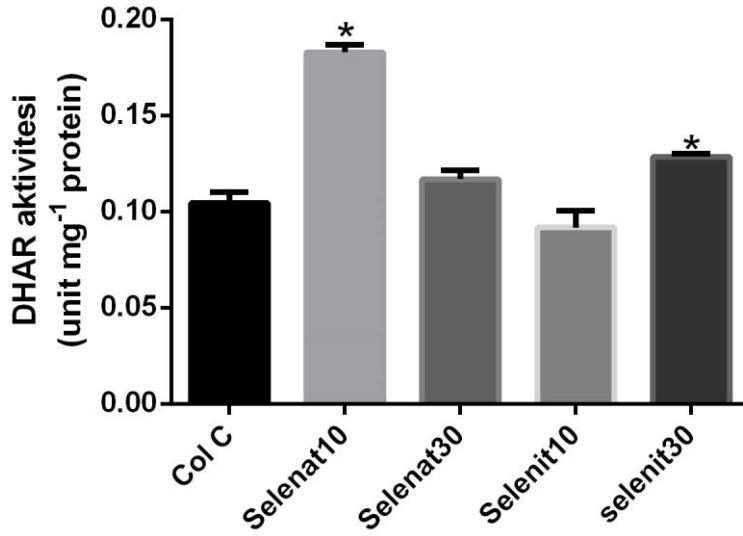
Şekil 3.15 Selenyum uygulamasının *Arabidopsis thaliana col.* sürgünlerinde MDHAR enzim aktivitesi üzerine etkisi. ‘*’ istatistiksel olarak farklılıkları simgeler ($p < 0.05$).

3.2.10 DHAR enzim aktivitesi

Selenyum uygulanan gruplar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında SOD enzim aktivitesinde 10 μ M selenat ve 30 μ M selenit gruplarında sırasıyla % 66.92 ve % 16.43 oranında artış, 10 μ M selenit grubunda % 16.24 azalma gözlenmiştir. 30 μ M selenat grubunda ise anlamlı oranda değişim görülmemiştir.

Selenyum uygulanan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında 30 μ M selenat konsantrasyonu 10 μ M selenata oranla % 36.04 azalma gözlenirken, 10 μ M selenit konsantrasyonu 30 μ M yükseltildiğinde ise %

30.09' luk bir artma gözlemlenmiştir (şekil 3.15).

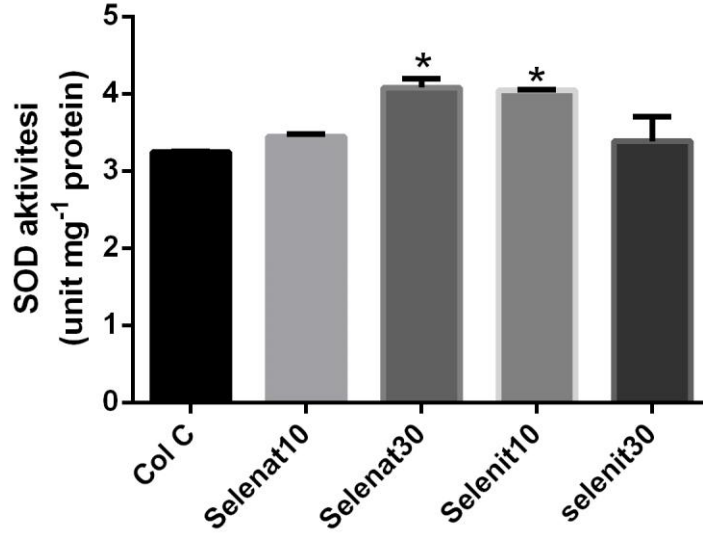


Şekil 3.16 Selenyum uygulamasının *Arabidopsis thaliana col.* sürgünlerinde DHAR enzim aktivitesi üzerine etkisi. ‘*’ istatistiksel olarak farklılıkları simgeler ($p < 0.05$).

3.2.11 SOD izoenzim tayini

Selenyum uygulanan gruplar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında SOD enzim aktivitesinde 10 μ M selenat, 30 μ M selenat, 10 μ M selenit ve 30 μ M selenit gruplarında sırasıyla % 6.20, % 25.74, % 24.58 ve % 12.01 oranında artış gözlenmiştir.

Selenyum uygulanan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında 30 μ M selenat, 10 μ M’ a göre % 18.4 arttırırken, 10 μ M selenit 30 μ M’ a göre SOD aktivitesinde % 10.09’ luk bir azalmaya neden olmuştur (şekil 3.15).

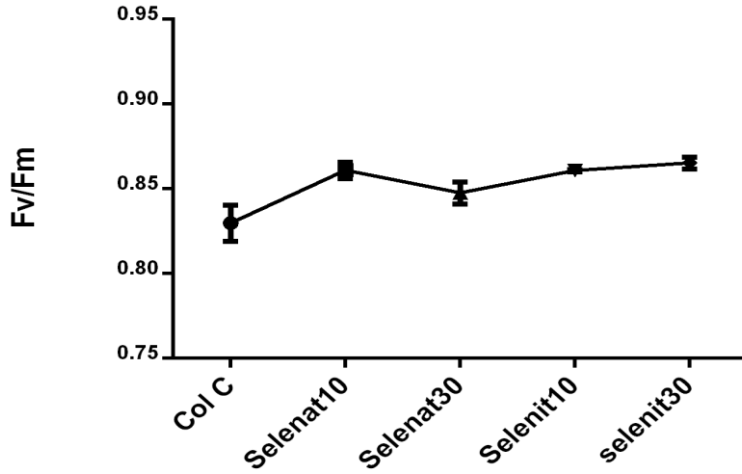


Şekil 3.17 Selenyum uygulamasının *Arabidopsis thaliana* Col. sürgünlerinde SOD enzim aktivitesi üzerine etkisi. ‘*’ istatistiksel olarak farklılıkları simgeler ($p < 0.05$).

Klorofil Floresans

Selenyum uygulanan gruplar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında PSII maksimal kuantum veriminde 10 μ M selenat, 30 μ M selenat, 10 μ M selenit ve 30 μ M selenit gruplarında sırasıyla % 3, % 0.4, % 2.64 ve % 3.18 oranında artış gözlenmiştir.

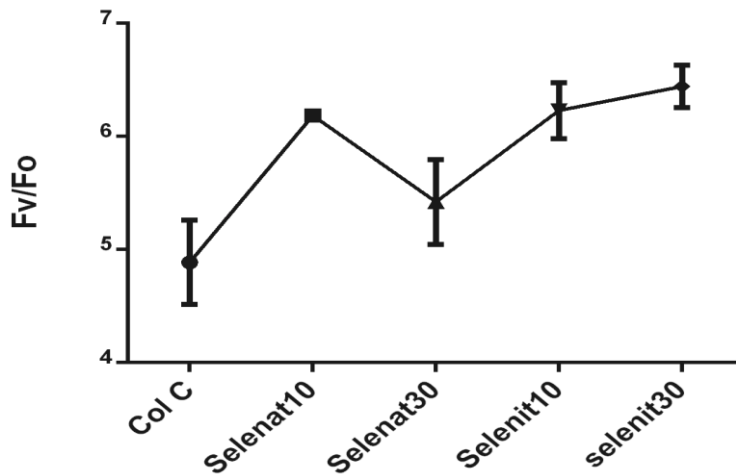
Selenyum uygulanan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında 30 μ M selenat konsantrasyonu 10 μ M selenata oranla % 2.53 azalmıştır. Selenit uygulamasının klorofil floresansı üzerinde herhangi bir etkisi gözlenmemiştir (şekil 3.12).



Şekil 3.18 Selenyum uygulamasının *Arabidopsis thaliana col.* gövdelerindeki PSII maksimal kuantum verimi (Fv/Fm) üzerine etkisi.

Selenyum uygulanan gruplar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında potansiyel fotosentez kapasitesinde 10µM selenat, 30µM selenat, 10µM selenit ve 30µM selenit gruplarında sırasıyla % 18.8, % 3.42, % 17.95 ve % 22.86 oranında artış gözlenmiştir.

Selenyum uygulanan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında 30µM selenat, 10µM selenata göre fotosentez verimini % 12,94 azaltırken, 10µM selenit konsantrasyonu 30µM' a göre % 4.17 artmıştır (şekil 3.18).



Şekil 3.19 Selenyum uygulamasının *Arabidopsis thaliana col.* gövdelerindeki potansiyel fotosentez kapasitesi (Fv/Fo) üzerine etkisi

4. TARTIŞMA

Bitkilerin Se bakımından içeriğinin arttırılması büyüme, antioksidan kapasitesi ve stres toleransı üzerinde olumlu etkileri olsada (Hartikainen 2005), Se hala yüksek bitkiler için esansiyel mikro element olarak tanımlanmamıştır (Seppanen et al. 2010). Bu çalışmada selenat ve selenit farklı konsantrasyonlarda *Arabidopsis thaliana* Col. ekotipine uygulanarak büyüme, fotosentetik seviyeleri, antioksidan enzim aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Çalışmamız daha önce yapılan farklı selenyum formları ve konsantrasyonlarında ortaya çıkan sonuçlarla (Feng et al. 2013) uyumludur ki selenyum farklı formlarda ve farklı konsantrasyonlarda uygulandığında bitki de ikili etki gösterebilmektedir.

Arabidopsis hızlı yaşam döngüsüne sahip ve kontrollü koşullar altında kolayca büyütülebilen model bir bitki olarak bilim dünyasında yaygınca kullanılmaktadır. Çalışmamızda bitkiler için yararlı bir mikro nutrient olduğuna inanılan selenyum uygulaması ile i) antioksidan savunma sistemi ve ii) fotosentez sistemi üzerinde oluşturacağı değişimler *Arabidopsis thaliana* da incelenmiştir.

Selenyum uygulanan marul (Hawrylak-Nowak, 2013) fidelerinde selenit için 15 μM ve selenat için 20 μM eşliğinden sonra gövde yaş ağırlığında azalma gözlenmiştir. Ayrıca salatalıkla yapılan başka bir çalışmada 80 μM ve 20 μM selenat ve selenit uygulaması bitki ağırlığında belirgin değişikliklere neden olmuştur (Hawrylak-Nowak 2015). Çalışmamızda kontrol ve selenyum grupları arasında karşılaştırma yapıldığında 10 μM selenat ve 10 μM selenit konsantrasyonun bitkiye yarar sağlayarak büyümeyi teşvik ederken, 30 μM selenatta toksik etki yaratması sonucunda büyümenin engellendiği, 30 μM selenit grubunda ise belirgin farkın olmadığı görülmüştür.

Bitkilerdeki nisbi su içeriği (RWC) çevresel koşullara bağlı olarak değişen ve bitkinin içinde bulunduğu durumun fizyolojik kapasitesini gösteren önemli parametrelerdendir. Rios et al. (2009) marul türüyle yaptığı denemedeki kadar belirgin olmasada 10 μM selenat uygulanan deney grubunda bir artış, 30 μM selenat grubunda ise azalma gözlenmiştir. Selenit gruplarında ise gözlenebilir bir farklılık oluşmamıştır. Sonuç olarak selenit ve özellikle düşük konsantrasyondaki selenatın bitkinin su durumunu koruduğunu göstermektedir.

Selenyumun faydalı ve ya toksik etki yarattığı konsantrasyon skalasının oldukça dar olması bitki uygulamasında karşılaşılan genel zorluklardan biridir.

Çalışmamızda düşük konsantrasyonda uygulandığında stres etkilerini azalttığı ve antioksidan savunma mekanizmasını uyardığı için H_2O_2 ve TBARS miktarlarında azalma gözlenirken, yüksek konsantrasyonlarda uygulandığında artan ROS' un süpürülmesindeki denge sağlanamadığı için artış gözlenir. Feng et al. (2013) salata fideleriyle yaptığı çalışmadakine benzer şekilde selenat ve selenitin indirgenme basamaklarındaki farklılıklarından dolayı selenatta nispeten daha az H_2O_2 ve TBARS birikimi gösterir.

Ming Diao et al. (2014) domates fideleriyle yaptıkları çalışmada selenit grubundaki APOX aktivitesi yükselişinde olduğu gibi 10 μM selenit uygulanan gruplarda APOX aktivitesi artırılmıştır. H_2O_2 ve TBARS oranının da yüksek olmayışı 10 μM selenitin bitkide toksik etki yaratmadığını işaret etmektedir. 10 μM selenat grubunda H_2O_2 miktarıyla doğru orantılı olarak kontrol grubundan düşüktür. 30 μM selenat ve 30 μM selenit gruplarında APOX oranı düşüktür, bu da H_2O_2 ' in süpürülmesi için farklı enzimlerin tercih edilmiş olabileceğini işaret etmektedir.

30 μM selenat grubunda CAT aktivitesi en yüksek düzeydedir. Bu durum Malik et al. (2012) tarafından selenatın stres yarattığı durumlarda yüksek H_2O_2 miktarının süpürülmesi için öncelikle APX ve CAT' ı, özellikle de CAT' ı tercih ettiğini gösterdiği çalışmayla desteklenmektedir. 10 μM selenit en düşük CAT enzim aktivitesi gösteren gruptur, bu durum selenit indirgenmesinin plastidlerde başlamasından ve bu yüzden öncelikli olarak APX' i tercih etmesinden kaynaklanıyor olabilir. 10 μM selenat ve 30 μM selenit grubunda da kontrol grubuna oranla artış gözlenmiştir.

Aşırı ROS' un etkisizleştirilmesinde diğer bir durum da, AsA ve GSH' ın indirgeyici gücünü sağlamaktır (Mittler, 2002). Bunun için de yüksek oranda GR aktivitesi gereklidir. Çünkü Se, organik selenyum bileşiklerinin sentezlenmesinde gerekli olan GSH oranını artırır. Bunu bazen GR aktivitesini artırarak sağlarken bazen de doğrudan GSH oranına etki ederek gerçekleştirir (Hasanuuzaman and Fujita, 2011). GSH genel olarak sülfat taşınımının regülasyonunda, sinyal transdüksiyonunda, stres koruma genlerinin ekspresyonun düzenlenmesinde, tiyol gruplarının korunumu ve hücre redoks dengesinde rol oynayan bir tripeptit bileşiktir. Se indirgenmesinde de proteinlerin yapısına katılarak uçucu forma dönüşümünde önemli görev üstlenir. ROS oluşumu da bu indirgenme basamağı sırasında gerçekleşir (Terry et al. 2000). Fakat GSH dengesinin sağlanamadığı ve ya GSH oranı yükseldikten sonra total S, -SH seviyeleri arasındaki oranın

korunamadığı durumlarda ROS birikimi hızlanabilir. Ya da GSH miktarına bağlı olarak fazla üretilen selenosisteinler proteinlerin yapısına geliş güzel katılarak stresi arttırabilir (Mroczek-Zdyraka and Wojcik, 2011). Bu bağlamda çalışmamızda düşük konsantrasyon selenyum uygulaması olan 10µM selenat ve 10 µM selenit grubunda GSH oranının gruplar arasında en yüksek seviyede olması bitkiye optimal düzeyde yarar sağladığını ve bu yüksek GSH oranının artan GR enzim aktivitesiyle ilişkili olduğu görülürken, 30µM selenyum gruplarında nispeten daha az artış olmuştur.

Kloroplastlarda CAT enzimi olmadığından buradaki artan H₂O₂ miktarları POX tarafından detoksifiye edilerek tiyol düzenleyicisi olan enzimlerin korunmasını sağlar (Noctor and Foyer, 1998). Bitkiye düşük dozajlarda Se uygulaması yapıldığında diğer antioksidanlarda olduğu gibi POX enzimi tarafından da H₂O₂ süpürümü gerçekleştirilir (Feng and Wei, 2015). Bizim çalışmamızda da selenyum uygulanan tüm gruplarda POX enzim aktivitesi yükselmiştir. En fazla artışın 30 µM selenat grubunda ortaya çıkmasının nedeni hücre duvarı POX enzim aktivitesinin en yüksek olmasından kaynaklanıyor olabilir. Aynı durum bir sonraki yüksek grup 30 µM selenit grubu içinde geçerlidir. 10 µM selenat ve selenit uygulanan gruplarda POX aktivitesindeki artışı düşük HD POX aktivitesi ve H₂O₂ miktarıyla değerlendirecek olursak bu dozajdaki uygulamanın bitkiyi olumlu etkilediğini görmüş oluruz.

Organik Se bileşiklerini arttırmak için Se' nin GSH içeriğini arttırmasına paralel olarak GR gibi DHAR, MDHAR aktivitesinin de artmasını bekleriz. Hasanuzzaman and Fujita (2011), kuraklık stresine maruz kalmış kolza fidelerine Se uyguladıklarında bu doğrultuda sonuçlar elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızda DHAR ve MDHAR aktivitelerindeki artış GSH oranıyla uyuşsa da 10 µM selenit grubundaki yüksek GSH oranına paralel DHAR artışı görülmemiştir. Bu sonucun GSH' ın direk olarak selenit indirgenmesine katılmasından ve ya GPX enzimi tarafından kullanılmış olmasından kaynaklanması muhtemeldir.

ROS üretilmesi ve süpürülmesi arasındaki denge antioksidanlar tarafından iyi kontrol edilmelidir. Bir antioksidan enzimin aktivitesinin artışı bir diğer antioksidan enzime gereksinimi düşürebilir. Örneğin GPX enzimi ile kendiliğinden O₂⁻ indirgenmesi gerçekleştirildiğinde, SOD enzimine olan gereklilik azalmıştır. Kolza fideleriyle yapılan çalışma da genç yapraklara selenyum uygulaması yapıldığında SOD aktivitesinde düşüş gözlenmiştir (Hartikainen et al., 2000). Feng and Wei (2012) *Pteris vittata* L. ile yaptıkları

çalışmada düşük dozajda Se uygulamasının SOD aktivitesinde azalmaya sebep olduğu gözlenirken, daha yüksek dozajda uygulandığında enzim aktivitesinde artış olmuştur. Selenat gruplarında indirgenmenin sitoplazlamada başlamasından kaynaklı kloroplast ve sitosolde bulunan Cu/Zn SOD enzimi daha yüksek oranda bulunurken, selenit gruplarında ise indirgenmenin plastidlerde başlamasından dolayı Fe-SOD enzimi miktarı diğer SOD' lara oranla daha yüksektir . Total SOD miktarına bakıldığında en yüksek oran 30 μ M Se uygulaması gruplarında 10 μ M Se gruplarına oranla artış göstermiştir.

Klorofil floresansı öncül sinyallerin kararında olarak aktif ve pasif metodlarla kullanılabilinmektedir (Murchie and Lawson, 2013). Örneğin Fo, Fm, Fv, Fv/Fm ve Fv/Fo değerleri öncül PSII fotokimyasal parametrelerdir ve çevresel stresin etkilerinin teşhisinde kullanılabilirler (Zhu et al., 2010). *Oryza sativa* ile yapılan bir çalışmada farklı konsantrasyonlarda selenit uygulaması yapıldığında 50 μ M ' den sonra Fm/Fv ve Fm/Fo oranında düşüş gözlenmeye başlanmıştır (Zhang et al., 2014). Nitekim bunu destekler şekilde bizim çalışmamızda da selenit gruplarında 30 μ M' da bu oran artmıştır. Selenat grubunda ise durum tam tersidir. Bu sonuçlar uygun dozajlarda selenyum uygulamasının aktif bir proses olduğunu ve fotosentetik aparatı koruyabileceğini işaret etmektedir.

Önceki çalışmalarda Fv/Fm oranının 0.8' den düşük olduğu durumlarda PSII etkinliği olumsuz yönde değişmiş demektir (De Faria et al., 2013). Fv/Fm ve Fm' deki ani düşüşler açık PSII merkezinin maksimum kuantum verimindeki azalmanın yanında yapraklardaki fotoinhibisyonu işaret ederken, Fo' daki artış PSII aktivitesinin down regüle edildiğini işaret etmektedir.

5.SONUÇLAR

Uygun dozajlarda kullanıldığında bitki büyümesini teşvik eden bir bileşik olarak çalışmamızda selenyumun iki farklı organik formunun uygulaması yapıp fotosentez ve antioksidan metabolizma üzerinde meydana getirdiği değişiklikler çalışılmıştır.

Bu çalışmaya göre 10 μ M selenat ve selenit uygulamasının fotosentetik sistemi ve antioksidan sistemi olumlu şekilde etkilendiği artan ROS süpürücü enzimlerin bitki büyümesini teşvik etmesinden kaynaklandığı gözlenirken, 30 μ M selenat ve selenit uygulamalarında antioksidan metabolizmada selenit grubunun selenata oranla daha düşük toksisite eşik değerine sahip olduğu; fotosentez mekanizmasında ise her iki grubunda iyileştirici etkisinin olduğu fakat selenit grubunda bu etkinin daha belirgin olduğu gözlenmiştir. Her iki konsantrasyon uygulamasında da gerek stresi savuşturmak gerek büyümeyi teşvik etmesi için özellikle Gr, GSH, POX aktivitelerinde değişik oranlarda artış görülmüştür. Diğer antioksidan enzim aktivitelerindeki artışlar ise uygulanan inorganik bileşik türüne ve konsantrasyonuna göre değişiklik göstermiştir.

Bu çalışmada etki skalası oldukça dar olan selenyum bileşiğinin farklı konsantrasyonlarının *Arabidopsis thaliana*'nın fotosentez ve antioksidan savunma sistemlerinde meydana getirdiği değişimler araştırılmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Asada, K.**, 2006, Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions, *Plant Physiol.*, 141(2):391-396pp.
- Belokobylsky, A.I., Ginturi, E.I., Kuchava, N.E., Kirkesali, E.I., Mosulishvili, L.M., Frontasyeva, M.V., Pavlov, S.S. and Aksenova, N.G.**, 2004, Accumulation of selenium and chromium in the growth dynamics of *Spirulina platensis*, *J. Radioanal. Nucl. Ch.*, 259(1):65-68pp.
- Belzile, N., Wu, G.J., Chen, Y.M. and Appanna, V.D.**, 2006, Detoxification of selenite and mercury by reduction and mutual protection in the assimilation of both elements by *Pseudomonas fluorescens*, *Sci. Total Environ.*, 367(2-3):704-714pp.
- Bluemlein, K., Klimm, E., Raab, A. and Feldmann, J.**, 2009, Selenite enhances arsenate toxicity in *Thunbergia alata*, *Environ. Chem.*, 6(6): 486-494pp.
- Broadley et al.**, 2010, Selenium biofortification of high-yielding winter wheat (*Triticum aestivum* L.) by liquid or granular Se fertilisation, *Plant Soil*, 332: 5-18pp.
- Cartes, P., Jara, A.A., Pinilla, L., Rosas, A. and Mora, M.L.**, 2010, Selenium improves the antioxidant ability against aluminium-induced oxidative stress in ryegrass roots, *Ann. Appl. Biol.*, 156(2): 297-307pp.
- Chen, L.C., Yang, F.M., Xu, J., Hu, Y., Hu, Q.H., Zhang, Y.L. and Pan, G.X.**, 2002, Determination of selenium concentration of rice in china and effect of fertilization of selenite and selenate on selenium content of rice, *J. Agric. Food Chem.*, 50(18):10 5128-5130pp.
- Chu, J.Z., Yao, X.Q. and Zhang, Z.N.**, 2010, Responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under cold stress, *Biol. Trace Elem. Res.*, 136(3):355-363pp.
- Cox, D.N. and Bastiaans, K.**, 2007, Understanding Australian consumers' perceptions of selenium and motivations to consume selenium enriched foods, *Food Qual. Prefer.*, 18(1):66-76pp.
- Djanaguiraman, M., Devi, D.D., Shanker, A.K., Sheeba, J.A. and Bangarusamy, U.**, 2005, Selenium – an antioxidative protectant in soybean during senescence, *Plant Soil*, 272:77-86pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Djanaguiraman, M., Prasad, P.V.V. and Seppänen, M.,** 2010, Selenium protects sorghum leaves from oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defense system, *Plant Physiol. Bioch.*, 48(12):999-1007pp.
- Ebbs, S. and Weinstein, L.,** 2001, Alteration of selenium transport and volatilization in barley (*Hordeum vulgare*) by arsenic, *J. Plant Physiol.*, 158:1231-1233pp.
- Fargašová, A., Pastierová, J. and Svetková, K.,** 2006, Effect of Se-metal pair combinations (Cd, Zn, Cu, Pb) on photosynthetic pigments production and metal accumulation in *Sinapis alba* L. seedlings, *Plant Soil Environ.*, 52:8-15pp.
- Feng, R.W. and Wei, C.Y.,** 2012, Antioxidative mechanisms on selenium accumulation in *Pteris vittata* L., a potential selenium phytoremediation plant, *Plant Soil Environ.*, 58(3):105-110pp.
- Feng, R.W., Wei, C.Y, Tu, S.X. and Sun, X.,** 2009a, Interactive effects of selenium and arsenic on their uptake by *Pteris vittata* L. under hydroponic conditions, *Environ. Exp. Bot.*, 65(2-3): 363-368pp.
- Feng, R.W., Wei, C.Y, Tu, S.X., Tang, S.R. and Wu, F.C.,** 2011, Detoxification of antimony by selenium and their interaction in paddy rice under hydroponic conditions. *Microchem. J.* 97(1): 57-61pp.
- Feng, R.W., Wei, C.Y, Tu, S.X. and Wu, F.C.,** 2009b, Effects of Se on the essential elements uptake in *Pteris vittata* L., *Plant Soil*, 325(1-2):123-132pp.
- Filek, M., Gzyl-Malcher, B., Zembala, M., Bednarska, E., Laggner, P. and Kriechbaum, M.,** 2010, Effect of selenium on characteristics of rape chloroplasts modified by cadmium, *J. Plant Physiol.*, 167(1):28-33pp.
- Filek, M., Keskinen, R., Hartikainen, H., Szarejko, I., Janiak, A., Miszalski, Z. and Golda, A.,** 2008, The protective role of selenium in rape seedlings subjected to cadmium stress, *J. Plant Physiol.*, 165(8):833-844pp.
- Filek, M., Zembala, M., Hartikainen, H., Miszalski, Z., Kornaś, A., Wietecha-Posłuszny, R. and Walas, P.,** 2009, Changes in wheat plastid membrane properties induced by cadmium and selenium in presence/absence of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid, *Plant Cell, Tiss. Org.*, 96(1):19-28pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Freeman, J.L., Tamaoki, M., Stushnoff, C., Quinn, C.F., Cappa, J.J., Devonshire, J., Fakra, S.C., Marcus, M.A., McGrath, S.P., Hoewyk, D.V. and Pilon-Smits, E.A.H., 2010**, Molecular mechanisms of selenium tolerance and hyperaccumulation in *Stanleya pinnata*, *Plant Physiol.* 153(4): 1630-52pp.
- Gailer, J., 2007**, Arsenic-selenium and mercury-selenium bonds in biology, *Coordin. Chem. Rev.* 251(1-2): 234-254pp.
- Gailer, J., 2009**, Chronic toxicity of AsIII in mammals: the role of (GS)₂AsSe-, *Biochimie* 91(10): 1268-1272pp.
- Garifullina, G.F., Owen, J.D., Lindblom S., Tufan, H., Pilon, M., Pilon-Smits and E.A.H., 2003**, Expression of a mouse selenocysteine lyase in *Brassica juncea* chloroplasts affects selenium tolerance and accumulation, *Physiol. Plantarum* 118(4): 538-544pp.
- Hartikainen, H., Xue, T.L. and Piironen, V., 2000**, Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass, *Plant Soil*, 225: 193-200pp.
- Hasanuzzaman, M. and Fujita, M., 2011**, Selenium pretreatment upregulates the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system and confers enhanced tolerance to drought stress in rapeseed seedlings, *Biol. Trace Elem. Res.*, 143:1758–1776pp.
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M.A. and Fujita, M., 2011**, Selenium-induced up-regulation of the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system reduces salinity-induced damage in rapeseed seedlings, *Biol. Trace Elem. Res.*, 143:1704–1721pp.
- Hawrylak-Nowak, B., 2009**, Beneficial effects of exogenous selenium in cucumber seedlings subjected to salt stress, *Biol. Trace Elem. Res.*, 132(1): 259-269pp.
- He, P.P., Lv, X.Z. and Wang, G.Y., 2004**, Effects of Se and Zn supplementation on the antagonism against Pb and Cd in vegetables, *Environ. Int.*, 30: 167-172pp.
- Khattak, R.A., Page, A.L., Parker, D.R. and Bakhtar, D., 1991**, Accumulation and interactions of arsenic, selenium, molybdenum and phosphorus in Alfalfa, *J. Environ. Qual.*, 20: 165–168pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Kramer, G.F., Ames, B.N.,** 1988., Mechanisms of mutagenicity and toxicity of sodiumselenite (Na₂SeO₃) in *Salmonella typhimurium*, *Mutat. Res.*, 201(1): 169–180pp.
- Kumar, M., Bijo, A. J., Baghel, R. S., Reddy, C. R. K., and Jha, B.,** 2012., Selenium and spermine alleviate cadmium induced toxicity in the red seaweed *Gracilaria dura* by regulating antioxidants and DNA methylation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 51, 129-138pp.
- Łabanowska, M., Filek, M., Kościelniak, J., Kurdziel, M., Kuliś, E. and Hartikainen, H.,** 2012., The effects of short-term selenium stress on Polish and Finnish wheat seedlings—EPR, enzymatic and fluorescence studies, *J. Plant Physiol.*, 169: 275–284pp.
- Landberg, T. and Greger, M.,** 1994., Influence of selenium on uptake and toxicity of copper and cadmium in pea (*Pisum sativum*) and wheat (*Triticum aestivum*), *Physiol. Plantarum*, 90(4): 637-644pp.
- Lu, S.C.,** 1999, Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies, *The FASEB J.*, 13(10): 1169-1183pp.
- Malik, J.A., Goel, S., Kaur, N., Sharma, S., Singh, I. and Nayyar, H.,** 2012., Selenium antagonises the toxic effects of arsenic on mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) plants by restricting its uptake and enhancing the antioxidative and detoxification mechanisms, *Environ. Exp. Botany.*, 77: 242-248pp.
- Meharg, A.A. and Hartley-Whitaker, J.,** 2002., Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species, *New Phytol.*, 154 (1): 29-43pp.
- Mittler, R.,** 2002, Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, 7(9): 405-410pp.
- Mroczek-Zdyrska, M. and Wójcik, M.,** 2011, The influence of selenium on root growth and oxidative stress induced by lead in *vicia faba* L. minor plants. *Biol. Trace Elem. Res.*, DOI 10.1007/s12011-011-9292-6pp.
- Paciolla, C., De Leonardis, S., Dipierro, S.,** 2011. Effects of selenite and selenate on the antioxidant systems in *Senecio scandens* L. *Plant Biosyst.* 145(1): 253-259pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Pedrero, Z., Madrid, Y., Hartikainen, H. and Cámara, C.,** 2008, Protective effect of selenium in broccoli (*Brassica oleracea*) plants subjected to cadmium exposure, *J. Agric. Food Chem.*, 56(1): 266-271pp.
- Pezzarossa, B., Remorini, D., Gentile, M. L and Massai, R.,** 2012, Effects of foliar and fruit addition of sodium selenate on selenium accumulation and fruit quality, *J. Sci. Food Agric.*, 92: 781 – 786pp.
- Pilon, M., Owen, J.D., Garifullina, G.F., Kurihara, T., Mihara, H., Esaki, N., and Pilon-smits, E.A.H.,** 2003, Enhanced selenium tolerance and accumulation in transgenic *Arabidopsis* expressing a mouse selenocysteine lyase, *Plant Physiol.*, 131(3): 1250-1257pp.
- Pukacka, S., Ratajczak, E. and Kalemba, E.,** 2011, The protective role of selenium in recalcitrant *Acer saccharium* L. seeds subjected to desiccation. *J. Plant Physiol.*, 168(3): 220-225pp.
- Raven, J.A., Evans, M.C.W. and Korb, R.E.,** 1999, The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms, *Photosynth. Res.*, 60(2): 111-150pp.
- Schwarz, K. and Foltz, C.M.,** 1957, Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration, *J. Am. Chem. Soc.*, 70: 3292-3293pp.
- Seppänen, M., Turakainen, M. and Hartikainen, H.,** 2003, Selenium effects on oxidative stress in potato, *Plant Sci.*, 165: 311-319pp.
- Shanker, K., Mishra, S., Srivastava, S., Srivastava, R., Daas, S., Prakash, S. and Srivastava, M.M.,** 1996a, Effect of selenite and selenate on plant uptake and translocation of mercury by tomato (*Lycopersicum esculentum*), *Plant soil*, 183(2): 233-238pp.
- Shanker, K., Mishra, S., Srivastava, S., Srivastava, R., Daas, S., Prakash, S. and Srivastava, M.M.,** 1996b, Effect of selenite and selenate on plant uptake of cadmium by maize (*Zea mays*), *B. Environ. Contam. Tox.*, 56(3): 419-424pp.
- Shanker, K., Mishra, S., Srivastava, S., Srivastava, R., Daas, S., Prakash, S. and Srivastava, M.M.,** 1996c, Study of mercury-selenium (Hg---Se) interactions and their impact on Hg uptake by the radish (*Raphanus sativus*) plant, *Food Chem. Toxicol.*, 34(9): 883-886pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Shanker, K., Mishra, S., Srivastava, S., Srivastava, R., Daas, S., Prakash, S., Srivastava, M.M., 1995.** Effect of selenite and selenate on plant uptake of cadmium by kidney bean (*Phaseolus mungo*) with reference to Cd-Se interaction. *Chem. Spec. Bioavailab.* 7(3): 97-100pp.
- Shtangeeva, I., Bali, R. and Harris, A., 2011,** Bioavailability and toxicity of antimony, *J. Geochem. Explor.*, 110:40-45pp.
- Srivastava, M., Ma, L.Q., Rathinasabapathi, B. and Srivastava, P., 2009,** Effects of selenium on arsenic uptake in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L., *Bioresource Technol.*, 100(3):1115-1121pp.
- Srivastava, S., Shanker, K., Srivastava, S., Shrivastav, R., Das, S., Prakash, S. and Srivastava, M.M., 1998,** Effect of selenium supplementation on the uptake and translocation of chromium by spinach (*Spinacea oleracea*), *B. Environ. Contam. Tox.*, 60(5):750-758pp.
- Sun, H.W., Ha J., Liang, S.X. and Kang, W.J., 2010,** Protective role of selenium on garlic growth under cadmium stress, *Commun. Soil Sci. Plan.*, 41(10):1195-1204pp.
- Takeda, T., Ishikawa, T. and Shigeoka, S., 1997,** Metabolism of hydrogen peroxide by the scavenging system in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Physiol. Plant*, 99:49-55pp.
- Tamaoki, M., Freeman, J.L. and Pilon-Smits, E.A.H., 2008,** Cooperative ethylene and jasmonic acid signaling regulates selenite resistance in Arabidopsis, *Plant Physiol.*, 146:1219-1230pp.
- Tapiero, H., Townsend, D.M. and Tew, K.D., 2003,** The antioxidant role of selenium and seleno-compounds, *Biomed. Pharmacother.*, 57(3-4):134-144pp.
- Terry, N. and Abadia, J., 1986,** Function of iron in chloroplasts, *J. Plant Nutr.*, 9(3-7):609-646pp.
- Terry, N., Zayed, A.M., de Souza, M.P. and Tarun, A.S., 2000,** Selenium in higher plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51:401-432pp.
- Thompson, J.E., Legge, R.L. and Barber, R.F., 1987,** The role of free radicals in senescence and wounding, *New Phytol.*, 105(3):317-344pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Van Hoewyk, D., Garifullina, G.F., Ackley, A.R., Abdel-Ghany, S.E., Marcus, M.A., Fakra, S., Ishiyama, K., Inoue, E., Pilon, M., Takahashi and Pilon-Smits, E.A.H.**, 2005, Overexpression of AtCpNifS enhances selenium tolerance and accumulation in Arabidopsis, *Plant Physiol.*, 139(3):1518-1528pp.
- Vítová, M., Bišová, K., Hlavová, M., Zachleder, V., Rucki, M. and Čížková, M.**, 2011, Glutathione peroxidase activity in the selenium-treated alga *Scenedesmus quadricauda*, *Aquat. Toxicol.*, 102(1-2):87-94pp.
- Wang, C.Q.**, 2011, Water-stress mitigation by selenium in *Trifolium repens* L., *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 174(2): 276-282pp.
- Wang, Y.D., Wang, X. and Wong, Y.S.**, 2012, Proteomics analysis reveals multiple regulatory mechanisms in response to selenium in rice, *J. Proteomics*, 75:184-1866pp.
- Xue, T.L., Hartikainen, H. and Piironen, V.**, 2001, Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce, *Plant Soil*, 237:55-61pp.
- Xue, T.L., Hou, S.F., Tan, J.A. and Liu, G.L.**, 1993, The antioxidative function of selenium in higher plants: II. Non-enzymatic mechanisms, *Chinese Sci. Bull.*, 38:356-358pp.
- Yao, X., Chu, J., He, X. and Ba, C.J.**, 2011, Protective role of selenium in wheat seedlings subjected to enhanced UV-B radiation, *Russ. J. Plant Physl.*, 58(2):283-289pp.
- Yao, X.Q., Chu, J.Z. and Ba, C.J.**, 2010a, Antioxidant responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under enhanced ultraviolet-B, *Biol. Trace Elem. Res.*, 136(1):96-105pp.
- Yao, X.Q., Chu, J.Z. and Ba, C.J.**, 2010b, Responses of wheat roots to exogenous selenium supply under enhanced ultraviolet-B, *Biol. Trace Elem. Res.*, 137(2):244-252pp.
- Yao, X.Q., Chu, J.Z. and Wang, G.Y.**, 2009a, Effects of selenium on wheat seedlings under drought stress, *Biol. Trace Elem. Res.*, 130(3):283-290pp.
- Yao, X.Q., Chu, J.Z. and Wang, G.Y.**, 2009b, Effects of drought stress and selenium supply on growth and physiological characteristics of wheat seedlings, *Acta Physiol. Plant.*, 31(5):1031-1036pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Yathavakilla, S.K.V. and Caruso, J.A.**, 2007, A study of Se-Hg antagonism in *Glycine max* (soybean) roots by size exclusion and reversed phase HPLC-ICPMS, *Anal. Bioanal. Chem.*, 389(3):715-723pp.
- Zayed, A., Lytle, C.M. and Terry, N.**, 1998, Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants, *Planta*, 206: 284-292pp.
- Zembala, M., Filek, M., Walas, S., Mrowiec, H., Kornaś, A., Miszalski, Z. and Hartikainen, H.**, 2010, Effect of selenium on macro- and microelement distribution and physiological parameters of rape and wheat seedlings exposed to cadmium stress, *Plant Soil*, 329(1-2):457-468pp.
- Zhang, L.H., Ackley, A.R. and Pilon-Smits, E.**, 2007, Variation in selenium tolerance and accumulation among 19 *Arabidopsis thaliana* accessions, *J. Plant Physiol.*, 164(3):327-336pp.

ÖZGEÇMİŞ

Gönül DÜNDAR

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Tarihi ve Yeri 15.03.1990 - BATMAN

EĞİTİM BİLGİLERİ

2013- Yüksek Lisans Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji A.B.D.

2008-2013 Lisans Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji
Bölümü (Moleküler Biyoloji ve Genetik Opsiyonu)

2004-2007 Lise Bursa Cumhuriyet Lisesi

STAJLAR ve ÇALIŞMALAR

2011 Ege Üniversitesi EgeMikal Laboratuvarı

2010 Özel Bursa MedikalPark Hastanesi Biyokimya ve Mikrobiyoloji
Laboratuvarı

KONGRELER

EBİLTET II. Kök Hücre Sempozyumu ,Ege Üniversitesi, 2010, İzmir, TÜRKİYE.

VII. Molecular Biology and Genetics Students' Winter School, 2010 İstanbul
Üniversitesi