

BAZI ARPA GENOTİPLERİNDE KURŞUN TOLERANSININ KLOROFİL A FLORESANSI İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Ali Doğru¹

¹ Sakarya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 54187, SAKARYA

Öz

Bu çalışmanın amacı, iki arpa (*Hordeum vulgare* L.) genotipinde (Tarm-92 ve Tokak 157/37) kurşun toksisitesinin (1.5 mM PbNO₃) etkilerinin klorofil a floresansı tekniği ile araştırılmasıdır. Her iki arpa genotipinde kurşun uygulaması ile kök ve gövde büyümesi ile toplam bitki boyu inhibe edilmiştir. Gövde büyümesindeki inhibisyon, muhtemelen yapraklardaki kurşun birikimi nedeniyle, toplam bitki boyundaki azalmadan sorumlu bulunmuştur. Diğer yandan, klorofil a floresansı ölçümleri ile gösterildiği üzere, her iki arpa genotipinde fotosistem II aktivitesi kurşun uygulaması sonucunda azalmıştır. Sonuçlarımız Tokak 157/37 ile karşılaştırıldığında, kurşun toksisitesi altındaki Tarm-92'deki reaksiyon merkezlerinde daha fazla hasarın oluştuğunu göstermiştir. Ayrıca kurşun uygulaması Tarm-92'de kinonA'nın indirgenmesini sağlayan yakalanan enerji miktarını ve ısı olarak dağıtılan enerji miktarını artırmış, kinonA'dan sonraki maksimum elektron taşınım hızını azaltmıştır. Bu sonuçlar kurşun stresi altındaki Tarm-92'nin absorbladığı ışığın büyük kısmını kullanamayıp ısı olarak dağıttığını ve sonuçta fotosistem II aktivitesinin azaldığını göstermektedir. Ancak Tokak 157/37'de daha az enerji ısı olarak dağıtılmakta ve TRo/RC ile ET0/RC'deki değişimlerle ispatlandığı gibi daha yüksek fotosistem II aktivitesi belirlenmiştir. Sonuç olarak, kurşun toksisitesi şartlarında daha yüksek fotosistem II aktivitesine sahip olduğu için Tokak 157/37'nin Tarm-92 ile karşılaştırıldığında kurşuna daha toleranslı olduğu söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Arpa, klorofil floresansı, kurşun, toksisite

EVALUATION OF LEAD TOLERANCE IN SOME BARLEY GENOTYPES BY MEANS OF CHLOROPHYLL A FLUORESCENCE

Extended Abstract

Heavy metals are grouped with regard to their density. They can be found naturally in the soil because of weathering and other processes on rocks. However, because of industrialization and a rapid population increase, production of anthropogenic biosolids and agrochemical waste has been enhancing the risk of heavy metal contamination in soils. This is one of the main environmental problems, keeping in mind that metals reach the soil and end up depreciating the whole area. In toxic concentrations, heavy metals damage plants and organisms, affecting their organs, changing their biochemical processes, organelles, cellular membranes, and causing health problems. Most of the heavy metals are persistent in soil because of their immobile nature. The main heavy metals present in soil are Cadmium (Cd), copper (Cu), lead (Pb), zinc (Zn), chrome (Cr), nickel (Ni), barium (Ba), argon (Ag), cobalt (Co), mercury (Hg), and antimony (Sb), and some of these elements are essential for many physiological functions in plants, whereas others have no known biological function. Lead is widespread toxic element having no role in biological metabolism. The major source of Pb in the environment includes metal smelting, agriculture, industry, and urban activities. In plants, excess Pb inhibits germination of seeds, growth of plants, synthesis of chlorophyll and photosynthesis. Photosynthesis has been reported to be one of the most sensitive process against Pb toxicity. The most modern and sensitive technique used to measure photosynthesis is chlorophyll a fluorescence. Chlorophyll a fluorescence measurements provide valuable information about the state of photosystem II. One of the important advantages of

*Sorumlu Yazar (Corresponding Author):

Ali DOĞRU (Dr.); Sakarya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 54187, Sakarya -Turkey. Tel: +90 (264) 295 6202, E-mail: adogru@sakarya.edu.tr

Geliş (Received) : 01.10.2019

Kabul (Accepted) : 22.12.2019

Basım (Published) : 31.12.2019

this technique is that it enables the determination of stress effects long before the observing of visible symptoms of any stress factor.

In this study, the effect of lead toxicity (1.5 mM PbNO₃) in barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes (Tarm-92 and Tokak 157/37) was investigated by means of chlorophyll fluorescence technique. Root and shoot growth and total plant length were inhibited by lead treatment in the both barley genotypes. Inhibition of shoot growth was mainly responsible for the decreased total plant length, probably due to higher level of lead accumulation in the barley leaves. Photosystem II efficiency, on the other hand, was decreased by lead toxicity in the both barley genotypes, as evaluated by chlorophyll fluorescence measurement. Our results showed that Tarm-92 had higher level of damaged reaction centers under lead toxicity as compared to Tokak 157/37. In addition, lead treatment increased the amount of trapped energy leading to quinoneA reduction (TRo/RC) and dissipated energy as heat (DIo/RC) and decreased maximum electron transport flux further than quinoneA (ETo/RC) in Tarm-92. These results showed that Tarm-92 under lead stress can not use absorbed light energy and dissipated it as heat, resulting in the decreased photosystem II activity. In Tokak 157/37, however, less energy was dissipated as heat and higher photosystem II activity was determined as confirmed by the changes in TRo/RC and ETo/RC. As a result, it may be concluded that Tokak 157/37 is more tolerant to lead toxicity because of higher photosystem II activity under lead toxicity as compared to Tarm-92.

Keywords: Barley, chlorophyll fluorescence, lead, toxicity

1. Giriş

Kurşun (Pb) farklı amaçlarla yaygın olarak kullanılan bir ağır metaldir. Akümülatör, cam, boya, pigment ve cila üretiminin yanı sıra matbaacılık alanında metalik kurşun ve kurşunun oksit, karbonat, nitrat, kromat ve sülfatlı bileşikleri kullanılmaktadır. Dünya kurşun üretimim yılda birkaç milyon ton civarındadır. En önemli antropojenik kurşun kaynakları arasında metalürji, metal işleme, farmasötik, kimyasal ve petrokimyasal süreçlerle birlikte taşıtların egzoz gazları sayılabilir. En yüksek seviyedeki kurşun kirliliğine askeri faaliyetlerin sürdürüldüğü alanlarda gözlenmektedir (Adamia vd., 2003).

Topraklardaki kurşun kontaminasyonu her şeyden önce toprağın mikrobiyolojik yapısını bozmaktadır. Kurşunun mikroflora üzerinde neden olduğu toksisitenin derecesi toprak tipine bağlı olarak değişmektedir (Rusin, 1988). Mikroskopik mantarlar gibi bazı ökaryot canlılar ve bazı bakteri türleri gibi prokaryotlar kurşun toksisitesine nispeten toleranslıdır. Ancak Actinomycetes grubundaki mantarlarla moleküler azot asimilasyonu yapan bakteriler kurşuna oldukça duyarlıdır. Bu nedenle kurşun kontaminasyon derecesinin belirlenmesi konusunda biyoindikatör olarak kullanılan canlılardır.

Kurşun orta derecede toksik olan bir ağır metal olarak değerlendirilmektedir. Kurşunun insanlardaki toksik etkileri arasında merkezi ve periferik sinir sisteminde, kemik iliği ve kan damarlarındaki hasarların yanı sıra protein sentezinin baskılanması, genetik yapıdaki bozulmalar, gonad ve embriyoda gelişim bozuklukları ile çeşitli kanser türleri sayılabilir (Cohen, 2001).

Toprakta bitki büyümesini ve ürün miktarını %5-20 oranında azaltan kurşun konsantrasyonu toksik olarak kabul edilmektedir. Topraklardaki kurşun konsantrasyonu 50 mg kg⁻¹'den fazla ise, tarımsal bitkilerin dokularındaki kurşun miktarı da kabul edilebilir sınır değerini aşmaktadır. İnsan doku ve organlarındaki kurşunun yaklaşık %90'lık kısmı gıdalardan, bunun %60-70'lik bölümü de bitkisel gıdalardan kaynaklanmaktadır.

Yapılan çalışmalar topraktaki kurşunun bitkiler tarafından absorblandığını; kök, gövde, yaprak, kök nodülleri ve tohum gibi organlarda akümüle edildiğini göstermiştir. Kökler tarafından alınan kurşunun genellikle az bir kısmı bitkinin toprak üstü organlarına taşınır. Çünkü köklerde bulunan endodermis tabakası kurşunun gövde ve yapraklara taşınımını kısmen engelleyen bir bariyer görevi yapmaktadır (Sobotik vd., 1998). Buna rağmen kurşun toksisitesinin yapraklarda çok belirgin etkileri gözlenmektedir. Yaprak laminasında klorotik ve nekrotik bölgelerin oluşması bunlar arasında sayılabilir. Bunun dışında kurşun toksisitesi yapraklardaki klorofil, protein, DNA, RNA ve kuru ağırlığın azalmasına; proteaz ve RNAaz aktivitesinin azalmasına yol açarak senesens olayını hızlandırabilir. Tohum çimlenmesi de birçok bitki türünde kurşun toksisitesi sonucunda inhibe edilmektedir. Hücresel boyutta düşünüldüğünde kurşun toksisitesi çeşitli membran sistemlerindeki lipid kompozisyonunu değiştirmekte ve aktif oksijen türlerinin (AOT) oluşumunu hızlandırarak lipid peroksidasyonuna yol açmaktadır (Singh vd., 2010; Shadid vd., 2012). Kurşun toksisitesi bitki hücrelerinde gen ekspresyonunda değişimlere neden olarak, protein oksidasyonunu stimüle ederek ve serbest amino asit miktarını azaltarak bitki hücrelerindeki toplam çözünür protein miktarını azaltmaktadır (Kovalchuk vd., 2005; Wang vd., 2008; Xiong vd., 2006).

Fotosentez bitkilerde kurşun toksisitesine en duyarlı olan metabolik olaylardan biridir. Kurşun toksisitesine maruz kalan bitkilerde yaprak büyümesinin yavaşladığı, fotosentetik pigment miktarının azaldığı, kloroplast yapısının bozulduğu ve CO₂ asimilasyonu ile ilgili enzimlerin aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir (Ernst vd., 2000). Kupper vd. (1996) kurşun toksisitesinin fotosentetik aktiviteyi azaltmasının nedenlerinden birinin, kurşunun klorofil molekülünün yapısındaki magnezyum ile yer değiştirmesi olduğunu belirtmişlerdir. Gupta vd. (2009) ise kurşun toksisitesi altındaki bitkilerde fotosentetik pigment sentezinin inhibe edildiğini rapor etmişlerdir. Kurşunun kloroplast üzerindeki direkt etkileri ise fotosentetik elektron taşınımının inhibisyonuna neden olmaktadır. Örneğin Qufei ve Fashui (2009) kloroplastlarda birikim gösteren kurşunun fotosistem II'nin (FS II) sekonder yapısını bozduğunu ve FS II yapısındaki pigment-protein kompleksleri arasındaki enerji transferini inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Ancak kurşun toksisitesinin bitkilerde fotosentetik aktivite üzerindeki inhibe edici etkisinin nedenleri tam olarak bilinmemektedir.

Günümüze kadar fotosentez hızının veya fotosentetik aktivitenin ölçülmesine yönelik birçok metod geliştirilmiştir. Günümüzde fotosentezin ölçülmesinde kullanılan en modern ve hassas teknik klorofil a floresansıdır (Maxwell ve Johnson, 2000). Klorofil a floresansı ölçümleri ile FS II'nin durumu hakkında bilgi elde edilmektedir. Klorofil moleküllerinin absorbladığı ışık enerjisinin ne kadarının fotosistem II tarafından kullanıldığı ve fazla ışık enerjisi nedeniyle FS II'de meydana gelen zararın boyutları gibi konularda fikir vermektedir. FS II' de meydana gelen elektron hareketleri, tüm fotosentez hızı hakkında belirleyici etkiye sahiptir. FS II aynı zamanda, ışık etkisiyle çeşitli zararların meydana geldiği fotosentetik aygıtın en duyarlı bölgesi olarak bilinmektedir. Herhangi bir stres faktörünün etkili olduğu ilk bölgenin de FS II olduğu bilinmektedir (Maxwell ve Johnson, 2000). Bu tekniğin sağladığı en büyük avantajlardan biri herhangi bir stres faktörünün gözle görünür belirtilerinin gözlenmesinden çok daha önce stres etkilerinin belirlenmesini sağlamasıdır. Klorofil a floresansı ölçümleri ile bir bitkinin fotosentetik performansı hakkında değerli bilgiler elde edilmektedir.

Tarımsal alanlardaki toprakların kurşunla kontaminasyonu her geçen gün ülkemiz topraklarının tarımsal verimliliği için büyüyen bir tehdit oluşturmaktadır. Arpa, ülkemizde buğdaydan sonra en büyük ekim alanına sahip olan bir bitki türüdür (Şahin, 2001). Bu çalışmada iki farklı arpa genotipinde kurşun toksisitesi etkilerinin klorofil a floresansı tekniği ile karşılaştırılmalı olarak araştırılması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Bitki materyali ve deneysel plan

Araştırmada arpa (*Hordeum vulgare* L.) bitkisine ait Tarm-92 ve Tokak 157/37 genotipleri kullanılmıştır. Tohumlar Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Eşit büyüklükte ve sağlam olan tohumlar seçilerek cam petri kaplarında bidistile su ile ıslatılmış kurutma kağıtları arasına yerleştirilmiştir. Petri kapları 24 °C sıcaklık ve %40-50 oransal neme sahip olan iklim dolabında karanlık ortamda çimlenmeye bırakılmıştır. Üç gün sonra her iki genotipe ait uniform fideler perlit ve ½ oranında sulandırılmış Hoagland besin çözeltisi içeren saksılara transfer edilerek 18/25 °C sıcaklık (gece/gündüz), 16/8 saat fotoperiyot (gündüz/gece), %50±5 oransal nem ve 200 µmol foton m⁻² s⁻¹ ışık şiddetine sahip iklim dolabına yerleştirilmiştir. 32 günlük olan bitkiler iki gruba ayrılmıştır. Birinci grupta bulunan kontrol bitkileri denemenin sonuna kadar ½ oranında sulandırılmış Hoagland besin çözeltisi ile sulanırken, ikinci gruptaki bitkilere 1.5 mM kurşun nitrat (PbNO₃), çözeltisi verilmiştir. Uygulamanın başlamasından sonraki altıncı gün klorofil a floresansı tekniği ile fotosentetik aktivite ölçülmüş ve bazı fizyolojik büyüme parametreleri belirlenmiştir.

2.2. Kök ve gövde boylarının belirlenmesi

6 günlük kurşun toksisitesi uygulaması sonunda fidelerin kök ve gövdeleri birleşme yerlerinden bisturi ile kesilerek, uzunlukları milimetrik bir cetvel yardımıyla 10 tekrarlı olarak ölçülmüştür. Ölçümler sırasında en uzun kökün uzunluğu esas alınmıştır. Kök boyu, gövde boyu ve toplam bitki boyu cm bitki⁻¹ olarak ifade edilmiştir.

2.3. Taze ve kuru ağırlıkların belirlenmesi

Kontrol ve stres grubuna ait bitkilerin hasat işlemlerinin yapıldığı gün kök ve gövdelerin taze ağırlıkları (gr bitki⁻¹) 5 tekrarlı olarak tartılmıştır. Daha sonra bitkiler 80 °C'ye ayarlanmış etüvde 48 saat bekletilmiş ve tekrar tartılarak kuru ağırlıkları (gr bitki⁻¹) kaydedilmiştir.

2.4. Metal analizleri

Hasat edilen arpa fidelerinin kök ve gövdeleri bisturi yardımıyla ayrıldıktan sonra yapraklar bidistile suyla yıkanmış ve 150 °C'ye ayarlanmış etüvde 48 saat kurutulmuştur. Konsantr HNO₃ ekstraksiyonundan elde edilen örneklerdeki Pb miktarı ICP-OES yöntemiyle belirlenmiştir (Bilal vd., 2018).

2.5. Klorofil a floresansı ölçümleri

Klorofil a floresans parametreleri hem kontrol hem de kurşun toksisitesi uygulanan bitkilerin yapraklarında "bitki verimlilik analizatörü" (HandyPEA florometresi, Hansatech Instruments Ltd., Pentney, King's Lynn, Norfolk, England) yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ölçüm için kullanılacak yapraklar, yaprak klipsleri yardımıyla 45-60 dakika karanlık adaptasyonuna maruz bırakılmıştır. Daha sonra yaprak yüzeylerine 3,500 µmol m⁻² s⁻¹ şiddetinde ışık uygulanmış ve elde edilen parametrelerin değerlendirilmesi PeaPlus ve Biolyzer adlı programlarla uygulanan JIP testi ile yapılmıştır (Bussotti vd., 2007). JIP testi ile ilgili terminoloji tablo 1' de verilmiştir.

Tablo 1. Klorofil a floresansı ölçümlerine bağlı olarak hesaplanan JIP testi parametreleri.

Parametreler	
F_o	Karanlık adaptasyonu sağlanmış örnekte tüm FS II reaksiyon merkezlerinin açık olduğu andaki minimum floresans
F_m	Karanlık adaptasyonu sağlanmış örnekte tüm FS II reaksiyon merkezlerinin kapalı olduğu andaki maksimum floresans
F_v	Fotokimyasal olmayan tüm prosesler minimum seviyede iken maksimum değişken floresans
F_v/F_m	FS II' nin maksimum kuantum etkinliği
F_v/F_o	Hill reaksiyonu (fotoliz) etkinliği
ABS/RC	Reaksiyon merkezi başına FS II'nin ortalama anten boyutu
ET_o/RC	FS II'de reaksiyon merkezi başına Q_A 'dan sonraki basamaklardaki maksimum elektron taşınımı
TR_o/RC	FS II'de reaksiyon merkezi başına yakalanan ve Q_A 'nın indirgenmesini sağlayan maksimum enerji
DIO/RC	FS II'de reaksiyon merkezi başına fotokimyasal olaylar dışında kaybedilen dissipasyon enerjisi
RC/ABS	FS II'deki anten klorofilleri başına aktif reaksiyon merkezi miktarı
$Alan$	OJIP eğrisinin üzerinde kalan, F_o ile F_m arasında bulunan ve indirgenmiş plastokinon (PQ) havuzunun boyutunu ifade eden bölge
t_{F_m}	F_m 'ye ulaşılması için gereken zaman
$\Delta V/\Delta t_o$	Kapalı reaksiyon merkezlerinin birikim hızı
N	F_m 'ye ulaşıncaya kadar geçen sürede Q_A 'nın indirgenme sayısı
PI_{ABS}	Performans indeksi
SFI_{ABS}	FS II'nin yapısal ve fonksiyonel durumunun indikatörü
SM	Tüm reaksiyon merkezlerinin kapanması için gereken enerji
Ψ_o	Yakalanan bir eksitonun bir elektronu Q_A 'dan elektron taşınım sistemine hareket ettirme etkinliği
ϕ_{D_o}	Termal dissipasyonun kuantum verimi
ϕ_{E_o}	Q_A 'dan PQ'ya elektron taşınımının kuantum verimi
ϕ_{R_o}	PQ'dan FS I'in son elektron akseptörüne elektron taşınımının kuantum verimi
Δ_{R_o}	Elektronların sistemler arası elektron taşıyıcılarından FS I'in akseptör bölgesine taşınım hızı

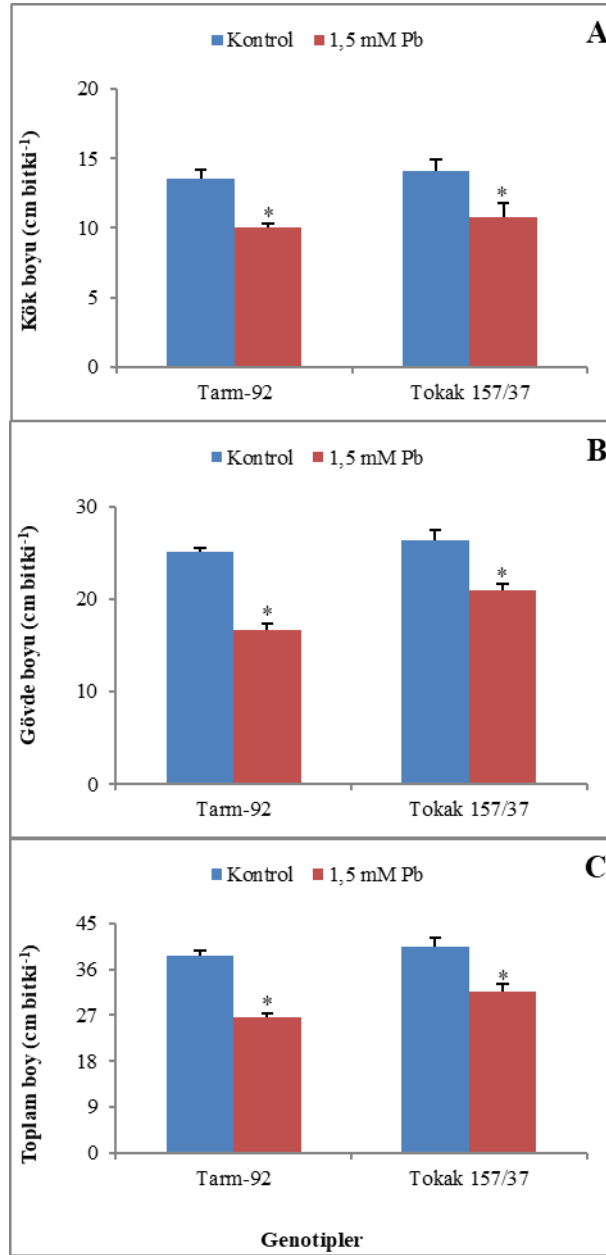
2.6. İstatistik analizler

Elde edilen verilerin aritmetik ortalama ve standart hataları hesaplanmış, daha sonra verilere SPSS 20.0 paket programı kullanılarak, istatistiki varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Her bir bağımsız değişken için uygulamaların kontrole göre neden olduğu farkın önem kontrolü Duncan testi ile (Anlamlı Önemli Fark; AÖF) %5 düzeyinde hesaplanmıştır.

3. Bulgular

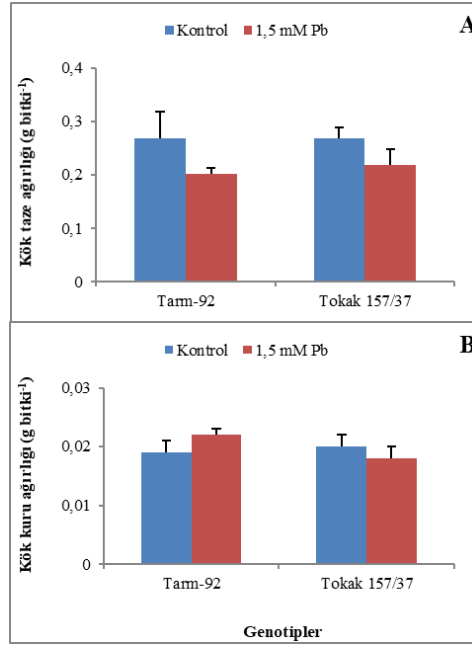
Farklı iki arpa genotipinde kurşun toksisitesinin kök büyümesi üzerine etkisi şekil 1A'da verilmiştir. Tarm-92 ve Tokak 157/37'de kurşun uygulamaları kök büyümesini ilgili kontrollere göre önemli derecede inhibe etmiştir ($P<0,05$). Kurşun toksisitesinin kök büyümesi üzerine etkisi bakımından iki arpa genotipi arasında fark bulunmamıştır ($P>0,05$). Çalışmada kullanılan kurşun konsantrasyonu Tarm-92 ve Tokak 157/37'de gövde büyümesini ve toplam bitki boyunu kontrollere göre istatistiksel olarak inhibe etmiştir ($P<0,05$) (Şekil 1B ve C).

1.5 mM'lık kurşun uygulamasının Tarm-92 genotipinde, Tokak 157/37 ile karşılaştırıldığında gövde büyümesi üzerindeki inhibe edici etkisinin daha belirgin olduğu gözlenmiştir ($P<0,05$). Ancak 1.5 mM'lık kurşun uygulaması, Tarm-92'de toplam bitki boyunu Tokak 157/37'ye göre daha belirgin şekilde azaltmıştır (Şekil 1C).



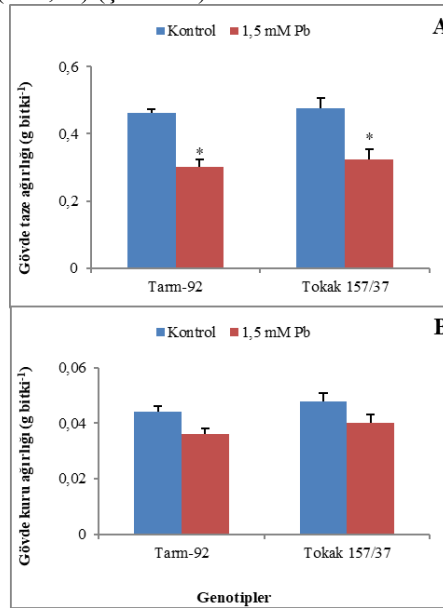
Şekil 1. Kurşun toksisitesinin arpa genotiplerinde (A) kök boyu, (B) gövde boyu ve (C) toplam boy üzerindeki etkisi (* işareti uygulamaların kontrollere göre $P=0,05$ seviyesinde farklı olduğunu göstermektedir).

Tarm-92 ve Tokak 157/37 genotiplerinde kurşun uygulamaları kök taze ve kuru ağırlıklarını kontrollere göre önemli derecede etkilememiştir ($P>0,05$) (Şekil 2A ve B).



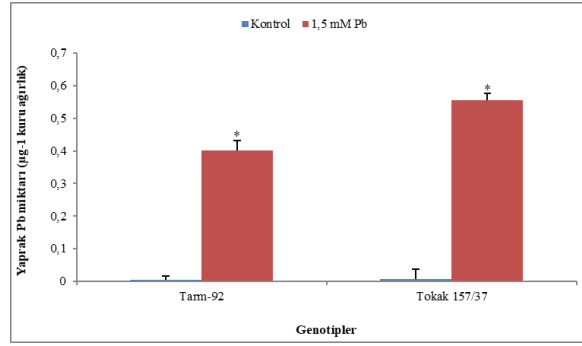
Şekil 2. Kurşun toksisitesinin arpa genotiplerinde (A) kök taze ağırlığı ve (B) kök kuru ağırlığı üzerindeki etkisi (* işaretli uygulamaların kontrollere göre $P=0.05$ seviyesinde farklı olduğunu göstermektedir).

Gövde taze ağırlıkları her iki genotipte de 1.5 mM'lık kurşun uygulaması sonucunda kendi kontrollerine göre önemli derecede azalırken ($P<0,05$); genotipler arasında istatistiksel fark gözlenmemiştir ($P>0,05$) (Şekil 3A). 1.5 mM'lık kurşun uygulaması her iki genotipte de sadece gövde kuru ağırlığını kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak etkilememiştir ($P>0,05$) (Şekil 3B).



Şekil 3. Kurşun toksisitesinin arpa genotiplerinde (A) gövde taze ağırlığı ve (B) gövde kuru ağırlığı üzerindeki etkisi

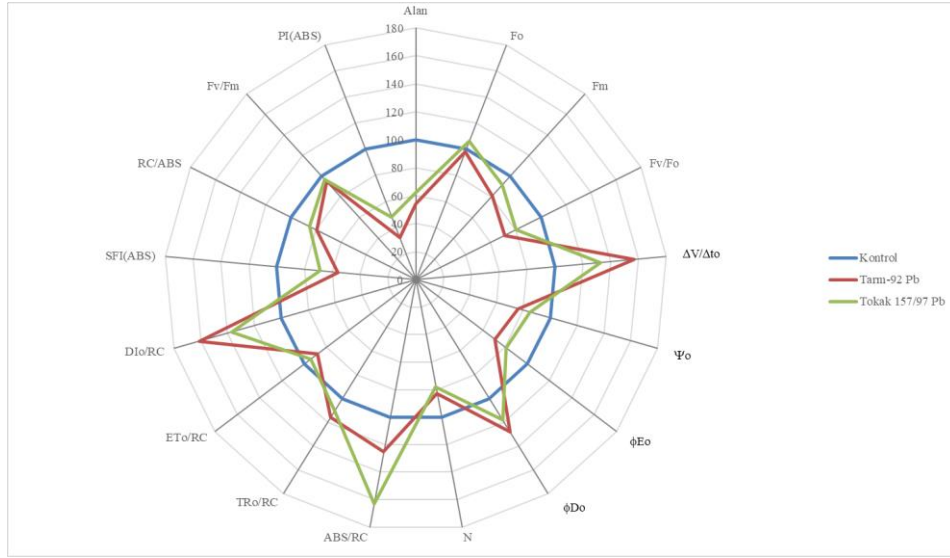
Çalışmada kullanılan her iki kurşun konsantrasyonu da arpa genotiplerinin yapraklarındaki kurşun miktarını kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında önemli derecede artırmıştır ($P<0,05$) (Şekil 4). Tokak 157/37 genotipinin yapraklarındaki kurşun birikiminin Tarm-92'ye göre daha fazla olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$).



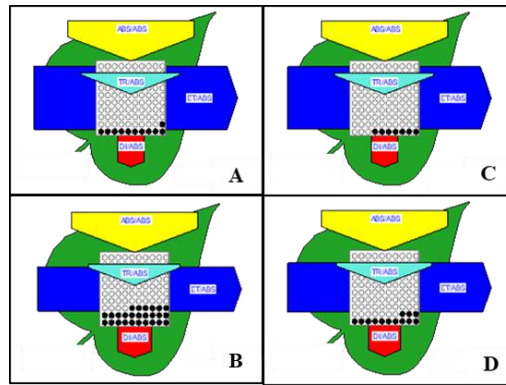
Şekil 4. Kurşun toksisitesinin arpa genotiplerinin yapraklarındaki kurşun miktarı üzerindeki etkisi (* işareti uygulamaların kontrollere göre $P=0.05$ seviyesinde farklı olduğunu göstermektedir).

Bu araştırmada kurşun toksisitesinin iki arpa genotipindeki fotosentetik etkinlik üzerindeki etkisi klorofil a floresansı tekniği kullanılarak değerlendirilmiştir. F_0 (minimum floresans) değeri kurşun toksisitesi uygulanan iki arpa genotipinde de kontrollere göre istatistiksel bir fark göstermemiştir ($P>0,05$) (Şekil 5) Ancak kurşun toksisitesi Tokak157/37 genotipinde Tarm-92'ye göre daha yüksek bir F_0 değerine neden olmuştur ($P<0,05$) (Şekil 5). F_m (maksimum floresans) değeri kurşun toksisitesi altındaki Tarm-92 genotipinde kontrole göre belirgin derecede azalırken ($P<0,05$), Tokak157/37'de etkilenmemiştir. (Şekil 5). Kurşun toksisitesi uygulanan Tokak 157/37'deki F_m değerinin Tarm-92'ye göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu gözlenmiştir ($P<0,05$). F_v/F_m oranı (FS II'nin maksimum kuantum etkinliği) iki genotipte de kurşun uygulaması sonucunda kendi kontrollerine göre önemli derecede azalmıştır ($P<0,05$) (Şekil 5). Ancak genotipler arasında istatistiksel bir fark gözlenmemiştir ($P>0,05$). Kurşun toksisitesine maruz bırakılan her iki arpa genotipinde de; alan, F_v/F_0 (Hill reaksiyonu etkinliği), Ψ_0 (yakalanan bir eksitonun bir elektronu Q_A 'dan elektron taşınım sistemine hareket ettirme etkinliği), ϕ_{E_0} (Q_A ' dan PQ ' ya elektron taşınımının kuantum verimi), N (F_m 'ye ulaşılincaya kadar geçen sürede Q_A 'nın indirgenme sayısı), SFI_{ABS} (FS II'nin yapısal ve fonksiyonel durumunun indikatörü), RC/ABS (FS II'de anten klorofilleri başına aktif reaksiyon merkezi miktarı), PI_{ABS} (performans indeksi) ve ϕ_{R_0} (PQ 'dan FS I'in son elektron akseptörüne elektron taşınımının kuantum verimi) kendi kontrollerine göre önemli derecede azalırken ($P<0,05$), bu parametreler açısından genotipler arasında önemli fark gözlenmemiştir ($P>0,05$) (Şekil 5). Kurşun toksisitesi Tarm-92 ve Tokak 157/37 genotiplerinin yapraklarında $\Delta V/\Delta t_0$ (kapalı reaksiyon merkezlerinin birikim hızı), ϕ_{D_0} (termal dissipasyonun kuantum verimi) ve DI_0/RC 'nin (FS II'de reaksiyon merkezi başına fotokimyasal olaylar dışında kaybedilen dissipasyon enerjisi) ilgili kontrollere göre istatistiksel olarak artmasına yol açmış ($P<0,05$); ancak genotipler arasında fark gözlenmemiştir ($P>0,05$) (Şekil 5). Sadece Tarm-92'de kurşun toksisitesi sonucunda ABS/RC (reaksiyon merkezi başına FS II'nin ortalama anten boyutu) ve TR_0/RC 'nin (FS II'de reaksiyon merkezi başına yakalanan ve Q_A 'nın indirgenmesini sağlayan maksimum enerji) kontrolle karşılaştırıldığında önemli oranda arttığı ancak ET_0/RC 'nin (FS II'de reaksiyon merkezi başına Q_A 'dan sonraki basamaklardaki maksimum elektron taşınımı) azaldığı belirlenmiştir ($P<0,05$) (Şekil 5).

ABS/RC , TR_0/RC ve ET_0/RC parametreleri bakımından genotipler arasındaki istatistiksel bir fark görülmemiştir ($P>0,05$). Δ_{R_0} (elektronların sistemler arası taşıyıcılar elektron taşıyıcılarından FS I'in akseptör bölgesine taşınım hızı) her iki genotipte de kontrol değerleri ile karşılaştırıldığında kurşun toksisitesinden etkilenmemiş $P>0,05$ ancak bu değer Tarm-92'de Tokak 157/37'ye göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$) (Şekil 5). Ancak kurşun toksisitesi her iki arpa genotipinde de absorbe edilen ışık enerjisi başına elektron taşınım hızını (ET_0/ABS) azaltırken hasarlı reaksiyon merkezi miktarı (RC/ABS) ve fotokimyasal olmayan olayların neden olduğu dissipasyon enerjisini (DI_0/ABS) artırmıştır (Şekil 6).



Şekil 5. Kurşun toksisitesinin arpa genotiplerinin yapraklarındaki klorofil a floresansı parametreleri üzerindeki etkisi.



Şekil 6. Kurşun toksisitesinin arpa genotiplerinin FS II birimlerindeki reaksiyon merkezleri üzerindeki etkisi (A: Tarm-92 kontrol; B: Tarm-92Pb; C: Tokak 157/37 kontrol; D: Tokak 157/37Pb) (boş daireler sağlam, dolu daireler ise hasarlı reaksiyon merkezlerini göstermektedir).

4. Tartışma

Kurşun bitki büyümesi için gerekli bir element olmadığı gibi çevre kirlenmesine yol açtığı da bilinmektedir. Örneğin kurşun ile kontamine olmuş topraklarda 1.9-3.9 mM kurşun bulunduğu bildirilmiştir (Angelone ve Bini, 1992). Kurşunun bitkilerde hasar oluşturma potansiyelinin toprak çözeltisindeki miktarına ve çözünürlüğüne, kökler tarafından alınabilirliğine ve taşınımına bağlıdır. Yapılan araştırmalar kurşunun bitkilerde erken büyüme evresinde çeşitli toksik etkiler yoluyla olumsuz etkilere neden olduğunu göstermiştir (An, 2006).

Schützendübel vd. (2001) kurşun gibi ağır metallerin kök büyümesini inhibe ettiğini bildirmiştir. Bitkiler makro ve mikro elementlerin yanı sıra zararlı ağır metalleri de kökleri aracılığı ile aldıklarından ilk zararlanmanın meydana geldiği bölgeler olarak kabul edilmektedir (Verma ve Dubey, 2003). Çalışmada kullanılan kurşun konsantrasyonu (1.5 mM) her iki arpa genotipinde de kök ve gövde büyümesini belli oranda inhibe etmiştir. Yapılan bir araştırmada kurşun elementinin bitkilerde kök ve gövdenin apikal meristemlerindeki mitotik aktiviteyi azalttığı belirlenmiştir (Malkowski vd., 2002). Buna göre bu araştırmada kurşun uygulanan arpa genotiplerinin kök ve gövde büyümesinde gözlenen inhibisyonun nedeni uygulanan kurşunun büyüme bölgelerinde mitoz bölünmeyi olumsuz etkilemesi olabilir. Bunun yanı sıra yapılan bazı çalışmalarda da kurşun toksisitesinin bitkilerde mineral madde beslenmesini olumsuz etkilediği bildirilmiştir. Örneğin kurşunun, hücre bölünmesi için gerekli bir element olan potasyum alınımını azalttığı rapor edilmiştir (Elumalai vd., 2002). Çalışmada elde edilen diğer önemli bir sonuç da kurşun toksisitesi altındaki Tarm-92 genotipinde gövde büyümesinin, Tokak 157/37'ye göre daha belirgin şekilde inhibe edilmesidir. Bu sonuç Tarm-92 genotipinde

köklerle alınan kurşunun gövde apikal meristemlerine taşınım hızının ve birikim yoğunluğunun daha fazla olmasından kaynaklanıyor olabilir. Ancak yapılan metal analizlerinde Tarm-92'nin yapraklarındaki kurşun miktarının Tokak 157/37'ye göre daha az olduğu belirlenmiştir. Bu durumda Tokak 157/37 genotipinin yapraklarında daha fazla kurşun birikimi olmasına rağmen gövde büyümesinin kurşun toksisitesinden Tarm-92'ye göre daha az etkilenmesi, bu genotipin kurşuna daha toleranslı olduğunu gösterebilir. Ayrıca araştırmadan elde edilen sonuçlar, özellikle Tarm-92'de kurşun toksisitesi sonucunda toplam boyda gözlenen azalmadan temelde gövde büyümesinin inhibisyonundan kaynaklandığını da ortaya çıkarmıştır. Diğer yandan çalışmada kullanılan ve kurşun uygulanan iki arpa genotipinde kök taze ağırlığı etkilenmemiş ancak gövde taze ağırlıkları kontrollere göre azalmıştır. Bu sonuçlar da her iki arpa genotipinde kurşun toksisitesinin kökler tarafından gerçekleştirilen su alınımını etkilemediğini ancak köklerden toprak üstü organlara su taşınım hızını azalttığını ortaya çıkarmıştır. Nitekim kurşun toksisitesi altındaki arpa genotiplerinin yapraklarındaki kuru madde birikimi kontrollerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak etkilenmemiştir.

Kalaji vd. (2011) klorofil a floresansı tekniğinin farklı çevresel stres faktörlerinin fotosentetik aktivite üzerindeki etkilerinin araştırılmasında çok uygun bir yöntem olduğunu bildirmiştir. Bu teknikle özellikle FS II'nin yapısında meydana gelen elektron taşınım olayları hakkında bilgiler elde edilmektedir. Bunun dışında ölçümlerin canlı bitkiler üzerinde yapılması sayesinde stres faktörlerinin fotosentetik aktivite üzerindeki etkilerinin çok kısa bir sürede ortaya çıkarılmasını sağlamaktadır (Kalaji vd., 2011). Birçok çalışmada çeşitli stres faktörleri altındaki bitkilerde Fo'ın artmasının nedeni olarak, elektronların Q_A'dan Q_B'ye geçişinin engellenmesi ve FS II'nin ışık enerjisini yakalama etkinliğindeki azalma gösterilmiştir (Kalaji vd., 2011). Fm değeri FSII'nin akseptör bölgesinin redüksiyon durumunu göstermektedir (Georgieva ve Lichtenthaler, 1999). Bitkilerde Fv/Fm oranı çevresel koşulların normal olduğu durumlarda 0,83 civarındadır. Bu oranın azalması bir fotoinhibisyon göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Björkman ve Demmig, 1987). Araştırmada kurşun toksisitesi uygulanan iki arpa genotipinde Fo değerleri kontrole göre önemli bir değişim göstermemiş ancak Tokak 157/37'nin yapraklarındaki Fo değerinin Tarm-92'ye göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Tarm-92 genotipinin yapraklarındaki Fm değeri hem kontrole hem de kurşun uygulanmış Tokak 157/37'nin yapraklarındaki Fm değerine göre daha düşük bulunmuştur. Fv/Fm oranı ise kurşun toksisitesi altındaki her iki arpa genotipinin yapraklarında kontrollere göre daha düşük bulunmuştur (Şekil 5).

Tokak 157/37'de gözlenen daha yüksek Fo değeri bu genotipte Fs II'deki elektron taşınımının kurşun toksisitesi nedeniyle daha olumsuz etkilenmesinden kaynaklanmış olabilir. Ancak Tokak 157/37'nin yapraklarındaki Fm değerinde gözlenen değişimler de bu genotipte FS II'nin akseptör bölgesinin kurşun toksisitesine Tarm-92'ye göre daha dayanıklı olduğunu göstermektedir. Her iki genotipte kurşun toksisitesi altında Fv/Fm oranının azalması fotoinhibisyon göstergesi olarak kabul edilebilir (Kalaji vd., 2011). Ayrıca Tarm-92'nin yapraklarındaki fotoinhibisyonun kurşun toksisitesinin etkisiyle elektronların Q_A'dan Q_B'ye taşınımının engellenmesinden; Tokak 157/37'de ise Fs II'nin akseptör bölgesinin yeterince indirgenememesinden kaynaklandığı söylenebilir.

Fv/Fo oranı FS II'nin donör bölgesinde bulunan ve suyu parçalayarak sistemde taşıyacak elektronların oluşumunu sağlayan yapının etkinliğini göstermektedir. Araştırmada her iki arpa genotipinde de kurşun toksisitesi altında Fv/Fo oranı kontrollere göre belirgin derecede azalmıştır (Şekil 5). Suyu parçalayan kompleksin çeşitli stres faktörlerine karşı fotosentetik elektron taşınım sisteminin en duyarlı bölgesi olduğu bilinmektedir. Fotosentetik elektron taşınım sisteminde meydana gelebilecek herhangi bir anormallik bu oranın azalmasına neden olmaktadır (Pereira vd., 2000). Buna göre Fo ve Fm değerleri ile Fv/Fm oranında meydana gelen değişimler göz önüne alındığında, suyu parçalayan sistemin kurşun toksisitesine duyarlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca FS II'de kurşun toksisitesi nedeniyle Q_A ve Q_B düzeyinde elektron taşınımında meydana gelen anormallikler de Fv/Fo oranının azalmasına yol açmış olabilir.

Klorofil a floresans sinyallerinde zamana (logaritmik) bağlı olarak meydana gelen değişimleri gösteren grafiğe OJIP eğrisi adı verilmektedir. Bu grafikte "O" noktası Fo değerini, "P" noktası ise Fm değerini göstermektedir. Oluşan grafiğin üzerindeki bölgenin (Fo-Fm arası) büyüklüğü FS II'nin indirgeyici bölgesindeki Q_A miktarı ile ilgili bilgi sağlamaktadır. Oukarroum vd. (2015) reaksiyon merkezlerinden Q_A'ya doğru gerçekleşen elektron taşınımının inhibisyonu sonucunda bu alanın azaldığını bildirmiştir. Yapılan çalışmada alan parametresi kurşun toksisitesine maruz bırakılan arpa genotiplerinde kontrollere göre önemli oranda azalmıştır (Şekil 5). Bu sonuç da kurşun toksisitesinin her iki arpa genotipinde elektron taşınım reaksiyonlarını belli oranda inhibe ettiğini göstermektedir.

Bunun dışında her iki genotipte kurşun uygulamaları; $\Delta V/\Delta t_0$ (kapalı reaksiyon merkezlerinin birikim hızı) değerini artırırken, Ψ_0 (yakalanan bir eksitonun bir elektronu Q_A 'dan elektron taşınım sistemine hareket ettirme etkinliği), ϕ_{E0} (Q_A 'dan PQ'ya elektron taşınımının kuantum verimi), N (F_m 'ye ulaşıncaya kadar geçen sürede Q_A 'nın indirgenme sayısı) değerlerini azaltması tuz stresinin FS II'deki elektron taşınımını farklı bölgelerde inhibe ettiğini göstermektedir. SFI_{ABS} (FS II' nin yapısal ve fonksiyonel durumunun indikatörü) değerinde gözlenen değişimler de bu bulguları destekler niteliktedir. Nitekim SFI_{ABS} değeri kurşun toksisitesi uygulanan iki arpa genotipinde de kontrollere göre önemli düzeyde azalmıştır (Şekil 5). Çalışmada kurşun uygulamalarının arpa genotiplerinde fotosentetik elektron taşınım reaksiyonlarını inhibe ettiğini gösteren kanıtlardan biri de RC/ABS (FS II' deki anten klorofilleri başına aktif reaksiyon merkezi miktarı) oranında meydana gelen azalmalardır (Şekil 5 ve Şekil 6). Bu nedenle arpa genotiplerindeki elektron taşınım reaksiyonlarının yavaşlamasının önemli sebeplerinden birinin de aktif reaksiyon merkezi miktarında gözlenen azalma olduğu söylenebilir.

Çalışmada Tarm-92 genotipinde kurşun uygulaması sonucu ABS/RC (reaksiyon merkezi başına FS II'nin ortalama anten boyutu), TR_0/RC (FS II'de reaksiyon merkezi başına yakalanan ve Q_A 'nın indirgenmesini sağlayan maksimum enerji miktarı), DI_0/RC (FS II'de reaksiyon merkezi başına fotokimyasal olaylar dışında kaybedilen dissipasyon enerjisi miktarı) ve ϕ_{D0} (termal dissipasyonun kuantum verimi) kontrole göre artarken, ET_0/RC (FS II'de reaksiyon merkezi başına Q_A 'dan sonraki basamaklardaki maksimum elektron taşınım hızı) azalmıştır (Şekil 5). Bu sonuçlar Tarm-92'de yakalanan eksitasyon enerjisinin elektron taşınımını sağlamak amacıyla kullanımının kurşun toksisitesi etkisiyle azaldığını ve bu enerjinin ortama ısı olarak geri verildiğini göstermektedir. Tokak 157/97'de ise ABS/RC (reaksiyon merkezi başına FS II'nin ortalama anten boyutu), TR_0/RC (FS II'de reaksiyon merkezi başına yakalanan ve Q_A 'nın indirgenmesini sağlayan maksimum enerji miktarı) ve ET_0/RC (FS II'de reaksiyon merkezi başına Q_A 'dan sonraki basamaklardaki maksimum elektron taşınım hızı) kurşun toksisitesi altında değişmemiş; DI_0/RC (FS II'de reaksiyon merkezi başına fotokimyasal olaylar dışında kaybedilen dissipasyon enerjisi miktarı) ise artmıştır. Bu sonuç Tokak 157/97'de dissipasyon enerjisinin ısı olarak dağıtım yoluyla FS II'deki elektron taşınım reaksiyonlarının belli ölçüde regüle edildiğini göstermektedir.

Araştırmada kurşun toksisitesi uygulanan arpa genotiplerinde ΔR_0 (elektronların sistemler arası elektron taşıyıcılarından FS I'in akseptör bölgesine taşınım hızı) kontrole göre değişim göstermemiş ancak ϕ_{R0} (PQ'dan FS I'in son elektron akseptörüne elektron taşınımının kuantum verimi) azalmıştır (Şekil 5). Bu sonuçlar her iki arpa genotipinde kurşun toksisitesinin neden olduğu oransal inhibisyona rağmen elektronların FS II' den FS I' in akseptör bölgesine taşındığını ancak muhtemelen kurşun toksisitesinin FS I'de neden olduğu yapısal ve/veya fonksiyonel hasarlardan dolayı elektronların FS I'in son elektron akseptörü olan ferrodoksin taşınım hızının yavaşladığını ispat etmektedir.

4. Sonuçlar

Sonuç olarak araştırma bulguları kurşun toksisitesinin hem Tarm-92 hem de Tokak 157/37 adlı arpa genotiplerinde fotosentetik aktiviteyi olumsuz yönde etkilediğini göstermiştir. Ancak Tokak 157/37 genotipinin, Tarm-92 ile karşılaştırıldığında, yapraklarındaki kurşun birikimi daha yüksek düzeyde olmasına rağmen kurşun toksisitesine daha toleranslı olduğu ve bu toleransı fotosentetik elektron taşınım reaksiyonlarını farklı noktalarda regüle ederek gösterdiği sonucuna varılabilir.

Teşekkür

Bu çalışma Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 2011-50-01-026 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. **Adamia G., Khatisashvili G., Varazashvili T., Pruidze M., Ananniashevili T., Gvakharia V., Adamia T. & Gordeziani M. (2003).** Determination of the type and rate of soil contamination with heavy metals and organic toxicants on the territories of military proving grounds in Georgia. *Bull Georg Acad Sci*, 167, 155-158.
2. **An Y. (2006).** Assessment of comparative of lead and copper using plant assay. *Chemosphere*, 62, 1359-1365.
3. **Angelone M. & Bini C. (1992).** Biogeochemistry of trace metals, Lewis Publishers, Boca Raton, London.

4. Bilal S., Khan A.L., Kim Y.H., Imran M., Khan M.J., Al-Harrasi A., Kim T.H. & Lee I.J. (2018). Mechanisms of Cr (VI) resistance by endophytic *Sphingomonas* sp. LK11 and its Cr (VI) phytotoxic mitigating effects in soybean (*Glycine max* L.). *Ecotoxicol Environ Safety*, 164, 648–658.
5. Björkman O. & Demmig B. (1987). Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 °K among vascular plants of diverse origin. *Planta*, 170, 489-504.
6. Bussotti F., Strasser R.J. & Schaub M. (2007). Photosynthetic behaviour of woody species under high ozone exposure probed with the JIP-test: a review. *Environ Pollut* 147, 430–437.
7. Cohen S.M. (2001). Lead poisoning: a summary of treatment and prevention. *Pediatr Nutr* 27, 125-130.
8. Elumalai R.P., Nagpal P. & Reed J.W. (2002). A mutation in the *Arabidopsis* *KT2/KUP2* potassium transporter gene affects shoot cell expansion. *Plant Cell*, 14, 119-1313.
9. Ernst W.H.O., Nielsseni H.G.M. & Ten Bookum W.M. (2000). Combination toxicology of metal-enriched soils: physiological responses of a Zn- and Cd-resistant ecotypes of *Silene vulgaris* on polymetallic soils. *Environ Exp Bot*, 43, 55-71.
10. Georgieva K. & Lichtenthaler H.K. (1999). Photosynthetic activity and acclimation ability of pea plants to low and high temperature treatment as studied by means of chlorophyll fluorescence. *J Plant Physiol* 155, 416-423.
11. Gupta D.K., Nicoloso F.T., Schetinger M.R.C., Rossato L.V., Pereira L.B., Castro G.Y., Srivastava S. & Tripathi R.D. (2009). Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown *Zea mays* seedlings under moderate lead stress. *J Hazard Mater*, 172, 479-484.
12. Kalaji H.M., Govindjee Bosa K., Koscielniak J. & Zuk-Golaszewska K. (2011). Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO₂ assimilation of two Syrian barley landraces. *Env Exp Bot*, 73, 64-72.
13. Kovalchuk I., Titov V., Hohn B. & Kovalchuk O. (2005). Transcriptome profiling reveals similarities and differences in plant responses to cadmium and lead. *Mutat Res. Fund Mol Med*, 570, 149-161.
14. Kupper H., Kupper F. & Spiller M. (1996). Environmental relevance of heavy metal substituted chlorophylls using the example of water plants. *J Exp Bot*, 47, 259-266.
15. Malkowski E., Kita A., Galas W., Karcz W. & Kuperberg J.M. (2002). Lead distribution in corn seedlings (*Zea mays* L.) and its effect on growth and the concentrations of potassium and calcium. *Plant Growth Regul* 37, 69-76.
16. Maxwell K. & Johnson G.N. (2000). Chlorophyll fluorescence-A practical guide. *J Exp Bot* 51, 659-668.
17. Oukarroum A., Bussotti F., Goltsev V. & Kalaji H.M. (2015). Correlation between reactive oxygen species production and photochemistry of photosystems I and II in *Lemna gibba* L. plants under salt stress. *Env Exp Bot*, 109, 80-88.
18. Pereira W.E., de Siqueira D.L., Martinez C.A. & Puiatt M. (2000). Gas exchange and chlorophyll fluorescence in four citrus rootstocks under aluminum stress. *J Plant Physiol*, 157, 513–520.
19. Qufei L. & Fashui H. (2009). Effects of Pb²⁺ on the structure and function of photosystem II of *Spirodela polyrrhiza*. *Biol Trace Elem Res*, 129, 251-260.
20. Schützendübel A., Schwanz P., Teichmann T., Gross K., Langenfeld-Heyser R., Godbold D.L. & Polle A. (2001). Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiol*, 127, 887-898.
21. Shadid M., Dumat C., Silvestre J. & Pinelli E. (2012). Effect of fulvic acid on lead-induced oxidative stress to metal sensitive *Vicia faba* L. plant. *Biol Fertil Soils*, 48, 689-697.
22. Singh R., Tripathi R.D., Dwivedi S., Kumar A., Trivedi P.K. & Chakrabarty D. (2010). Lead bioaccumulation potential of an aquatic macrophyte *Najas indica* are related to antioxidant system. *Bioresour Technol*, 101, 3025-3032.
23. Sobotik M., Ivanov V.B., Obroucheva N.V., Seregin I.V., Martin M.L., Antipova O.V. & Bergmann H. (1998). Barrier role in root systems in lead-exposed plants. *J App Bot*, 72, 144-147.
24. Şahin, S. (2001). Türkiye’de Mısır Ekim Alanlarının Dağılışı ve Mısır Üretimi. *G.Ü. Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi* 1, 73-90.
25. Verma, S. & Dubey, R.S. (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci*, 164, 645-655.
26. Wang C.R., Wang X.R., Tian Y., Yu H.X., Gu X.Y., Du W.C. & Zhou H. (2008). Oxidative stress, defence response, and early biomarkers for lead-contaminated soil in *Vicia faba* seedlings. *Environ Toxicol Chem*, 27, 970-977.
27. Xiong Z.T., Zhao F. & Li M.J. (2006). Lead toxicity in *Brassica pekinensis* Rupr. effect on nitrate assimilation and growth. *Environ Toxicol*, 21, 147-153.