

Araştırma Makalesi

Arsenik Stresine Maruz Kalan Kavun (*Cucumis melo* L.) Fidelerinde Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi

Yonca SURGUN-ACAR*

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Çanakkale, Türkiye

*Sorumlu yazar: yoncasurgun@gmail.com

Geliş Tarihi: 06.11.2018

Düzeltilme Geliş Tarihi: 22.02.2019

Kabul Tarihi: 15.03.2019

Özet

Arsenik (As) tüm organizmalar için toksik bir metaloiddir. Bitki dokularına As alımı bitki metabolizmasını etkileyerek çeşitli fizyolojik ve yapısal bozukluklara neden olmaktadır. Bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda arsenat [As(V)] uygulamalarına maruz bırakılan kavun (*Cucumis melo* L.) fidelerinin antioksidan profili araştırılmıştır. Filtre kağıt içeren magenta kaplarına 4'er adet tohum ekimi yapılmış ve ekimi takiben on gün sonra kavun fidelerine 10 gün boyunca 0, 50, 100, 150 ve 200 mg L⁻¹ di-sodyum hidrojen arsenat heptahidrat (Na₂HAsO₄·7H₂O) içeren Hoagland solüsyonu uygulanmıştır. Deneme, tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak bitki büyütme kabininde yürütülmüştür. Kavun fidelerine ait yaprak ve kök dokularında antioksidan sistemin anahtar enzimlerinden olan süperoksit dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1) ve katalaz (CAT) (EC 1.11.1.6) enzim aktiviteleri, toplam antioksidan ve lipid peroksidasyon seviyeleri, fotosentetik pigment (toplam klorofil ve karotenoid) ve serbest prolin içerikleri tespit edilmiştir. Arsenatın yüksek konsantrasyonda (200 mg L⁻¹) yapılan uygulaması yapraklarda toplam klorofil ve karotenoid miktarının sırasıyla %26 ve %33 azalmasına neden olmuştur. SOD ve CAT enzim aktiviteleri ve toplam antioksidan seviyesi kök dokusunda 100, 150 ve 200 mg L⁻¹ As(V) uygulamaları sonucu artmıştır. Yapraklarda, SOD ve CAT enzim aktiviteleri 50 ve 100 mg L⁻¹ As(V) uygulamalarıyla artarken, 150 ve 200 mg L⁻¹ As(V) uygulamaları sonucu enzim aktiviteleri diğer As(V) uygulamalarına kıyasla azalmıştır. Oksidatif hasarın indikatörlerinden biri olan lipid peroksidasyonu As(V) stresi altında yaprak ve kök dokularında kontrole nazaran artmıştır. Ayrıca, tüm As(V) uygulamaları her iki dokuda da serbest prolin miktarının anlamlı olacak şekilde artmasına neden olmuştur.

Anahtar kelimeler: Antioksidan sistem, arsenat, kavun (*Cucumis melo* L.), oksidatif stres.

Determination of Antioxidant Activities in Melon (*Cucumis melo* L.) Seedlings Exposed to Arsenic Stress

Abstract

Arsenic (As) is a toxic metalloid for all living organisms. Uptake of As in plant tissues affects plant metabolism and causes to several physiological and structural disorders. In this study, antioxidant profile of melon (*Cucumis melo* L.) seedlings exposed to different arsenate [As(V)] treatments was investigated. Four seeds were sowed in each magenta vessel including filter paper and following ten days after sowing, melon seedlings were treated with Hoagland solution containing 0, 50, 100, 150 and 200 mg L⁻¹ disodium hydrogen arsenate heptahydrate (Na₂HAsO₄·7H₂O) for 10 days. The experiment was set up in a plant growth cabinet as randomized plots design with 3 replications. Superoxide dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) and catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) enzyme activities which are the key enzymes of antioxidant system, total antioxidant and lipid peroxidation levels, the contents of photosynthetic pigments (total chlorophyll and carotenoids) and free proline were determined in leaf and root tissues of melon seedlings. In leaves, high concentration of As(V) (200 mg L⁻¹) treatment caused a significant decrease in total chlorophyll and carotenoid content by 26% and 33%, respectively. SOD and CAT enzyme activities and total antioxidant level increased in response to 100, 150 and 200 mg L⁻¹ As(V) treatments in roots. In leaves, while SOD and CAT activities increased at 50 and 100 mg L⁻¹

As(V) treatments, enzyme activities decreased as a result of 100 and 150 mg L⁻¹ As(V) treatments compared with other As(V) treatments. Lipid peroxidation, one of the indicators of oxidative stress, increased in leaf and root tissues under As(V) stress when compared control. In addition, all As(V) treatments caused an increase in free proline content in both tissues significantly.

Key words: Antioxidant system, arsenate, melon (*Cucumis melo* L.), oxidative stress.

Giriş

Toprak ve su kaynaklarında As kontaminasyonu dünya genelinde ciddi bir problemdir (Srivastava ve ark., 2007) ve doğal jeokimyasal sistemler veya madencilik, ağır sanayi, gübreleme, pestisit kullanımı gibi antropojenik kaynaklı aktivitelere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (Chun-xi ve ark., 2007; Finnegan ve Chen, 2012). Arsenik doğada büyük çoğunlukla inorganik formda arsenit (AsIII) ve arsenat (AsV) olarak bulunmaktadır. Bitkiler arseniği fosfat analogu olarak fosfat taşıyıcıları ya da akuaporinler aracılığı ile almaktadır (Sharma, 2012). Arseniğin hücrelerdeki sülfidril (-SH) grupları ile etkileşimin yanı sıra ATP'de fosfatın yerine geçerek çeşitli metabolik yolları etkilediği bilinmektedir (Carbonell-Barrachina ve ark., 1995, 1998; Knauer ve ark., 1999).

Bitkiler değişen çevre koşullarına metabolizmalarında adaptasyonu sağlamak üzere stres sinyallerini algılama ve iletme gibi mekanizmalara sahiptir (Turner ve ark., 2002; Xiong ve ark., 2002). Bu mekanizma uyarıyı organdan almak ve organizmaya yayılmasından sorumlu olmaktadır ki bu durum biyokimyasal süreçlere dayanarak savunmayı aktifleştirmektedir (Maksymiec, 2007). Bitkilerde, ağır metallerin oksidatif strese yol açan reaktif oksijen türleri (ROS)'nin oluşumunu uyardığı bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2003; Azevedo ve ark., 2005; Loureiro ve ark., 2006). Reaktif oksijen türlerini kontrol altında tutmak amacıyla bitkiler antioksidan fonksiyonları olan enzimler ve bileşikler ile donatılmıştır (Mittler, 2002). Farklı bitkilerde yapılan çalışmalar sonucu As stresinin bitkilerde amino asitler, mineral besin durumu ve antioksidan sistemde değişime neden olduğu ortaya koyulmuştur (Dwivedi ve ark., 2010a, 2010b, Tripathi ve ark., 2012). İki farklı mısır kültüründe kadmiyum (Cd) ve As stresinin morfo-fizyolojik büyüme ve verim üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada tek başına ve kombine yapılan Cd ve As uygulamalarının mısır kültürlerinin büyüme ve verimini azalttığı ortaya koyulmuştur (Anjum ve ark., 2017). Diğer bir çalışmada, As stresine maruz bırakılan *Pteris vittata* (As hiperakümülatörü) ve *Vetiveria zizanioides* (As hiperakümülatörü olmayan) bitkilerinde antioksidan enzim aktivitelerindeki artışın *P. vittata* bitkisinde As toleransında ve hiperakümülyasyonunda önemli rol oynadığı ortaya

koyulmuştur (Tiwari ve Sarangi, 2017). Souri ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada, *Isatis cappadocica*'da As(V) ve fosfat interaksyonunun büyüme, lipid peroksidasyonu, As ve fosfat birikimi yanı sıra bazı antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkileri araştırılmış ve yüksek konsantrasyonda As(V) uygulamaları sonucu antioksidan enzim aktivitelerinde artış tespit etmişlerdir. Bununla birlikte fosfat uygulamalarının arseniğin indüklediği oksidatif stresin hafifletilmesinde bazı etkileri olduğu belirtilmiştir. İki farklı çeltik kültürüne yapılan As(V) uygulamaları antioksidan enzim aktivitelerini arttırırken, protein içeriğini azaltmıştır. As(V) ile birlikte yapılan giberellik asit uygulamaları ise çeltik kültürlerinin As(V) stresine karşı dayanıklılığını arttırmıştır (Fallah ve Mohammadian, 2017). Farklı As konsantrasyonlarına maruz bırakılan *Artemisia annua*'nın kök ve yaprak dokularında strese cevap olarak reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonu için antioksidatif savunmanın, fitoşelatinler aracılı As sekestrasyonunun ve ayrıca çeşitli sekonder metabolitlerin üretiminin aktif hale geldiği ortaya koyulmuştur (Kumari ve ark., 2017). Arsenik stresine maruz bırakılan buğdayda (*Triticum aestivum*) selenyum uygulamasının As alımını azalttığı, antioksidan seviyesini arttırarak oksidatif hasarı baskıladığı rapor edilmiştir (Ghosh ve Biswas, 2017). Pandey ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada arseniğin glukozinolatlar, tiyol ve fitokimyasal bileşikler üzerine etkileri iki Brassica kültüründe karşılaştırılmıştır. Yapılan bu çalışmanın amacı; artan konsantrasyonlarda As(V) uygulamaları yapılan kavun fidelerinin yaprak ve kök dokularında meydana gelen oksidatif stres ve buna karşın antioksidan savunma sisteminin rolünü değerlendirmektir.

Materyal ve Yöntem

Bitki materyalinin yetiştirilmesi ve uygulamalar

Çalışmada, bitki materyali olarak kavun (*Cucumis melo* L.) tohumları kullanılmıştır. Kavun tohumları steril su ile doyurulmuş üç katlı filtre kağıt (Whatman No.1) içeren steril magenta kaplarına (7,6 x 7,6 x 10 cm) ekilmiş ve 3 gün boyunca karanlık ortamda (25 ± 1 °C) çimlenmeye bırakılmıştır. Daha sonra çimlenen tohumlar bitki büyütme kabine (1.980 mm yükseklik x 1.450 mm genişlik x 810 mm derinlik) (Aralab, Portekiz)

aktarılmış ve Hoagland besin solüsyonu (Hoagland ve Arnon, 1938) verilmiştir. Tohum ekimi takiben 10. günden itibaren kavun fidelerine (2-3 yapraklı aşamada) 10 gün boyunca birer gün aralıklarla 3 mL 0 (kontrol), 50, 100, 150 ve 200 mg L⁻¹ di-sodyum hidrojen arsenat heptahidrat (Na₂HAsO₄·7H₂O) içeren Hoagland solusyonu verilmiştir. Son uygulamayı takiben 24 saat sonra kavun fideleri hasat edilmiş ve biyokimyasal analizler için -80°C’de muhafaza edilmiştir. Deneme, 30 ± 1 °C gündüz / 26 ± 1 °C gece sıcaklık, 16/8 fotoperiyot, 200 µmol m⁻² s⁻¹ ışık ve %70 nem koşullarında gerçekleştirilmiştir. Tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekrarlı olarak yürütülen denemede her magenta kabına 4 tohum ekilmiş ve her uygulama grubu için 15 magenta kabı kullanılmıştır.

Toplam klorofil ve karotenoid içeriğinin belirlenmesi

Her uygulamaya ait 0.5 g yaprak dokusu 10 mL %90’lık aseton ile havanda ezildikten sonra filtre kağıdı yardımıyla süzölmüş ve son hacim %90’lık aseton ile 10 mL’ye tamamlanmıştır. Örnekler 15 dakika (dak.) 5000 rpm’de santrifüj edildikten sonra süpernatantlar yeni tüplere aktarılarak 450, 663 ve 645 nanometre (nm) dalga boyundaki absorbansları spektrofotometrede belirlenmiştir. Toplam klorofil ve karotenoid miktarları Arnon (1949) metoduna göre hesaplanmıştır. Pigment konsantrasyonları mg g⁻¹ yaş ağırlık (YA) olarak ifade edilmiştir.

Antioksidan enzim analizleri ve toplam antioksidan seviyesi

Kavun fidelerine ait 1 g dondurulmuş kök ve yaprak örnekleri 3 mL soğuk Na-fosfat tampon çözeltisi (0,2 M Na-fosfat tamponu, %2 polivinylpyrrolidone-40 (PVP-40), 1 mM Na-EDTA, pH 7) içerisinde ezilmiş ve tüplere aktarıldıktan sonra 4 °C’de 10.000 rpm’de 20 dak. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası yeni tüplere aktarılan süpernatantlar süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktiviteleri ile toplam antioksidan seviyesinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

SOD (EC 1.15.1.1) enzim aktivitesi (ng mL⁻¹) Plant (SOD) Elisa kiti (SunRed, Çin) ve CAT (EC 1.11.1.6) enzim aktivitesi (ng mL⁻¹) Plant (CAT) Elisa kiti (SunRed, Çin) kullanılarak belirlenmiştir. Toplam antioksidan seviyesi (mmol L⁻¹) ise Total Antioxidant Status Assay (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) kiti yardımı ile tespit edilmiştir.

Lipid peroksidasyonu

Kök ve yaprak örneklerinde lipid peroksidasyon seviyesi malondialdehit (MDA)

konsantrasyonu olarak Madhava Rao ve Sresty (2000) metoduna göre tespit edilmiştir. Uygulamalara ait 0.5 g kök ve yaprak örnekleri 5 mL % 0,1 (w/v) trikloroasetik asit (TCA) içeren ekstraksiyon tampon çözeltisi içerisinde ezildikten sonra 10000 rpm’de 5 dak. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatantlardan 1’er mL alınarak tüplere aktarılmış ve üzerine 4 mL %20 TCA (w/v) içerisinde hazırlanmış % 0.5 tiyobarbitirik asit (TBA) (w/v) eklenmiştir. Örnekler 95 °C’de 30 dak. su banyosunda bekletilmiş ve hemen ardından buz banyosuna alınarak reaksiyon durdurulmuştur. Ardından örnekler 15 dak. 10000 rpm’de tekrar santrifüj edilmiş ve süpernatant kısımları alınarak 532 ve 600 nm’deki absorbansları spektrofotometrede belirlenmiştir. MDA konsantrasyonu µmol MDA g⁻¹ YA olarak ifade edilmiştir.

Serbest prolin içeriğinin tespiti

Prolin miktarının belirlenmesi amacıyla 0.5 g yaprak ve kök örnekleri 10 mL %3’lük (w/v) sülfosalisilik asitte 4 °C’de homojenize edilmiş ve filtre kağıdından süzölmüştür. Tüplere 2 mL örnek, 2 mL asit-ninhidrin çözeltisi ve 2 mL glasiyal asetik asit eklenerek kısa süreli vorteks edilmiş ve tüpler 1 saat 100 °C’de bekletilmiştir. Reaksiyon buz banyosuna alınarak sonlandırılmış ve karışıma 4 mL tolüen ilave edilerek, sıvı fazdan aspire edilen toluen fraksiyonunun 520 nm’de absorbans değerleri spektrofotometrede ölçülmüştür. Kavun fidelerine ait prolin içeriği Bates ve ark. (1973)’in yöntemine göre belirlenmiştir. Prolin miktarı µmol g⁻¹ YA olarak ifade edilmiştir.

İstatistiksel analiz

Her data için parametrik varsayımlar (normal dağılım ve varyansların homojenliği) Shapiro-Wilk ve Bartlett testleri kullanılarak test edilmiştir. Kontrol ve As(V) uygulanan fidelerin analiz sonuçları tek yönlü varyans analizi (ANOVA)’ne tabii tutulmuş ve ardından ortalamaların çoklu karşılaştırılması Tukey testi ($P < 0.05$) kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama (\pm SE) olarak verilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Arsenik, toksisitesi ve kanserojen özellikleri nedeniyle günümüzde önemli bir çevresel endişe unsuru olmuştur (Srivastava ve ark., 2007). Arsenik redoks olmayan bir aktif element olmasına rağmen As(V)’in As(III) dönüşümü sırasında veya dolaylı olarak moleküllerin -SH gruplarına bağlanması sonucu reaktif oksijen türleri (ROS) oluşmakta ve bitkilerde oksidatif strese neden olmaktadır (Hartley-Whitaker ve ark., 2001). Requejo ve Tena (2005), arseniğe maruz kalan mısır (*Zea mays* L.)

bitkisinde yaptıkları proteomik çalışması sonucunda oksidatif stresin bitkilerdeki As toksisitesinin altında yatan ana süreç olduğu sonucuna varmışlardır. Mevcut çalışmada, As(V) uygulamalarının kavun (*Cucumis melo* L.) bitkisinde meydana getirdiği oksidatif strese karşı antioksidatif değişimler ortaya koyulmuştur.

Toksik metallerin en belirgin etkilerinden biri bitkilerde fotosentetik pigmentlerde azalmaya neden olmasındır (Hasanuzzaman ve Fujita, 2013). Bu çalışmada kavun fidelerinin yapraklarında 200

mg L⁻¹ As(V) uygulaması toplam klorofil ve karotenoid miktarını istatistiksel olarak önemli düzeyde azaltmıştır (Çizelge 1). Pigment sentezindeki azalma bitkilerin yüksek As konsantrasyonlarına adapte olamadığını ve As toksisitesinin bir sonucu olarak belirtilmektedir (Srivastava ve ark., 2017). Arsenik toksisitesinin *Pitters vittata* ve *Sphagnum nemoreum*'un kloroplast membran yapısında ve ardından tilakoid membranında bozulma ve şişmeye neden olduğu ortaya koyulmuştur (Simola, 1997).

Çizelge 1. On gün süreyle farklı konsantrasyonlarda As(V) uygulamalarına maruz bırakılan kavun fidelerinin yapraklarında toplam klorofil (mg g⁻¹ YA) ve karotenoid miktarı (mg g⁻¹ YA)

| Arsenat uygulamaları (mg L ⁻¹) | Toplam klorofil (mg g ⁻¹ YA) | Karotenoid (mg g ⁻¹ YA) |
|---|--|---------------------------------------|
| Kontrol (0) | 0.65 ± 0.02 b | 4.12 ± 0.15 b |
| 50 | 0.68 ± 0.03 b | 4.44 ± 0.19 b |
| 100 | 0.65 ± 0.03 b | 4.19 ± 0.33 b |
| 150 | 0.58 ± 0.02 ab | 3.65 ± 0.14 ab |
| 200 | 0.48 ± 0.01 a | 2.78 ± 0.06 a |

Tukey testine göre uygulamalar arasındaki farklılıklar ($P < 0.05$) harflendirme yoluyla gösterilmiştir. Değerler ortalama ± SE (n=9-10) olarak sunulmuştur.

Süperoksit dismutaz enzimi erken uyarılan antioksidan enzimlerden biridir ve aktif süperoksit radikallerinin detoksifikasyonundan sorumludur (Bowler ve ark., 1992). Bitkilerde çeşitli SOD izomerik formları, süperoksit radikallerinin (O₂⁻) hidrojen peroksit (H₂O₂) dönüşmesini katalize etmektedir. Hidrojen peroksitin suya dönüşümü peroksizomlarda katalaz (CAT), sitosol ve kloroplastlarda askorbat peroksidaz (APX), askorbat (AsA), indirgenmiş glutatyon (GSH) ve glutatyon redüktazı (GR) içeren askorbat-glutatyon döngüsü ile gerçekleşmektedir (Noctor ve Fuyer, 1998). Mevcut çalışmada, kavun fidelerine ait yaprak dokusunda 50, 100, 150 ve 200 mg L⁻¹ As(V) uygulamaları SOD enzim aktivitesinin kontrole göre sırasıyla %59.3, %104.3, %24.3 ve %27.0 oranlarında arttırmıştır ve bu artışlar anlamlı bulunmuştur (Çizelge 2). Yaprak dokusunda, kontrole kıyasla 200 mg L⁻¹ As(V) uygulaması CAT enzim aktivitesinde önemli bir artış meydana getirmeye iken, 100 mg L⁻¹ As(V) uygulaması diğer uygulamalara göre CAT enzim aktivitesini en fazla

(47.48 ng mL⁻¹) arttıran uygulama olmuştur. Kök dokusunda, 100, 150 ve 200 mg L⁻¹ As(V) uygulamaları SOD ve CAT enzim aktivitelerini önemli oranda arttırmıştır (Çizelge 2). Benzer şekilde, As stresine maruz kalan *Zea mays* (Anjum ve ark., 2016) ve *Oryza sativa* (Mishra ve ark., 2011) bitkilerinde antioksidan enzim aktivitelerinde artış tespit edilmiştir. Singh ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada in vitro olarak elde edilen *Vetiveria zizanoioides* bitkilerine 14 gün boyunca yapılan As uygulaması sonucu kök ve gövdede SOD, CAT, glutatyon peroksidaz (GPX) ve glutatyon-S-transferaz (GST) enzim aktivitelerinin arttığı rapor edilmiştir. Diğer bir çalışmada, *Vigna mungo* bitkisinde SOD enzim aktivitesinin As konsantrasyonlarına bağlı olarak artmasının yanı sıra 200 µM As uygulaması sonucu doğal (native) poliakrilamid jel elektroforez analizi ile manganez (Mn)-SOD ve bakır/çinko (Cu/Zn)-SOD izoenzim bantlarının yoğunluğunun arttığı belirlenmiştir (Srivastava ve ark., 2017). Bununla birlikte yaprak dokusunda kök dokusundan farklı olarak 150 ve

200 mg L⁻¹ As(V) uygulamaları sonucu SOD ve CAT enzim aktivitelerinin 50 ve 100 mg L⁻¹ uygulamalara kıyasla azaldığı tespit edilmiştir (Çizelge 2). Arsenik stresine maruz kalan farklı bitkilerin kök ve gövdelerinde antioksidan enzim aktivitelerinde tespit edilen farklılıkların, doku spesifik farklılaşmış koruyucu mekanizma olabileceği tahmin edilmektedir (Shri ve ark., 2009). Hartley-Whitaker ve ark. (2001) tarafından yapılan çalışmada, arseniğe maruz kalan *Holcus lanatus* bitkisinde SOD aktivitesinin düşük konsantrasyonlarda artarken, yüksek konsantrasyonlarda kısıtlandığı belirlenmiştir. Nikel uygulaması yapılan *Zea mays* bitkilerinde SOD aktivitesinin 48 saat içinde belirgin bir şekilde arttıktan sonra normal seviyeye düştüğü tespit edilmiştir (Baccouch ve ark., 1998). Farklı bir çalışmada ise mevcut çalışmanın bulguları ile uyumlu sonuçlar tespit edilmiş ve *Triticum aestivum* bitkisine yapılan yüksek konsantrasyonda As uygulamalarında CAT enzim aktivitesi azalan bir

eğilim göstermiştir (Chun-xi ve ark., 2007). Katalaz O₂⁻ radikallerine karşı duyarlıdır ve CAT aktivitesindeki azalmanın enzimin doğrudan O₂⁻ veya As ile etkileşiminden ya da azalan CAT sentezinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Ushimaru ve ark., 1999).

Bitkilerde ROS oluşumu antioksidan enzimlerin yanı sıra antioksidan moleküllerin sentezini de arttırmaktadır (Bowler ve ark., 1992). Kavun fidelerine ait yapraklarda 100 ve 150 mg L⁻¹ As(V) uygulamaları sonucu toplam antioksidan seviyesinde kontrole göre sırasıyla yaklaşık %72 ve %64 oranlarında artış tespit edilmiştir (Çizelge 2). Köklerde ise toplam antioksidan seviyesi 100, 150 ve 200 mg L⁻¹ As(V) uygulamaları sonucu artmış olmakla birlikte en fazla artış 150 mg L⁻¹ As(V) (%151) uygulaması sonucu meydana gelmiştir (Çizelge 2). Antioksidan moleküller oksidatif stresin neden olduğu zararlı reaksiyonları engellemekte veya kısıtlanmaktadır (Erel, 2004).

Çizelge 2. On gün süreyle farklı konsantrasyonlarda As(V) uygulamalarına maruz bırakılan kavun bitkilerinin yaprak ve köklerinde SOD (ng mL⁻¹), CAT (ng mL⁻¹) enzim aktivitesi ve toplam antioksidan seviyesi (mmol L⁻¹)

| Arsenat uygulamaları (mg L ⁻¹) | SOD (ng mL ⁻¹) | | CAT (ng mL ⁻¹) | | Toplam antioksidan seviyesi (mmol L ⁻¹) | |
|--|----------------------------|----------------|----------------------------|----------------|---|---------------|
| | Yaprak | Kök | Yaprak | Kök | Yaprak | Kök |
| Kontrol (0) | 21.70 ± 0.37 d | 22.78 ± 0.41 b | 24.40 ± 1.11 d | 22.77 ± 0.45 b | 0.61 ± 0.02 c | 0.45 ± 0.05 b |
| 50 | 34.56 ± 1.63 b | 22.71 ± 0.26 b | 40.96 ± 1.21 b | 23.26 ± 1.31 b | 0.80 ± 0.09 abc | 0.44 ± 0.02 b |
| 100 | 44.34 ± 1.33 a | 26.29 ± 0.36 a | 47.48 ± 0.82 a | 30.06 ± 0.75 a | 1.05 ± 0.09 a | 0.88 ± 0.08 a |
| 150 | 26.98 ± 0.21 c | 27.66 ± 1.20 a | 29.28 ± 0.37 c | 28.90 ± 0.88 a | 1.00 ± 0.04 ab | 1.13 ± 0.10 a |
| 200 | 27.56 ± 0.50 c | 28.45 ± 0.84 a | 27.34 ± 0.40 cd | 31.14 ± 0.74 a | 0.73 ± 0.03 bc | 1.02 ± 0.10 a |

Tukey testine göre uygulamalar arasındaki farklılıklar ($P < 0.05$) harflendirme yoluyla gösterilmiştir. Değerler ortalama ± SE (n=9-10) olarak sunulmuştur.

Ağır metallerin hücresele seviyede en önemli etkilerinden biri membran bütünlüğünü değiştirmesidir (Singh ve ark., 2017). Aktif oksijen radikalleri membranda bulunan doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna neden olmakta ve MDA gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin

oluşumuna yol açmaktadır (Singh ve ark., 2007). Yapılan çalışmada, 150 mg L⁻¹ As(V) (1.50 µmol⁻¹ YA) uygulaması yapraklarda MDA seviyesini en fazla arttıran uygulama olmuştur (Çizelge 3).

Kök dokusunda ise MDA miktarında artış 50, 100, 150 ve 200 mg L⁻¹ uygulamaları için kontrole göre sırasıyla yaklaşık %17, %48, %44 ve % 33 oranlarında olmuştur (Çizelge 3). Kısa süreli As uygulamasının *Arabidopsis thaliana* (Col 0) bitkisinde gaz değişimi, metabolizma ve

antioksidan savunma üzerine çeşitli etkilerinin ortaya koyulduğu çalışmada, 108 ve 216 µM As uygulamalarının yaprak ve kökte anlamlı bir şekilde MDA seviyesini arttırdığı belirlenmiştir (Pita-Barbosa ve ark., 2019).

Çizelge 3. On gün süreyle farklı konsantrasyonlarda As(V) uygulamalarına maruz bırakılan kavun bitkilerinin yaprak ve köklerinde MDA (µmol⁻¹ YA) ve prolin (µmol⁻¹ YA) miktarı

| Arsenat uygulamaları (mg L ⁻¹) | MDA (µmol ⁻¹ YA) | | Prolin (µmol ⁻¹ YA) | |
|---|--------------------------------|---------------|-----------------------------------|----------------|
| | Yaprak | Kök | Yaprak | Kök |
| Kontrol (0) | 0.99 ± 0.03 c | 0.54 ± 0.01 d | 1.03 ± 0.02 c | 1.70 ± 0.06 b |
| 50 | 1.16 ± 0.01 bc | 0.63 ± 0.02 c | 2.11 ± 0.05 b | 1.93 ± 0.05 ab |
| 100 | 1.29 ± 0.01 b | 0.80 ± 0.02 a | 2.89 ± 0.04 a | 2.31 ± 0.11 a |
| 150 | 1.50 ± 0.02 a | 0.78 ± 0.02 a | 2.91 ± 0.10 a | 2.24 ± 0.09 a |
| 200 | 1.26 ± 0.06 b | 0.72 ± 0.01 b | 2.08 ± 0.17 b | 2.23 ± 0.13 a |

Tukey testine göre uygulamalar arasındaki farklılıklar ($P < 0.05$) harflendirme yoluyla gösterilmiştir. Değerler ortalama ± SE (n=9-10) olarak sunulmuştur.

Bitkiler antioksidan enzimleri aktif ederek etkin olarak hidrojen peroksiti yok etmelerine rağmen kolay difüzyon eğiliminden dolayı hidrojen peroksit bu detoksifikasyon işleminden kaçabilmekte ve geçiş metalleri yardımıyla son derece reaktif hidroksil radikale (OH^{*}) dönüşebilmektedir. Bitki hücreleri bu yüksek toksik olan hidroksil radikalının detoksifikasyonunu kolaylaştırmak amacıyla prolin biriktirmeye başlamaktadır (Briat, 2002). Arsenat uygulamaları yapraklarda prolin miktarını kontrole kıyasla arttırmakla birlikte en fazla artış 150 mg L⁻¹ As(V) (2.91 µmol⁻¹ YA) uygulaması sonucu tespit edilmiştir (Çizelge 3). Köklerde ise düşük konsantrasyonda As(V) uygulaması (50 mg L⁻¹) sonucu prolin miktarında meydana gelen artış önemli bulunmaz iken, diğer As(V) uygulamaları kontrole göre benzer oranlarda artışlar meydana getirmiştir (Çizelge 3). *Glycine max* tohumlarının 5 gün süreyle As (100 µM), As + difenilyodonyum (DPI) (10 µM), As + 24-Epibrassinolid (EBL) (0.5 µM) veya As + prolin (10 mM) uygulamalarına maruz bırakıldığı çalışmada As uygulaması büyüme parametrelerinde azalmaya, prolin, toplam şeker ve oksidatif stres markörlerinin seviyesinde

artmaya neden olmuştur. As ile birlikte uygulanan DPI, EBL ve prolin ise As akümülyasyonunu azaltarak endojen prolin ve antioksidan seviyesinin artmasını sağlamıştır (Chandrakar ve ark., 2018). Tripathi ve Gaur (2004) hücre içi prolinin anahtar antioksidanlardan daha fazla ROS detoksifiye ettiğini vurgulamaktadır.

Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmada, As stresine maruz bırakılan kavun fidelerinin farklı dokularında oksidatif stres ile ilgili parametrelerin yanı sıra bazı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların yanıtları belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan As(V)'in kavun bitkisinde doğrudan ya da dolaylı olarak ROS oluşumunun artmasına yol açtığı ve As(V) tarafından indüklenen oksidatif strese adapte olmak amacıyla yaprak ve kökte kısmen benzer şekilde antioksidan enzimlerin ve antioksidanların seviyesini arttırdığı ortaya konulmuştur. Arsenik stresi altında doku spesifik hücresel yanıtların belirlenebilmesi ve biyokimyasal yolların ortaya çıkarılmasına ilişkin daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Kaynaklar

- Anjum, S.A., Tanveer, M., Hussain, S., Shahzad, B., Ashraf, U., Fahad, S., Hassan, W., Jan, S., Khan, I., Saleem, M.F., Bajwa, A.A., Wang, L., Mahmood, A., Samad, R.A., Tung, S.A. 2016. Osmoregulation and antioxidant production in maize under combined cadmium and arsenic stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 23: 11864-11875.
- Anjum, S.A., Tanveer, M., Hussain, S., Ashraf, U., Khan, I., Wang, L. 2017. Alteration in growth, leaf gas exchange, and photosynthetic pigments of maize plants under combined cadmium and arsenic stress. *Water, Air, Soil & Pollution*, 228: 13.
- Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplast, polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24: 1-15.
- Azevedo, H., Gomes, C., Fernandes, J., Loureiro, S., Santos, C. 2005. Cadmium effects on sunflower growth and photosynthesis. *Journal of Plant Nutrition*, 28: 2211-2220.
- Baccouch, S., Chaoui, A., El Ferjani, E. 1998. Nickel-induced oxidative damage and antioxidant responses in *Zea mays* shoots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36: 689-694.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*, 39: 205-207.
- Bowler, C.M., van Montagu, M., Inze, D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43: 83-116.
- Briat, J.F. 2002. Metal ion-activated oxidative stress and its control. *Oxidative stress in plants*. (ed) Inze, D. ve Montagu, M.V. New York, USA, 171-189.
- Carbonell-Barrachina, A., Burlo Carbonell, F., Mataix Beneyto, J. 1995. Arsenic uptake, distribution, and accumulation in tomato plants: effect of arsenic on plant growth and yield. *Journal of Plant Nutrition*, 18: 1237-1250.
- Carbonell-Barrachina, A.A., Aarabi, M.A., De Laune, R.D., Gambrell, R.P., Patrick, W.H. 1998. The influence of arsenic chemical form and concentration on *Spartina patens* and *Spartina alterniflora* growth and tissue arsenic concentration. *Plant Soil*, 198: 33-43.
- Chandrakar, V., Dubey, A., Keshavkant, S. 2018. Modulation of arsenic-induced oxidative stress and protein metabolism by diphenyleneiodonium, 24-epibrassinolide and proline in *Glycine max* L.. *Acta Botanica Croatica*, 77(1): 51–61.
- Chun-xi, L., Shu-li, F., Yun, S., Li-na, J., Xu-yang, L., Xiao-li, H. 2007. Effects of arsenic on seed germination and physiological activities of wheat seedlings. *Journal of Environmental Science*, 19: 725-732.
- Dwivedi, S., Tripathi, R.D., Srivastava, S., Singh, R., Kumar, A., Tripathi, P., Dave, P., Rai, U.N., Chakrabarty, D., Trivedi, P.K., Tuli, R., Adhikari, B., Bag, M.K. 2010a. Arsenic accumulation profile effects trace nutrients in different rice (*Oryza sativa* L.) genotypes grown on arsenic-contaminated soils of West Bengal. *Protoplasma*, 245: 113-124.
- Dwivedi, S., Tripathi, R.D., Tripathi, P., Kumar, A., Dave, R., Mishra, S., Singh, R., Sharma, D., Rai, U., Chakrabarty, D., Trivedi, P.K., Adhikari, B., Bag, M.K., Dhankher, O.P., Tuli, R. 2010b. Arsenate exposure affects amino acids, mineral nutrient status and antioxidants in rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. *Environmental Science & Technology*, 44 (24): 9542-9549.
- Erel, O. 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37(4): 277-285.
- Fallah, S.F., Afshar-Mohammadian, M. 2017. Growth, antioxidant enzymes activities and photosynthetic pigments of two rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars as influenced by application of gibberellic acid and sodium arsenate. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 13(2): 381-392.
- Finnegan, P.M. ve Chen, W. 2012. Arsenic toxicity: the effects on plant metabolism. *Frontiers in Plant Physiology*, 3: 1-18.
- Ghosh, S. ve Biswas, A.K. 2017. Selenium modulates growth and thiol metabolism in wheat (*Triticum aestivum* L.) during arsenic stress. *American Journal of Plant Sciences*, 8: 363-389.
- Hasanuzzaman, M. ve Fujita, M. 2013. Exogenous sodium nitroprusside alleviates arsenic-induced oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings by enhancing antioxidant defense and glyoxalase system. *Ecotoxicology*, 22: 584-596.
- Hartley-Whitaker, J., Ainsworth, G., Meharg, A.A. 2001. Copper and arsenate- induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L. clones with differential sensitivity. *Plant Cell & Environment*, 24: 713-722.
- Hoagland, D.R., Arnon, D. 1938. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circulation*, 347: 1-39.

- Knauer, K., Behra, R., Hemond, H. 1999. Toxicity of inorganic and methylated arsenic to algal communities from lakes along an arsenic contamination gradient. *Aquatic Toxicology*, 46: 221-230.
- Kumari, A., Pandey, N., Pandey-Rai, S. 2017. Protection of *Artemisia annua* roots and leaves against oxidative stress induced by arsenic. *Biologia Plantarum*, 61(2): 367-377.
- Loureiro, S., Santos, C., Pinto, G., Costa, A., Monteiro, M., Nogueira, A.J.A, Soares, A.M.V.M. 2006. Toxicity assessment of two soils from Jales Mine (Portugal) using plants: growth and biochemical parameters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50: 182-190.
- Madhava Rao, K.V., Stresty, T.V.S. 2000. Antioxidative parameters in the seedling of pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh) in response to Zn and Ni stress. *Plant Science*, 157: 113-128.
- Maksymiec, W. 2007. Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(3): 177-187.
- Mishra, S., Jha, A.B., Dubey, R.S. 2011. Arsenite treatment induces oxidative stress, upregulates antioxidant system, and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings. *Protoplasma*, 248: 565-577.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7: 405-410.
- Noctor, G., Foyer, C.H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and plant Molecular Biology*, 49: 249-279.
- Pandey, C., Augustine, R., Panthri, M., Zia, I., Bisht, N.C., Gupta, M. 2017. Arsenic affects the production of glucosinolate, thiol and phytochemical compounds: A comparison of two Brassica cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 111:144-154.
- Pita-Barbosa, A., Williams, T.C.R., Loureiro, M.E. 2019. Effects of short-term arsenic exposure in *Arabidopsis thaliana*: tolerance versus toxicity responses. *Biologia Plantarum*, 63: 43-53.
- Requejo, R., Tena, M. 2005. Proteome analysis of maize roots reveals that oxidative stress is a main contributing factor to plant arsenic toxicity. *Phytochemistry*, 66: 1519-1528.
- Sharma, I. 2012. Arsenic induced oxidative stress in plants. *Biologia*, 67(3): 447-453.
- Shri, M., Kumar, S., Chakrabarty, D., Trivedi, P.K., Mallick, S., Misra, P., Shukla, D., Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Tuli, R. 2009. Effect of arsenic on growth, oxidative stress and antioxidant system in rice seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 1102–1110.
- Simola, L.K. 1997. The effect of lead, cadmium, arsenate and fluoride ions on the growth and fine structure of *Sphagnum nemoreum* in aseptic culture. *Canadian Journal of Botany*, 90: 375-405.
- Singh, H.P., Batish, D.R., Kohlo, R.K., Arora, K. 2007. Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. *Plant Growth Regulation*, 53: 65-73.
- Singh, S., Sounderajan, S., Kumar, K., Fulzelea, D.P. 2017. Investigation of arsenic accumulation and biochemical response of in vitro developed *Vetiveria zizanioides* plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145: 50-56.
- Souri, Z., Karimi, N., Oliveira, L.M. 2018. Antioxidant enzymes responses in shoots of arsenic hyperaccumulator, *Isatis cappadocica* Desv., under interaction of arsenate and phosphate. *Environmental Technology*, 39(10): 1316-1327.
- Srivastava, S., Mishra, S., Tripathi, R.D., Dwivedi, S., Trivedi, P.K., Tandon, P.K. 2007. Phytochelatin and antioxidant systems respond differentially during arsenite and arsenate stress in *Hydrilla verticillate* (L.f.) Royle. *Environmental Science & Technology*, 41(8): 2930-2936.
- Srivastava, S., Sinha, P., Sharma, Y.K. 2017. Status of photosynthetic pigments, lipid peroxidation and anti-oxidative enzymes in *Vigna mungo* in presence of arsenic. *Journal of Plant Nutrition*, 40(3): 298-306.
- Tripathi, B.N., Gaur, J.P. 2004. Relationship between copper and zinc-induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus* sp. *Planta*, 219: 397-404.
- Tripathi, R.D., Tripathi, P., Dwivedi, S., Dubey, S., Chatterjee, S., Chakrabarty, D., Trivedi, P.K. 2012. Arsenomics: omics of arsenic metabolism in plants. *Frontiers in Physiology*, 3: 275.
- Tiwari, S., Sarangi, B.K. 2017. Comparative analysis of antioxidant response by *Pteris vittata* and *Vetiveria zizanioides* towards arsenic stress. *Ecological Engineering*, 100: 211-218.
- Turner, J.G., Ellis, C., Devoto, A. 2002. The jasmonate signal pathway. *The Plant Cell*, Supplement 2002, S153–S164.
- Ushimaru, T., Kanematsu, S., Shibasaka, M., Tsuji, H. 1999. Effect of hypoxia on the antioxidative enzymes in aerobically grown

- rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Physiologia Plantarum*, 107:181-187.
- Xiong, L., Schumaker, K.S., Zhu, J.K. 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell, Supplement 2002*, S165–S183.
- Zhang, F., Shi, W., Jin, Z., Shen, Z. 2003. Response of antioxidative enzymes in cucumber chloroplasts to toxicity. *Journal of Plant Nutrition*, 26: 1779-1788.