



**AĞIR METAL STRESİ KOŞULLARINDA
VERBASCUM OLYMPICUM BOISS. TÜRÜNÜN
ENZİMATİK AKTİVİTESİ ÜZERİNDE
ARAŞTIRMALAR**

AYŞEGÜL AKPINAR



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AĞIR METAL STRESİ KOŞULLARINDA
VERBASCUM OLYMPICUM BOISS. TÜRÜNÜN ENZİMATİK
AKTİVİTESİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

Ayşegül AKPINAR

Prof. Dr. Hülya ARSLAN
(Danışman)

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2017

TEZ ONAYI

Ayşegül AKPINAR tarafından hazırlanan "Ağır Metal Stresi Koşullarında *Verbascum olympicum* Boiss. Türünün Enzimatik Aktivitesi Üzerinde Araştırmalar" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'na **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Hülya ARSLAN



Başkan : Prof. Dr. Hülya ARSLAN
Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Gürcan GÜLERYÜZ
Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Nuray SİVRİTEPE
Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Ahmet AKSOY
Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Gülriz BAYÇU KAHYAOĞLU
İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Ali BAYRAM

Enstitü Müdürü

09.13.2017



U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

..../..../....

Ayşegül AKPINAR

ÖZET

Doktora Tezi

AĞIR METAL STRESİ KOŞULLARINDA *VERBASCUM OLYMPICUM* BOISS. TÜRÜNÜN ENZİMATİK AKTİVİTESİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

Ayşegül AKPINAR

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hülya ARSLAN

Bu çalışmada Uludağ'ın sub-alpin ve alpin kuşağındaki bozulmuş alanlarda egemen olan ruderal bitki *Verbascum olympicum* Boiss. (Sığır kuyruğu)'a ait fideler laboratuvar koşullarında (gece/gündüz sıcaklığı 15°C/25°C, 16 saat ışık/8 saat karanlık periyot) Hoagland besin çözeltisinde yetiştirilerek farklı konsantrasyon ve sürelerde kadmiyum (Cd), krom (Cr), bakır (Cu), nikel (Ni) ve çinko (Zn) uygulamasına maruz bırakılmıştır. Örnekleme dönemlerinde hasat edilen, metal uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol grubu) fidelerin kök ve yapraklarında biyokütle (mg KA), su içeriği (%), eriyebilir protein içeriği (mg g⁻¹), lipid peroksidasyonu (MDA içeriği, nmol/g YA), hücre membran zararı (%), iyon sızıntısı (%), azot metabolizması (Nitrat redüktaz: NR, Glutamin sentetaz: GS) ve antioksidatif savunma sistemi enzimlerinin (Süperoksitdismutaz: SOD, Askorbat peroksidaz: APX ve Katalaz: CAT) aktivitesi tayin edilmiştir. Ayrıca yaprak kısımlarında klorofil içeriği (klorofil *a*, *b* ve total klorofil; mg/g YA) belirlenmiştir. Elde edilen veriler İki-Yönlü (Two-Way ANOVA) varyans testi ile analiz edilmiştir ($\alpha:0,05$). Araştırılan metallerin çoğunlukla konsantrasyon ve uygulama süresine bağlı olarak biyokütle, su içeriği, eriyebilir protein ve klorofil içeriğinde azalışa, MDA, hücre membran zararı ve iyon sızıntısında artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Nitrat redüktaz ve glutamin sentetazın metal uygulamalarından genellikle olumsuz etkilendiği, buna karşın antioksidatif savunma sistemi enzimlerinin (SOD, APX ve CAT) aktivitesinin uygulama süresi ve konsantrasyona bağlı olarak artma eğiliminde olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar *V. olympicum*'un ağır metal stresinden bir dereceye kadar etkilenmesine rağmen ağır metaller ile başa çıkmak için güçlü bir antioksidatif savunma sistemine sahip olduğunu ve Uludağ'da bozulmuş alanlarda gelişip sekonder süksesyon sürecindeki rolünü ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Ağır metal, ruderal, Uludağ, Nitrat redüktaz, Glutamin sentetaz, Süperoksit dismutaz, Katalaz, Askorbat peroksidaz, *Verbascum olympicum*.

2017, XX + 271 sayfa

ABSTRACT

Doctorate Thesis

STUDIES ON THE ENZYMATIC ACTIVITIES OF *VERBASCUM OLYMPICUM* BOISS. UNDER HEAVY METAL STRESS CONDITIONS

Ayşegül AKPINAR

Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Hülya ARSLAN

In this study, the seedlings of ruderal *Verbascum olympicum* Boiss. which is dominated in areas of sub-alpine and alpine belts of Uludag Mountain were grown in Hoagland nutrient solution with controlled conditions (day/night temperature 15°C/25°C, 16 h light/8 h dark) and they were treated with different concentrations and durations of cadmium (Cd), chromium (Cr), copper (Cu), nickel (Ni) and zinc (Zn). Biomass (mg DW), water content (%), chlorophyll content (chlorophyll *a*, *b* and total chlorophyll; mg/g FW), lipid peroxidation (MDA content, nmol/g FW), electrolyte leakage (%) and cell membrane damage (%) with the changes in the enzyme activities of nitrogen metabolism (Nitrate reductase: NR, Glutamine synthetase: GS) and antioxidative defence system (Superoxidedismutase: SOD, Ascorbate peroxidase: APX and Catalase: CAT) in root and leaves of the metal treated and control plants. Chlorophyll content was also determined in leaves. The differences among the means of values for examined parameters according to different metal concentrations and exposure periods by a Two-Way ANOVA ($\alpha:0,05$). It was generally found that biomass, water content, chlorophyll content and protein content was decreased, MDA, electrolyte leakage and cell membrane damage were increased depending on concentration and duration in examined metals. Nitrate reductase and glutamine synthetase activities were negatively affected by metal treatments, whereas it was determined an increase tendency in antioxidative defence system enzyme (SOD, CAT, APX) activities. It can be concluded that although *V. olympicum* was affected to a certain extent from metal treatments, it has a powerful antioxidative defence system to cope with heavy metal stress and it has an important role in seconder succession on Uludag disturbed areas via this properties.

Key Words: Heavy metals, ruderal, Uludag, Nitrate reductase, Glutamine synthetase, Superoxide dismutase, Catalase, Ascorbate peroxidase, *Verbascum olympicum*.

2017, XX + 271 pages.

TEŐEKKÖR

Bu alıőmanın gerekleőtirilmesinde değerli bilgilerini benimle paylaőan ve önerileriyle bana yön veren, kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım saygıdeğer danışman hocam; Sayın **Prof. Dr. Hülya ARSLAN**'a, gerek önerileri gerekse de yürütücülüğünü yaptığı projenin [UBAP(F)-2009/27] tüm olanakları ile çalıőmalarım sırasında katkılarını esirgemeyen Sayın **Prof. Dr. Gürcan GÖLERYÖZ'e**, çalışma laboratuvarının kullanımına olanak sağlayarak ilgi ve desteğini benden esirgemeyen Sayın **Prof. Dr. Nuray SİVRİTEPE**, Sayın **Prof. Dr. őeref GÖÇER** ve Sayın **Doç. Dr. Serap KIRMIZI**'ya, hayatımın her döneminde maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili annem **Ayőe UĞUR**, babam **Mehmet Ali UĞUR**, eőim **Atilla AKPINAR**'a ve dünyaya geldiği günden itibaren yaőama sevincim olan **Atakan Efe AKPINAR**'a sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Ayőegöl AKPINAR

27/01/2017

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
μL	Mikrolitre
TBA	Tiyobarbiturik asit
Ort.	Ortalama
Std. sapma	Standart sapma
g	Gram
cm	Santimetre
cm^3	Santimetre küp
mg	Miligram
kg	Kilogram
%	Yüzde
μg	Mikrogram
L	Litre
mmol	Milimol
μM	Mikromolar
mM	Milimolar
NADH	Nikotinamid adenin dinuklotid
UV	Ultraviyole
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
kDa	Kilodalton
ml	Mililitre
e^{-1}	Elektron
NR	Nitrat redüktaz
GS	Glutamin sentetaz
SOD	Süperoksit dismutaz
CAT	Katalaz
APX	Askorbat peroksidaz

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM	70
3.1. Materyal	70
3.2. Bitki Yetiştirme	71
3.3. Ağır Metal Uygulamaları	73
3.4. Bitkilerin Analiz için Hazırlanması	73
3.5. Biyokütle ve Su İçeriğinin Belirlenmesi	74
3.6. Klorofil İçeriğinin Belirlenmesi	74
3.7. Malondialdehit (MDA) İçeriğinin Belirlenmesi	75
3.8. Hücre Membran Zararı ve İyon sızıntısının Belirlenmesi	75
3.9. Azot Metabolizması Enzimlerinin Aktivitesinin Belirlenmesi	76
3.9.1. Nitrat Redüktaz Aktivitesinin (NRA) Tayini	76
3.9.2. Glutamin Sentetaz Aktivitesinin (GS) Tayini	79
3.10. Total Eriyebilir Protein İçeriğinin Belirlenmesi	79
3.11. Antioksidatif Enzim (SOD, CAT, APX) Aktivitesi Tayini	80
3.11.1. Bitki Materyalinin Ekstraksiyonu	80
3.11.2. Süperoksitdismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini	81
3.11.3. Katalaz (CAT) Aktivitesi Tayini	82
3.11.4. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi Tayini	83
3.12. Bulguların Değerlendirilmesi ve İstatistik Analizler	83
4. BULGULAR	84
4.1. Kadmiyum (Cd)	84

4.1.1. Cd Uygulanmış Fidelerde Büyüme Parametreleri (Biyokütle, Su İçeriği ve Klorofil İçeriği)	84
4.1.2. Cd Uygulanmış Fidelerde Azot Metabolizması Enzimlerinin (NR ve GS) Aktivitesi ve Eriyebilir Protein İçeriği	92
4.1.3. Cd Uygulanmış Fidelerde İyon sızıntısı, Hücre Membran Zararı ve Malondialdehit (MDA) içeriği	98
4.1.4. Cd Uygulanmış Fidelerde Antioksidatif Enzim Aktivitesi (SOD, CAT, APX) ..	104
4.2. Bakır (Cu)	112
4.2.1. Cu Uygulanmış Fidelerde Büyüme Parametreleri (Biyokütle, Su İçeriği ve Klorofil İçeriği)	112
4.2.2. Cu Uygulanmış Fidelerde Azot Metabolizması Enzimlerinin (NR ve GS) Aktivitesi ve Protein İçeriği	120
4.2.3. Cu Uygulanmış Fidelerde İyon Sızıntısı, Hücre Membran Zararı ve Malondialdehit (MDA) İçeriği	126
4.2.4. Cu Uygulanmış Fidelerde Antioksidatif Enzim Aktivitesi (SOD, CAT, APX) ..	132
4.3. Krom (Cr)	140
4.3.1. Cr Uygulanmış Fidelerde Büyüme Parametreleri (Biyokütle, Su İçeriği ve Klorofil İçeriği)	140
4.3.2. Cr Uygulanmış Fidelerde Azot Metabolizması Enzimlerinin (NR ve GS) Aktivitesi ve Eriyebilir Protein İçeriği	148
4.3.3. Cr Uygulanmış Fidelerde İyon sızıntısı, Hücre Membran Zararı ve Malondialdehit (MDA) içeriği	154
4.3.4. Cr Uygulanmış Fidelerde Antioksidatif Enzim Aktivitesi (SOD, CAT, APX) ..	160
4.4. Nikel (Ni)	168
4.4.1. Ni Uygulanmış Fidelerde Büyüme Parametreleri (Biyokütle, Su İçeriği ve Klorofil İçeriği)	168
4.4.2. Ni Uygulanmış Fidelerde Azot Metabolizması Enzimlerinin (NR ve GS) Aktivitesi ve Eriyebilir Protein İçeriği	176
4.4.3. Ni Uygulanmış Fidelerde İyon sızıntısı, Hücre Membran Zararı ve Malondialdehit (MDA) içeriği	183
4.4.4. Ni Uygulanmış Fidelerde Antioksidatif Enzim Aktivitesi (SOD, CAT, APX) ..	189
4.5. Çinko (Zn)	196

4.5.1. Zn Uygulanmış Fidelerde Büyüme Parametreleri (Biyokütle, Su İçeriği ve Klorofil İçeriği)	196
4.5.2. Zn Uygulanmış Fidelerde Azot Metabolizması Enzimlerinin (NR ve GS) Aktivitesi ve Eriyebilir Protein İçeriği	204
4.5.3. Zn Uygulanmış Fidelerde İyon sızıntısı, Hücre Membran Zararı ve Malondialdehit (MDA) içeriği	211
4.5.4. Zn Uygulanmış Fidelerde Antioksidatif Enzim Aktivitesi (SOD, CAT, APX) ..	217
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	224
5.1. Kadmiyum (Cd)	224
5.2. Krom (Cr)	229
5.3. Bakır (Cu)	233
5. 4. Nikel (Ni)	237
5. 5. Çinko (Zn)	240
KAYNAKLAR	244
ÖZGEÇMİŞ	272

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Ağır metal kaynakları ve ekosistemlerde ağır metal döngüsü	1
Şekil 1.2. Bitki hücrelerinin farklı organellerinde ağır metallerce uyarılan ROS oluşumu ve ROS tarafından uyarılan sinyal mekanizması.....	8
Şekil 1.3. Lipid peroksidasyon basamakları	9
Şekil 1.4. Reaktif oksijen radikalinin SOD enzimi ile zararsız hale getirilme aşaması. 11	
Şekil 1.5. Askorbat-glutasyon döngüsü	12
Şekil 1.6. Nitrat asimilasyonunda nitrat redüktaz (NR)'in rolü ve yapısı	13
Şekil 1.7. Glutamin sentetaz–Glutamat sentaz (GS/GOGAT) döngüsü üzerinden amonyum asimilasyonunun şeması	14
Şekil 3.1.1. <i>Verbascum olympicum</i> Boiss.'un genel görünüşü.....	70
Şekil 3.2.1. Uludağ'dan <i>V. olympicum</i> tohumlarının toplanması	71
Şekil 3.2.2. Steril petrilere ekim yapılan <i>V.olympicum</i> tohumları	71
Şekil 3.2.3. %10'luk Hoagland besin çözeltisine alınan iki kotiledonlu fideler	72
Şekil 3.2.4. a; 8 haftalık fidelerin toprak üstü kısımları b; 8 haftalık fidelerin toprakaltı kısımları	72
Şekil 3.6.1. a; Uygulama yapılmamış fidelerin yapraklarından elde edilen homojenat b; Metal (Cd) uygulaması yapılmış fidelerin yapraklarından elde edilen homojenat ...	74
Şekil 3.8.1. a; 2 saat boyunca su banyosunda inkübasyona bırakılan örneklerde EC ₁ değerlerinin ölçümü b; Otoklavlanan örneklerde EC ₂ değerlerinin ölçümü	76
Şekil 3.9.1.1. Ağır metal uygulanmış fidelerde NR aktivite tayini	78
Şekil 4.1.1.1. Cd uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama biyokütle değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	85
Şekil 4.1.1.2. Cd uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama su içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	87
Şekil 4.1.1.3. Cd uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama klorofil <i>a</i> ve <i>b</i> içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5)	89
Şekil 4.1.1.4. Cd uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama total klorofil içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5)	90
Şekil 4.1.2.1. Cd uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama NR aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	93

Şekil 4.1.2.2. Cd uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama GS aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	95
Şekil 4.1.2.3. Cd uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama eriyebilir protein içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5) ...	97
Şekil 4.1.3.1. Cd uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama iyon sızıntısı değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5) ...	100
Şekil 4.1.3.2. Cd uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama hücre membran zararının konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5) ...	102
Şekil 4.1.3.3. Cd uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama MDA içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	103
Şekil 4.1.4.1. Cd uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama SOD aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	106
Şekil 4.1.4.2. Cd uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama APX aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	108
Şekil 4.1.4.3. Cd uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama CAT aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	110
Şekil 4.2.1.1. Cu uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama biyokütle değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	113
Şekil 4.2.1.2. Cu uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama su içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	115
Şekil 4.2.1.3. Cu uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama klorofil <i>a</i> ve <i>b</i> içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).....	117
Şekil 4.2.1.4. Cu uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama total klorofil içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	118
Şekil 4.2.2.1. Cu uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama NR aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	121
Şekil 4.2.2.2. Cu uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama GS aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	123
Şekil 4.2.2.3. Cu uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama eriyebilir protein içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5) ...	125
Şekil 4.2.3.1. Cu uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama iyon sızıntısı değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	128
Şekil 4.2.3.2. Cu uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama hücre membran zararının konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi(n=5)	130
Şekil 4.2.3.3. Cu uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama MDA içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	131

Şekil 4.2.4.1. Cu uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama SOD aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	134
Şekil 4.2.4.2. Cu uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama APX aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	136
Şekil 4.2.4.3. Cu uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama CAT aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	138
Şekil 4.3.1.1. Cr uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama biyokütle değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	141
Şekil 4.3.1.2. Cr uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama su içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	143
Şekil 4.3.1.3. Cr uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama klorofil <i>a</i> ve <i>b</i> içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5) ...	145
Şekil 4.3.1.4. Cr uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama total klorofil içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5)	146
Şekil 4.3.2.1. Cr uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama NR aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	149
Şekil 4.3.2.2. Cr uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama GS aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	151
Şekil 4.3.2.3. Cr uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama eriyebilir protein içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)....	153
Şekil 4.3.3.1. Cr uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama iyon sızıntısı değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).....	156
Şekil 4.3.3.2. Cr uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama hücre membran zararının konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)....	158
Şekil 4.3.3.3. Cr uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama MDA içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).....	159
Şekil 4.3.4.1. Cr uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama SOD aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).	162
Şekil 4.3.4.2. Cr uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama APX aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).....	164
Şekil 4.3.4.3. Cr uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama CAT aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).....	166
Şekil 4.4.1.1. Ni uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama biyokütle değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5).....	169
Şekil 4.4.1.2. Ni uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama su içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).....	171

Şekil 4.4.1.3. Ni uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama klorofil <i>a</i> ve <i>b</i> içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5)	173
Şekil 4.4.1.4. Ni uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama total klorofil içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5)	174
Şekil 4.4.2.1. Ni uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama NR aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	177
Şekil 4.4.2.2. Ni uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama GS aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	179
Şekil 4.4.2.3. Ni uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama eriyebilir protein içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5) ...	181
Şekil 4.4.3.1. Ni uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama iyon sızıntısı değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	184
Şekil 4.4.3.2. Ni uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama hücre membran zararının konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5) ...	186
Şekil 4.4.3.3. Ni uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama MDA içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	187
Şekil 4.4.4.1. Ni uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama SOD aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).....	190
Şekil 4.4.4.2. Ni uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama CAT aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	192
Şekil 4.4.4.3. Ni uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama APX aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)	194
Şekil 4.5.1.1. Zn uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama biyokütle değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5).....	197
Şekil 4.5.1.2. Zn uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama su içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).....	199
Şekil 4.5.1.3. Zn uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama klorofil <i>a</i> ve <i>b</i> içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5).....	201
Şekil 4.5.1.4. Zn uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama total klorofil içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5)	202
Şekil 4.5.2.1. Zn uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama NR aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).....	205
Şekil 4.5.2.2. Zn uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama GS aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).....	207
Şekil 4.5.2.3. Zn uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama eriyebilir protein içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5)...	209

Şekil 4.5.3.1. Zn uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama iyon sızıntısı değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).....	212
Şekil 4.5.3.2. Zn uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama hücre membran zararının konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).....	214
Şekil 4.5.3.3. Zn uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama MDA içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).....	215
Şekil 4.5.4.1. Zn uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama SOD aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).....	218
Şekil 4.5.4.2. Zn uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama CAT aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).....	220
Şekil 4.5.4.3. Zn uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama APX aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).....	222

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.3.1. <i>V.olypticum</i> fidelerine uygulanan metallerin (Cd, Cr, Cu, Ni, Zn) uygulama şekli, konsantrasyonları ve uygulama süreleri	73
Çizelge 3.9.1.1. NRA Standartının Hazırlanması	78
Çizelge 3.10.1. Bradford Standartının Hazırlanması	80
Çizelge 3.11.2.1. SOD Standartının Hazırlanması	82
Çizelge 4.1.1.1. Cd uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama biyokütle değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	84
Çizelge 4.1.1.2. Cd uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama su içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	86
Çizelge 4.1.1.3. Cd uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama klorofil <i>a</i> ve <i>b</i> içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma).....	88
Çizelge 4.1.1.4. Cd uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama total klorofil içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	90
Çizelge 4.1.1.5. Biyokütle, su ve klorofil değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Cd) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].....	91
Çizelge 4.1.2.1. Cd uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama NR aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	92
Çizelge 4.1.2.2. Cd uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama GS aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	94
Çizelge 4.1.2.3. Cd uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama eriyebilir protein içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	96
Çizelge 4.1.2.4. Azot metabolizması enzimlerine ait (NR ve GS) ortalama aktivite değerleri ve eriyebilir protein içeriği değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Cd) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir]	98
Çizelge 4.1.3.1. Cd uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama iyon sızıntısı değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	99
Çizelge 4.1.3.2. Cd uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama hücre membran zararının konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	101
Çizelge 4.1.3.3. Cd uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama MDA içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	103

Çizelge 4.1.3.4. İyon sızıntısı, hücre membran zararı ve yaprak kısımlarında belirlenen MDA değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Cd) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir]	104
Çizelge 4.1.4.1. Cd uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama SOD aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	105
Çizelge 4.1.4.2. Cd uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama APX aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	107
Çizelge 4.1.4.3. Cd uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama CAT aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	109
Çizelge 4.1.4.4. Antioksidatif savunma sistemi enzimlerine (SOD, CAT, APX) ait ortalama aktivite değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Cd) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir]	111
Çizelge 4.2.1.1. Cu uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama biyokütle değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	112
Çizelge 4.2.1.2. Cu uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama su içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	114
Çizelge 4.2.1.3. Cu uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama klorofil <i>a</i> ve <i>b</i> içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	116
Çizelge 4.2.1.4. Cu uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama total klorofil içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	118
Çizelge 4.2.1.5. Biyokütle, su ve klorofil değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Cu) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].....	119
Çizelge 4.2.2.1. Cu uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama NR aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	120
Çizelge 4.2.2.2. Cu uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama GS aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	122
Çizelge 4.2.2.3. Cu uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama eriyebilir protein içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	124
Çizelge 4.2.2.4. Azot metabolizması enzimlerine ait ortalama aktivite değerleri ve ortalama eriyebilir protein içeriği değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Cu) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].....	126
Çizelge 4.2.3.1. Cu uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama iyon sızıntısı değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	127

Çizelge 4.2.3.2. Cu uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama hücre membran zararının konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	129
Çizelge 4.2.3.3. Cu uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama MDA içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	131
Çizelge 4.2.3.4. İyon sızıntısı, hücre membran zararı ve yaprak kısımlarında belirlenen MDA değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Cu) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].....	132
Çizelge 4.2.4.1. Cu uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama SOD aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	133
Çizelge 4.2.4.2. Cu uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama APX aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	135
Çizelge 4.2.4.3. Cu uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama CAT aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	137
Çizelge 4.2.4.4. Antioksidatif savunma sistemi enzimlerine (SOD, CAT, APX) ait ortalama aktivite değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Cu) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir]	139
Çizelge 4.3.1.1. Cr uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama biyokütle değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	140
Çizelge 4.3.1.2. Cr uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama su içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	142
Çizelge 4.3.1.3. Cr uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama klorofil <i>a</i> ve <i>b</i> içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	144
Çizelge 4.3.1.4. Cr uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama total klorofil içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	146
Çizelge 4.3.1.5. Biyokütle, su ve klorofil değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Cr) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].....	147
Çizelge 4.3.2.1. Cr uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama NR aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	148
Çizelge 4.3.2.2. Cr uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama GS aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	150
Çizelge 4.3.2.3. Cr uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama eriyebilir protein içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	152

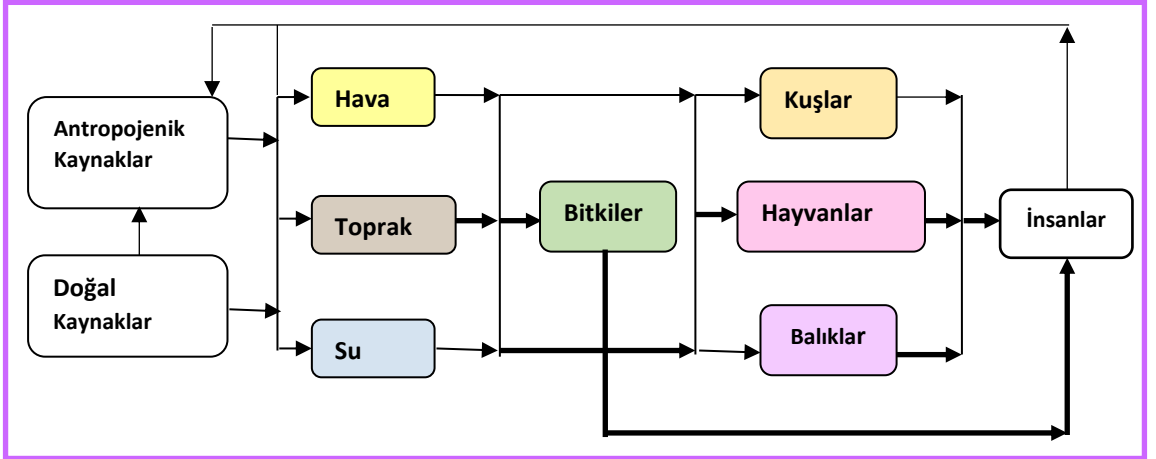
Çizelge 4.3.2.4. Azot metabolizması enzimlerine ait ortalama aktivite değerleri ve ortalama eriyebilir protein içeriği değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Cu) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].....	154
Çizelge 4.3.3.1. Cr uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama iyon sızıntısı değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	155
Çizelge 4.3.3.2. Cr uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama hücre membran zararının konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	157
Çizelge 4.3.3.3. Cr uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama MDA içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	159
Çizelge 4.3.3.4. İyon sızıntısı, hücre membran zararı ve yaprak kısımlarında belirlenen MDA değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Cr) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].....	160
Çizelge 4.3.4.1. Cr uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama SOD aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	161
Çizelge 4.3.4.2. Cr uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama APX aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	163
Çizelge 4.3.4.3. Cr uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama CAT aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	165
Çizelge 4.3.4.4. Antioksidatif savunma sistemi enzimlerine (SOD, CAT, APX) ait ortalama aktivite değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Cr) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir]	167
Çizelge 4.4.1.1. Ni uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama biyokütle değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	168
Çizelge 4.4.1.2. Ni uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama su içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	170
Çizelge 4.4.1.3. Ni uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama klorofil <i>a</i> ve <i>b</i> içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	172
Çizelge 4.4.1.4. Ni uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama total klorofil içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	174
Çizelge 4.4.1.5. Biyokütle, su ve klorofil değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Ni) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].....	175
Çizelge 4.4.2.1. Ni uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama NR aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	176

Çizelge 4.4.2.2. Ni uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama GS aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	178
Çizelge 4.4.2.3. Ni uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama eriyebilir protein içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	180
Çizelge 4.4.2.4. Azot metabolizması enzimlerine ait ortalama aktivite değerleri ve ortalama eriyebilir protein içeriği değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Ni) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].....	182
Çizelge 4.4.3.1. Ni uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama iyon sızıntısı değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	183
Çizelge 4.4.3.2. Ni uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama hücre membran zararının konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	185
Çizelge 4.4.3.3. Ni uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama MDA içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	187
Çizelge 4.4.3.4. İyon sızıntısı, hücre membran zararı ve yaprak kısımlarında belirlenen MDA değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Ni) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].....	188
Çizelge 4.4.4.1. Ni uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama SOD aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	189
Çizelge 4.4.4.2. Ni uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama CAT aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	191
Çizelge 4.4.4.3. Ni uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama APX aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	193
Çizelge 4.4.4.4. Antioksidatif savunma sistemi enzimlerine (SOD, CAT, APX) ait ortalama aktivite değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Cr) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir]	195
Çizelge 4.5.1.1. Zn uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama biyokütle değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	196
Çizelge 4.5.1.2. Zn uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama su içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	198
Çizelge 4.5.1.3. Zn uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama klorofil <i>a</i> ve <i>b</i> içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	200
Çizelge 4.5.1.4. Zn uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama total klorofil içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma)	202

Çizelge 4.5.1.5. Biyokütle, su ve klorofil değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Zn) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].....	203
Çizelge 4.5.2.1. Zn uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama NR aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	204
Çizelge 4.5.2.2. Zn uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama GS aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	206
Çizelge 4.5.2.3. Zn uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama eriyebilir protein içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	208
Çizelge 4.5.2.4. Azot metabolizması enzimlerine ait ortalama aktivite değerleri ve ortalama eriyebilir protein içeriği değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Ni) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].....	210
Çizelge 4.5.3.1. Zn uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama iyon sızıntısı değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	211
Çizelge 4.5.3.2. Zn uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama hücre membran zararının konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	213
Çizelge 4.5.3.3. Zn uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama MDA içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	215
Çizelge 4.5.3.4. İyon sızıntısı, hücre membran zararı ve yaprak kısımlarında belirlenen MDA değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları[Tüm parametreler konsantrasyon (Ni) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].....	216
Çizelge 4.5.4.1. Zn uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama SOD aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	217
Çizelge 4.5.4.2. Zn uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama CAT aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	219
Çizelge 4.5.4.3. Zn uygulanan <i>V. olympicum</i> fidelerinde ortalama CAT aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma)	221
Çizelge 4.5.4.4. Antioksidatif savunma sistemi enzimlerine (SOD, CAT, APX) ait ortalama aktivite değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Cr) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir]	223

1.GİRİŞ

Ağır metaller ekosistemde giderek artma eğiliminde olan günümüzün önemli çevresel kirleticilerindendir. Geleneksel olarak kimyasal bakış açısı ile değerlendirildiğinde “ağır metal” terimi bakır (Cu), çinko (Zn), demir (Fe), kadmiyum (Cd), mangan (Mn), nikel (Ni), krom (Cr), kurşun (Pb) ve arsenik (As) gibi atom numarası 20 ve özgül ağırlığı 5 g/cm³'in üzerinde olan geçiş elementleri için kullanılmaktadır (Adriano 2001, Singh ve ark. 2011, Farnese ve ark. 2016). Ağır metallerin çevreye yayılımı doğal ve antropojenik kaynaklar olmak üzere temelde iki kaynaktan sağlanmaktadır. Minerallerin ayrışması, erozyon ve volkanik aktiviteler ağır metallerin doğal kaynaklarıdır. Madencilik, pestisid kullanımı, düzensiz ve bilinçsiz tarımsal faaliyetler, evsel ve endüstriyel atıklar, yoğun taşıt kullanımı ise antropojenik kaynaklar arasında sayılabilir (Garbisu ve Alkorta 2003, Gonzales ve Gonzales-Chavez 2006, Fulekar ve ark. 2009, Rodriguez Martin ve ark. 2015). Ağır metaller biyolojik olarak parçalanamadıkları için toprak ve suda birikerek insan ve çevre sağlığı açısından tehlikeli olabilirler (Şekil 1.1.). Besin zincirinde düşük beslenme basamaklarından yüksek basamaklara geçebildikleri için biyolojik birikime sebep olarak tüm ekosistemi olumsuz etkileyebilirler. Ayrıca, toprak organizmalarının sayı ve aktivitelerini değiştirerek toprakta toksik etkilere yol açabilirler (Khan ve ark. 2010).



Şekil 1.1. Ağır metal kaynakları ve ekosistemlerde ağır metal döngüsü (Brady 1994)

Biyolojik süreçlerde bazı ağır metaller organizmaların normal gelişim ve metabolizmaları için düşük miktarlarda gereklidir (Göhre ve Paszkowski 2006, Nagajyoti ve ark. 2010). Bu metaller literatürde ‘iz elementler’ olarak anılır. Bakır (Cu), demir (Fe), mangan (Mn), çinko (Zn) ve nikel (Ni) bitkiler için gerekli metallere örnek olarak verilebilir. Bu metaller

bitki büyümesi için mutlak gerekli olmasına rağmen, yüksek konsantrasyonlarda toksik etki göstererek bitkilerdeki pek çok metabolik sürece zarar verebilir. Bu metallerin her birinin metabolik anlamda farklı bir fonksiyonu olduğu için toksik etkileri de değişiklik göstermektedir. Örneğin Ni, üreaz ve hidrogenaz gibi azot metabolizmasında yer alan enzimlerin yapısında bulunmaktadır. Bu nedenle yüksek konsantrasyonlarda nikelin azot metabolizması ve büyüme üzerinde olumsuz etkileri görülebilir (Marschner 1995, Hänsch ve Mendel 2009, Yusuf ve ark. 2011). Toksik düzeylerde Zn'nun ise fotosentez sürecinde, elektron taşıma zincirinde yer alan plastokinon düzeyini azalttığı bilinmektedir. Aynı zamanda klorofil biyosentezinde geriye dönüşü olmayan hasarlara yol açmaktadır (Tsonev ve Lidon 2005).

Kadmiyum (Cd), krom (Cr), kurşun (Pb), arsenik (As) ve civa (Hg) gibi ağır metallere ise organizmalar canlılıklarını sürdürmek için ihtiyaç duymaz ve bunlar çok düşük konsantrasyonlarda bile zararlı etkiye sebep olabilir (Ali ve ark. 2013). Örneğin kadmiyum çeşitli endüstriyel faaliyetler ile çevreye yayılarak bitkilerde düşük konsantrasyonlarda bile kalıcı hasarlara neden olabilir (Prasad 2004). Yüksek konsantrasyonlarda ise kloroplast yapısındaki Mg'un yerini alabilir, klorofil sentezini olumsuz etkileyebilir. Kadmiyumun aynı zamanda fotosentez sürecinde gerekli olan Fe'in alınımını engelleyerek dolaylı etkilere de sahip olduğu bilinmektedir (Benavides ve ark. 2005, Mishra ve ark. 2006, Nagajyoti ve ark. 2010). Kadmiyum gibi krom da zararlı çevresel kirleticilerden biridir ve özellikle endüstriyel faaliyetler sonucu ekosistemde birikerek olumsuz etkilere neden olabilir. Bitkilerde, fotosentez süreçlerinden azot ve karbohidrat metabolizmasına kadar pek çok metabolik sürece zarar verebilir (Prado ve ark. 2010, Gill ve ark. 2015). Ayrıca Fe, Mo, N, K gibi önemli bitki besin elementlerinin alınımını engelleyerek bitki büyüme ve gelişimini olumsuz yönde etkileyebilir (Shanker ve ark. 2005).

Yüksek konsantrasyonlarda ağır metal(ler)e maruz kalan bitkilerde gözlenen en yaygın durum büyümenin engellenmesidir (Prasad 2004). Gajewska ve Sklodowska (2010) ağır metallere etkileşim içinde olan öncelikli bitki kısmının kökleri olduğunu, bu nedenle büyümede meydana gelen azalışın dallardan ziyade köklerde daha belirgin gözlendiğini ifade etmektedir. Ağır metaller, kökte bitki besin elementlerinin alınım yolları üzerinden hücre içine alınmaktadır ve bu nedenle bitki için gerekli elementlerin alınımında rekabet

oluşturabilir. Bitki besin elementlerinin alınamaması beraberinde hücrel yapılar, temel metabolizma ve taşınım süreçlerinde zararlı etkilere neden olabilir (Lefebvre ve Vernet 1990, Boojar ve Goodarzi 2007, Nedjimi ve Daoud 2009, Sharma ve Dietz 2009). Nitekim çeşitli araştırmalarda yetiştirme ortamında artan ağır metal içeriğinin bitkilerin gelişimi ve su içeriği, çeşitli fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler süreçleri üzerinde yarattığı olumsuz etkilere değinilmiştir (Malec ve ark. 2008, 2009, Maleva ve ark. 2009, Wan ve ark. 2011, Gangwar ve ark. 2011, Yusuf ve ark. 2012, Kumar ve ark. 2012).

Ağır metallerin bitkiler üzerindeki bu gibi olumsuz etkileri, zamanla ağır metallerce kirletilmiş alanlarda doğal bitki örtüsünün tamamen yok olmasına neden olabilir. Bu durum toprak erozyonu başta olmak üzere karasal ekosistem süreçlerinde çeşitli değişimlere ve çevredeki diğer alanlarda kirlenmeye yol açabilir (Xia 2004). Ağır metallerin ekolojik etkilerini minimum seviyeye indirmek amacıyla şimdiye kadar ağır metallerce kirlenmiş alanlarda toprağın yıkanması, çukur açarak atıkların doldurulması, katılaştırma ve stabilizasyon gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal temizleme yöntemleri geliştirilmiştir (Sheoran ve ark. 2011, Wuana ve Okieimen 2011). Fakat bu yaklaşımların yüksek maliyet ve iş gücü, toprak özelliklerinde geri dönüşümsüz değişimler ve doğal toprak mikro florasında bozulmalara neden olması gibi kısıtlamalarının olduğu ifade edilmektedir (de Souza Costa ve ark. 2012, Kumar ve ark. 2014). Kimyasal yöntemler ayrıca ikincil kirlilik problemlerine de yol açabilir. Bu nedenle düşük maliyetli, etkin ve çevreyle uyumlu temizleme ve geri kazanım tekniklerinin geliştirilerek kullanılması zorunlu hale gelmiştir.

Ağır metal kirliliği problemine karşı “yeşil çözüm” olarak da düşünülen “bitkilerle iyileştirme” (Phytoremediation) bu zorunluluğu karşılama potansiyeline sahip ve dünyada uygulamaları gerçekleştirilen nispeten yeni bir yaklaşımdır (Swaileh ve ark. 2004, Zeidler 2005, González ve González-Chávez 2006, Ali ve ark. 2013). Bu yaklaşımda ağır metallere toleranslı bitkiler ve bunlarla ilişkili olan toprak bakterileri kullanılarak çevredeki kirleticilerin konsantrasyonlarının veya toksik etkilerinin azaltılması amaçlanmaktadır (Greipsson 2011, Rajkumar ve ark. 2013). Böylece toprağın yüzeyini etkilemeksizin yani toprağın kullanılabilirliğini ve verimliliğini koruyarak, organik madde girişi sağlayarak kirleticiler zararsız hale getirilir ve toprağın geri kazanımı sağlanır. Kirlenmiş alanlarda vejetasyonun gelişimi ise toprak erozyonunu ve

ekosistemden metal verilişini sınırlandırarak ekosistemlerin sürekliliğine katkı sağlamaktadır (Chaudhry ve ark. 1998). Ayrıca, estetik olarak memnuniyet verici ve toplum desteği alan bir yaklaşımdır. Ağır metaller, radyonükleidler ve organik kirleticiler (polinükleer aromatik hidrokarbonlar, poliklorürlü bifeniller, pestisidler) bu yöntemle uzaklaştırılabilecek kirleticilerdir. Diğer geri kazanım yöntemlerinin uygulanamadığı çok büyük alanlarda bu yöntemin uygulanabilirliği mevcuttur. Bu yöntemin uygun maliyetli, etkin, ekolojik, doğal koşullarda uygulanabilir, güneş ışığı ile yürütülebilen stratejik bir yaklaşım olduğu çeşitli araştırmalarda ifade edilmiştir (Clemens 2001, Van Aken 2009, Sing ve Prasad 2011, Maestri ve ark. 2013).

Bilim insanları, mühendisler, kamu ve özel sektördeki çevre uzmanlarının giderek dikkatini çeken bitkilerle iyileştirme tekniği fitoekstraksiyon (kirleticinin kökler tarafından alınarak özümlemesi), fitostabilizasyon (kirleticiyi etkisizleştirme), fitovolatilizasyon (kirleticiyi yapraklardan buharlaştırma), fitodegradasyon (doku içinde kirleticinin metabolizmaya uğraması) gibi mekanizmalara dayanmaktadır (Fulekar ve ark. 2009, Marques ve ark. 2009, Hamutoğlu ve ark. 2012). Örneğin fitoekstraksiyonda, kirleticilerin toprak veya su ortamından kökler yoluyla alınıp sürgünlere ve/veya diğer hasat edilebilir bitki kısımlarına taşınmasını içeren metabolik süreçlere sahip bitkiler kullanılmaktadır (Sas-Nowosielska ve ark. 2008). Bu açıdan değerlendirilebilecek bitki türlerinde hızlı gelişme, yüksek biyokütle üretimi, kolay hasat ve daha da önemlisi fazla sayıda metali biriktirebilme gibi bazı özellikler aranmaktadır (Jabeen ve ark. 2009, Seth ve ark. 2011).

Bitkilerin bitki besin elementleri de dâhil olmak üzere metal alınımı için geliştirdiği çeşitli mekanizmalar mevcuttur. Toprağın asitleştirilmesi, organik şelatörlerin salgılanması ve yüksek eğilimli metal taşıyıcıların (transporter) oluşumu bu mekanizmalar arasında sayılabilir (Rauser 1999). Örneğin; asidifikasyon ile Fe, Cu, Zn gibi katyonların rizosferdeki çözünürlükleri artırılır (Palmer ve Guerinot 2009). Çözünen metaller hücre duvarında absorbe edilebilir veya kök apoplastı yoluyla hareket edebilir. Köklerde Kaspari şeridinin varlığına bağlı olarak metallerin simplasta geçişi için aktif alınımına gerek olup bu çeşitli taşıyıcılarla gerçekleştirilir. Örneğin *Arabidopsis thaliana* türünde mangan kök tüyü hücrelerinin plazma membranlarında bulunan NRAMP1 taşıyıcısı ile taşınır (Cailliatte ve ark. 2010). Ksileme verilen ağır metallerin toprak üstü organlara

taşınımında ise şelat oluşumu önemlidir. Şelat oluşumu, metallerin çeşitli amino asitler, organik asitler ve metalotiyoninler ile kompleks oluşturmasıdır (DalCorso ve ark. 2014).

Bitkiler plazma membranından metalin geçişini sınırlayarak membran geçirgenliğini ve metalin hücre duvarına bağlanabilme kapasitesini değiştirerek, metal şelatlaştırıcı maddelerin eksüdasyonunu arttırarak sitoplazmada toksik iyon birikiminden sakınabilirler (Yang ve ark. 2005). Sitoplazmaya giren metal iyonları ise fitoşelatlar, metalotiyoninler, organik asitler, aminoasitler, hücre duvarı proteinleri/pektinler/polifenoller gibi organik bileşiklerle şelat oluşturma yoluyla zararsızlaştırılabilir (Clemens 2001, Hall 2002, Sharma ve Dietz 2009). Şelat oluşumu ile serbest metal iyon konsantrasyonu düşürülerek hücrede ağır metalle uyarılan toksik etkiler azaltılır ve oluşan metal-şelat kompleksi tonoplast yoluyla sitoplazmadan vakuollere taşınır (Thakur ve ark. 2016). Bu oluşum, bitkilerin ağır metal konsantrasyonlarının yüksek olduğu doğal ortamlarda yaşayabilmesi için geliştirdiği ağır metal tolerans mekanizmalarındandır. Dolayısıyla ağır metallerce kirletilmiş alanların geri kazanılmasında bitkilerin kullanılmasına dayanan yöntemin (bitkilerle iyileştirme, phytoremediation) esası bitkilerin ağır metal toleransı ile ilgili olup yöntemin başarılı olabilmesi için bu kavram bir ön koşul olarak düşünülebilir. Bitkiler hücrelerindeki ağır metal konsantrasyonlarını metal için spesifik olan toksik eşik değerinin altında tutmaya çalışırlar (Sharma ve Dietz 2006). Sitoplazmada aşırı metal birikimini önlemek için ise sakınma ve tolerans olmak üzere iki temel strateji geliştirmektedir (Thakur ve ark. 2016). Sakınma, aşırı metal alınımını engelleme yeteneği olarak ifade edilebilirken (Verklei ve Schat 1990), tolerans farklı mekanizmalar yoluyla biriktirilen metal iyonları ile başa çıkma yeteneği olarak ifade edilebilir (Thakur ve ark. 2016). Söz konusu metal/metallerin ve bitkinin türü ve gelişim dönemi gibi özellikleri bu mekanizmaları belirler (Navari-Izzo ve Quartacci 2001).

Baker (1981) ağır metal bakımından zengin topraklarda gelişen bitkileri “Metal dışlayıcı (Excluder) bitkiler”, “İndikatör bitkiler” ve “Akümülatör bitkiler” olmak üzere üç kategoriye ayırmıştır. Metal dışlayıcı bitkiler, metal iyonlarını sınırlı düzeyde alarak toprak üstü kısımlarına iletmezler. İndikatörler genellikle dıştaki metal yoğunluğunu kendi bünyelerinde doğrusal bir şekilde yansıtırlar (McGrath ve ark. 2002). Akümülatörler ise ağır metalleri toprak üstü kısımlarında yüksek miktarlarda biriktirmeye

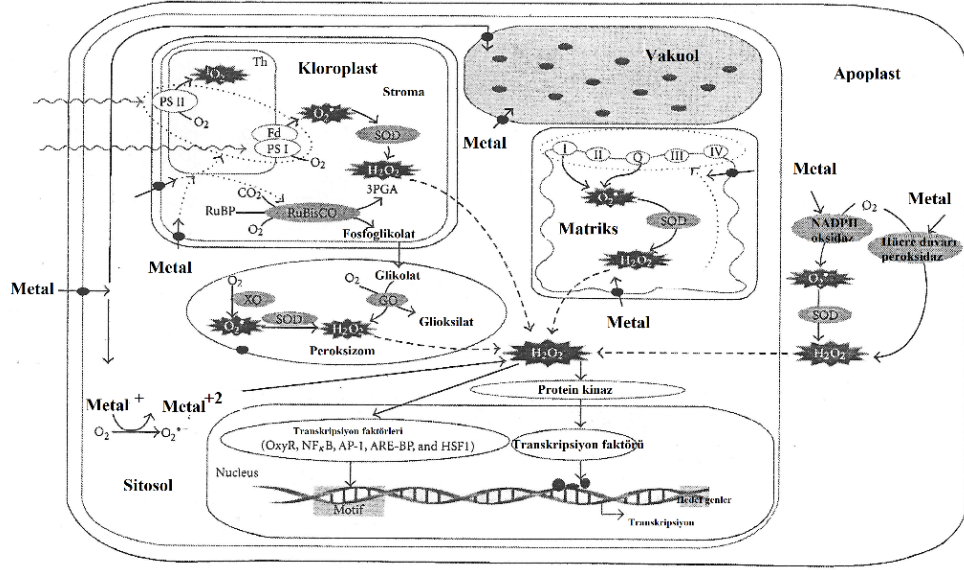
olanak sağlayacak mekanizmalara sahip olup metallerin kök dokularına girmesine ve taşınmasına izin vererek birikimi sağlarlar. Bu bitkilerin ekstrem bir grubu olan ‘Hiperakümülatör bitkiler’ ise çoğunlukla mineral toprakların endemik türleri olup (Raskin ve ark. 1997) toprak üstü organlarında, akümülatör olmayan bitkilerin metal konsantrasyonundan çok daha yüksek oranlarda ağır metalleri biriktirebilirler (Memon ve Schröder 2009). Hiperakümülatör kavramı ilk kez Brooks ve ark. (1977) tarafından 1000 mg kg⁻¹ kuru ağırlık (% 0,1)’tan daha fazla Ni içeren bitkileri ifade etmek için kullanılmıştır. Reeves (1992) ise doğal habitatında canlılığını sürdüren ve toprak üstü organlarında minimum 1000 mg kg⁻¹ kuru ağırlık Ni içeren bitkiyi Ni hiperakümülatörü olarak ifade etmiştir. Tanımdaki “doğal habitatında canlılığını sürdüren” ifadesi hiperakümülatörlerin kendi popülasyon sürekliliğini korumaya yetecek şekilde sağlıklı kaldığını ve bunu yaparken de hiperakümülatöre ulaşılması gerekliliğini belirtir (Van der Ent ve ark. 2013). Hiperakümülatör bitkilerin normal bir bitkiden 50-500 kez daha fazla metal absorblama yeteneğine sahip olmaları nedeniyle bu türlerin tanımlanması bitkilerle geri kazanım tekniğinin gelişmesine katkı sağlamaktadır (Lasat 2000). Bu amaçla çeşitli familyalara ait yaklaşık 500 bitki türü hiperakümülatör tür olarak tanımlanmıştır (Aksoy ve ark. 2015). Bu bitkilerin kirletilmiş alanlarda yaşamını devam ettirmesini sağlayan, metal biriktirme kapasitelerini belirleyen biyokimyasal ve moleküler özelliklerin ve süreçlerin ortaya konması, bitkilerle geri kazanım tekniğinin geliştirilmesi açısından önemlidir (Yang ve ark. 2005, Bhargava ve ark. 2012). Özellikle Brassicaceae familyasına ait *Alyssum* ve *Thlaspi* cinslerine ait çeşitli bitki türleri bu amaçla çeşitli yönleriyle ele alınmaktadır (Reeves ve Baker 2000, Verbruggen ve ark. 2009 vd.).

DalCorso ve ark. (2013)'a göre ağır metaller besin maddelerine benzerlikleri nedeniyle kökte absorpsiyon için rekabet ederek, sülfidril grupları ile (-SH) reaksiyona girerek, enzimler ve sinyal proteinleri için gerekli iyonlarla yer değiştirerek toksik etki gösterebilir. Örneğin; kromat (CrO₂⁻²) ve selenat (SeO₄⁻²) kimyasal olarak sülfat (SO₄⁻²) ile benzer olduğu için kök hücre membranlarından sülfat taşıyıcıları ile geçerek rekabete girerler (Schiavon ve ark. 2012). Cd, Pb, Hg ve As gibi ağır metaller proteinlerdeki sülfidril grupları ile kolayca reaksiyona girerler ve sistein kalıntıları ile bağlanarak enzimler dâhil çok sayıda proteinin yapı ve fonksiyonunu bozarlar (Quig 1998). Aynı zamanda proteinlerdeki karboksil (-COOH) grupları ile etkileşime girerek proteinlerin yapı ve fonksiyonlarını etkilerler (Sharma ve Dubey 2005). Buna ilaveten ağır metaller

belirli moleküllerdeki iyonlarla yer değiştirerek etki gösterebilir. Örneğin; çinko uygulanmış *Phaseolus vulgaris* bitkilerinde çinkonun Fotosistem II'deki magnezyum ile yer değiştirerek fotosentez üzerinde etkili olduğu ifade edilmiştir (Van Assche ve Clijsters 1986).

Bitkilerde ağır metal toksisitesini oluşturan en önemli mekanizmalardan birisi de reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunun uyarılmasıdır. Çünkü ağır metaller bitkiler için hücresel anlamda bir stres kaynağıdır. Bu kavram literatürde 'Oksidatif stres' olarak tanımlanır (Halliwell ve Gutteridge 1984, Shaw ve Rout 1998, Rodriguez-Serrano ve ark. 2006, Wang ve ark. 2010). Oksidatif stres, bitki hücrelerinde aktif oksijen moleküllerinin birikmesi sonucu meydana gelir ve bu moleküllere Reaktif Oksijen Türleri (ROS; Reactive Oxygen Species) denir. Singlet oksijen (1O_2), süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^-) reaktif oksijen türlerinin örnekleridir. Bitkilerde çeşitli ROS kaynakları bulunur. Bunlardan bazıları fotosentez ve solunum gibi normal metabolik süreçlerde gerçekleşen reaksiyonlardır. Bunlar aerobik metabolizmanın kaçınılmaz yan ürünleri olarak düşünülebilen ROS kavramı ile uyumlu reaksiyonlardır. NADPH oksidaz, amino oksidaz ve hücre duvarına bağlı peroksidazlar ise bitkilerde tanımlanmış diğer ROS kaynaklarıdır.

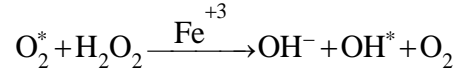
Normal gelişme koşullarında hücrelerde ROS üretimi düşüktür. Örneğin; kloroplastlardaki H_2O_2 'in kararlı seviyesi $0,5 \mu M$ civarındadır (Çakmak ve Marschner 1992). Çeşitli stres tipleri hücresel homeostazisi ROS üretimi ile bozar ve kloroplastlardaki H_2O_2 seviyesini $5-15 \mu M$ seviyesine yükseltir. Kuraklık ve tuz stresi, yüksek ışık, UV, mekanik stres, yaralanma, patojen saldırısı ve ağır metal stresi bunlar arasındadır. Ağır metallerce uyarılan stres varlığında ROS üretimi kloroplast, mitokondri ve peroksizomlarda gerçekleşir (Şekil 1.2.). Peroksizomal ksantinoksidaz ve NADPH'e bağımlı oksidaz aktivitesi O_2^- üretirken, glikolat oksidaz ve flavin oksidaz H_2O_2 üretir. Diğer taraftan plazma membranına bağlı NADPH oksidaz metal stresi koşullarında ROS üretimini gerçekleştirir (Sharma ve Dietz 2009, Hossain ve ark. 2012).



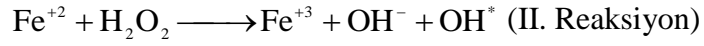
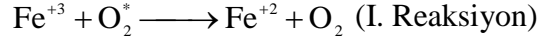
Şekil 1.2. Bitki hücrelerinin farklı organellerinde ağır metallerce uyarılan ROS oluşumu ve ROS tarafından uyarılan sinyal mekanizması (Sharma ve Dietz 2009, Hossain ve ark. 2012)

Stres varlığında artan ROS üretimi hücreler için bir tehdit oluşturabilir. Buna karşın ROS üretimi stres yanıt ve savunma mekanizmalarının uyarılması için bir sinyal olarak iş görür. Bu nedenle ROS hücrel stres indikatörü ve stres yanıtı/sinyal transdüksiyon yollarında sekonder haberciler olarak kabul edilebilir. Aşırı ROS birikimi ise membran lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, enzim inhibisyonu, DNA ve RNA hasarı gibi oksidatif süreçler yolu ile hücre ölümüne neden olabilir (Navari-Izzo 1998, Dixit ve ark. 2001, Tripathi ve Gaur 2004, Gratão ve ark. 2008, Barconi ve ark. 2011, Azevedo ve ark. 2012, Gallego ve ark. 2012).

Membran lipidlerinin peroksidasyonu yüksek konsantrasyonlarda reaktif oksijen türlerinin neden olduğu toksik etkilerin başında gelir (Van Assche ve Clijsters 1990, Mazhoudi ve ark. 1997, Sandalio ve ark. 2001). Buna Fenton/Haber-Weiss reaksiyonları üzerinden meydana gelen hidroksil radikalleri (OH^*) de neden olabilir (Mittler 2002). Redoks aktif metaller (Fe, Cu, Cr, Co ve V) aktif olmayan metallerin aksine (Cd^{+2} ve Zn^{+2}) hücrede redoks reaksiyonlarını gerçekleştirebilir (Örneğin; $\text{Fe}^{+2} \leftrightarrow \text{Fe}^{+3} + \text{e}^-$). Bunlar Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları ile OH^- oluşumunu sağlarlar (Çakmak 2000, Michalak 2006, Broadley ve ark. 2012).

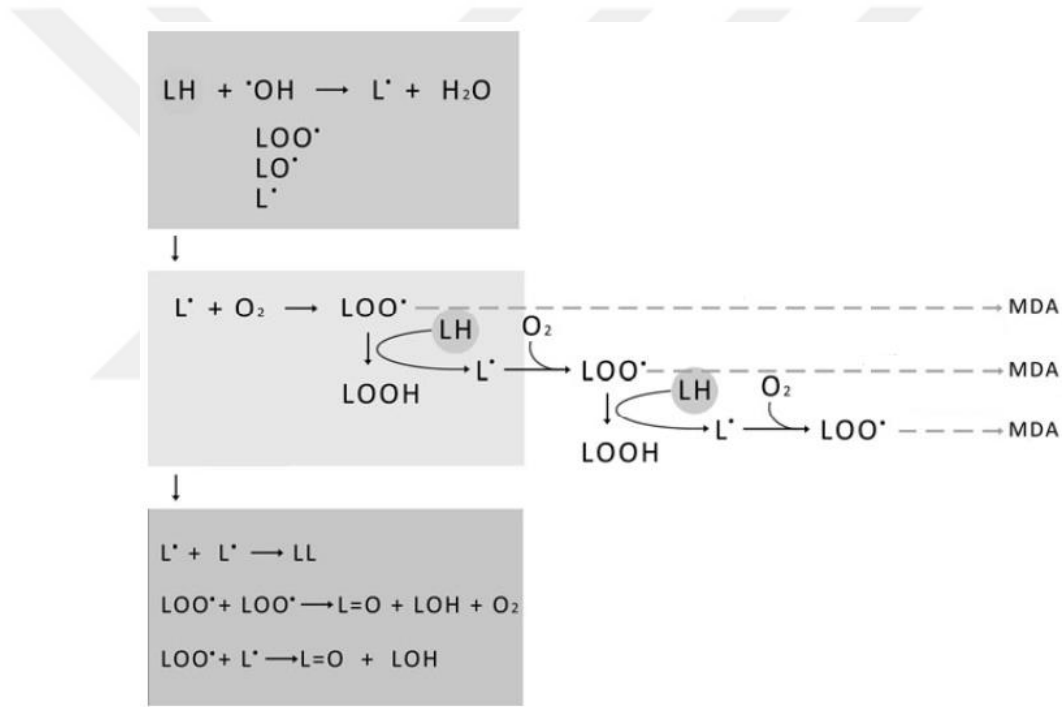


Haber-Wiess reaksiyonları (Michalak 2006)



Fenton Reaksiyonları (Çakmak 2000)

Lipid peroksidasyonu üç aşamadan oluşan bir zincir reaksiyonu içerir (Şekil 1.3.) ve lipoksigenaz (LOX) aktivitesinin ağır metaller tarafından uyarılışı ile ilişkilidir.



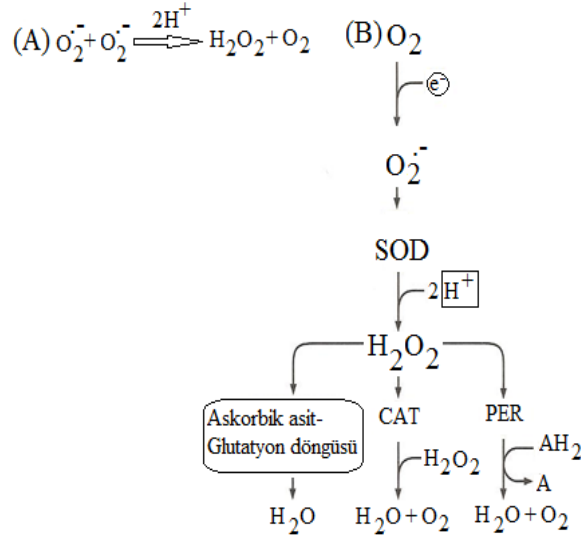
Şekil 1.3. Lipid peroksidasyon basamakları (Syta ve ark. 2013). (LH: Doymamış yağ asitleri, L=O: alfa okso yağ asiti, L*: Alkan radikali, LO*: alkoksi radikali, LOO*: peroksi radikali, LOOH: yağ asit peroksit, LL: yağ asidi dimeri; LOH: alfa hidroksi yağ asidi, MDA: malondialdehit, *OH: hidroksil radikali, TBA: tiobarbiturik asit)

Lipid peroksidasyonunda, bu radikaller plazma ve hücrelerarası membranlarda yer alan lipidlere etki edip LOX enzimini uyararak doymamış yağ asitlerindeki metilen (-CH₂-) gruplarından bir hidrojen atomunun ayrılmasına neden olur. Bu durumda karbon atomu çift bağ oluşturma eğilimi gösterir. Böylece membran lipidleri çoklu doymamış yağ asiti zincirlerini meydana getirir. Sonuç olarak lipid radikalleri ve reaktif aldehydler meydana gelir ve membranlar yapısal olarak zarar görür (Liu ve ark. 2004, Mishra ve ark. 2006,

Gajewska ve Sklodowska 2010). Lipid peroksidasyonu ile oluşan membran hasarı ise oluşan tiobarbiturik asit reaktif madde (TBARS) içeriği ya da malondialdehit (MDA) içeriği ile tayin edilir (Sytar ve ark. 2013). Reaktif oksijen türlerinin membranlarda meydana getirdiği bir diğer hasar da membran iyon kanallarında (K^+ ve Na^+) oluşan değişimdir. İyon kanallarının her biri farklı bir gen tarafından kontrol edilir (Demidchik ve ark. 2014). Reaktif oksijen türleri bu kanalların açık ya da kapalı olma durumunu etkileyerek hücrede iyon kaybının yaşanmasına ve hücre membran geçirgenliğinin artmasına neden olur.

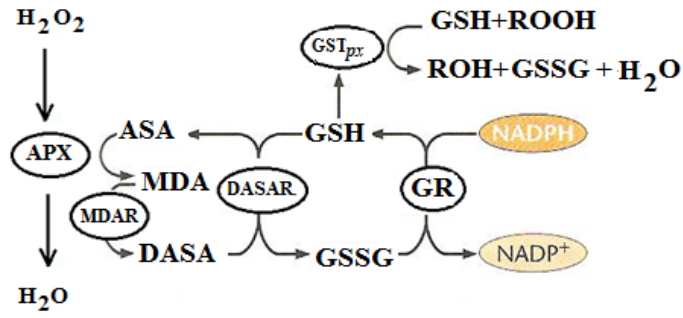
Reaktif oksijen türlerinin hücre içindeki zararlarının ortadan kaldırılmasında bitkiler, 'antioksidatif ya da antioksidant sistem' adı verilen etkili bir savunma sistemine sahiptir (Shaw ve ark. 2004, Kim ve ark. 2008). Bu sistem enzimatik ve enzimatik olmayan iki mekanizma ile düzenlenmektedir Enzimatik olmayan (non-enzimatik) antioksidatif sistemde glutasyon, sistein, hidroksiquinon, askorbat (C vitamini), α -tokoferol, karotenoid pigmentleri, alkaloidler gibi küçük moleküler ağırlıklı antioksidanlar rol alır (Larson 1988). Enzimatik sistemde ise, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POX), askorbat peroksidaz (APX), glutasyon redüktaz (GR), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) ve dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) gibi reaktif oksijen türlerini zararsız hale getiren enzimler (Şekil 1.4.) bulunmaktadır (Shaw ve ark. 2004, Smith ve ark. 2010). Bu enzimler ve metabolitler ağır metal stresi altında bitkinin hayatta kalması ve ortama adaptasyonunda önemli rol oynamaktadır.

Enzimatik antioksidatif sistemde yer alan süperoksit dismutaz (SOD; EC.1.15.1.1) enzimi, süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit (H_2O_2) ve O_2 'ye dönüştürülerek bertaraf edilmesinde ilk basamağı oluşturur (Şekil 1.4.). Bu enzim tüm aerobik organizmalarda ve oksidatif stresin gerçekleştiği tüm hücresel kısımlarda bulunmaktadır. Enzimin aktif bölgesinde Fe, Mn, Cu gibi metallere en az bir tane bulunur.



Şekil 1.4. Reaktif oksijen radikalinin SOD enzimi ile zararsız hale getirilme aşaması (A) SOD enziminin süperoksit radikalini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürmesi (B) Reaktif oksijen radikallerinin zararlı hale getirilmesinde enzimatik antioksidatif mekanizmada yer alan enzimlerin rolünü gösteren şema (Smith ve ark. 2010)

SOD enziminin canlı organizmaya ve hatta organizmanın sahip olduğu organellere göre farklı izoformları bulunmaktadır. Örneğin, Cu/Zn SOD bitki, hayvan ve mantarlarda bulunur. MnSOD, ökaryotlarda bulunan mitokondriyal bir enzimdir. FeSOD ise bazı bitkilerin kloroplastlarında ve prokaryotik organizmalarda bulunmaktadır. SOD enzimini kodlayan genler çevresel strese oldukça duyarlı olup stres koşullarındaki değişim SOD aktivitesindeki azalış ya da artış ile gözlemlenebilir. Böylece SOD aktivitesi ile ortadan kaldırılan süperoksit radikalleri, yine bir toksik radikal olan H_2O_2 oluşumuna neden olmaktadır. Bu radikalın bertaraf edilmesinde ise CAT (EC.1.11.1.6) ve APX (EC 1.11.1.11) gibi peroksidazlar yer alır (Dixit ve ark. 2001). Aşırı miktarlarda biriken H_2O_2 radikalleri CAT ve APX tarafından bertaraf edilmezse, SOD enzimini kodlayan genlerin ifadesini engelleyip enzim aktivitesini de azaltabileceği çeşitli çalışmalarda ifade edilmektedir (Yang ve ark. 1996, Dixit ve ark. 2001, Wang ve ark. 2009). Nitekim mitokondri ve kloroplastlar H_2O_2 'in ana kaynağıdır ve bu toksik radikallerin organellerden sitosole kontrolsüz geçişinden dolayı bertaraf edilmesi mutlak gereklidir. APX enzimi askorbat-glutasyon döngüsü üzerinden H_2O_2 'in suya (H_2O) dönüşmesini sağlamaktadır (Şekil 1.5.). Bu döngüde elektron verici olarak askorbat kullanılır.



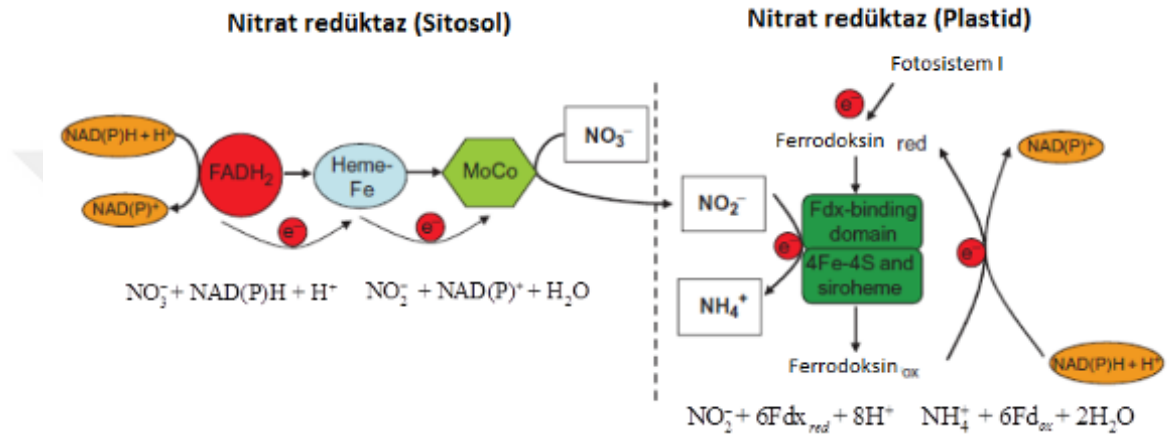
Şekil 1.5. Askorbat-glutasyon döngüsü ASA: Askorbat, MDA: Monodehidroaskorbat, DASA: Dehidroaskorbat, GSH: İndirgenmiş glutasyon, GSSG: Oksitlenmiş glutasyon, APX: Askorbat peroksidadz, MDAR: monodehidroaskorbat redüktaz, DASAR: Dehidroaskorbat redüktaz, GR: glutasyon redüktaz, GST_{px}: Peroksimal glutasyon 5-transferaz (Smith ve ark. 2010)

APX enzimi, kloroplastlardaki H₂O₂'in ortadan kaldırılmasında temel olup (Caverzan ve ark. 2012), mitokondri ve peroksizomlarda ise CAT enzimi önemli rol oynamaktadır (Gupta ve ark. 2009). Fakat APX enziminin kloroplast, mitokondri, peroksizom ve sitosol gibi farklı hücresel kısımlarda farklı izoformlarının bulunduğunu (Caverzan ve ark. 2012) ve APX'un substrata olan eğiliminin CAT'dan daha fazla olduğunu belirten çalışmalar da vardır (Siedlecka ve Krupa 2002).

Ağır metallerin bitkilere etkisi sadece oksidatif stres ve bununla ilişkili olan antioksidatif enzimlerin etkenliği üzerindeki etkileri ile sınırlı değildir. Azot asimilasyonu gibi bitkilerin temel metabolik süreçleri de bu süreçlerde rol alan enzimlerin etkenliğinin değişmesine bağlı olarak ağır metallerin artan düzeylerinden etkilenirler. Azot, bitkilerin ihtiyaç duyduğu besin elementlerinin başında gelir ve bitki kuru ağırlığının %1,5-2'sini oluşturur (Frink ve ark. 1999). Tarım topraklarının çoğunda nitrat (NO₃⁻) bitkilerin temel azot kaynağıdır (Hirsch ve Sussman 1999). Azot bitkiler tarafından genelde nitrat (NO₃⁻) formunda alınmaktadır ve temel fonksiyonların yerine getirilmesi için kökler ile alınan nitratın öncelikle nitrite, sonra da amonyağa indirgenmesi gerekmektedir. Nitratın amonyağa indirgenmesinde sırasıyla Nitrat Redüktaz (NR) ve Nitrit Redüktaz (NiR) aktif rol oynamaktadır. Bu nedenle NR ve NiR, azot metabolizmasının önemli iki enzimidir (Beever ve Hageman 1983, Solomonson ve Barber 1990, Marschner 1995, Solanki ve Dhankhar 2011).

NR, nitrat varlığına oldukça duyarlıdır. Bu nedenle NR aktivitesinin bitkinin bulunduğu habitatın nitrat içeriğini yansıttığı öne sürülmektedir (Lee ve Stewart 1978, Güteryüz ve

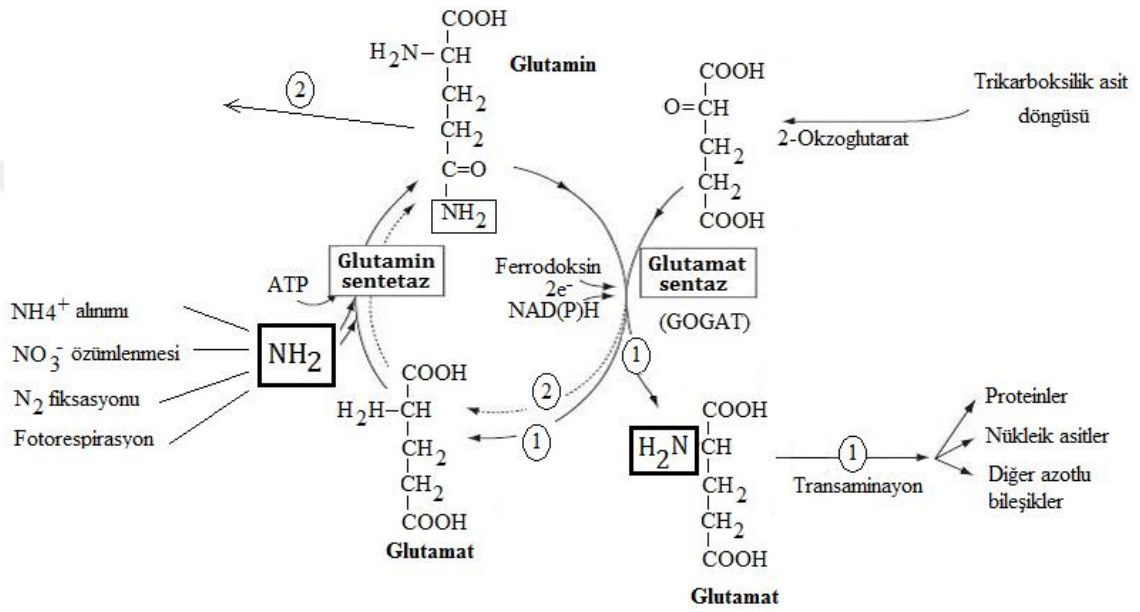
Arslan 1999). Bu özelliğinden dolayı NR aktivitesi, ekolojik çalışmalarda nitrat varlığının bir indikatörü olarak kabul edilmektedir (Högberg ve ark. 1986, Gebauer ve ark. 1988, Lodhi ve Ruess 1988, Olson ve Falkengren-Grerup 2003, Arslan ve Güleriyüz 2005). Ağır metallerin etkisiyle nitrat alınımında meydana gelen sorunlar NR aktivitesinin azalmasına neden olmaktadır (Solanki ve Dhankhar 2011). NR, azot metabolizmasındaki temel işlevi nitratın nitrite indirgenmesini katalize etmektir ve bu işlem sırasında elektron verici olarak NADH kullanılmaktadır (Şekil 1.6.).



Şekil 1.6. Nitrat asimilasyonunda nitrat redüktaz (NR)'in rolü ve yapısı (Marschner 2012)

Ağır metallerin etkisiyle yeterli miktarda metabolik enerji kaynaklarının üretilmemesi NR işlevini de olumsuz etkiler. Ayrıca NR yapısında Mo, Fe, hem ve FAD bulunmakta olup enzimin aktif bölgesinde -SH grubu yer almaktadır. Ağır metallerin etkisi ile Mo, Fe gibi iz elementlerin alınımının engellenmesi bu enzimlerin yapısının bozulmasına neden olabilir. Ayrıca ağır metal stresi altında bitkilerde -SH fonksiyonel grupları arasında disülfid köprülerinin oluşumundan dolayı NR'ın yapısı da bozulabilir (Dubey ve Pessaraki 2002, Xiong ve ark. 2006, Gajewska ve Sklodowska 2009). NiR ise toksik özelliğe sahip olan nitritin amonyağa indirgenmesinden sorumludur. Bu indirgenme olayı ferredoksin bağımlıdır. NiR yaprakta kloroplastlarda, köklerde ise plastidlerde bulunmaktadır. 60-64 kDa ağırlığında bir protein molekülünden oluşur ve aktif merkezinde 4Fe-4S içermektedir. Işık ve nitritin varlığı NiR aktivitesini uyarırken, karbonhidrat, amino asit, glutamat, glutamin ve asparginin varlığının NiR aktivitesini engellediği belirtilmektedir (Singh 1997).

Bitkilerin azot beslenmesinde rol oynayan bir diğer enzim de glutamin sentetaz (GS)'dir (Zheng-Xun ve ark. 2007). Azot fiksasyonu sonucu meydana gelen amonyağın asimilasyonunu gerçekleştiren GS, glutamatın amonyak ile reaksiyonunu kataliz ederek glutamin oluşturur. Bu sırada da enerji kaynağı olarak ATP kullanır (Marquez ve ark. 2005). Oluşan glutaminin tekrar glutamata dönüşmesinden ise glutamat sentaz (GOGAT) sorumludur (Gajewska ve Sklodowska 2009). Sonuç olarak GS/GOGAT döngüsü ortaya çıkmaktadır (Şekil 1.7.).



Şekil 1.7. Glutamin sentetaz–Glutamat sentaz (GS/GOGAT) döngüsü üzerinden amonyum asimilasyonunun şeması (Marschner 2012)

GS/GOGAT döngüsü, metabolik enerji kaynaklarının kullanıldığı bir döngüdür. Bu döngü ile bitkilerin ihtiyaç duyduğu azot kaynağı, glutamin ve glutamat şeklinde sağlanır. Bu moleküllerden de diğer amino asit ve protein yapıları meydana gelmektedir (Zheng-Xun ve ark. 2007, Moschou ve ark. 2012). Ağır metal stresi altında bitkilerde ATP ya da NAD(P)H gibi metabolik enerji kaynaklarının yeterli düzeyde üretilmemesi, GS ve GOGAT aktivitesini olumsuz yönde etkileyebilir (Gajewska ve Sklodowska 2009, Gajewska ve ark. 2009). Ayrıca bu gibi enzimlerin katalitik aktivitesi için Cu gibi metal iyonlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Ağır metallerin etkisi ile Cu, Fe gibi iz elementlerin alınımının engellenmesi bu enzimlerin yapısının bozulmasına neden olabilir. Bu nedenle azot asimilasyonunun önemli bir aşaması olan GS/GOGAT döngüsünde yer alan enzimlerin aktivitesi etkilenmektedir. Aynı zamanda ağır metallerin, amonyağın

GS/GOGAT döngüsüne girmesine engel olarak gerekli yapısal bileşiklerin oluşumunu engellediği bilinmektedir (Balestrasse ve ark. 2006, Li ve ark. 2007).

Ayrıca azot metabolizmasında yer alan bu enzimlerin zarar görmesi, bitkilerde amonyak ya da nitrat birikimi gibi olumsuz etkilere neden olur. Çünkü bu enzimler birikimi zararlı olabilecek bileşiklerden bitkiyi koruyarak biyolojik bir kontrol mekanizması oluşturur (Hageman ve Flesher 1960). Ağır metallere bitkiler arasındaki etkileşimler çok çeşitli yönleriyle ele alınmış olmasına rağmen bu çalışmalar çoğunlukla kültür türleri ile sınırlıdır. Antropojenik etkenliklerle ağır metal kirliliğinin artma eğiliminde olduğu düşünüldüğünde özellikle doğal bitki türlerinin ağır metallere verdiği yanıtların ortaya konarak metallere toleranslı türlerin belirlenmesi hem bitki fizyolojisi açısından ağır metallere ilgili veri tabanının oluşturulması hem de bitkilerle geri kazanım tekniği açısından önemlidir.

Verbascum olympicum Uludağ'ın hem sub-alpin hem de alpin kuşağındaki yol ve bina yapımı, kayak pisti açılması, maden işletmeciliği (Etibank wolfram madeni) gibi etkenlerle bozulan alanlarda gelişen ruderal bitki topluluğunun önemli türlerinden olup öncül tür (pioneer) olarak tanımlanmıştır (Ellenberg 1988, Rehder ve ark. 1994). Bu türler insan etkisinin yoğun olduğu alanlara adapte olmuştur ve bu alanlarda doğal bitki örtüsünün tekrar gelişmesi sürecinde öncü rol oynar (Ellenberg 1988). Ayrıca diğer bitkilere göre daha yüksek nitrat özümleme kapasitesine sahiplerdir. Bu nedenle bu türler "Nitrofilik türler" olarak da isimlendirilir (Marschner 1995). Bozulmuş alanlarda, topraktaki nitratın bitki bünyesine alınarak, ekosistemden bu azot kaybının önlenmesi kararlı bir ekosistemin oluşması bakımından önemlidir (Güleryüz ve ark. 2008). *V. olympicum*'un nitrat özümleme ve organik madde biriktirme kapasitesinin yüksek olduğu önceki çalışmalarda tespit edilmiştir (Güleryüz ve Arslan 1999, 2001). Ayrıca ağır metal biriktirme özellikleri arazi koşullarında araştırılmış olup Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn metalleri için biyoindikatör olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Güleryüz ve ark. 2006, Arslan ve ark. 2009). *V. olympicum*'un hızlı büyüme, yüksek azot özümleme yeteneği ve ağır metalleri biriktirme özellikleri bu türün bozulmuş alanlarda ağır metal kirliliğinin izlenmesi (biomonitöring) ve ağır metalce kirlenmiş alanların tekrar geri kazanılmasına aday bir tür olabileceği fikrini ortaya koymaktadır.

Bu nedenle çalışmamızda *V. olympicum*'un ağır metal toleransı ve bozulmuş alanlarda dominant tür olma özelliğinin azot metabolizması ve antioksidatif savunma mekanizması ile olan ilişkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla laboratuvar koşullarında farklı konsantrasyon ve sürelerle gerçekleştirilen Cd, Cr, Cu, Ni ve Zn uygulamalarının bu türün azot metabolizması ve antioksidatif savunma sistemi enzimlerinin aktivitesi (NR, GS, SOD, AP ve CAT) üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Ayrıca, metal uygulamalarına bağlı olarak biyokütle, su ve klorofil içeriği, lipid peroksidasyonu, iyon sızıntısı ve hücre membran zararındaki değişimler tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar hem türün artan ağır metal konsantrasyonuna bağlı olarak verdiği temel fizyolojik yanıtların hem de Uludağ'da bozulmuş alanlarda sekonder süksesyona sürecindeki rolünün ortaya konması açısından temel veriler sağlayacaktır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Ağır metal kirliliği günümüzde yaygın çevresel problemlerden biridir. İnsan kaynaklı faaliyetler nedeniyle toprakta giderek artan ağır metal konsantrasyonları hem bitkiler tarafından alınımı ve besin zincirine girmeleri hem de çeşitli ekosistemlerde birikimi nedeniyle büyük bir çevresel tehdit oluşturmaktadır. Özellikle Cd, Cu, Cr, Hg, Ni, Pb ve Zn gibi ağır metallerin insan kaynaklı faaliyetler nedeniyle doğada aşırı miktarlarda biriktiği ve bu birikimin bitkilerde strese neden olduğu vurgulanmaktadır. Bu ağır metallerin bitkiler üzerindeki etkilerine yönelik çalışmalar gün geçtikçe önem kazanmaktadır.

Fernandes ve Henriques (1991) tarafından yapılan bir derleme çalışmasına göre bitkiler toksik (>20 mg/g Kuru Ağırlık) Cu konsantrasyonlarına oldukça duyarlıdır ve bu konsantrasyonlar, büyümenin engellenmesi başta olmak üzere hücre membran bütünlüğünün bozulmasına, fotosentez, solunum gibi bitkinin temel metabolik süreçlerinde sorunlara neden olabilmektedir. Ayrıca bu çalışmada, alglerin ve sucul bitkilerin Cu konsantrasyonlarından daha kolay etkilendikleri ifade edilmiştir.

Prasad (1995)'in derleme çalışmasında ise yaygın ağır metallere biri olan Cd'un bitkinin çeşitli metabolik fonksiyonları üzerinde toksik etkiler meydana getirdiği, buna bağlı olarak düşük konsantrasyonlarda bile fotosentez, stomaların fonksiyonu, su dengesi, karbonhidrat metabolizması ve bu metabolik yollarda yer alan enzim aktivitelerinde olumsuz etkilere neden olduğunu belirtilmiştir.

Ye ve ark. (1997) tarafından gerçekleştirilen çalışmada ekstrem çevrelere adapte olmuş bir tür olan *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel (Kamış) bitkisinin farklı popülasyonlara ait bireylerine Cd, Pb ve Zn uygulamalarının ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ Cd, $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ Pb, $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ Zn) yapıldığı belirtilmiştir. Buna bağlı olarak bitki bünyesindeki metal birikimi ve tolerans mekanizması incelenmiş, metal toleransı bakımından popülasyonlar arasında bir fark olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre her üç metal uygulamasında da konsantrasyonlar arttıkça kök ve dal uzunluğunda ve kuru ağırlıkta azalış meydana geldiği ifade edilmiştir. Cd uygulamasının *Phragmites australis*'in tüm popülasyonlarında köklerde daha fazla biriktiği ve Cd'a verilen yanıtlar bakımından popülasyonlar arasında önemli bir fark görülmediği belirtilmiştir. Zn'nun da Cd uygulamasında gözlenen yanıtlara benzer olarak

dallardan daha ziyade kök kısımlarında biriktiği ve popülasyonlar arasında farklılık gözlenmediği açıklanmıştır. Pb'nin ise diğer metallere farklı olarak dallarda biriktiği vurgulanmış olup Pb'ye verilen yanıtlar bakımından popülasyonlar arasında farklılıklar gözlemlendiği ifade edilmiştir.

Mazhoudi ve ark. (1997) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise *Lycopersicon esculentum* Mill. (Domates) bitkisinin antioksidan enzim sisteminde 50 µM Cu konsantrasyonunun etkileri araştırılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre, Cu uygulamasına bağlı olarak büyümenin azaldığı, Cu birikiminin köklerde daha fazla olduğu ve tüm bitki kısımlarında (kök, yaprak ve dallar) lipid peroksidasyonunun arttığı belirtilmiştir. Bununla birlikte antioksidatif savunma sistemi enzimlerinden CAT aktivitesinin köklerde azaldığı, yaprak ve dallarda ise değişikliğe uğramadığı ifade edilmiştir. APX aktivitesinin ise kök ve dallarda değişmediği, yapraklarda ise azaldığı ifade edilmiştir. Ayrıca GPX aktivitesinin sadece kök ve dallarda arttığı, yapraklarda ise değişmediği belirtilmiştir.

Kevresan ve ark. (1998) tarafından *Beta vulgaris* L. (Şeker pancarı) bitkisinde yapılan bir çalışmada, aynı koşullarda yetiştirilen şeker pancarı fidelerine 12-16 gün boyunca 10^{-4} , 10^{-2} ve 1 mM konsantrasyonlarında ayrı ayrı Ni, Cd ve Mo uygulaması yapılmıştır. Ardından bitkinin yaprak kısımlarındaki nitrat içeriği, nitrat redüktaz (NR) ve glutamin sentetaz (GS) aktiviteleri, eriyebilir protein içeriği ve ribuloz-1,5 bifosfat karboksilaz/oksijenaz (RuBPCO)'ın miktarında meydana gelen değişimler belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre, uygulanan tüm metallerin kuru ağırlığı azalttığı tespit edilmiştir. Özellikle de en yüksek konsantrasyondaki Mo uygulamasında (1 mM) kuru ağırlıkta yaklaşık % 25 oranında bir azalış meydana geldiği açıklanmıştır. Ayrıca Ni ve Cd konsantrasyonları arttıkça nitrat içeriğinin ve NR aktivitesinin azaldığı ifade edilmiştir. Mo uygulamasında ise sadece en yüksek konsantrasyonda (1 mM) bitkinin yapraklarındaki nitrat içeriğinin arttığı, diğer konsantrasyonlarda ise nitrat içeriğinin kontrole göre düşük olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, NR aktivitesinin Mo konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak arttığı gösterilmiştir. Azot metabolizmasına ait diğer analizlerde ise Ni konsantrasyonları arttıkça GS aktivitesi ve protein içeriğinin azaldığı belirtilmiştir. Cd uygulamasında da GS aktivitesi ve protein içeriği bakımından nikel benzer yanıtlar elde edildiği ifade edilmiştir. GS aktivitesi ve protein içeriğinin konsantrasyonlardaki artışa bağlı olarak sadece Mo uygulamasında arttığı vurgulanmıştır. Buna göre, şeker pancarı yapraklarında en zararlı etkiyi Cd'un oluşturduğu belirtilmiştir.

Gerendás ve ark. (1999) ise bitki büyümesi ve metabolizmasında nikelin önemini vurgulamak amacıyla iki farklı azot kaynağında (üre ve amonyum) yetiştirilen *Cucurbita pepo* L. (Sakız kabağı) ve *Glycine max* L. (Soya fasulyesi) bitkilerinde Ni varlığı ve yokluğunun etkisini gözlemlemiştir. Buna göre tek azot kaynağı olarak üreyi kullanan kabak bitkisinde Ni eksikliğinde üreaz aktivitesinin düştüğünü ve ürede var olan azotun bitki tarafından etkin bir şekilde kullanılmadığı belirtilmiştir. Bu durumun bitkide fizyolojik N eksikliğine yol açtığı, sonuç olarak da bitki büyümesinin azaldığı ifade edilmiştir. Ayrıca Ni eksikliği nedeniyle üreaz enziminin inaktif olmasının bitkilerde üre birikimine ve amino asit stoklarının azalmasına neden olduğu, beraberinde arginaz ve GS aktivitesinin de azaldığı belirtilmiştir. Ayrıca 0,05 µM Ni uygulamasında bitkide N eksikliğinde gözlenen semptomlara benzer belirtiler meydana geldiği, membran yapısı ve fonksiyonunun zarar gördüğü ifade edilmiştir. Bu nedenle bu grup bitkilerde optimum büyüme için gerekli Ni ihtiyacının diğer bitkilere göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Azot beslenmesinde mineral N kullanan bitkilerde ise ürenin metabolik yıkımı gerçekleşmediği için düşük konsantrasyonlarda Ni varlığının yeterli olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca Mo'in, nikelin bitkilerin azot metabolizmasındaki fonksiyonuna benzer bir role sahip olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte Ni içeriğinin yüksek olduğu topraklarda ve serpentin topraklarda yetişen bitkilerde tespit edilen Ni içeriğinin diğer bitkilere oranla yüksek olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca Ni'in bitki hücresine alınımında Cu^{+2} , Co^{+2} ve Zn^{+2} ile antagonistik etkiye sahip olduğu, Ca^{+2} ve Mg^{+2} un ise Ni alınımında herhangi bir rekabeti olmadığı belirtilmiştir.

Tan ve ark. (2000)'nin çalışmasında ise nitrat ya da üre olmak üzere iki farklı azot kaynağında yetiştirilen *Lycopersicon esculentum* Mill. (Domates) bitkisine farklı konsantrasyonlarda (0,01, 0,1 ve 1 mg/L) nikel uygulaması yapılmış olup, bitkinin azot metabolizması üzerinde nikelin etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonuçlarında, farklı konsantrasyonlarda uygulanan Ni'in azot kaynağına bağlı olmaksızın bitkideki nikel içeriğini arttırdığı ifade edilmiştir. Azot kaynağı olarak üreyi kullanan bitki örneklerinde artan nikel konsantrasyonları ile birlikte ürenin toksik etkisinin azaldığı tespit edilmiştir. Azot kaynağı olarak nitratı kullanan bitki örneklerinde Ni'in kök ve dalların kuru ağırlığında herhangi bir etkisi görülmezken N kaynağı olarak üreyi kullanan bitki örneklerinin kuru ağırlığında sadece en yüksek Ni konsantrasyonunda (1 mg/L) önemli bir azalış olduğu ifade edilmiştir. Yapraklardaki klorofil içeriğinde ise, nitratı kullanan

bitki örneklerinde Ni'in hiçbir etkisinin görülmediği belirtilmiştir. Üreyi kullanan bitki örneklerinde, 0,1 mg/L konsantrasyonuna kadar klorofil içeriğinde bir artış tespit edildiği, en yüksek Ni konsantrasyonunda ise klorofil içeriğinin azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca nitratı kullanan örneklerde belirlenen total N, amonyum ve nitrat içeriğinin Ni konsantrasyonlarından etkilenmediği, üreyi kullanan örneklerde ise total N ve amonyum içeriğinin artan Ni konsantrasyonlarıyla birlikte arttığı, üre içeriğinin ise azaldığı belirlenmiştir. Nitrat içeriğinde ise hiçbir değişiklik olmadığı ifade edilmiştir.

Panković ve ark. (2000)'nın çalışmasında, kontrollü koşullarda ve farklı azot konsantrasyonlarında (2, 7,5, 10 μ M N) yetiştirilen *Helianthus annuus* L. (Ayçiçeği) bitkisine 17 gün boyunca 0,5, 2 ve 5 μ M Cd uygulanmış, ardından büyüme, fotosentez ve protein içeriğinde meydana gelen değişimler açıklanmıştır. Buna göre farklı azot konsantrasyonlarında yetiştirilen fidelerin yapraklarında belirlenen fotosentez oranının 0,5 ve 2 μ M Cd uygulamasında değişmediği belirtilmiştir. 5 μ M Cd uygulamasında ise her üç N konsantrasyonunda yetiştirilen fidelerde de fotosentetik aktivitede kontrole göre belirgin bir azalış olduğu ifade edilmiştir. Bununla birlikte 7,5 μ M azot içeriğinin ayçiçeği bitkisinin büyümesinde optimum etki yarattığı ve protein içeriğinin bu konsantrasyondaki N uygulamasında maksimum değere ulaştığı vurgulanmıştır. Sonuç olarak optimum azot beslenmesinin (7,5 μ M N) Cd' un olumsuz etkisini ortadan kaldırmada etkili olduğu ifade edilmiştir.

El-Shintinawy ve El-Ansary (2000) ise 10 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda (5, 50, 100 ve 200 μ M) Cd ve Ni'in *Glycine max* L. (Soya fasulyesi) amino asit metabolizması ile kuru ve yaş ağırlık üzerindeki etkisini incelemiştir. Buna göre artan Cd ve Ni konsantrasyonlarının kök ve dalların kuru ve yaş ağırlığında azalışa neden olduğu ifade edilmiştir. Uygulanan her iki metalde de köklerde taze ağırlığın azaldığı ve sonuçların birbirine benzer olduğu vurgulanmıştır. Dallarda ise Ni uygulamalarının taze ağırlığın azalışında daha etkili olduğu gösterilmiştir. Kuru ağırlıkta ise hem kök hem de dallarda Ni'in Cd'dan daha fazla azalışa neden olduğu vurgulanmıştır. Eriyebilir ve total protein içeriğinde Cd ve Ni' in 200 μ M konsantrasyonunun benzer bir inhibisyona neden olduğu gösterilmiştir. NR aktivitesinde ise her iki metalin de kontrole göre bir azalışa neden olduğu fakat Cd' un bu azalışta NR aktivitesi üzerinde daha etkili olduğu belirtilmiştir. Uygulanan konsantrasyonlar arasında yalnızca 200 μ M Cd'un amino asit içeriğinde

azalışa neden olduğu, aynı konsantrasyondaki Ni' in ise amino asit içeriğini arttırdığı tespit edilmiştir.

Cd'un nitrat asimilasyonunda görev alan enzimler (NR ve NiR, GS ve GOGAT) üzerindeki etkisini ortaya koymayı amaçlayan Gouia ve ark. (2000), *Phaseolus vulgaris* L. cv. Morgane (Fasulye) bitkisinde 50 ve 100 µM Cd'un kısa (24 saat) ve uzun (7 gün) dönemli etkisini araştırmıştır. Buna göre bitkinin su, nitrat ve amonyum içeriğini, NR ve NiR, GS ve GOGAT aktivitesini ve solunum oranını belirlemiştir. Araştırma sonuçlarında her iki Cd konsantrasyonunun da bitkide solunum oranını, su içeriğini ve nitrat alınımını azalttığı, bu azalışın artan Cd konsantrasyonları ile orantılı olduğu belirtilmiştir. NR aktivitesinin artan Cd konsantrasyonlarıyla birlikte kısa ve uzun dönemli uygulamaların her ikisinde de azaldığı, bu azalışın özellikle köklerde daha belirgin olduğu ifade edilmiştir. Amonyum içeriğinin ise artan Cd konsantrasyonlarıyla paralel olarak arttığı, özellikle de köklerde belirlenen amonyum içeriğinin daha fazla olduğu vurgulanmıştır. GS ve GOGAT aktivitesinde artan Cd konsantrasyonları ve uygulama süresinin artışıyla paralel bir azalış olduğu belirtilmiştir.

Lorens ve ark. (2000) ise laboratuvar koşullarında yetiştirilen *Vitis vinifera* L. (Asma) bitkisine iki ay boyunca 0,07, 1, 2 ve 5 µg/g konsantrasyonlarında Cu uygulaması gerçekleştirmiş olup bitkinin azot metabolizması üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Buna göre amonyum, nitrat, nitrit, amino asit ve protein içerikleri ile azot metabolizmasında yer alan NR, NiR, GS, glutamat sentaz ve glutamat dehidrojenaz gibi önemli enzimlerin aktiviteleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlarda uygulanan tüm Cu konsantrasyonlarının hem kök hem de yapraklarda nitrat, nitrit, aminoasit ve protein içeriğinde, NR ve NiR aktivitelerinde azalışa neden olduğu belirtilmiştir. Ayrıca yaprak kısımlarında belirlenen azot metabolizmasına ait parametrelerin kök kısımlarına göre Cu uygulamalarından daha fazla etkilendiği vurgulanmıştır. Bununla birlikte kök kısımlarında belirlenen glutamat dehidrojenaz aktivitesinin, GS ve glutamat sentaz aktivitelerine göre daha yüksek değerlerde tespit edilmesinden dolayı köklerde glutamat dehidrojenaz enzimi üzerinden azot asimilasyonunun gerçekleştiği ifade edilmiştir.

Monni ve ark. (2000) tarafından yapılan bir çalışmada kontrollü koşullarda yetiştirilen *Calluna vulgaris* (L.) Hull. (Süpürgeotu) bitkisine 1, 10, 22, 46 ve 100 mg/L Cu konsantrasyonları uygulanmış, buna göre bitkinin büyümesinde (kuru ağırlık, uzunluk)

meydana gelen değişimler ve Cu birikimi araştırılmıştır. Araştırma sonuçlarında, uygulanan tüm Cu konsantrasyonlarının büyümeyi olumsuz etkilediği, kuru ağırlığın artan Cu konsantrasyonlarına bağlı olarak azaldığı, hatta 100 mg/L Cu konsantrasyonuna maruz kalan örneklerin yarıdan fazlasının canlılığını yitirdiği belirtilmiştir. Ayrıca uygulanan Cu konsantrasyonlarındaki artışa paralel olarak tüm bitki kısımlarında (kök, dal ve yapraklar) Cu birikiminin arttığı, özellikle de kök kısımlarında bu birikimin daha yüksek olduğu vurgulanmıştır.

Madhava ve Sresty (2000) ise kontrollü koşullarda laboratuvar ortamında *Cajanus cajan* (L.) Millspaugh (Güvercin bezelyesi) bitkisinin iki farklı kültürünü (ICPL87 ve LRG30) yetiştirmiştir. Her iki kültüre ait fidelerden bir kısmına 2,5, 5 ve 7,5 mM konsantrasyonlarında Zn ve diğer bir kısmına da 0,5, 1 ve 1,5 mM konsantrasyonlarında Ni uygulamıştır. Buna göre her iki kültüre ait bitkilerin kök ve dal kısımlarında Ni ve Zn stresine karşı meydana gelen değişimleri ortaya koymuştur. Bitki kuru ağırlığı, metal içeriği, lipid peroksidasyonu ve antioksidatif savunma sistemi enzimlerinden peroksidaz, SOD, CAT aktivitesi ile askorbik asit ve total glutatyon içeriği belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarında, Zn ve Ni uygulamalarının kültürlerin kök ve dallardaki metal birikimini arttırdığı, kuru ağırlığı azalttığı belirtilmiştir. Her iki kültürde de Ni birikiminin köklerde daha fazla olduğu vurgulanmıştır. Her iki kültürde de MDA içeriğinin dallarda daha fazla arttığı ifade edilmiştir. Zn'ye göre Ni uygulamalarının her iki kültürde de lipid peroksidasyonunu daha fazla arttırdığı tespit edilmiştir. Her iki kültürde de kök ve dallarda belirlenen SOD ve peroksidaz aktivitelerinin hem Ni hem Zn konsantrasyonlarındaki artışa paralel olarak arttığı, bu artışın özellikle LRG30 kültüründe daha fazla olduğu belirtilmiştir. CAT aktivitesi ile askorbik asit ve total glutatyon içeriklerinde ise her iki metal uygulamasında da konsantrasyonlar arttıkça belirgin bir azalış meydana geldiği vurgulanmıştır. Bu azalışın ICPL87 kültüründe daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Baccouch ve ark. (2001), *Zea mays* L. (Mısır) bitkisinin köklerinde 5 gün boyunca uygulanan 250 µM nikelin meydana getirdiği oksidatif zararı araştırmıştır. Bunun için antioksidatif savunma sistemi enzimlerinden SOD, CAT, APX, GPX (guaiakol peroksidaz), GR (glutatyon redüktaz), DHAR (dehidroaskorbat redüktaz), MDHAR (monodihidroaskorbat peroksidaz) aktivitelerindeki değişimler ortaya konmuştur. Ayrıca

kök büyümesi ve lipid peroksidasyonu üzerinde nikelin etkileri de belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre, mısır bitkisinin köklerinde uygulama süresine bağlı olarak Ni içeriğinin arttığı belirtilmiştir. Kuru ağırlıkta 48 saatten sonra önemli bir azalış olduğu vurgulanmıştır. Araştırmacılar metal uygulandıktan 6 saat sonra membran lipid peroksidasyonunun arttığını, SOD ve GPX aktivitelerinin Ni uygulamasından etkilenmediğini belirtmiştir. Ancak CAT aktivitesinin, metal uygulamasından 24 saat sonra artmaya başladığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, GR ve DHAR aktivitesi sabit kalırken APX ve MDHAR aktivitesinin uygulama süresindeki artışa paralel olarak arttığı belirtilmiştir.

Dixit ve ark. (2001) ise, kontrollü koşullarda su kültüründe yetiştirilen *Pisum sativum* L. cv. Azad. (Bezelye) bitkisine 7 gün boyunca 4 ve 40 µM Cd uygulamıştır. Uygulama sonucu bitkilerin kök ve yaprak kısımlarındaki Cd birikimi, biyokütledeki değişimi, MDA ve H₂O₂ içeriğiyle antioksidan savunma sistemine ait enzimlerdeki (SOD, CAT, APX, GSH, GR) değişimler belirlenmiştir. Araştırma sonucunda, 4 µM Cd konsantrasyonunun büyümede önemli bir değişiklik yaratmadığı fakat 40 µM Cd konsantrasyonunun belirgin bir azalışa neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca tüm Cd konsantrasyonlarında her iki bitki kısmında da Cd birikiminin meydana geldiği ve köklerdeki Cd birikiminin daha fazla olduğu ifade edilmiştir. Kök ve yapraklardaki MDA ve H₂O₂ içeriğinin, artan Cd konsantrasyonlarıyla birlikte arttığı vurgulanmıştır. Yapraklarda belirlenen SOD aktivitesinin uygulamanın ilk günlerinde arttığı, sonraki günlerde ise azaldığı belirtilmiştir. Köklerde ise sadece uygulamanın 7. gününde SOD aktivitesinde önemli bir artış olduğu vurgulanmıştır. CAT aktivitesinin artan Cd konsantrasyonlarına bağlı olarak azaldığı ve bu azalışın kök kısımlarında daha yüksek olduğu ifade edilmiştir. Bununla birlikte 4 µM Cd konsantrasyonunun hem kök hem de yaprak kısımlarında belirlenen APX aktivitesini arttırdığı, 40 µM Cd konsantrasyonunun ise azalttığı belirtilmiştir. APX aktivitesine ait bu değerlerim köklerde daha yüksek olduğu vurgulanmıştır.

Pisum sativum L. (Bezelye) bitkisi ile yapılan başka bir çalışmada Kevresan ve ark. (2001) tarafından aynı koşullarda yetiştirilmiş bitkilere 12-16 gün boyunca 10⁻⁷, 10⁻⁵ ve 10⁻³ mol dm⁻³ konsantrasyonlarında Mo, Ni, Cd, Pb uygulaması yapılmıştır. Buna göre bitkinin azot ve protein metabolizmasının belirlenmesi amacıyla hem kök hem de toprak

üstü kısımlarında kuru ağırlık, nitrat ve ağır metal içerikleri, NR aktivitesi, RuBPCO ve protein içeriği analiz edilmiştir. Araştırma sonuçlarında Mo'in kuru ağırlıkta % 35-50 oranında azalış meydana getirdiği belirtilmiş olup Mo'in büyümede en kuvvetli inhibisyona neden olduğu, bunu Cd ve Pb nin takip ettiği ifade edilmiştir. Uygulanan metallere içerisinde bitkinin büyümesi üzerinde en az olumsuz etkiye sahip olan metalin Ni olduğu vurgulanmıştır. Hatta düşük konsantrasyonlarda Ni' in bitki üzerinde uyarıcı etkisinin olduğu belirtilmiştir. Tüm metal uygulamalarında bitki kısımlarındaki metal içeriğinin arttığı, özellikle köklerde metal birikiminin daha fazla olduğu vurgulanmıştır. Bununla birlikte tüm metal uygulamalarında toprak üstü kısımlarındaki nitrat içeriğinin azaldığı, kök kısımlarında ise Pb uygulamasının nitrat içeriğini arttırdığı, Cd ve Mo'in nitrat içeriğini değiştirmedeği ve Ni'in ise nitrat içeriğini azalttığı bildirilmiştir. Ni, Cd ve Pb uygulamalarının tüm konsantrasyonlarda NR aktivitesini önemli derecede azalttığı belirtilmiştir. Ancak Mo varlığında NR aktivitesinin arttığı sonucuna varılmıştır. GS aktivitesinde ise uygulanan bu dört metalinde enzimi inhibe edici etkiye sahip oldukları belirtilmiştir. GS aktivitesi üzerinde azalışa neden olan metal uygulamalarının sıralaması şöyledir; Cd>Pb>Ni>Mo. Protein içeriğindeki azalışta da benzer bir sıralama elde edildiği vurgulanmıştır.

Sucul bir bitki olan *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. (Söğüt yosunu) bitkisinde ise 5-10 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda Cd, Pb ve Zn uygulaması yapılmış olup, yosunun protein ve amino asit biyosentezi üzerindeki etkileri araştırılmıştır (Sutter ve ark. 2002). Çalışmada protein ve amino asit içeriği N¹⁵ izotopu ile belirlenmiştir. Buna göre 25, 50, 100 ve 400 µM konsantrasyonlarında Cd, 100 ve 500 µM konsantrasyonlarında Pb ve Zn uygulandığı belirtilmiştir. Araştırma sonuçlarında Cd, Pb ve Zn konsantrasyonlarındaki artış ile birlikte amino asit ve protein içeriğinin azaldığı ifade edilmiştir. Fakat en fazla azalışın Cd uygulamasında elde edildiği, bunu sırayla Pb ve Zn'nun takip ettiği vurgulanmıştır.

Boominathan ve Doran (2002)'in çalışmasında, Cd hiperakümülatörü olan *Thlaspi caerulescens* J.Presl & C. Presl.'de bitkinin 20 ppm Cd' a olan toleransı ve antioksidatif savunma sistemi incelenmiştir. Çalışmada ayrıca, Cd hiperakümülatörü olmayan *Nicotiana tabacum* L. (Tütün) bitkisiyle arasındaki farklar kıyaslanmıştır. Buna göre, her iki bitkide de 30 gün boyunca meydana gelen metal birikimi, biyokütle, H₂O₂, MDA ve

glutasyon içeriği, SOD, CAT, APX gibi bazı önemli antioksidatif enzimlerdeki değişimler tespit edilmiştir. Araştırma sonuçlarında Cd uygulamasının *T. caerulea*'de biyokütleyi arttırdığı, *N. tabacum*'da ise biyokütleyi azalttığı belirtilmiştir. *T. caerulea*'nin köklerinde Cd birikiminin ilk 15 günlük sürede daha fazla olduğu, daha sonraki uygulama süresinde birikimin sabit kaldığı ifade edilmiştir. Her iki bitki türünde de Cd uygulamasının SOD aktivitesini azalttığı gösterilmiştir. CAT aktivitesinin *T. caerulea*'de Cd uygulamasından 3-5 gün sonra artmaya başladığı belirtilirken, *N. tabacum*'da 3-5 günden sonra azalmaya başladığı belirtilmiştir. *T. caerulea*'de Cd uygulamalarının APX aktivitesini arttırdığı belirtilmiştir. Ayrıca her iki bitki türünde de MDA içeriğinin Cd uygulaması ile birlikte uygulama süresindeki artışa paralel olarak arttığı gösterilmiştir.

Shu ve ark. (2002) ise *Paspalum distichum* L. (Yalancı otu) ve *Cynodon dactylon* L. Pers (Köpekdişi ayırığı) populasyonları üzerinde 14 gün boyunca Pb (5, 10, 20 ve 40 mg/L), Zn (2,5, 5, 10, 20 ve 30 mg/L) ve Cu (0,25, 0,50, 1 ve 2 mg/L)'ın etkilerini incelemiştir. Maden yataklarından ve kirlenmemiş alanlardan alınan bitki örneklerine laboratuvar koşullarında farklı konsantrasyonlarda Pb, Zn ve Cu uygulandıktan sonra, bitkilerdeki metal içeriği ve kök büyümesindeki değişimler belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre tüm metal uygulamalarının her iki bitki türünde de kök büyümesini azalttığı vurgulanmıştır. *Paspalum distichum*'un Pb ve Zn ye toleransının daha yüksek olduğu, *C. dactylon* 'un ise Cu toleranslı olduğu vurgulanmıştır.

Landberg ve Greger (2002) tarafından yapılan bir çalışmada *Salix viminalis* L. (Sepetçi söğüdü) bitkisinin duyarlı ve dirençli klonlarına 20 gün boyunca 7 µmol/L Cd, 3 µmol/L Cu ve 70 µmol/L Zn uygulaması yapılmıştır. Buna bağlı olarak bitkide meydana gelen oksidatif stres ve buna ait mekanizmaların belirlenmesi amacıyla antioksidatif enzim aktiviteleri (SOD, CAT, APX, GPX), lipid peroksidasyonu, glutasyon (GSH) ve salisilik asit içeriği belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarında dirençli ve duyarlı klonlar arasında önemli farklar olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca hem dirençli hem de duyarlı klonlarda belirlenen antioksidatif savunma sistemine ait enzimlerin aktivitesinin en çok Cu uygulamasında arttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte her iki klonda da Cd ve Cu içeriğinin dallara göre kök kısımlarında daha fazla olduğu gösterilmiştir. Zn içeriğinin ise duyarlı türlerde dallarda daha fazla olduğu, dirençli türlerde ise kök ve toprak üstü

kisimlerinde yaklaşık olarak birbirine yakın değerlerde olduğu belirtilmiştir. Metal uygulamaları sonucu lipid peroksidasyonunun her iki klonunda da arttığı fakat bu artışın duyarlı klonlarda ve Cu uygulamasında daha yüksek olduğu ifade edilmiştir.

Tripathi ve Gaur (2004) tarafından yapılan çalışmada da bir yeşil alg olan *Scenedesmus* sp.' de 5, 10, 25, 50 ve 100 µM Zn uygulamasına bağlı olarak meydana gelen oksidatif stres düzeyi, prolin miktarı ve lipid peroksidasyon düzeyi belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarında, prolin içeriğinin arttığı ve lipid peroksidasyonunun meydana geldiği ve buna bağlı olarak Zn uygulamalarının *Scenedesmus* sp.'de oksidatif strese neden olduğu ifade edilmiştir. Oksidatif stresin, artan Zn konsantrasyonlarına bağlı olarak arttığı vurgulanmıştır. Zn konsantrasyonlarına bağlı olarak artan lipid peroksidasyonu ile birlikte membran geçirgenliğinin azaldığı tespit edilmiştir.

Rai ve ark. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada ise *Ocimum tenuiflorum* L. (Fesleğen) bitkisinde Cr uygulamalarına bağlı olarak fotosentetik pigment içeriği, biyokütledeki değişim, lipid peroksidasyonu, antioksidatif enzimlerin (SOD, CAT, APX, GPX) yanıtları ve bitkinin azot metabolizmasına ait NR aktivitesi, nitrat ve protein içeriği ortaya konmuştur. Çalışmada 72 saat boyunca 10, 20, 50 ve 100 µM Cr uygulamaları yapılmış olup bu konsantrasyonların biyokütle, fotosentetik pigment ve protein içeriğini önemli oranda azalttığı belirtilmiştir. Aynı zamanda Cr konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak NR aktivitesinin azaldığı, nitrat içeriğinin ise arttığı ortaya konmuştur. Lipid peroksidasyonu ve antioksidatif enzimlerden CAT ve GPX aktivitesinin artan Cr konsantrasyonlarıyla birlikte arttığı, APX aktivitesinin ise azaldığı vurgulanmıştır. SOD aktivitesinde 20 µM Cr uygulamasına kadar artış meydana geldiği, sonrasında ise azaldığı belirtilmiştir. Buna bağlı olarak 50 ve 100 µM Cr konsantrasyonlarının *Ocimum tenuiflorum* için toksik olduğu ifade edilmiştir.

Demirevska-Kepova ve ark. (2004)'nın *Hordeum vulgare* L. cv. 'Obzor' (Arpa) bitkisi ile yaptığı çalışmada ise 5 gün boyunca 1,5, 15, 150 ve 1500 µM konsantrasyonlarında Cu ve 18,3, 183, 1830 ve 18,300 µM Mn uygulamasının, kuru ağırlıkta, fotosentez sürecinde ve azot asimilasyonuna katılan GS, GOGAT enzimlerinde, protein içeriğinde ve antioksidatif savunma sistemine ait SOD, CAT, APX ve GPX enzimlerinde meydana getirdiği değişiklikler belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarında yapraklardaki Cu ve Mn birikiminin, artan metal konsantrasyonların bağlı olarak attığı ve kuru ağırlıkta herhangi

bir azalış meydana gelmediği belirtilmiştir. Klorofil ve total protein içeriğinin ise azaldığı ifade edilmiştir. SOD aktivitesinin 15 µM Cu konsantrasyonunda arttığı, 150 ve 1500 µM'da ise azaldığı gösterilmiştir. CAT ve APX aktivitesinin ise 15 µM Cu konsantrasyonunda azaldığı, diğer konsantrasyonlarda ise arttığı belirtilmiştir. Mn uygulamasında ise 183 µM konsantrasyonunun SOD aktivitesinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı, diğer konsantrasyonların ise SOD aktivitesini azalttığı vurgulanmıştır. APX aktivitesinin artan Mn konsantrasyonlarıyla ters orantılı olarak azaldığı, CAT aktivitesinin ise arttığı ifade edilmiştir.

Wang ve ark. (2004)'nin çalışmasında ise yabani bir bitki türü olan *Commelina communis* L. (Asya günçiçeği) bitkisinin Cu hiperakümülatörü olan ve olmayan bireyleri incelenmiştir. Bu bireylere 8 gün boyunca 1, 10, 100, 1000 ve 10000 µM konsantrasyonlarında Cu uygulamıştır. Ardından Cu birikimi, MDA içeriği, çözülebilir protein içeriği ve antioksidatif enzimler (SOD, APX, GPX) belirlenmiş ve bireyler arasındaki farklar kıyaslanmıştır. Araştırma sonuçlarına göre Cu birikiminin hiperakümülatör bireylerde daha yüksek olduğu, bu birikimin 6. günden sonra ve 100 µM'dan daha yüksek konsantrasyonlardaki Cu uygulamalarında kendini gösterdiği ifade edilmiştir. Bireylerin kısa süreli metale maruz kaldığında MDA içeriğinin arttığı, uygulamanın 8.gününde ise konsantrasyonlardaki artışa ters orantılı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, MDA içeriğindeki artışın bireyler arasında fark yaratmadığı belirtilmiştir. Protein içeriğinin her iki bireyde de konsantrasyonlardaki ve uygulama süresindeki artışa paralel olarak arttığı, bu artışın hiperakümülatör olmayan bireylerde daha fazla olduğu vurgulanmıştır. SOD aktivitesinin her iki bireyde de uygulamanın 4. gününe kadar konsantrasyondaki artış ile paralel olarak arttığı, uygulamanın 4.gününden sonra ise azaldığı belirtilmiştir. APX ve GPX aktivitelerinin ise hiperakümülatör olmayan bireylerde daha yüksek olduğu ve konsantrasyonlar arttıkça azaldığı vurgulanmıştır. Hiperakümülatör bireylerde ise konsantrasyonların arttırılmasının APX aktivitesinde değişikliğe neden olmadığı, GPX aktivitesinde ise sadece en yüksek Cu konsantrasyonunda artış olduğu belirtilmiştir.

Broadhurst ve ark. (2004) ise bir Ni hiperakümülatörü olan *Alyssum murale* L. (Kuduzotu) bitkisinin iki farklı kültürüne (Kotodesh ve AJ9) 5, 10, 20, 40 ve 80 mmol/kg konsantrasyonlarında Ni uygulamıştır. Uygulama sonucunda bitkinin büyüme

parametrelerindeki değişimi, morfolojik gözlemlerle de destekleyerek sunmuştur. Buna göre uygulanan Ni konsantrasyonlarının 20 mmol/kg konsantrasyonuna kadar herhangi bir toksik etki oluşmadığı, 40 mmol/kg konsantrasyonunda ise yapraklarda %20 oranında klorozis ve bir takım morfolojik değişiklikler gözlemlendiği ifade edilmiştir. 80 mmol/kg Ni konsantrasyonunun ise biyokütleyi ilk başta % 60-70 oranında azalttığı, klorozis oluşturduğu, sonrasında ise bitkinin areal kısımlarının ölümüne neden olduğu belirtilmiştir.

Chaffei ve ark. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada da *Lycopersicon esculentum* L. (Domates) bitkisinde 7 gün boyunca Cd uygulamasının (0-50 µM) kuru ve yaş ağırlık, total klorofil içeriği üzerinde ve azot metabolizmasına ait enzimler (NR, NiR ve GS) ile amino asit içeriğinde meydana getirdiği değişimler incelenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre, hem kök hem de yaprak kısımlarında kuru ve yaş ağırlığın azaldığı, bu azalışın yaprak kısımlarında daha fazla olduğu ifade edilmiştir. Bununla birlikte yaprak yüzeyinin de % 40 oranında azaldığı belirtilmiştir. Ayrıca uygulanan Cd konsantrasyonlarının total klorofil içeriğini azalttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte fotosentetik aktivite ve solunum oranında da azalış olduğu ifade edilmiştir. Artan Cd konsantrasyonlarına bağlı olarak hem kök hem de yapraklarda nitrat içeriğinin azaldığı ve nitrat içeriğinin köklerde daha fazla olduğu belirtilmiştir. Amonyum ve total amino asit içeriğinin artan Cd konsantrasyonları ile birlikte yaprak ve köklerde arttığı ortaya konmuştur. Total protein içeriğinin, her iki bitki kısmında da azaldığı ve bu azalışın yapraklarda daha fazla olduğu ifade edilmiştir. NR aktivitesinin artan Cd konsantrasyonlarıyla birlikte azaldığı, bu azalışın dallarda %35, köklerde ise %23'e kadar düştüğü belirtilmiştir. NiR aktivitesinde de NR' ye benzer bir eğilim olduğu, fakat NR den farklı olarak dallarda NiR aktivitesindeki azalışın daha fazla olduğu belirtilmiştir. GS aktivitesinde de Cd konsantrasyonlarındaki artış ile birlikte bir azalış olduğu tespit edilmiştir. Bu azalışın dallarda daha fazla olduğu gösterilmiştir.

Zea mays L. (Mısır) bitkisine kükürt (S) varlığında 5 gün boyunca 100 µM Cd uygulaması gerçekleştiren Astolfi ve ark. (2004), bitkinin azot metabolizması üzerindeki etkilerini ortaya koymuştur. 12 gün boyunca büyütme ortamına kükürt takviyesi yapıldıktan sonra bitkinin taze ve kuru ağırlığı, klorofil ve ATP içeriği, GS, GDH ve NR aktivitesindeki değişimler belirlenmiştir. Kükürt eksikliğinde büyütülmüş ve Cd uygulanmış örneklerde taze ağırlıkta maksimum düzeyde bir azalış meydana geldiği gösterilmiştir. Kuru ağırlıkta ise Cd uygulanmış örneklerde S varlığına bağlı olmaksızın benzer düzeyde bir azalış

olduğu belirtilmiştir. Sadece yeterli S varlığında yetiştirilen örneklerin kuru ve taze ağırlığında meydana gelen azalışın minimum düzeyde olduğu vurgulanmıştır. Klorofil içeriğinin tüm uygulamalarda 5 gün sonunda azaldığı, fakat en düşük klorofil içeriğinin Cd uygulanmış ve S eksikliğinde büyütülmüş örneklerde elde edildiği belirtilmiştir. ATP içeriğinin de 5 gün sonunda tüm uygulamalarda azaldığı, fakat en düşük ATP içeriğinin Cd uygulanmış ve yeterli S varlığında büyütülmüş örneklerde elde edildiği gösterilmiştir. NR aktivitesinin S eklisinde büyütülmüş örneklerde uygulama süresine bağlı olarak azaldığı, Cd uygulamaların da bu azalışın daha da arttığı belirtilmiştir. En düşük NR aktivitesinin, S varlığında Cd uygulanmış örneklerde elde edildiği vurgulanmıştır. GS aktivitesinde ise S eksikliğinde yetiştirilen örneklerde 5 gün sonunda artış olduğu ve GS aktivitesinde Cd uygulamasının önemli bir etkisinin görülmediği belirtilmiştir.

Hordeum vulgare L. cv. *minorimuği* (Arpa) bitkisinde 1, 10 ve 100 μM Ni konsantrasyonlarının etkisini belirlemeyi amaçlayan Rahman ve ark. (2005) tarafından bitkinin büyüme parametreleri (kök ve dal kuru ağırlığı) ile klorofil indeksi ve Mn, Cu, Zn, Fe gibi mikrobese element içeriğinde meydana gelen değişiklikler belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarında, 100 μM Ni konsantrasyonunda bitki büyümesinde toksik semptomlar geliştiği, genç yapraklarda klorozis, yaşlı yapraklarda ise nekroz olduğu ifade edilmiştir. Bununla birlikte aynı Ni konsantrasyonunun kuru ağırlıkta azalışa neden olduğu, bu azalışın köklerde daha fazla olduğu belirtilmiştir. Diğer Ni konsantrasyonlarında herhangi bir toksik etki gözlenmediği ifade edilmiş olup 10 μM 'da bitkinin hem kök hem de dallarında kuru ağırlığın arttığı vurgulanmıştır. Klorofil indeksinde de sadece 100 μM Ni konsantrasyonunun azalışa neden olduğu belirtilmiştir. Mikro besin elementlerinden Mn ve Zn'nin Ni konsantrasyonlarındaki artış ile birlikte hem kök hem de dallarda azaldığı, Cu ve Fe içeriğinin ise Ni konsantrasyonlarındaki artış ile birlikte köklerde arttığı, dallarda ise azaldığı belirtilmiştir.

Phaseolus vulgaris L. (Fasulye) bitkisi ile yapılan bir çalışmada 72 saat boyunca 2 μM Cd uygulamasının bitkinin kök ve yaprak kısımlarında meydana getirdiği oksidatif stres ve buna karşı bitkinin geliştirdiği antioksidatif mekanizmalar belirlenmiştir (Smeets ve ark. 2005). Araştırma sonuçlarında, 2 μM Cd uygulamasının 24 saat sonra bitkinin antioksidatif savunma mekanizmasını aktif hale getirdiği vurgulanmıştır. Ayrıca büyüme parametrelerinin ilk 48 saatten sonra azalmaya başladığı belirtilmiştir. Bitki dokusundaki Cd birikiminin zamana bağlı olarak arttığı ve özellikle primer yapraklarda gözlemlendiği

ifade edilmiştir. MDA içeriğiyle belirlenen lipid peroksidasyonunun da ilk 48 saatten sonra arttığı ifade edilmiştir. Klorofil *a*, *b* ve karotenoid içeriğinde ise önemli bir farklılık gözlenmediği vurgulanmıştır. Antioksidan enzimlerden syringaldezin peroksidaz (SPOD) ve guaiakol peroksidaz (GPOD)'ın 24-48 saat arasında zamana bağlı olarak arttığı gösterilmiştir. Askorbat peroksidaz aktivitesinde (APX) ise uygulamadan 24 saatten sonra artış gözlendiği belirtilmiştir. Bununla birlikte total askorbat içeriğindeki artışın 24 saatten sonra başladığı ifade edilmiştir. Fasulye bitkisinin primer yapraklarında Cd uygulamasının glutasyon birikimine neden olduğu ve uygulamadan 48 saat sonra maksimum düzeye ulaştığı belirtilmiştir.

Bir yosun türü olan *Polytrichum commune* (L.) ex Hedw. bitkisinde ise Panda ve Choudhury (2005) tarafından 24 ve 48 saat olmak üzere iki farklı uygulama süresinde 1, 10 ve 100 mM konsantrasyonlarında Cr, Cu ve Zn uygulanmıştır. Buna bağlı olarak bitkide meydana gelen oksidatif stres, ağırmetal birikimi ve NR aktivitesi belirlenmiştir. 24 ve 48 saat boyunca uygulanan her üç metalin de konsantrasyonlardaki artışa paralel olarak NR aktivitesinde azalışa neden olduğu gösterilmiştir. Fakat NR aktivitesindeki en fazla inhibisyonun Cu uygulamalarında elde edildiği belirtilmiştir. Ayrıca üç metalin de total klorofil içeriğini azalttığı, yine en büyük azalışın Cu uygulamasında elde edildiği ifade edilmiştir. Her iki uygulama süresinde de en fazla biriken metalin Cu olduğu vurgulanmıştır. Her üç metal uygulamasında da metal konsantrasyonundaki artışa paralel olarak MDA içeriğinin arttığı ve en fazla artışın Cu uygulamasında elde edildiği belirtilmiştir. Antioksidatif savunma sistemine ait enzimlerden CAT ve SOD aktivitesinde konsantrasyonlardaki artışa paralel olarak tüm metal uygulamalarında artış belirlendiği gösterilmiştir. 24 saat sonunda belirlenen en yüksek CAT ve SOD aktivitelerinin Cr uygulamasında elde edildiği ifade edilmiştir. 48 saat sonrasında ise SOD ve CAT aktivitelerindeki en yüksek değerlerin Cu uygulamasına ait olduğu belirtilmiştir.

Shanker ve ark. (2005)'nın derleme çalışmasında Cr'un doğada Cr (III) ve Cr (IV) olmak üzere iki farklı formda bulunduğu ve bunlardan Cr (IV)'ün bitkiler için en toksik Cr formu olduğu belirtilmiştir. Bitkiler tarafından Cr'un alınımında sipesifik bir taşınım sistemine gerek olmadığı, bitki besin elementlerinin alınım yolları üzerinden Cr'un hücreye alındığı ifade edilmiştir. Bitkinin büyüme ve gelişim basamaklarında yer alan süreçlerde ciddi negatif etkilerinin bulunduğu vurgulanmıştır. Aynı zamanda oksidatif

stres oluşumuna neden olan reaktif oksijen radikallerinin birikimine neden olarak çeşitli enzim ve metabolitlere yapısal olarak zarar verdiği belirtilmiştir. Ayrıca Cr'un toksik etkilerine tolerans gösteren bitki türleri ve bu türlerin bitkilerle iyileştirme yöntemindeki öneminden bahsedilmiştir.

Yruela (2005) ise yaptığı derleme çalışmasında Cu'ın bitkiler üzerindeki etkilerini ortaya koymuştur. Bakır, bitki besin elementlerinden biri olduğu için düşük konsantrasyonlarda ilişkili olduğu süreçlerde akasaklıklara neden olacağı ifade edilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda Cu'ın bitkilerdeki antioksidatif savunma sisteminde değişikliğe neden olduğu belirtilmiştir. Cu'ın SOD gibi antioksidatif sistemde önemli rol oynayan enzimlerin kofaktörü olması (Cu/Zn SOD) nedeniyle yapısal öneme sahip olduğu vurgulanmıştır. Aynı zamanda bazı bitkilerin Cu'a karşı tolerans göstererek toksik etkilerini bertaraf etmede sahip olduğu mekanizmaların olduğundan bahsedilmiştir.

Devi ve Prasad (2005), kontrollü şartlarda yetiştirdikleri 8 günlük *Brassica juncea* L. (Hardal) bitkisine 50, 100, 150 ve 200 µM Cu uygulamış, ardından 48 saat boyunca meydana gelen oksidatif zararı kök ve yaprak kısımlarında ayrı ayrı belirlemiştir. Çalışmada Cu birikimi ile lipid peroksidasyonu, GSH içeriği ve antioksidan enzimlerin (SOD, CAT, APX) aktivitelerindeki değişimler ortaya konmuştur. Buna göre, 50-150 µM arasındaki Cu konsantrasyonlarında köklerde kontrole göre 4 kat fazla Cu birikiminin olduğu, 200 µM'lık Cu uygulamasında ise diğerlerinden farklı olarak yaklaşık 5 kat bir artış ile Cu birikiminin en yüksek değere ulaştığı tespit edilmiştir. Yapraklardaki Cu birikiminin ise artan Cu konsantrasyonlarıyla paralel olarak arttığı ifade edilmiştir. Lipid peroksidasyonunun da hem kök hem de yapraklarda uygulanan Cu konsantrasyonlarındaki artış ile paralel olarak arttığı belirtilmiştir. Antioksidatif enzimlerin (SOD, CAT, APX) aktivitelerinde ise konsantrasyonlardaki artışa paralel olarak artış olduğu vurgulanmıştır.

Cardosa ve ark. (2005)'nin yaptıkları çalışmada ise *Crotalaria juncea* L. (Hint keneviri) bitkisinde 0,05 mmol/L ve 0,5 mmol/L Ni konsantrasyonlarının 7 gün boyunca meydana getirdiği değişiklikler incelenmiştir. Buna göre kök ve dallardaki Ni birikimi, MDA içeriği ve CAT ile GR aktiviteleri belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarında kök ve dallardaki Ni birikiminin konsantrasyonlardaki artışa paralel olarak arttığı, fakat köklerdeki Ni birikiminin dallara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. CAT ve GR

aktivitelerinin ise dallarda belirgin düzeyde arttığı, köklerde ise azaldığı ifade edilmiştir. MDA içeriği ile belirlenen lipid peroksidasyonunun da uygulama süresine bağlı olarak kök ve dal kısımlarında arttığı gösterilmiştir.

Ghanati ve Ishka (2006), *Camellia sinensis* L. x *assamica* x *sinensis* (Çay) bitkisine 24 saat boyunca 40 µM Ni uygulaması yapmış ve antioksidan enzim aktivitelerini, lignin, MDA ve metal içeriğini belirlemiştir. Elde edilen sonuçlarda, 40 µM Ni konsantrasyonunun köklerde nikel birikimini arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca SOD aktivitesinin CAT ve APX aktivitesinde olduğu gibi uygulanan Ni konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı belirtilmiştir. Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA içeriğinde de 40 µM Ni uygulamasıyla önemli bir artış olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca köklerde lignin içeriğinin azaldığı tespit edilmiş olup bu durum nikelin çay bitkisinde yarattığı hüresel hasar ile ilişkilendirilmiştir. Buna göre *Camellia sinensis* L. x *assamica* x *sinensis*' in Ni gibi diğer bitkiler için toksik olabilecek elementlere karşı toleranslı olduğunu ifade edilmiştir.

Sucul bir bitki olan *Salvinia natans* L.'da Cd'un toksik etkilerini araştıran Mohan ve Hosetti (2006), 5 farklı konsantrasyonun (0,5, 1, 5 ve 10 µM dm⁻³) Cd birikimi, protein içeriği, karbohidrat, prolin ve klorofil içeriği ile antioksidatif enzimlerin aktivitesinde (CAT, SOD, POD) meydana getirdiği değişiklikleri belirlemiştir. Araştırma sonuçlarında Cd konsantrasyonlarındaki artışa paralel olarak Cd birikiminin ve prolin içeriğinin arttığı, protein, klorofil ve karbohidrat içeriğinin azaldığı belirtilmiştir. Ayrıca, antioksidatif enzimlerden POD ve SOD aktivitesinin Cd konsantrasyonlarındaki artış ile birlikte arttığı, CAT aktivitesinin ise azaldığı gösterilmiştir.

Başka bir çalışmada ise bir akvaryum bitkisi olan *Bacopa monnieri* L. bitkisinde 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 µM Cd konsantrasyonlarının kök, dal ve yaprak biyokütlesi, fotosentetik pigmentleri, protein düzeyi, lipid peroksidasyonu, Cd birikimi, antioksidan enzimleri üzerindeki etkileri incelenmiştir (Mishra ve ark. 2006). Araştırma sonuçlarında, tüm bitki kısımlarında Cd konsantrasyonu arttıkça dokulardaki Cd birikiminin de arttığı, kök kısımlarında bu artışın daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda biyokütlede 10 µM Cd konsantrasyonuna kadar giderek artan değerlerin, 25 µM Cd uygulamasıyla birlikte azalmaya başladığı belirtilmiştir. Tüm konsantrasyonlarda Cd uygulamalarının hem kök hem de yaprak kısımlarında iyon sızıntısını ve MDA içeriğini arttırdığı, klorofil

içeriğini ise azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca 25 µM Cd uygulamasına kadar protein içeriğinde artış olduğu, daha yüksek konsantrasyonlarda ve uygulama süresi arttıkça protein içeriğinin de azladığı vurgulanmıştır. CAT aktivitesi dışında diğer antioksidan enzimlerde (SOD, APX, GR) düşük konsantrasyonlarda Cd uygulamalarının uyarıcı etkisinin olduğu, yüksek Cd konsantrasyonlarının ise enzim aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir. CAT aktivitesinde ise tüm bitki kısımlarında ve konsantrasyonlarda uygulama süresi boyunca bir azalış meydana geldiği belirtilmiştir. Ayrıca artan Cd konsantrasyonlarıyla orantılı olarak yapraklarda fitoşelat içeriğinin arttığı, köklerde ise 10 µM Cd konsantrasyonuna kadar arttığı, daha yüksek konsantrasyonlarda ise azaldığı tespit edilmiştir.

Pál ve ark. (2006)'nın yaptığı derleme çalışmasında ise *Zea mays* L. (Mısır) bitkisinin yüksek Cd konsantrasyonları ile başa çıkmada geliştirdiği mekanizmalara yer verilmiştir. Bu Cd ile başa çıkma mekanizmaları arasında fitoşelat oluşumunun önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir. Fitoşelat oluşumu bitkinin verdiği ilk yanıt olup bunun erken uyarı sistemi olarak değerlendirilebileceği vurgulanmıştır. Stres proteinleri, antioksidatif enzimler, salisilik asit gibi diğer eylemlerin ikincil yanıt oluşturduğu savunulmuştur.

Liu ve ark. (2006)'nın *Zea mays* L. (Mısır) bitkisi ile yaptığı çalışmada, 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M Cd konsantrasyonlarının ve bazı besin elementlerinin (Mn, Fe, Cu) alınımı ve birikimi araştırılmıştır. Araştırma sonuçlarında artan Cd konsantrasyonlarıyla orantılı olarak tüm kültürlerde Cd birikiminin arttığını belirtmiştir. Temel olarak köklerde biriken Cd'un çok az bir kısmının dallara aktarıldığı vurgulanmıştır. Ayrıca Mn alınımının artan Cd konsantrasyonlarıyla azaldığı, özellikle de köklerde bu durumun daha belirgin olduğu ifade edilmiştir. Fe iyonlarının genellikle bitkinin köklerinde biriktiği ve çok az bir kısmının toprak üstü kısımlarına aktarıldığı ve Cd'un Fe alınımını engellediği vurgulanmıştır. Ayrıca tüm kültürlerde % 80'den daha fazla Cu'un köklerde biriktiği ve dallardaki Cu içeriğinin uygulanan Cd konsantrasyonlarından etkilenmediği belirtilmiştir.

Chatterjee ve ark. (2006)'nın *Raphanus sativus* L. (Turp) bitkisi ile yaptığı çalışmada ise 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda Cu uygulaması yapılmış olup bitkinin biyokütlesindeki ve klorofil içeriğindeki değişim ile antioksidatif savunma sistemine ait enzimlerin (CAT ve POX) aktivitesindeki değişiklikler ortaya konmuştur. Aynı zamanda

bitki kısımlarındaki (yaprak ve kök) Cu birikimi tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlarda Cu uygulamasının klorofil içeriği ve fotosentez oranında azalışa neden olduğu ve bu durumun Cu ve Fe'in bitkilerdeki metabolik süreçlerde birbirleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. En fazla Cu birikimi bitkinin kök kısımlarında tespit edilmiştir. Ayrıca Cu uygulamasına bağlı olarak antioksidatif enzimlerde artış gözlemlendiği belirtilmiştir.

Cu stresine maruz bırakılan bitkilerde azot metabolizmasının negatif yönde etkilendiğine dair yapılan çalışmalarda literatürde yer almaktadır. Örn; Xiong ve ark. (2006)'nın *Brassica pekinensis* Rupr. (Çin lahanası) bitkisi ile yaptıkları çalışmada 0,3 ve 10,3 µmol/L Cu konsantrasyonlarının azot metabolizması ve bitki büyümesi üzerindeki fitotoksik etkilerini incelemiştir. Buna göre biyokütle, klorofil, nitrat ve Cu içeriği ile NR aktivitesinde ve serbest amino asit içeriğindeki değişimleri belirlemiştir. Elde edilen sonuçlarda Cu uygulamasıyla kök ve dallardaki biyokütlenin belirgin bir şekilde azaldığı ifade edilmiştir. Kök ve yaprakların nitrat içeriğinin ise Cu uygulamasından etkilenmediği belirtilmiştir. Nitrat redüktaz (NR) aktivitesinin Cu uygulamalarıyla hem kök hem de yapraklarda azaldığı vurgulanmıştır. Ayrıca yapraklardaki NR aktivitesinin köklere göre daha yüksek olduğu ifade edilmiştir. Cu uygulamalarının yapraklardaki serbest amino asit içeriğini arttırdığı belirtilmiştir. Ayrıca Cu uygulamalarının yapraklardaki klorofil içeriğini azalttığı ifade edilmiştir.

Li ve ark. (2007), *Elsholtzia haichowensis* S. bitkisinin bakıra toleranslı ve toleranslı olmayan popülasyonlarında 50 µM Cu konsantrasyonunun azot metabolizması üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Çalışmada, NR ve GS aktiviteleri ile nitrat, amonyum ve amino asit içeriği belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarında bakıra toleranslı popülasyonda hem kök hem de yapraklarda belirlenen NR aktivitesinde anlamlı bir değişiklik olmadığı, GS aktivitesinin ise her iki bitki kısmında (kök ve yaprak) da azaldığı belirtilmiştir. Bununla birlikte nitrat içeriğinde önemli bir değişiklik olmadığı fakat amonyum ve amino asit içeriğinin arttığı ifade edilmiştir. Bakıra toleranslı olmayan popülasyonda ise NR ve GS aktivitesinin, nitrat, amonyum ve a.asit içeriğindeki azalış ile orantılı olarak azaldığı vurgulanmıştır. Bununla birlikte her iki popülasyonda da uygulanan Cu konsantrasyonunun hem kök hem de yaprak kısımlarındaki Cu içeriğini arttırdığı belirtilmiştir.

Boojar ve Goodarzi (2007), bakır madeni yakınlarında yetişen üç bitki türünde (*Datura stramonium*, *Malva sylvestris*, *Chenopodium ambrosioides*) bakıra tolerans stratejilerini ve antioksidatif savunma sistemini araştırmıştır. Bakır madenine yakınlığı bakımından 3 farklı lokasyon belirlenmiş olup belirlenen bu alanlardan bitki türleri toplanarak biyokütle, klorofil içeriği, antioksidatif savunma sistemi enzimlerinin (SOD, CAT ve GPX) aktivitesi analiz edilmiştir. Buna göre *Malva sylvestris* ile *Chenopodium ambrosioides* bitkilerinde Cu birikiminin köklerde, *Datura stramonium* bitkisinde ise yapraklarda daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Klorofil içeriğinin ve biyokütlenin *Malva sylvestris* ile *Chenopodium ambrosioides* bitkilerinde daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Her üç bitkide de antioksidatif savunma sistemine ait enzimlerin (SOD, CAT ve GPX) tümü ve MDA içeriği bakır madenine en yakın alandan toplanan örneklerde en yüksek değerlerde olduğu gösterilmiştir.

Ke ve ark. (2007)'nin çalışmasında ise bakır madeni çevresi ve kirlenmemiş alanlardan *Rumex japonicus* Houtt. (Kuzukulağı) türüne ait iki popülasyonundan örnekler alınmış ve laboratuvar koşullarında hidrofonic ortamda 14 gün boyunca 25 ve 100 µM konsantrasyonlarında Cu uygulamasına tabi tutulmuştur. Ardından her iki popülasyona ait bireylerde Cu uygulamalarının mineral elementlerin alınımı (Ca, Fe, Mg), Cu birikimi ve büyüme üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Buna göre kirlenmemiş alandaki popülasyonun kontrollü koşullarda yapılan Cu uygulamalarından olumsuz etkilendiği ve bu alandan toplanan bireylerde biyokütlenin % 17 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Kirlenmiş alandaki popülasyona ait bireylerde ise biyokütledeki azalış sadece % 4'tür. Ayrıca kök ve dallardaki Cu içeriğinin kirlenmemiş alandan alınan örneklerde daha yüksek olduğu ve Cu konsantrasyonlarındaki artışa paralel olarak Cu birikiminin de arttığı gösterilmiştir.

Lemna minor L. (Su mercimeği) ile yapılan bir çalışmada Razinger ve ark. (2007) tarafından kısa dönemli (24 saat boyunca) Cu stresi (0, 25, 0,5, 1, 2, 5 ve 10 µM Cu) uygulanmıştır. Buna göre örneklerdeki total glutatyon içeriği (GSH, GSSG) ile antioksidatif enzimlerdeki (POD, CAT) değişimler belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarında total glutatyon içeriğinin değişmediği fakat yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) içeriğinin azaldığı belirtilmiştir. POD, GR ve CAT aktivitelerinin 2 µM'dan düşük konsantrasyonlarda arttığı, >2 µM konsantrasyonlarda ise sabit kaldığı gösterilmiştir.

Ayrıca *L. minor*'da Cu birikiminin gerçekleştiği, fakat hiperakümülatör tür denilebilecek düzeyde olmadığı (>1000 µg/g) belirtilmiştir.

Remon ve ark. (2007) ise *Plantago arenaria* Waldst. & Kit. (Sinirotu) bitkisinin Cd, Cu, Ni ve Zn' ye olan toleransını, aynı bölgedeki iki öncü bitki (*Coniza sumatrensis* ve *Verbascum densiflorum*) ile kıyaslayarak değerlendirmiştir *Plantago arenaria*' da en fazla toksik etkinin Zn uygulamasında elde edildiği ve en çok da Cd'a toleranslı olduğu belirtilmiştir. Her bir metal uygulaması (Cd, Cu, Ni ve Zn) için metal birikiminin *Plantago arenaria*' nın kök kısımlarında daha fazla olduğu gösterilmiştir. Cd toleransı bakımından bu türün *Coniza sumatrensis* ve *Verbascum densiflorum*'a göre 2-4 kat daha fazla dayanıklı olduğu belirtilmiştir.

Vigna radiata (L. Wilczek) (Maş fasülyesi)'nin tolerant ve duyarlı varyeteleri üzerinde yapılan çalışmada ise (Wahid ve ark. 2007) Cd'un fizyolojik ve enzimatik zararları ortaya konmuştur. Buna göre 12 mg/kg Cd uygulanmış örneklerde büyüme, klorofil, karbon, nitrat ve bitki su içeriği, gaz değişimi, NR aktivitesi belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarında, hassas varyetelerde dallardaki kuru ağırlığın ve su içeriğinin azaldığı ifade edilmiştir. Bununla birlikte yapraklarda kloroz oluşumunun hassas varyetelerde daha fazla olmasına rağmen tolerant varyetelerde de belirgin bir şekilde gözlemlendiği vurgulanmıştır. Her iki varyetede de NR aktivitesinin Cd uygulaması ile azaldığı, fakat bu azalışın hassas varyete de daha fazla olduğu ortaya konmuştur. Bununla birlikte nitrat birikiminin duyarlı varyetelerde daha fazla olduğu belirtilmiştir.

Semane ve ark. (2007) tarafından da *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Farekulağı teresi) bitkisine 1 hafta boyunca 1 ve 10 µM konsantrasyonlarında Cd uygulanmış, buna bağlı olarak glutatyon mekanizmasında ve antioksidatif savunma sistemine ait bazı enzimlerde (SOD, CAT) meydana gelen değişimler incelenmiştir. Buna göre Cd birikiminin konsantrasyonlardaki artışa paralel olarak arttığı, glutatyon içeriğinin ise azaldığı ve glutatyon sentezinden sorumlu genlerin ifadesinin ise arttığı belirtilmiştir. Bu durum bitki bünyesine alınan Cd'un fitoşelat oluşturularak etkisiz hale getirildiği yönünde açıklanmıştır. Ayrıca SOD ve CAT aktivitelerinde Cd uygulamalarının belirgin bir artışa neden olduğu, buna göre en yüksek SOD aktivitesinin 10 µM Cd uygulamasında, en yüksek CAT aktivitesinin ise 1 µM Cd konsantrasyonunda elde edildiği gösterilmiştir.

Nada ve ark. (2007)'nin yaptığı çalışmada *Prunus dulcis* L. (Badem) bitkisine ait fidelerin 25, 50, 100 ve 150 µM Cd konsantrasyonlarına verdiği yanıtlar değerlendirilmiştir. Buna göre yaprak ve kök kuru ağırlığının Cd konsantrasyonlarındaki artış ile birlikte azaldığı belirtilmiştir. Ayrıca yapraklarda klorofil içeriğinin azaldığı, karbohidrat içeriğinin ise arttığı ifade edilmiştir. Özellikle de klorofil *b* içeriğinin 25 µM Cd konsantrasyonunda bile yarı yarıya azaldığı belirtilmiştir. Ayrıca konsantrasyonlardaki artışa paralel olarak kök ve dal kısımlarında Cd birikiminin arttığı ve kök kısımlarında bu artışın daha fazla olduğu gösterilmiştir. MDA içeriğinin de hem kök hem de yaprak kısımlarında arttığı, fakat yapraklardaki artışın daha fazla olduğu belirtilmiştir. Ca, Mg, K ve Fe gibi bitki besin elementlerinin içeriğinde Cd konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak yapraklarda belirgin bir azalış meydana geldiği, köklerde ise sadece 100 ve 150 µM Cd konsantrasyonlarında K ve Mg'un azaldığı, diğer konsantrasyonlarda ise değişmediği ifade edilmiştir.

Yüksek konsantrasyonlarda Zn'nun bitkilerde meydana getirdiği değişiklikler Broadley ve ark. (2007)'nin derleme çalışmasında açıklanmıştır. Çinkonun topraktan Zn⁺² iyon halinde ya da organik ligandlar ile kompleks oluşturmuş şekilde alındığı ifade edilmiştir. Toprakta yüksek konsantrasyonlarda Zn bulunduğu mikro besin elementlerinden Mn, Mg ve P ile rekabet ederek alınımını engellediği belirtilmiştir. Zn'nun bitki bünyesindeki pek çok proteinin yapısında yer aldığı, yüksek konsantrasyonlarda bitkilerde Fe eksikliğine neden olduğu belirtilmiştir. Ayrıca Fe eksikliğine bağlı olarak bitkide klorozis olduğu, klorofil sentezinin ve kloroplastların zarar gördüğü, buna bağlı olarak bitki büyümesinin azaldığı vurgulanmıştır. Aynı zamanda yüksek konsantrasyonlarda Zn'nun askorbat-glutasyon döngüsü üzerinden reaktif oksijen türlerini oluşturarak oksidatif strese neden olduğu belirtilmiştir (Prasad ve ark. 1999).

Morina ve ark. (2008) tarafından kirlenmiş alanlarda dominant bir tür olan *Verbascum thapsus* L. (Adi sığırkuyruğu) bitkisinde yapılan bir çalışmada 10 gün boyunca 1, 5 ve 10 mM konsantrasyonlarında Zn uygulanmıştır. Buna göre bitkideki Zn birikimi, antioksidatif savunma sistemi enzimlerinden POD içeriği ve total fenolik bileşiklerin içeriği belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarında kirlenmiş alanlarda dominant olan *Verbascum thapsus*'un yapraklarında Zn konsantrasyonlarındaki ve uygulama süresindeki artışa paralel olarak Zn birikiminin ve total fenolik bileşik içeriğinin arttığı

ifade edilmiştir. POD aktivitesinde ise özellikle kök kısımlarında uygulama süresi ve Zn konsantrasyonlarına bağlı olarak azalış meydana geldiği ifade edilmiştir.

Karuppanapandian ve Manoharan (2008) tarafından *Vigna mungo* L. Hepper (Siyah mercimek) bitkisine 5 gün boyunca Cr(III) ve Cr(VI) formlarında 50, 75 ve 100 µM Cr uygulaması yapılmıştır. Buna bağlı olarak biyokütlerde, antioksidatif savunma sistemi enzimlerinden SOD, CAT ve APX aktiviteleri ve MDA içeriğinde meydana gelen değişimler tespit edilmiştir. Araştırma sonuçlarında Cr formuna bağlı olmaksızın Cr konsantrasyonları arttıkça biyokütlenin azaldığı ifade edilmiştir. Aynı zamanda lipid peroksidasyonunun da artan Cr konsantrasyonlarıyla birlikte arttığı fakat bu artışın Cr(VI) formunda Cr uygulamasında daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte SOD, CAT ve APX aktivitesinde elde edilen sonuçların uygulama süresindeki artışa paralel olarak arttığı ve kısa süreli Cr uygulamasında SOD/CAT döngüsünün aktif rol oynadığı, uzun süreli Cr uygulamasında ise APX aktivitesinin daha yüksek olduğu ortaya konmuştur. Aynı zamanda antioksidatif enzim aktivitelerindeki artışın Cr(VI) formunda Cr uygulamasında daha belirgin olduğu belirtilmiştir.

Dazy ve ark. (2008) ise sucül bir bitki olan *Fontinalis antipyretica* Hedw. (Söğüt yosunu) bitkisinde 14 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda ($6,25 \times 10^{-8}$, $6,25 \times 10^{-7}$, $6,25 \times 10^{-5}$, $6,25 \times 10^{-4}$, $6,25 \times 10^{-3}$, $1,25 \times 10^{-2}$, $2,5 \times 10^{-2}$, 5×10^{-2} M) ve farklı Cr formlarında (Cr(NO₃)₃, CrCl₃, K₂Cr₂O₇) Cr uygulaması yapılmıştır. Ardından bitkinin antioksidatif yanıtları (SOD, CAT ve APX) ve klorofil içeriğindeki değişimler belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarında klorofil içeriğinin K₂Cr₂O₇ formundaki Cr uygulamasında $6,25 \times 10^{-5}$ M Cr uygulamasında en yüksek değere sahip olduğu ifade edilmiştir. Yine aynı Cr formunda ve $6,25 \times 10^{-3}$ M Cr uygulamasından itibaren azalış meydana geldiği ve diğer uygulamalarda bu değer sabit kaldığı belirtilmiştir. Antioksidatif enzim aktivitesinde ise uygulama süresi arttıkça tüm enzim aktivitelerinin azaldığı gösterilmiştir. Bu azalış, enzimlerin yapısal olarak zarar gördüğü ifade edilerek açıklanmıştır. Ayrıca SOD ve CAT aktivitesi arasında bir korelasyon olduğu ve her üç antioksidatif enzim aktivitesinde (SOD, CAT ve APX) de Cr(NO₃)₃ formunda Cr uygulamasında en yüksek değerlerin elde edildiği ifade edilmiştir.

Başka bir çalışmada Liu ve ark. (2008) tarafından tek yıllık bir bitki olan *Amaranthus viridis* L. (Yeşil horozibiği) bitkisine farklı konsantrasyonlarda (10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M)

Cr uygulaması yapılmış ve bu uygulama sonucu bitkinin antioksidatif savunma sistemine ait bazı enzim aktiviteleri (SOD, CAT, POD), lipid peroksidasyonu, bitki besin elementlerinin alınımı (Mn, Fe, Cu ve Zn), Cr birikimi ve fotosentez süreci üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Cr konsantrasyonlarına bağlı olarak Cr birikiminin kök ve dallarda giderek arttığı fakat kök kısımlarında Cr birikiminin daha yüksek olduğu ifade edilmiştir. Bununla birlikte Mn, Fe, Cu ve Zn gibi bitki besin elementlerinde azalış meydana geldiği belirtilmiştir. Artan MDA içeriğine bağlı olarak lipid peroksidasyonunun arttığı ve bitkide oksidatif stres meydana geldiği vurgulanmıştır. Buna bağlı olarak antioksidatif savunma sisteminde yer alan enzimlerden SOD ve POD aktivitesinde Cr konsantrasyonlarına bağlı olarak artış gözlemlendiği belirtilmiştir. CAT aktivitesinde ise Cr konsantrasyonlarındaki artış negatif etki yaratmış olup enzim aktivitesinin giderek azaldığı gösterilmiştir.

Gajewska ve Sklodowska (2008), *Triticum aestivum* L. (Buğday) bitkisine 6 gün boyunca 10, 100 ve 200 μM konsantrasyonlarında Ni uygulaması gerçekleştirmiştir. Buna göre bitkinin kök ve dallarında Ni birikimi, su içeriği (RWC), prolin ve H_2O_2 konsantrasyonları ile antioksidatif savunma sistemine ait enzimlerde (SOD, CAT, APX, POD ve GST) meydana gelen değişiklikler belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre; 10 μM Ni uygulaması haricinde uygulanan diğer tüm konsantrasyonlarda büyümede bir azalış olduğu gösterilmiştir. Dallar ile karşılaştırıldığında kök uzunluğunda meydana gelen azalışın daha fazla olduğu belirtilmiştir. Bu durumun buğday bitkisinin dokularında biriken Ni miktarındaki artış ile paralellik gösterdiği ifade edilmiştir. Ayrıca 10 μM Ni uygulaması haricinde uygulanan diğer konsantrasyonlarda hem kök hem de dallarda RWC' nin azaldığı, prolin miktarının ise arttığı belirtilmiştir. Her iki bitki kısmında da uygulanan Ni konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak H_2O_2 miktarının arttığı ifade edilmiştir. Bununla birlikte CAT aktivitesinde dallarda % 30'a varan bir azalış meydana geldiği, kök kısımlarında ise aktivitede herhangi bir değişiklik gözlenmediği belirtilmiştir. SOD aktivitesinin ise bitkinin kök kısımlarında azaldığı, dallarda ise belirgin bir değişiklik meydana gelmediği gösterilmiştir. APX, POD ve GST aktivitelerinin Ni uygulamalarından sonra dallarda 7 kat arttığı, köklerde ise önemli bir değişiklik belirlenmediği ifade edilmiştir.

Gratão ve ark. (2008), *Nicotiana tabacum* L. (Tütün) bitkisinin fizyolojik mekanizmaları hakkında bilgi edinmek amacıyla, 72 saat boyunca 0,1 ve 0,2 mM Cd, 0,075 ve 0,75 mM Ni uygulayıp protein ve metal içeriği, büyüme, lipid peroksidasyonu ve enzimatik antioksidatif sistem ile ilgili parametreleri analiz etmiştir. Buna göre, Cd ve Ni'in benzer yanıtlar oluşturarak büyümeyi inhibe ettiği, MDA düzeyini arttırdığı ve oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca Cd ve Ni uygulamalarının 24 saat boyunca CAT aktivitesinde önemli bir değişiklik meydana getirmediği, 48 saat sonrasında ise her iki metalin de benzer düzeyde CAT aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir. Son 24 saatte ise Cd uygulamasının artan konsantrasyonlara paralel olarak CAT aktivitesinin arttırdığı, Ni uygulamasının ise azalttığı vurgulanmıştır. Sonuç olarak, tütün bitkisinin Cd ile başa çıkabilmede güçlü bir antioksidatif savunma sistemine sahip olduğu belirtilmiştir.

Lycopersicon esculentum Mill. (Domates) bitkisi ile yapılan bir çalışmada, 1, 10, 25 ve 50 µM Cd konsantrasyonlarına karşı bitkinin kök ve dallarından oluşan antioksidatif yanıtlar belirlenmiştir (Ammar ve ark. 2008). Buna göre dokulardaki Cd birikimi, lipid peroksidasyonu, klorofil içeriği ve antioksidatif enzim (SOD, CAT, APX, GR) aktiviteleri incelenmiştir. Araştırma sonuçlarında domates bitkisinin köklerindeki Cd birikiminin yapraklardan daha fazla olduğu, yapraklardaki klorofil içeriğinin artan Cd konsantrasyonları ile azaldığı ve TBARS içeriğiyle belirlenen lipid peroksidasyonunun arttığı ifade edilmiştir. Antioksidatif enzimlerden GR, SOD, CAT ve APX aktivitelerinin, artan Cd konsantrasyonlarına paralel olarak köklerde arttığı belirtilmiştir. Yapraklarda ise sadece GR ve SOD aktivitelerinin Cd konsantrasyonları ile ilişkili olarak arttığı, diğer enzim aktivitelerinde ise belirgin bir değişiklik gözlenmediği vurgulanmıştır.

Solanum nigrum L. (Köpek üzümü) bitkisi ile yapılan bir çalışmada ise Wang ve ark. (2008) tarafından 6, 12, 24 ve 48 mg/kg konsantrasyonlarında Cd uygulanmıştır. Buna göre bitkinin tüm büyüme evrelerinde ve tüm bitki kısımlarında (yaprak, dal ve kök) büyüme, Cd birikimi, total N konsantrasyonları, eriyebilir protein içeriği, nitrat ve amonyum içeriği ile azot metabolizmasında yer alan bazı önemli enzimlerin (NR, GS ve GDH) aktivitesindeki değişimler belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarında artan Cd konsantrasyonlarının tüm bitki kısımlarında (yaprak, kök ve dal) Cd birikimini arttırdığı, fakat yaprak kısımlarında Cd birikiminin en yüksek düzeyde olduğu gösterilmiştir. Fide durumundaki örneklerin kök ve dallarının kuru ağırlığında sadece 24 ve 48 mg/kg Cd

konsantrasyonlarında azalış olduğu, olgunluk durumunda ise sadece en yüksek Cd konsantrasyonunda (48 mg/kg) azalış olduğu gösterilmiştir. Eriyebilir protein içeriğinde fide ve çiçeklenme döneminde 24 ve 48 mg/kg Cd konsantrasyonlarında, olgun bireylerde ise sadece en yüksek Cd konsantrasyonunda azalış olduğu belirtilmiştir. Nitrat içeriğinin artan Cd konsantrasyonlarından etkilenecek şekilde azaldığı, amonyum içeriğinin ise bitkinin tüm büyüme evrelerinde arttığı vurgulanmıştır. NR aktivitesinde artan Cd konsantrasyonlarının enzim aktivitesini azalttığı belirlenmiştir. Buna göre fide ve çiçeklenme dönemine ait örneklerde 24 ve 48 mg/kg Cd konsantrasyonlarında, olgunluk durumundaki örneklerde ise sadece en yüksek Cd konsantrasyonunda NR aktivitesinde anlamlı bir azalış olduğu gösterilmiştir. GS aktivitesinde de NR'ye benzer bir eğilim görüldüğü belirtilmiştir.

Dinakar ve ark. (2009) tarafından 10-25 gün boyunca 25, 50, 100 µM konsantrasyonlarında Cd'a maruz bırakılan *Arachis hypogaea* L. (Yerfıstığı) bitkisinin kök ve dal kısımlarındaki prolin miktarı ile antioksidan enzimlerden POD, CAT aktiviteleri ve azot metabolizması enzimlerinden NR ve NiR aktivitelerindeki değişimler incelenmiştir. Ayrıca bitkinin dal ve kök uzunluğundaki değişimler de belirlenmiş olup, artan Cd konsantrasyonlarına paralel olarak kök ve dal uzunluğunun azaldığı tespit edilmiştir. Benzer eğilimin NR ve NiR aktivitelerinde de gözlemlendiği ve artan Cd konsantrasyonlarıyla birlikte aktivitelerinin azaldığı vurgulanmıştır. Prolin içeriği ile POD ve CAT aktivitelerinin 10. günden itibaren artmaya başladığı gösterilmiştir. Sonuç olarak belirlenen Cd konsantrasyonlarının tümünde büyümenin engellendiği ve *Arachis hypogaea* L.' in düşük Cd konsantrasyonlarına bile hassas olduğu ifade edilmiştir.

Hasan ve ark. (2009) tarafından yapılan bir derleme çalışmasında, Cd'un, köklerin absorpsiyon alanında yer alan bitki besin elementleri ile rekabet ettiği ve bu nedenle de bitki büyümesinde sorun oluşturduğu ifade edilmiştir. Özellikle nitrat gibi mineral besinlerin alınımında ortamda yüksek konsantrasyonlarda bulunan Cd'un nitrat alınımını önemli derecede etkilediği vurgulanmıştır. Cd birikiminin genelde bitki kök kısımlarında görüldüğü, Cd'un çok az bir miktarının dallara taşındığı belirtilmiştir. Bitkilerin Cd ile başa çıkmada geliştirdiği mekanizmalar arasında fitoşelat oluşumunun önemli bir yere sahip olduğu vurgulanmıştır. Bunun dışında bitkinin fotosentez ve azot metabolizması gibi temel metabolik süreçlerinde olumsuz etkilere neden olduğu ifade edilmiştir.

Antioksidatif enzimler üzerinde ise bitki türüne göre değişen etkilerinin görüldüğü, bu etkinin bazen enzim aktivitesini uyarıcı bazen de engelleyici olduğu belirtilmiştir.

Nedjimi ve Daoud (2009)'un *Atriplex halimus* subsp. *schweinfurthii* (Tuzçalısı) ile yaptığı çalışmada, büyüme, prolin içeriği ve besin elementlerinin alınımında 50, 100, 200 ve 400 μM Cd konsantrasyonlarının etkisi incelenmiştir. Buna göre, özellikle de en yüksek Cd konsantrasyonunda bitkinin hem kök hem de dallarının kuru ve yaş ağırlığında önemli bir azalış gözlemlendiği ifade edilmiştir. Klorofil içeriğinin de artan Cd konsantrasyonlarıyla paralel olarak azaldığı tespit edilmiştir. Prolin içeriğinde dallarda 50 μM Cd'un önemli bir değişikliğe neden olmadığı, diğer konsantrasyonlarda ise konsantrasyonlardaki artış ile birlikte prolin içeriğinin de arttığı ifade edilmiştir. Köklerde ise uygulanan tüm Cd konsantrasyonlarının prolin içeriğini orantılı olarak arttırdığı belirtilmiştir. Ca ve K içeriğinin ise *Atriplex halimus* subsp. *schweinfurthii*'un hem kök hem de dallarında artan Cd konsantrasyonlarıyla birlikte azaldığı gösterilmiştir.

Chen ve ark. (2009)'na ait bir derleme çalışmasında bitkiler için gerekli Ni miktarının 0,05-10 mg/kg kuru ağırlık olduğu belirtilmiştir. Nikelin kritik toksik düzeylerinin hassas türler için >10 mg/kg kuru ağırlık, tolerant türler için >50 mg/kg kuru ağırlık ve nikel hiperakümülatör bitkiler için >1000 mg/kg kuru ağırlık olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca nikelin köklerle alınımında Cu ve Zn ile rekabet ettiği, ksilem üzerinden dal ve yapraklara taşındığı fakat bitkiler tarafından absorbe edilen Ni'in % 50'inden fazlasının köklerde bulunduğu ifade edilmiştir. Ürün kalitesi ve veriminin artırılmasında düşük dozlarda nikel bitkiler için gerekli iken yüksek Ni konsantrasyonlarının bitkilerin metabolik süreçlerinde olumsuz etkilere neden olduğu, fotosentez, solunum, bitki-su ilişkisi gibi temel süreçlerde özellikle de bitkinin azot metabolizmasında sorun oluşturduğu ve oksidatif strese neden olduğu pek çok çalışmada vurgulanmaktadır.

Gajewska ve ark. (2009)'nın *Triticum aestivum* L. (Buğday) ile yaptığı çalışmada 7 gün boyunca 50 ve 100 μM Ni konsantrasyonlarının kök kısımlarının azot özümlemesinde yer alan NR, NiR, GS ve GOGAT gibi önemli enzimlerin aktivitelerindeki değişimler belirlenmiştir. Ayrıca taze ağırlıkta meydana gelen değişimler ve Ni içeriği de ortaya konmuştur. Araştırma sonuçlarında uygulamanın 1. gününde sadece 100 μM Ni uygulamasında, 4. ve 7. günlerde ise uygulanan tüm Ni konsantrasyonlarında taze ağırlığın ve kök uzunluğunun azaldığı belirtilmiştir. Ayrıca tüm uygulama günlerinde Ni

konsantrasyonu arttıkça Ni içeriğinin de arttığı vurgulanmıştır. NR aktivitesinin sadece 100 µM Ni konsantrasyonunda tüm uygulama sürelerinde azaldığı tespit edilmiştir. GS aktivitesinin ise uygulamanın 4. ve 7. günlerinde azaldığı tespit edilmiştir.

Triticum aestivum L. (Buğday) bitkisi ile yapılan bir çalışmada ise azot metabolizması üzerinde 1, 4 ve 7 gün boyunca 50 ve 100 µM Ni konsantrasyonlarının etkisi incelenmiştir (Gajewska ve Sklodowska 2009). Buğday bitkisinin dallarında nitrat, amonyum, glutamat, prolin ve Ni içeriği ile NR, NiR, GS, GOGAT, glutamat dehidrojenaz (GDH), alanin aminotransferaz (AlaAT) ve aspartat aminotransferaz (AspAT) aktiviteleri belirlenmiştir. Buna göre, artan Ni konsantrasyonlarına paralel olarak dallardaki Ni içeriğinin de arttığı belirtilmiştir. Aynı zamanda dallarda nikel içeriğinin artmasıyla birlikte amonyum miktarının da arttığı, nitrat içeriği ve taze ağırlığın ise azaldığı gösterilmiştir. Bununla birlikte dallardaki NR ve NiR aktivitesinin de 4. ve 7. günlerde artan nikel konsantrasyonlarıyla birlikte azaldığı tespit edilmiştir. Glutamat içeriğinin ise artan nikel konsantrasyonlarına bağlı olarak 1 ve 4. günlerde azaldığı, 7. günde ise 50 µM Ni uygulamasında en yüksek değere ulaştığı bildirilmiştir. Bununla birlikte prolin içeriğinin de arttığı ifade edilmiştir. GS aktivitesinde 1. günde herhangi bir değişiklik gözlenmezken 4. ve 7. günde kontrole göre uygulanan nikel konsantrasyonlarının GS aktivitesini azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca Fd-GOGAT aktivitesinin 1. ve 4. günlerde artan nikel konsantrasyonlarına bağlı olarak azaldığı, 7. günde ise 50 µM Ni uygulamasında artarken, 100 µM Ni'de yeniden azaldığı tespit edilmiştir. NADH-GOGAT aktivitesinin ise tüm uygulama sürelerinde Ni konsantrasyonlarındaki artış ile paralel olarak arttığı ifade edilmiştir.

Matricaria chamomilla L. (Papatya) bitkisinin farklı konsantrasyonlardaki (3, 60 ve 120 µM) Ni uygulamasına verdiği fizyolojik yanıtları inceleyen Kováčik ve ark. (2009a) ise, bu çalışmada biyokütle, su içeriği, fotosentetik pigment, MDA, fenolik bileşikler, Ni birikimi, prolin, protein ve lignin içeriğindeki değişimleri belirlemiştir. Araştırmacılar, uygulanan en yüksek Ni konsantrasyonunda bile *Matricaria chamomilla*'nın su ve pigment içeriğinde, büyümede ve MDA içeriğinde herhangi bir değişiklik görülmediğini ifade etmiştir. Ayrıca yapraklarda belirlenen protein içeriğinde de anlamlı bir değişiklik olmazken köklerde yüksek Ni konsantrasyonlarında % 48-70 arasında bir artış gözlemlendiği vurgulanmıştır. Bununla birlikte yapraklardaki prolin içeriğinin artan Ni

konsantrasyonlarıyla paralel olarak arttığı, köklerde ise sadece en yüksek Ni konsantrasyonunda bir artış olduğu vurgulanmıştır. En yüksek Ni konsantrasyonunun tüm bitki kısımlarında fenolik bileşiklerin birikimini uyardığı belirtilmiştir. Köklerde lignin birikiminin, uygulanan Ni konsantrasyonlarından etkilenmediği ifade edilmiştir. Ayrıca, Ni konsantrasyonları arttıkça hem kök hem de yapraklarda Ni birikiminin de arttığı ve bu artışın köklerde daha fazla olduğu vurgulanmıştır.

Nikelin antioksidatif savunma sistemi üzerindeki etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada *Oryza sativa* L. (Pirinç) bitkisine 20 gün boyunca 200 ve 400 µM konsantrasyonlarında NiSO₄ uygulanmıştır (Maheshwari ve Dubey 2009). Buna göre nikelin alınımı ve taşınımı ile lipid peroksidasyonu ve antioksidatif enzimlerin (SOD, CAT, APX) aktivitesindeki değişimler belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarında, uygulama süresine bağlı olarak artan Ni konsantrasyonlarının kök ve dal uzunluğunda ve her iki bitki kısmının taze ağırlıklarında azalışa neden olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca kök ve dallarda Ni birikiminin arttığı ve kök kısımlarında bu birikimin daha fazla olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte lipid peroksidasyonunun Ni konsantrasyonlarındaki artış ile paralel olarak arttığı, düşük moleküler ağırlıklı tiollerin seviyesinde ise bir azalış meydana geldiği gösterilmiştir. Ayrıca askorbik asit (AsA) ve dehidroaskorbik asit (DHA) düzeylerinin de arttığı ve dallarda bu artışın daha fazla olduğu vurgulanmıştır. Enzimatik antioksidanlardan SOD ve APX aktivitelerinde artan Ni konsantrasyonları ile birlikte bir artış olduğu ifade edilmiştir. APX aktivitesinin özellikle köklerde daha yüksek olduğu vurgulanmıştır. CAT aktivitesinin ise her iki bitki kısmında da değişmediği belirtilmiştir.

Zea mays L. (Mısır) bitkisi ile yapılan bir çalışmada ise Wang ve ark. (2009), 100 mg/kg Ni'in yarattığı oksidatif stres ile fotosentez ve büyüme üzerindeki olumsuz etkiler üzerinde püskürtme yoluyla salisilik asit (SA) uygulamasının iyileştirici bir etkisi olup olmadığını araştırmıştır. Buna göre, Ni uygulanmış toprakta yetiştirilen mısır bitkilerinin yarısına 1 mM SA uygulaması yapılarak, +SA ve -SA olmak üzere iki seri hazırlandığı ifade edilmiştir. Buna göre, Ni stresinin mısır bitkisinde büyümeyi önemli derecede azalttığı ifade edilmiştir. SA uygulamasının ise Ni stresi altındaki bitkilerin büyümesinde meydana gelen azalışı engellediği belirtilmiştir. Ayrıca Ni stresi ile fotosentetik pigment içeriğinde, net fotosentez oranında önemli bir azalış gözlemlendiği, SA uygulamasının ise bu

parametrelerdeki düşüşü azalttığı vurgulanmıştır. Bununla birlikte köklerde belirlenen nikel içeriğinin, dallardan daha fazla olduğu belirtilmiştir. SA uygulamasının Ni lokalizasyonu ve kök ile dallar arasındaki dağılımı arasında belirgin bir fark yaratmadığı belirtilmiştir. Ni uygulamasıyla kloroplastlara ait MDA düzeyinde önemli bir artış olmasına rağmen SA'in MDA düzeyini azalttığı vurgulanmıştır. Ayrıca 100 mg/kg Ni stresinin oksidatif strese neden olduğu, salisilik asit uygulamasının ise ROS birikimini üzerinde etkili olmadığı belirtilmiştir. Bununla birlikte kloroplastlardaki SOD, APX ve GR aktivitesinin Ni uygulamasıyla arttığı, SA nin ise bu artışı azalttığı ifade edilmiştir.

Maleva ve ark. (2009) 5 gün boyunca farklı Ni konsantrasyonlarına (1, 10 ve 50 μM) maruz bıraktıkları sucul bir bitki türü olan *Elodea canadensis* Michx. bitkisinin yapraklarında Ni içeriği ile pigment ve protein içeriğini, lipid peroksidasyonunu, gaz değişim oranını, antioksidatif enzim aktivitelerini (SOD, CAT) ve tiyol içeren bileşiklerin biyosentezinde nikel konsantrasyonlarının etkisini belirlemiştir. Buna göre artan Ni konsantrasyonları ile birlikte Ni birikiminin de arttığı gösterilmiştir. Ayrıca en etkili Ni alınımının 1 μM Ni konsantrasyonunda gerçekleştiği gösterilmiştir. Artan Ni içeriğine bağlı olarak fotosentez oranında bir düşüş olduğu bununla birlikte fotosentetik pigment içeriğinin de azaldığı ifade edilmiştir. Bununla birlikte klorofil *a*'nın diğer pigmentlere göre Ni uygulamalarından iki kat daha fazla etkilendiği vurgulanmıştır. Net fotosentez ve solunum oranında ise sadece 50 μM Ni uygulamasında önemli bir azalış olduğu belirtilmiştir. Ayrıca Ni uygulamalarıyla lipid peroksidasyonu ile SOD ve CAT aktivitelerinin arttığı ifade edilmiştir. Ayrıca glutatyon redüktaz aktivitesinde ve tiyol gruplarının konsantrasyonunda artış belirlenmiştir.

Santos ve ark. (2009)'nın bir çalı türü olan *Cistus ladanifer* L. ile yaptıkları çalışmada bakır madeni çevresinden ve kirlenmemiş alanlardan alınan örneklerde As, Cu, Pb ve Zn'ya tolerans düzeyleri ortaya konmuştur. Buna göre bitkinin antioksidatif enzim aktivitesi (SOD, POD ve CAT) ve besin elementlerinin içeriği (Organik C, total N, P, K, Ca, Mg, K, Na) araştırılmıştır. Ayrıca bahar ve yaz aylarında örnekleme yapıldığı belirtilmiştir. Buna göre Pb, As ve Cu içeriğinin bakır madeni çevresinden alınan örneklerde daha yüksek olduğu belirtilmiştir. En yüksek Pb içeriğinin yaz ayında kirlenmemiş alandan yapılan örneklerde, en düşük Pb içeriğinin ise bahar ayında maden çevresinden alınan örneklerde elde edildiği gösterilmiştir. Zn içeriğinin ise her iki alandan

alınan örneklerde de aynı olduğu tespit edilmiştir. As, Pb ve Cu içeriğinin bakır madeni çevresinde yüksek olmasının besin elementlerinin konsantrasyonunda bir değişiklik yaratmadığı ifade edilmiştir. Bununla birlikte en yüksek CAT aktivitesinin maden çevresinden alınan örneklerde elde edildiği, POD aktivitesinin ise baharda alınan tüm örneklerin yapraklarında tespit edildiği belirtilmiştir. SOD aktivitesinin ise her iki mevsimde alınan tüm örneklerin yapraklarında belirlendiği fakat en yüksek değerlerin kirlenmemiş alanlardan alınan örneklerde elde edildiği gösterilmiştir.

Hänsch ve Mendel (2009)'nın derleme çalışmasında mikro besin elementlerinden biri olan Cu'nun yarısından fazlasının kloroplastlarda bulunduğu ve fotosentetik reaksiyonlarda yer aldığı açıklanmıştır. Bu nedenle Cu eksikliğinde oluşacak ilk değişikliklerin genç yapraklarda gözlemlendiği vurgulanmıştır. Ayrıca bakırın metabolik süreçlerde Fe ile ilişkili olduğu ifade edilmektedir. Örn: Fenton/Haber-Weiss reaksiyonlarında ve Fotosistem I de elektron taşınımında Cu ve Fe'in birlikte çalıştığı belirtilmiştir.

Kováčik ve ark. (2009), *Silene vulgaris* L. (Gıvışkanotu) ve *Silene dioica* L. Clairv. (Pembe gıvışkanotu) bitkisinin Cu'a toleransını araştırmak amacıyla 7 gün boyunca 60 µM Cu uygulaması yapmıştır. Buna göre incelenen her iki türde de Cu uygulamasına bağlı olarak kök ve dallarda herhangi bir değişiklik olmadığı, ancak tüm örneklerin kök ve dallarında Cu birikiminin gerçekleştiği belirtilmiştir. Fenolik bileşik içeriğinin tüm popülasyonlarda kontrole göre arttığı fakat en yüksek fenolik bileşik içeriğinin *S. dioica*'nın dallarında elde edildiği belirtilmiştir. Ayrıca dallardaki H₂O₂ içeriğinin *S. vulgaris*'de değişiklik göstermediği, *S. dioica*'da ise azaldığı ifade edilmiştir. Köklerde ise H₂O₂ içeriğinin *S. vulgaris*'de değişmediği, diğer türde ise arttığı tespit edilmiştir. Bunun ile ilişkili olarak süperoksit içeriğinin köklerde *S. vulgaris*'de değişmediği, *S. dioica*'da ise azaldığı belirtilmiştir. Dallara ait süperoksit içeriğinde ise hiçbir bireyde değişiklik olmadığı vurgulanmıştır. Çözülebilir protein içeriğinin tüm popülasyonlarda dal ve köklerde azaldığı, MDA içeriğinin ise her iki bitkinin köklerinde arttığı belirtilmiştir. Dallarda ise MDA içeriğinin *S. vulgaris*'de azaldığı, *S. dioica*'da ise arttığı ifade edilmiştir. Mineral besin elementlerinden ise sadece K'un Cu uygulaması ile birlikte iki türde de azaldığı tespit edilmiştir.

Tiwari ve ark. (2009) tarafından *Pisum sativum* L. (Bezelye) bitkisinde yapılan çalışmada 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 ve 0,4 mM Cr uygulaması yapılmıştır. Buna bağlı olarak bitkinin

biyokütlesi, klorofil içeriği, su içeriği, protein ve şeker içeriği ile antioksidatif savunma sistemi enzimlerinden bazılarının (CAT, POD) aktivitesinde meydana gelen değişimler belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarında klorofil, su ve şeker içeriğinin % 60 oranında azaldığı, protein içeriğindeki azalışın ise % 80'i geçtiği belirtilmiştir. Bitki biyokütlesinde ise % 50'den daha fazla bir azalış olduğu tespit edilmiştir. Antioksidatif savunma sistemine ait enzimlerin aktivitesinde ise uygulanan Cr konsantrasyonlarındaki artışa paralel olarak bir artış gözlenmiştir.

Diwan ve ark. (2010) tarafından 50, 100 ve 200 µM Cr uygulamalarının *Brassica juncea* (L.) Czern. (Hardalotu) ve *Vigna radiata* (L.) R.Wilcz. (Maş fasulyesi) türlerinin büyüme performansı, bitki bünyesindeki Cr birikimi ve antioksidatif savunma sistemi enzimleri (SOD, CAT ve APX) üzerindeki etkisi incelenmiştir. Buna bağlı olarak *B. juncea*'nın kök ve dallarında kontrole göre iki-üç kat daha fazla Cr birikiminin gerçekleştiği ortaya konmuştur. *V. radiata*'nın ise meydana gelen toksik semptomlardan dolayı Cr'a daha hassas olduğu ifade edilmiştir. Uygulanan tüm Cr konsantrasyonlarında her iki bitki türünde de antioksidatif savunma sistemi enzimlerinin (SOD, CAT ve APX) arttığı belirtilmiştir.

Dominquez ve ark. (2010)'nın yabani bir ot türü olan *Spartina densiflora* L. ile yaptıkları çalışmada, yaprak kısımlarında 10, 100 ve 1000 µM Cd konsantrasyonlarında meydana gelen oksidatif stres ve bitkinin bu strese karşı verdiği antioksidatif yanıtlar belirlenmiştir. Buna göre, doğal habitatlarından getirilen fidelere, laboratuvar ortamında 28 günlük bir alışma dönemi geçirdikten sonra Cd stresi uygulanarak Cd ve H₂O₂ içeriği ile askorbik asit (AA), dehidroaskorbik asit (DHA) içeriği, POD, SOD, APX ve CAT aktivitesindeki değişimler belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarında doğal alanlarından getirilen örneklerde Cd birikiminin olduğu, fakat 28 günlük alışma dönemi sonunda bitki dokusunda biriken Cd içeriğinin azaldığı tespit edilmiştir. Uygulama döneminde ise, Cd konsantrasyonlarındaki artışa paralel olarak yapraklardaki Cd birikiminin arttığı belirtilmiştir. Ayrıca klorofil içeriğinin alışma döneminin sonunda arttığı, uygulamadan sonra ise tekrar azaldığı ifade edilmiştir. MDA içeriğinde ise alışma periyodu boyunca belirgin bir değişim gözlenmediği, uygulama periyodunda ise 100 ve 1000 µM Cd konsantrasyonlarında arttığı belirtilmiştir. H₂O₂ içeriğinin alışma ve uygulama periyodu boyunca giderek azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca doğal alandan toplanan örneklerde

antioksidan enzim aktivitelerinin daha yüksek olduğu, alıştırma periyodu boyunca bu enzim aktivitelerinin azaldığı gösterilmiştir. Uygulama periyodunda ise artan Cd konsantrasyonlarıyla birlikte bu enzim aktivitelerinin arttığı belirtilmiştir.

Zhao ve ark. (2010) hidrofonic ortamda yetiştirdikleri *Festuca arundinaceae* L. ve *Lolium perenne* L.'nin köklerinde Cu stresi altında (30, 60, 90 ve 120 mg/L konsantrasyonlarının) kök büyümesi, lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzimlerinde meydana gelen değişimleri tespit etmiştir. Elde edilen sonuçlarda, her iki bitki türünün de uygulanan Cu konsantrasyonlarından etkilendiği ve kök büyümesi ile biyomasın azaldığı belirtilmiştir. Bununla birlikte, MDA içeriğinin her iki bitki türünde de artan Cu konsantrasyonlarındaki artış ile birlikte arttığı ifade edilmiştir. *F. arundinaceae*'nin köklerinde SOD aktivitesinin artan Cu konsantrasyonlarına paralel olarak arttığı, *L. perenne*'de ise 60 mg/L konsantrasyonuna kadar bir azalış meydana geldiği belirtilmiştir. 90 ve 120 mg/L konsantrasyonlarında ise SOD aktivitesinin tekrardan arttığı vurgulanmıştır. POD aktivitesinde ise *F. arundinaceae*'nin köklerinde 30 mg/L Cu uygulamasında artış olduğu ve konsantrasyonlardaki artış ile paralel olarak aktivitenin azaldığı gösterilmiştir. *L. perenne*'nin köklerinde belirlenen POD aktivitesinde ise uygulanan Cu konsantrasyonlarının herhangi bir değişiklik meydana getirmediği belirtilmiştir.

Başka bir çalışmada 2 hafta boyunca 100 µM Cu konsantrasyonuna maruz bırakılan *Carthamus tinctorius* L. (Yalancı safran) bitkisinde antioksidan enzim aktivitelerindeki (SOD, POD ve CAT) değişimler ile klorofil ve karotenoid içeriği, Cu birikimi ve lipid peroksidasyonu belirlenmiştir (Ahmed ve ark. 2010). Buna göre klorofil *a*, *b* ve total klorofil içeriğinde azalış olduğu, MDA içeriğiyle belirlenen lipid peroksidasyonunun köklerde belirgin düzeyde arttığı gösterilmiştir. Ayrıca Cu birikiminin kök ve yapraklarda gerçekleştiği fakat köklerdeki birikimin daha fazla olduğu belirtilmiştir. SOD, POD ve CAT aktivitelerinin ise tüm bitki kısımlarında arttığı fakat bu artışın köklerde daha fazla olduğu ifade edilmiştir.

Lu ve ark. (2010)'nın iki çöl bitkisi olan tek yıllık *Halogeton glomeratus* (M. Bieb.) C.A. Mey. ve çok yıllık *Peganum harmala* (Harmal) Vault. ile yaptıkları çalışmada 2 aylık fidelere 10, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarında Ni+Cu uygulamış ve ağır metal birikimini, antioksidatif enzim aktivitelerini (SOD, CAT, APX) ve MDA içeriğini

belirlemiştir. Elde edilen sonuçlarda, 10 ve 100 µM Ni+Cu konsantrasyonlarının SOD aktivitesini arttırdığı, 200 µM Ni+Cu in ise azalışa neden olduğu belirtilmiştir. Ayrıca *H. glomeratus* bitkisinde SOD aktivitesinin daha yüksek olduğu ifade edilmiştir. CAT aktivitesinin *H. glomeratus* bitkisinde sadece yüksek konsantrasyonlarda arttığı, *P. harmala* bitkisinde ise yüksek konsantrasyonlarda azaldığı belirtilmiştir. *P. harmala*'nın APX aktivitesinin 10 µM' da en yüksek değere ulaştığı, *H. glomeratus*'da ise 100 µM da maximum düzeye ulaştığı vurgulanmıştır. Ayrıca *H. glomeratus* un büyümesinde 200 µM in hem kuru hem de taze ağırlıkta % 14-15 oranında bir azalışa neden olduğu tespit edilmiştir. *P. harmala*'da ise tüm uygulamaların biyokütleyi azalttığı belirtilmiştir. Ayrıca her iki bitki türünde de konsantrasyonlardaki artışa paralel olarak Ni ve Cu birikiminin arttığı, bu artışın *H. glomeratus* bitkisinde daha fazla olduğu ifade edilmiştir. Sonuç olarak, tek yıllık *Halogeton glomeratus* bitkisinin metal stresine karşı *Peganum harmala*'dan çok daha güçlü olduğu vurgulanmıştır.

Lamb ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada Avustralya'ya ait dört yerli ağaç türünde Cd, Cu, Zn ve Pb'nin etkisi incelenmiştir. Buna göre metaller arasında toksik etki düzeyine göre sıralamanın Cd ~ Cu > Pb > Zn olduğu belirtilmiştir. Buna göre Cd ve Cu metal uygulamalarının büyüme üzerinde %50 oranında azalışa neden olduğu vurgulanmıştır. Çalışmada incelenen türler arasında *Acacia* cinsine ait türlerin incelenen metallere karşı daha toleranslı olduğu, en hassas türün ise *Lactuca sativa* olduğu ifade edilmiştir.

Kachout ve ark. (2010a)'nın çalışmasında *Atriplex hortensis* L. ve *A. rosea* L. türlerine farklı konsantrasyonlarda (150, 400 ve 1000 µM/L) Pb, Cu, Ni, Zn ve Cd ayrı ayrı uygulanmış, buna göre bitki türlerinin büyümesi ve metal birikimi, taze ağırlık ve boy uzunluğu ile biyokonsantrasyon faktörü belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarında her iki *Atriplex* türünde de metal birikiminin köklerde daha fazla olduğu ifade edilmiştir. Çalışmada uygulanan metal konsantrasyonlarına en dirençli türün *A. rosea* olduğu ve bitkinin tolerans durumunun da Cd > Pb > Cu > Zn > Ni şeklinde olduğu belirtilmiştir. *A. rosea*'nın dallarında biriken Cd miktarının diğer türe ve diğer metallere göre daha yüksek olduğu, taze ağırlık ve boy uzunluğunda daha az bir düşüş olduğu ve biyokonsantrasyon faktörünün Cd uygulamasında daha yüksek olduğu gösterilmiştir.

Aynı araştırmacılar *Atriplex hortensis* L. ve *A. Rosea* L.'da Cu, Ni, Pb ve Zn'nin antioksidatif savunma sistemi (SOD, CAT, APX) üzerindeki etkilerini de incelemiştir (Kachout ve ark. 2010b). Çalışmada kirlenmiş alandan alınan örneklerin topraklarındaki kirlilik düzeyleri belirlenmiştir. Daha sonrada örnekler 1 ay boyunca laboratuvar koşullarında farklı yüzdelerde kirlenmiş (% 25, 50, 75 ve 100) topraklarda yetiştirilmiştir. Buna göre *A. hortensis*' in kök ve dal kuru ağırlığındaki azalışın *A. rosea*'ya göre daha fazla olduğu ve uygulanan kirlenmiş toprak yüzdesi arttıkça kuru ağırlığın da orantılı olarak azaldığı belirtilmiştir. *A. hortensis* ve *A. rosea* 'nın % 25 ve % 50 kirlilik düzeyine sahip topraklarda yetiştirilen örneklerinde CAT aktivitesinin arttığı, %75 ve % 100 kirlilik düzeyinde ise elde edilen değerlerin kontrol örnekleri ile aynı olduğu gösterilmiştir. SOD aktivitesinde ise her iki türde de uygulama yapılmış örneklerde kontrole göre SOD aktivitesinin azaldığı belirtilmiştir. APX aktivitesinin ise SOD'un aksine tüm uygulamalarda kontrole göre arttığı ifade edilmiştir.

Wang ve ark. (2010)'nın çalışmasında bir ağaç türü olan *Paulownia fortunei* L.'nin genç fidelerine 20, 40, 80 ve 160 mg/L konsantrasyonlarında Pb ve Zn; 10, 20, 40 ve 80 mg/L konsantrasyonlarında Cu ve 2,5, 5, 10 ve 20 mg/L konsantrasyonlarında Cd'un verdiği fizyolojik yanıtlar ve antioksidatif enzim (SOD, POD, CAT, APX ve GPX) aktivitesinde meydana getirdiği değişimler incelenmiştir. Buna göre ROS üretiminde Cd ve Pb konsantrasyonlarının bir artışa neden olduğu ve SOD, POD, CAT, APX ve GPX enzim aktivitelerinin Cd ve Pb uygulamalarında arttığı belirtilmiştir. Zn ve Cu uygulamalarında ise konsantrasyonlardaki artışın aksine antioksidatif enzim aktivitelerinde azalış meydana gelmiştir. Ayrıca Cd, Zn, Cu ve Pb konsantrasyonları arttıkça pigment içeriğinin azaldığı, fakat Cu ve Zn uygulamalarında bu azalışın daha fazla olduğu gösterilmiştir. MDA içeriğinde Pb ve Cd konsantrasyonlarındaki artışa paralel olarak bir artış olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte uygulanan diğer metallerin MDA içeriğinde önemli bir değişim yaratmadığı ifade edilmiştir.

Gajewska ve Sklodowska (2010)'nın *Triticum aestivum* L. (Buğday) fideleri ile yaptığı çalışmada 7 gün boyunca 75 µM konsantrasyonunda Cd, Cu ve Ni uygulaması yapılmış ve büyüme, metal birikimi, glutatyon içeriği, lipid peroksidasyonu ve membran zararı, protein oksidasyonu, proteaz ve POD aktivitesinde meydana gelen değişimler incelenmiştir. Buna göre üç metalin de kök ve dal büyümesini azalttığı, fakat en büyük

azalışın Cu uygulamasında meydana geldiği belirtilmiştir. Membranlardaki iyon kaybının kök kısımlarında üç metalde de benzer düzeyde arttığı, dallarda ise Cu uygulamasında en yüksek değere ulaştığı gösterilmiştir. Lipid peroksidasyonu iyon kaybına ait değerlere benzerdir. Proteolitik aktivitede Cd ve Ni uygulamasının önemli bir değişim yaratmadığı, 75 µM Cu' ın ise proteolitik aktiviteyi arttırdığı belirtilmiştir. Cd ve Ni uygulamalarının dallarda POD aktivitesini arttırdığı, köklerde ise POD aktivitesindeki artışın büyükten küçüğe Cu>Cd>Ni şeklinde olduğu belirtilmiştir.

Ağır metale toleranslı bitki türlerinin araştırılması, bu türlerin kirlenmiş alanların restorasyonunda kullanılma adına önemli bir yere sahiptir. Örneğin, Sharma ve ark. (2010) *Brassica juncea* (L.) Czern. (Hardal) bitkisinin kültürlerine (TM-4, TM-2, RH-30 ve T-59) 0,5, 1 ve 1,5 mM konsantrasyonlarında Cd uygulamış, buna bağlı olarak bitkinin büyüme durumunu, antioksidatif enzimlerden SOD aktivitesi ve nitrat asimilasyonunda yer alan NR ve NiR aktivitesindeki değişimi incelemiştir. 0,5-1,5 mM arasında uygulanan Cd konsantrasyonlarının çalışılan dört kültürde de tohum çimlenmesi ve fide büyümesinde bir azalış meydana getirdiğini göstermiştir. Ayrıca dört kültürde de Cd konsantrasyonundaki artışla birlikte NR aktivitesinin azaldığı, dokulardaki Cd ve prolin birikimi ile SOD aktivitesinin arttığı belirtilmiştir. Fakat T-59 varyetesinin diğer kültürlere göre bünyesinde daha fazla Cd biriktirdiği, peroksidaz aktivitesinin ve prolin içeriğinin artan Cd konsantrasyonlarına bağlı olarak arttığı ve Cd konsantrasyonu arttıkça NR aktivitesindeki düşüşün de azaldığı ortaya konmuştur. Buna göre T-59 varyetesinin en toleranslı varyete olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle T-59 varyetesinin bitkilerle geri kazanımda (phytoremediation) kullanılacak en iyi varyete olduğu sonucuna varılmıştır.

Khellaf ve Zerdaoui (2010), *Lemna gibba* L. (Su mercimeği) bitkisine 4 gün boyunca 0,1-2 mg/L konsantrasyonlarında Cu ve Ni uygulayarak bitkinin bu metallere olan tolerans düzeyini ve metal birikimini belirlemeyi amaçlamıştır. Araştırma sonuçlarında *Lemna gibba*'nın 0,1-0,3 mg/L Cu ve 0,1-0,5 mg/L Ni konsantrasyonlarını tolere edebildiği, fakat daha yüksek konsantrasyonlarda büyümenin minimum % 50 azaldığı belirtilmiştir. Ayrıca her iki metalin de bitki dokusunda biriktiği fakat en fazla birikimin Cu uygulamasında elde edildiği vurgulanmıştır. Bu nedenle Cu ile kirlenmiş sularda

uygulanacak bitkilerle geri kazanım (phytoremediation) teknikleri için *Lemna gibba* 'nın uygun bir tür olabileceği ifade edilmiştir.

Sun ve ark. (2010) bir yosun olan *Hypnum plumaeforme* Wilson'e Pb ve Ni'in farklı konsantrasyonlarını kombine halde uygulamış olup antioksidatif yanıtlarını incelemiştir. Buna göre, 0,01, 0,1, 1 ve 10 mM konsantrasyonlarında Pb ve 0,001, 0,01, 0,1 ve 1 mM konsantrasyonlarında Ni' in tek tek ve kombinasyonlarını içeren altı serilik (T1-T6) bir uygulama yapılmıştır. Elde edilen sonuçların Pb ve Ni metallerinin kombine uygulamalarının doza bağlı olarak H₂O₂ birikimine neden olduğu, POD aktivitesinin artmasına neden olurken APX aktivitesini azalttığı ifade edilmiştir. Ayrıca Pb ve Ni' in kombine uygulamasında askorbat (AsA) ve prolin içeriğinin önemli derecede arttığı belirtilmiştir. Bununla birlikte Pb'nin tek başına uygulamasında meydana gelen hücre zararının Ni konsantrasyonlarının neden olduğu zarardan daha fazla olduğu vurgulanmıştır.

Bir sucul bitki olan *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. 'te Cu'ın neden olduğu oksidatif stresi araştıran Xu ve ark. (2011), 0,05, 0,1, 0,2, 0,6, 0,8 ve 1 mM Cu konsantrasyonlarında MDA ve protein içeriği ile SOD, CAT, POD aktivitelerinde meydana gelen değişimleri incelemiştir. Araştırma sonuçlarında Cu birikiminin konsantrasyonlardaki artış ile birlikte arttığı, SOD aktivitesinin ise >0,1 mM konsantrasyonlarda arttığı belirtilmiştir. POD aktivitesinin tüm Cu konsantrasyonlarında azaldığı tespit edilmiştir. CAT aktivitesinin 0,6 mM Cu konsantrasyonuna kadar değişmediği, >0,6 mM konsantrasyonlarda ise azaldığı gösterilmiştir. MDA içeriğinin ise tüm Cu konsantrasyonlarında kontrole göre azaldığı belirtilmiştir.

Delmail ve ark. (2011) ise sucul bir bitki olan *Myriophyllum alterniflorum* DC. da 100 µg/L Cu konsantrasyonunun bitkinin su içeriği, prolin, pigment ve MDA içeriğindeki etkisi ve bu konsantrasyondaki Cu birikimi araştırılmıştır. Buna göre su içeriğinin Cu uygulanmış örneklerin genç ve yaşlı yapraklarında azaldığı, prolin içeriğinin ise sadece yaşlı yapraklarda arttığı belirtilmiştir. Klorofil *a* ve *b* içeriğinin genç yapraklarda daha belirgin düzeyde azaldığı hatta klorofil *b* içeriğindeki azalışın daha fazla olduğu gösterilmiştir. MDA içeriğinin sadece Cu stresine maruz bırakılmış genç yapraklarda arttığı tespit edilmiştir. Cu birikiminin ilk 24 saat boyunca arttığı, sonrasında ise sabit hale geldiği belirtilmiştir.

Medicago sativa L. (Yonca) bitkisi ile yapılmış bir çalışmada 10, 30, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarında Cu stresine bağlı olarak köklerde meydana gelen oksidatif stres ve antioksidatif yanıtlar değerlendirilmiştir (Wang ve ark. 2011). Buna göre uygulanan Cu konsantrasyonlarının köklerdeki MDA, glutatyon, protein içeriğinde, ayrıca membran bütünlüğü ile antioksidatif enzim aktivitelerinde (SOD, POD, CAT ve APX) meydana getirdiği değişimler belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarında kök büyümesinin azaldığı, Cu içeriğinin ise arttığı vurgulanmıştır. Bununla birlikte MDA içeriğinin 30-50 µM Cu konsantrasyonlarında yaklaşık % 35 oranında arttığı, fakat diğer konsantrasyonlarda önemli bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir. GSH içeriğinin yine 30-50 µM Cu konsantrasyonlarında arttığı, 100 µM'da ise azaldığı belirtilmiştir. SOD ve GR aktivitesinin 50 ve 100 µM Cu konsantrasyonlarında azaldığı, POD aktivitesinin ise bu konsantrasyonlarda arttığı gösterilmiştir. CAT aktivitesinin ise tüm konsantrasyonlarda arttığı, APX aktivitesinin ise 30 µM Cu uygulamasında arttığı belirtilmiştir.

Bir çalı türü olan *Atriplex halimus* L. ile yapılan çalışmada Brahim ve Mohamed (2011) 50, 500, 1000 ve 2000 µM Cu konsantrasyonlarının klorofil ve protein içeriği ile antioksidatif enzim aktivitelerinde (SOD, CAT, POX) meydana getirdiği değişiklikleri belirlemiştir. Buna göre klorofil *a* ve *b* içeriğinin artan Cu konsantrasyonlarına paralel olarak azaldığı tespit edilmiştir. Jel elektroforezi ile belirlenen antioksidatif enzim aktivitelerinde ise SOD' a ait 3 izoenzimden SOD1'in tüm konsantrasyonlarda aynı yoğunlukta var olduğu, SOD2 izoenziminin 500 µM Cu konsantrasyonundan itibaren görünür olduğu, SOD3 izoenziminin ise konsantrasyondaki artış ile azaldığı belirtilmiştir. CAT'a ait izoenzimlerden CAT1'in tüm uygulamalarda gözleendiği, CAT2 ve CAT3' ün ise kontrol örneklerinde olmayıp 50 µM Cu uygulaması ile birlikte görüldüğü ifade edilmiştir.

Lycopersicum esculentum Mill. (Domates) ve *Cucumis sativus* L. (Salatalık) bitkilerinde Cu uygulamalarının meydana getirdiği oksidatif zararı ve bitkilerin Cu stresine verdiği antioksidatif yanıtları belirlemeyi amaçlayan İşeri ve ark. (2011) ise bitkilere 7 gün boyunca 0-500 ppm konsantrasyonlarında Cu uygulaması yapmıştır. Araştırma sonuçlarında Cu konsantrasyonlarındaki artışa paralel olarak her iki bitkinin de kök büyümesinin azaldığı ifade edilmiştir. Bunun üzerine her iki bitki için de etkili Cu konsantrasyonlarının (Domates için 30 ppm, salatalık için 5,5 ppm) belirlendiği ifade

edilmiştir. Ayrıca her iki bitkide de MDA ve H₂O₂ içeriğinin arttığı gösterilmiştir. Fakat domates bitkisinde elde edilen bu değerlerin daha yüksek olduğu ifade edilmiştir. Belirlenen Cu konsantrasyonlarının her iki bitki türünde de CAT ve APX aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir. Bu artışın salatalık bitkisinde daha yüksek olduğu belirtilmiştir.

Rastgoo ve Alemzadeh (2011)'in çalışmasında farklı konsantrasyonlarda (50 µM ve 100 µM) Cd, Co, Pb ve Ag'ün *Aeluropus littoralis* (Gouan) Parl. (Sahilayrığı) bitkisinde meydana getirdiği biyokimyasal yanıtlar incelenmiştir. Buna göre, klorofil içeriği, fenolik bileşikler, prolin içeriği, eriyebilir protein ve enzimatik antioksidanların aktivitesindeki (SOD, CAT, GPOx) değişimler tespit edilmiştir. Araştırma sonuçlarında uygulanan dört metalin de konsantrasyonlardaki artış ile paralel olarak klorofil içeriğini azalttığı belirtilmiştir. Bununla birlikte tüm metallerin fenolik bileşik içeriğini ve prolin miktarını arttırdığı, fakat en fazla artışın Cd ve Pb metallerinde elde edildiği ifade edilmiştir. Protein içeriğinde ise Cd uygulamalarının olumsuz bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Diğer metallerin ise protein içeriğini arttırdığı vurgulanmıştır. Antioksidatif enzimlerden biri olan SOD aktivitesinin 50 µM Cd uygulamasında arttığı, 100 µM Cd konsantrasyonunda ise azaldığı belirtilmiştir. CAT aktivitesinin ise Cd konsantrasyonlarındaki artış ile paralel olarak arttığı ifade edilmiştir. Co ve Pb metallerinin ise konsantrasyonlardaki artış ile birlikte hem SOD hem de CAT aktivitesini arttırdığı vurgulanmıştır. Ag uygulamasında 50 µM konsantrasyonunun SOD ve CAT aktivitesini arttırdığı, 100 µM konsantrasyonunun ise her iki enzimin aktivitesinde azalışa neden olduğu belirtilmiştir.

Israr ve ark.(2011) yabancı bir bitki olan *Sesbania drummondii* (Rydb.) Cory fidelerinin hem kök hem de toprak üstü kısımlarına 10 gün boyunca Pb, Cu, Ni ve Zn uygulaması (tekli, ikili ve dördü kombinasyonları) yapmış olup bitkinin büyüme, metal alınımı ve antioksidatif metabolizması üzerindeki etkilerini incelemiştir. Buna göre, tüm metal uygulamalarında bitkinin köklerindeki metal içeriğinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bitki kısımlarındaki en yüksek metal birikimi Pb uygulamasında elde edilmiştir. Ayrıca toprak üstü kısımlarında Zn varlığında Pb ve Ni' nin alınımının arttığı, Pb varlığında ise Ni alınımının azaldığı gösterilmiştir. Bununla birlikte metalin tipine ve kombinasyonuna göre büyümenin engellendiği fakat gözle görülür herhangi bir toksik semptom oluşmadığı ifade edilmiştir. Büyümenin engellenmesinde en toksik metalin Cu olduğu tespit edilmiştir. Dördü kombinasyonda *Sesbania drummondii* fidelerinin

büyümesinde maksimum inhibisyon oluşmuştur. Fotosentetik aktivitede en çok Ni' in azalışa neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca hem enzimatik (SOD, APX, GR) hem de enzimatik olmayan antioksidanların (glutasyon vd.) tüm metal uygulamalarında birbirine benzer şekilde arttığı belirtilmiştir.

Marques ve Soares (2011) ise 45 ve 90 µmol/L konsantrasyonlarında Cd'un *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen (Ginseng) bitkisinin antioksidatif enzim sisteminde meydana getirdiği değişiklikleri ortaya koymuştur. Buna göre 1., 12. ve 20. günlerde örnekleme yapılmış olup SOD, CAT, APX ve GR aktiviteleri ile bitki örneklerinin kuru ağırlığı, MDA ve Cd içeriği belirlenmiştir. Cd birikiminin konsantrasyonlardaki artışa paralel olarak kök ve dallarda arttığı, köklerdeki Cd içeriğinin dallara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Kuru ağırlıkta da tüm bitki kısımlarında artan Cd konsantrasyonlarına ve uygulama süresine bağlı olarak artış olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca MDA içeriğinin kök kısımlarında 12. günden sonra, yaprak kısımlarında ise 20. günden sonra arttığı ifade edilmiştir. Bununla birlikte SOD aktivitesinin 1. günde 45 µM Cd konsantrasyonunda yapraklarda arttığı, köklerde ise değişmediği belirtilmiştir. 90 µM Cd konsantrasyonunda ise 1. günde yapraklardaki SOD aktivitesinin azaldığı, köklerde ise arttığı vurgulanmıştır. 12. günde hem kök hem de yapraklarda tüm Cd konsantrasyonlarının SOD aktivitesini azalttığı belirtilmiştir. CAT aktivitesinde ise 1. günde sadece 90 µM Cd konsantrasyonunun yapraklarda CAT aktivitesini arttırdığı, köklerde ise azalttığı ifade edilmiştir. 12. gün yapılan örneklemelemlerde ise yapraklarda tüm Cd konsantrasyonlarının CAT aktivitesini arttırdığı, köklerde ise sadece 90 µM Cd konsantrasyonunun CAT aktivitesinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir. 20. günde ise yalnızca 90 µM Cd konsantrasyonunun yapraklarda CAT aktivitesini arttırdığı, köklerde ise azalttığı belirtilmiştir. APX aktivitesinin kök kısımlarında daha yüksek olduğu vurgulanmıştır. Köklerde ise tüm Cd konsantrasyonları ve uygulama süresinde APX aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir.

Martins ve ark. (2011) *Nicotiana tabacum* L. (Tütün) bitkisinin farklı bitki kısımlarında (genç yaprak, yaşlı yaprak, dallar ve kök) Cd'un neden olduğu oksidatif stresi, antioksidatif yanıtları (SOD, APX) ve büyüme parametrelerini belirlemiştir. Buna göre, 10, 25, 50 ve 100 µM Cd konsantrasyonlarının büyümede önemli düzeyde bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir. Yüksek Cd konsantrasyonlarından (100 µM) genç

yaprakların daha fazla etkilendiği ve klorofil içeriğinde önemli bir azalış meydana geldiği belirtilmiştir. Dokulardaki Cd birikiminin artan konsantrasyonlar ile birlikte arttığı ve bu birikimin tütün bitkisinin köklerinde daha fazla olduğu gösterilmiştir. MDA içeriğiyle belirlenen lipid peroksidasyonunun Cd konsantrasyonlarındaki artışa paralel olarak arttığı, bu artışın en çok yapraklarda gözlemlendiği vurgulanmıştır. Bununla birlikte SOD aktivitesinin Cd uygulamalarıyla birlikte yaşlı yapraklarda arttığı, genç yapraklarda ise bunun aksine Cd konsantrasyonları arttıkça azaldığı belirtilmiştir. Ayrıca tütünün yaşlı ve genç yapraklarında APX aktivitesinde herhangi bir değişiklik meydana gelmediği gösterilmiştir.

Bao ve ark. (2011)'nin bir Cd hiperakümülatörü olan *Solanum nigrum* L. (Köpeküzümü) bitkisi ile yaptıkları çalışmada 0,01, 0,1 ve 1 mg/L konsantrasyonlarında Cd' un meydana getirdiği oksidatif yanıtlar ile bitki dokularında prolin ve Cd birikimi incelenmiştir. Ayrıca hiperakümülatör bir tür olmayan *S. lycopersicum* ile arasındaki farkları ortaya konmuştur. Buna göre, *S. nigrum*' un yapraklarında artan Cd birikimiyle orantılı olarak klorofil içeriğinin azaldığı, fakat yine de *S. lycopersicum* türüne göre klorofil içeriğinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Her iki türde de kök ve dal kısımlarına ait biyokütlenin artan Cd konsantrasyonları ile birlikte azaldığı vurgulanmıştır. Ayrıca *S. nigrum*' un dallarında *S. lycopersicum*' un ise kök kısımlarında daha fazla Cd biriktiği belirtilmiştir. Her iki türde de artan Cd konsantrasyonlarının MDA düzeyini arttırdığı, fakat bu artışın *S. lycopersicum* türünde daha fazla olduğu gösterilmiştir. Yapraklarda belirlenen SOD aktivitesinin *S. nigrum*' da daha fazla olduğu ve artan Cd konsantrasyonlarına bağlı olarak SOD aktivitesinin her iki türde de azaldığı ifade edilmiştir. CAT aktivitesinin ise artan Cd uygulamasına paralel olarak arttığı ve *S. nigrum*'da CAT aktivitesinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Son olarak belirlenen prolin içeriğinin her iki türde de köklerde daha fazla olduğu, aynı zamanda *S. nigrum*'da daha yüksek değerlerin elde edildiği ifade edilmiştir.

Başka bir çalışmada iki farklı fizikokimyasal özelliğe sahip toprakta yetişen *Glycine max* L. (Soya fasulyesi)'in büyüme ve antioksidan kapasitesinde 45 gün boyunca 2, 4, 6, 8, 10 mg/kg konsantrasyonlarında Cd ve 15, 30, 45 ve 60 mg/ kg konsantrasyonlarında Ba'un etkisi incelenmiştir (Melo Azevedo ve ark. 2011). Entisol (toprak tabakalarına sahip olmayan mineral içeriği yüksek genç topraklar) ve oksisol (toprak tabakalarının olduğu,

düşük katyon değişim kapasitesine sahip tropikal yağmur ormanlarındaki toprak tipi) topraklarda yetiştirilen örneklerin kuru ağırlığının oksisol topraklarda yetişen örneklerde daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Ayrıca uygulanan Cd konsantrasyonlarının her iki toprak tipinde yetişen örneklerin kuru ağırlığında azalışa neden olduğu, bu azalışın oksisol topraklardaki örneklerde daha fazla olduğu ifade edilmiştir. Ba uygulamalarında ise her iki toprak tipinde de kuru ağırlığın Cd kadar azalmadığı gösterilmiştir. Oksisol topraklarda lipid peroksidasyonunun tüm Cd konsantrasyonlarında ve örnekleme günlerinde arttığı, entisol topraklarda ise 45. günde yapılan örnekleme dışında diğer tüm örnekleme günlerinde azaldığı tespit edilmiştir. Her iki toprak tipinde de Cd konsantrasyonlarının SOD aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir. Entisol topraklardaki örneklerin yapraklarında SOD enzimine ait 12 izoenzimin tespit edildiği, fakat Mn-SOD izoenziminin her iki toprak tipindeki örneklerde de aynı düzeylerde var olduğu ifade edilmiştir. CAT aktivitesinin her iki toprak tipinde de artan Cd konsantrasyonlarıyla birlikte arttığı ifade edilmiştir.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada Özdener ve Kutbay (2011), 0,01, 0,025 mM konsantrasyonlarında Cd stresi uyguladıkları *Verbascum weidemannianum* Fisch. & Mey.' da meydana gelen fizyolojik ve biyokimyasal yanıtları incelemiştir. Buna göre uygulanan Cd konsantrasyonlarında *V. weidemannianum*'nın kök ve dal uzunluklarında belirgin bir azalış meydana geldiği ifade edilmiştir. Ayrıca MDA içeriğiyle belirlenen lipid peroksidasyonunun ve POD aktivitesinin Cd konsantrasyonlarındaki artış ile orantılı olarak arttığı tespit edilmiştir. Klorofil *a* ve *b* içeriğinde ise artan Cd konsantrasyonlarıyla birlikte anlamlı bir artış olduğu ifade edilmiştir. Oksidatif stresin varlığını gösteren prolin içeriğinde ise belirgin bir artış olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak, uygulanan Cd konsantrasyonlarının *V. weidemannianum*' da strese neden olduğu vurgulanmıştır.

Yılmaz ve Parlak (2011) ise 0,05, 0,5, 5, 10 ve 20 mg/L konsantrasyonlarında Cd stresi altında sucul bir bitki türü olan *Groenlandia densa* (L.) Fourr.'da prolin birikimini ve antioksidatif enzim aktivitelerindeki değişimleri incelemiştir. Buna bağlı olarak, tüm Cd konsantrasyonlarında bitki dokularında Cd birikiminin gerçekleştiği fakat en yüksek birikimin 0,5 mg/L Cd konsantrasyonunda elde edildiği ifade edilmiştir. 0,5 mg/L'dan daha yüksek konsantrasyonlarda Cd birikiminin değişmediği gösterilmiştir. Ayrıca klorofil içeriğinin artan Cd konsantrasyonlarıyla birlikte azaldığı belirtilmiştir. Total

protein içeriğinin 0,05 ve 0,5 mg/L Cd konsantrasyonlarında kontrole göre arttığı, diğer tüm Cd konsantrasyonlarında ise azaldığı vurgulanmıştır. Bununla birlikte MDA ve prolin içeriğinin uygulanan tüm Cd konsantrasyonlarında arttığı gösterilmiştir. CAT aktivitesinin 5 mg/L Cd konsantrasyonuna kadar arttığı ve bu konsantrasyonda en yüksek değere ulaştığı, 10 ve 20 mg/L Cd konsantrasyonlarında ise konsantrasyonlardaki artış ile paralel olarak azaldığı belirtilmiştir. SOD aktivitesinin de CAT aktivitesiyle benzer bir eğilim gösterdiği vurgulanmıştır. APX ve GR aktivitesinde ise en düşük Cd konsantrasyonunda artış olduğu, diğer Cd konsantrasyonlarında ise konsantrasyonlardaki artış ile birlikte APX ve GR aktivitesinin azaldığı ifade edilmiştir.

Soudek ve ark. (2011), kontrollü koşullarda yetiştirdiği *Allium sativum* L. (Sarımsak) bitkisine 48 saat boyunca 50 ve 250 µM konsantrasyonlarında Cd, Co, Cu ve Ni uygulamış ve buna göre her bir metalin klorofil ve karetonoid içeriği, ağır metal birikimi, kök uzunluğu ve amino asit içeriği üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Araştırma sonuçlarına göre uygulanan tüm metallerin 12 saat içinde etki ettiği ve bitkinin kök kısımlarında biriktiği ifade edilmiş olup *Allium sativum*'un Cd için hiperakümülatör olduğu belirtilmiştir. Glu ve Cys gibi fitoşelat oluşumunda yer alan amino asit içeriğinde meydana gelen azalışın Cd uygulamasında daha fazla olduğunu gösterilmiştir. Bu durum *Allium sativum*'da Cd'un fitoşelat oluşturduğunun bir göstergesi olarak belirtilmiştir. Co, Cu ve Ni'in de büyümeyi, klorofil, karetonoid ve amino asit içeriğini azalttığı fakat bu etkilerin Cd'daki kadar yüksek olmadığı ifade edilmiştir.

El-Shora ve Ali (2011) ise *Cucurbita pepo* L. (Sakız kabağı) bitkisine 10, 20, 30, 40 ve 50 µM konsantrasyonlarında Cd uygulamış ve bitkinin azot metabolizması enzimleri [glutamin sentetaz (GS), glutamat sentaz (GOGAT), nitrat redüktaz (NR), nitrit redüktaz (NiR)] üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Araştırma sonuçlarında azot metabolizması enzimleri ile Cd konsantrasyonları arasında negatif bir ilişki olduğu ifade edilmiştir. Buna göre NR ve NiR aktiviteleri Cd konsantrasyonlarındaki artış ile birlikte hem kök hem de dallarda azalmıştır. GOGAT aktivitesinde ise 20 µM Cd konsantrasyonunda dallarda artış olduğu gösterilmiştir. GS aktivitesinde de hem kök hem de dallarda Cd konsantrasyonlarındaki artışın azalışa neden olduğu belirtilmiştir. Amonyum içeriğinin dallarda arttığı, köklerde ise 10 ve 20 µM Cd uygulamasında artış olduğu, sonraki konsantrasyonlarda değişmediği vurgulanmıştır.

Azmat ve Khan (2011)'nin *Vigna radiata* (L.) Wilczek (Maş fasülyesi) ile yaptıkları çalışmada 5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 40 ppm Cu konsantrasyonlarının azot metabolizması üzerindeki etkileri incelenmiştir. Araştırma sonuçlarında 25 ppm'den sonraki Cu konsantrasyonlarında bitkinin zarar gördüğü, bu nedenle 5-25 ppm arasındaki değerlerin dikkate alındığı belirtilmiştir. Buna göre Cu konsantrasyonlarındaki artışın, incelenen bitkinin kuru ve yaş ağırlığında artışa neden olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca bitki kısımlarında belirlenen su içeriğinin Cu uygulamaları ile kök ve dallarda değişmediği, fakat yapraklarda azalışa neden olduğu ifade edilmektedir. Bununla birlikte kök ve dallarda belirlenen protein içeriğinin sadece 25 ppm Cu konsantrasyonunda azaldığı belirtilmiştir. Proteaz aktivitesinde Cu konsantrasyonlarındaki artışa paralel olarak bir artış gözlemlendiği ifade edilmiştir. Ayrıca artan Cu konsantrasyonlarına bağlı olarak prolin içeriğinde bir azalış olduğu gösterilmiştir. Total amino asit içeriğinin ise köklerde 20 ve 25 ppm Cu konsantrasyonunda, dallarda sadece 25 ppm Cu uygulamasında azaldığı diğer konsantrasyonlarda anlamlı bir değişiklik olmadığı belirtilmiştir.

Mishra ve Dubey (2011), *Oryza sativa* L. (Pirinç) bitkisinde azot metabolizmasına ait enzimlerin (NR, GS, NADH-GDH, AlaAT ve AspAT) aktivitelerinde Ni ve Al'un 20 gün boyunca meydana getirdiği toksik etkileri incelemiştir. 200 ve 400 µM Ni ile 80 ve 160 µM konsantrasyonlarındaki Al'un ayrı ayrı uygulandığı çalışmada Ni ve Al'a duyarlı Malviya-36 ve Pant-12 kültürleri kullanılmıştır. Buna göre Ni ve Al uygulamalarının pirinç bitkisinin her iki kültüründe de hem kök hem de dallarda NR ve GS aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir. NADH-GDH aktivitesinde ise alüminyum ve nikelin belirlenen konsantrasyonlarının her iki kültürde de artış meydana getirdiği vurgulanmıştır. Ayrıca çalışmada belirlenen alanin aminotransferaz (AlaAT) ve aspartat aminotransferaz (AspAT) aktivitelerinin her iki bitki kısmında da Ni ve Al uygulamalarıyla arttığı belirtilmiştir.

Thounaojam ve ark. (2012) ise *Oryza sativa* L. var. MSE-9 (Pirinç) bitkisine 5 gün boyunca 10, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarında Cu uygulaması ve bitkide meydana getirdiği oksidatif stresi ve antioksidatif yanıtları araştırmıştır. Antioksidatif enzimler (SOD, CAT, APX, GR, GPX), büyüme parametreleri, lipid peroksidasyonu, Cu birikimi, hidrojen peroksit, glutatyon, askorbat ve prolin içeriği belirlenen parametrelerdir. Buna göre uygulama süresi ve Cu konsantrasyonlarındaki artış ile birlikte kök ve dallardaki

kuru ve taze ağırlığın azaldığı fakat bu azalışın köklerde daha fazla olduğu belirtilmiştir. Ayrıca Cu'ın kök kısımlarında daha fazla biriktiği ve askorbat, glutatyon, prolin, MDA, hidrojen peroksit içeriğinin de uygulama süresi ve konsantrasyonlardaki artış ile birlikte arttığı ifade edilmiştir. Antioksidatif enzimlerden SOD, APX, GR ve GPx aktivitelerinin Cu uygulamaları ile birlikte kök ve dallarda arttığı, CAT aktivitesinin ise 10 ve 100 µM Cu konsantrasyonunda arttığı, 50 µM' da ise kontrole göre değişmediği belirtilmiştir.

Li ve ark. (2012a) bir kültür bitkisi olan *Triticum aestivum* L. (Buğday) bitkisinde 100, 300 ve 500 µM konsantrasyonlarında Cu'ın büyüme, Cu birikimi ve klorofil içeriği üzerindeki etkilerini incelemiştir. Buna göre, uygulanan tüm Cu konsantrasyonlarının kök ve dal uzunluğunu azalttığı, konsantrasyonlardaki artış ile paralel olarak dokularda Cu birikiminin arttığı belirtilmiştir. Klorofil *a*, *b* ve total klorofil içeriklerinin 100 µM Cu uygulamasında arttığı, diğer Cu konsantrasyonlarında ise azaldığı ifade edilmiştir.

Cu'ın incelendiği başka bir çalışmada ise Saha ve ark. (2012), *Camellia sinensis* L. (O.) Kuntze (Çay) bitkisinin iki farklı kültüründe 10 gün boyunca 50-700 µM Cu konsantrasyonlarının büyüme, lipid peroksidasyonu, fenolik bileşik ve klorofil içeriği ile antioksidatif enzim aktivitelerinde (SOD, CAT, APX ve POD) meydana getirdiği değişiklikleri belirlemiştir. Buna göre her iki kültürde de konsantrasyondaki artışa ve uygulama süresine paralel olarak lipid peroksidasyonunun arttığı, total klorofil içeriğinin ise azaldığı belirtilmiştir. Fenolik bileşik içeriğinin ve SOD, APX ve POD aktivitelerinin ise uygulama süresine ve metal konsantrasyonlarına bağlı olarak arttığı ve bu artışın TS-462 kültüründe fazla olduğu tespit edilmiştir. CAT aktivitesinde ise kültürler arasında değişiklik görülmemiştir, fakat enzim aktivitesinde 400 µM Cu konsantrasyonuna kadar artış, sonraki konsantrasyonlarda ise azalış gözlenmiştir.

Fernández ve ark. (2012) tarafından iki farklı *Populus* sp. (Kavak) türüne (I-214 ve ERIDANO) 1 ve 5 mM Zn uygulaması yapılan çalışmada, Zn uygulamalarının bitki büyüme ve gelişimindeki etkileri (klorofil ve su içeriği, Zn birikimi, askorbat, glutatyon ve total fenolik içeriği) incelenmiştir. Araştırma sonuçlarında Zn konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak her iki türde de biyokütlesinin, yaprak alanı ve kalınlığının azaldığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda iki türün de fotosentez oranında ve su içeriğinde Zn içeriğindeki artışa bağlı olarak azalış gözlemlendiği belirtilmiştir. Fakat türlerden birinde bu azalışın daha fazla olduğu ifade edilmiştir. Aynı zamanda 5 mM Zn konsantrasyonu bu

tür için geriye dönüşü olmayan sonuçlara neden olduğu vurgulanmıştır. Zn birikiminin, her iki türde de benzer olduğu ve kök kısımlarında biriktiği ifade edilmiştir.

Liu ve ark. (2012), uzak doğu ülkelerinde genişçe yayılış gösteren bir ağaç türü olan *Ficus microcarpa* L. f' nın köklerinde 25, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarında Pb, Cd ve Cu metallерinin oluşturduğu reaktif oksijen radikallerinin birikim düzeyini belirlemiştir. Buna göre hücrelerdeki ağır metal içeriğinin uygulanan konsantrasyonlardaki artışa paralel olarak arttığı, köklerin hava ile ilişkili kısımlarının oksidatif zarara oldukça hassas olduğu, bu kısımlarda biriken H₂O₂ ve O₂^{*} radikallerinin metal konsantrasyonlarındaki artış ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Kök hücrelerine yapılan canlılık testinde metal konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak önemli bir azalış olduğu gösterilmiştir. *Ficus microcarpa* 'nın köklerinde en fazla biriken metalin ise Cd olduğu belirtilmiştir.

Gallego ve ark. (2012) tarafından yapılan derleme çalışmasında, bitkilerin Cd ile başa çıkmada geliştirdiği mekanizmalar incelenmiş ve toleranslı türlerde genellikle Cd'un köklerin hücre duvarında depolandığı ve toprak üstü kısımlara Cd aktarımının sınırlı olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca Cd'un, Ca⁺², Fe⁺², Mg⁺², Cu⁺², Zn⁺² gibi mikro besin elementlerinin alım yolları üzerinden (membran proteinleri) kök hücrelerine alındığı ve bu elementlerin alımında rekabet oluşturduğu belirtilmiştir. Dolayısıyla bu durumun Cd'un bitki büyümesi üzerinde yarattığı inhibisyonu açıklayıcı bir veri olduğu ifade edilmiştir.

Janicka-Russak ve ark. (2012)'nın *Cucumis sativus* L. (Salatalık) bitkisi ile yaptığı çalışmada 6 gün boyunca 10 µM Cd ve Cu'ın hücre membranlarındaki H⁺-ATPaz aktivitesi üzerindeki etkisini incelemiştir. Aynı zamanda bitkinin savunma sistemi ile ilişkisini ortaya koyabilmek amacıyla APX, CAT gibi antioksidatif enzim aktivitelerindeki ve H₂O₂ düzeyindeki değişim belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlarda Cd ve Cu'ın H⁺-ATPaz aktivitesi üzerindeki etkisinin benzer olduğu ve her iki metalin de H⁺-ATPaz aktivitesini arttırdığı belirtilmiştir. Bununla birlikte Cd ve Cu uygulamalarından sonra H₂O₂ düzeyinin ve APX, CAT aktivitelerinin de arttığı saptanmıştır.

Li ve ark. (2012b) su kültüründe yetiştirdiği *Artemisia annua* L. (Pelinotu) bitkisine 336 saat boyunca 20, 60 ve 100 µmol/L konsantrasyonlarında Cd uygulamıştır. Buna bağlı

olarak fotosentetik pigmentlerinde, lipid peroksidasyonunda ve antioksidanlarda meydana gelen değişimleri belirlemiştir. Buna göre, klorofil içeriğinin artan Cd konsantrasyonlarına bağlı olarak azaldığı, klorofil *b*'nin klorofil *a* ve karotenoidlere göre Cd uygulamasından daha fazla etkilendiği ifade edilmiştir. Ayrıca iyon sızıntısının tüm Cd uygulamalarında ilk 24 saatte arttığı, sonraki uygulama saatlerinde ise giderek azaldığı belirtilmiştir. Uygulanan Cd konsantrasyonlarının MDA içeriğinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı ifade edilmiştir. Ayrıca askorbik asit (AsA) içeriğinde Cd uygulamalarının ya da uygulama süresinin herhangi bir değişime neden olmadığı, GSH içeriğinin ise artan Cd konsantrasyonlarıyla birlikte uygulama süresine göre arttığı vurgulanmıştır. Sekonder metabolitlerden biri olan artemisinin içeriğinde ise tüm uygulama sürelerinde artan Cd konsantrasyonları ile artemisinin içeriğinin arttığı belirtilmiştir.

Stanisavljević ve ark. (2012) ise yabani bir tür olan *Alyssum markgrafii* O.E. Schulz bitkisine 1, 3, 5 ve 8 mM konsantrasyonlarında Ni uygulamış olup bitkinin antioksidatif savunma sistemi hakkında bilgi edinmeyi amaçlamıştır. Buna göre dallarda Ni uygulamasına bağlı olarak biyokütle, malondialdehit (MDA), pigment ve Ni içeriğindeki değişimler ortaya konmuş, H₂O₂ içeriği ve CAT, APX, POD aktivitesi belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarında, tüm nikel konsantrasyonlarında taze ve kuru ağırlığın azalmasına rağmen bitkinin hayatta kaldığı ifade edilmiştir. Ayrıca Ni konsantrasyonları arttıkça dallardaki Ni birikiminin de arttığı, klorofil *a*, *b* ve total klorofil içeriğinde azalış meydana geldiği tespit edilmiştir. Dięer pigmentler için klorofil *a*'nın Ni'e daha duyarlı olduğu gösterilmiştir. 1 ve 3 mM Ni konsantrasyonlarının MDA içeriğinde önemli bir artışa neden olmadığı, en yüksek MDA içeriğinin 5 mM Ni uygulamasında elde edildiği belirtilmiştir. En yüksek Ni uygulamasında ise (8 mM) azalan ROS düzeyleriyle ilişkili olarak MDA içeriğinin düştüğü vurgulanmıştır. APX ve CAT aktivitesinin artan Ni konsantrasyonlarına bağlı olarak azaldığı belirtilmiştir. POD aktivitesinde ise 3 mM Ni uygulamasına kadar bir artış olduğu sonrasında ise aktivitenin düştüğü gösterilmiştir.

Nadgórska-Socha ve ark. (2013) ise Cd, Cu, Ni, Pb ve Zn bakımından kirlenmiş topraklarda yetişen *Vicia faba* L. (Bakla) bitkisinde ağır metal birikimini ve antioksidatif savunma sisteminde yer alan hem enzimatik hem de enzimatik olmayan sistemin verdiği yanıtları incelemiştir. Enzimatik sistemde CAT ve POD aktiviteleri belirlenirken,

enzimatik olmayan sistemde glutatyon ve prolin içeriğindeki değişimler ortaya konmuştur. Buna bağlı olarak *V. faba*'da, Ni ve Zn birikiminin diğer metallere göre daha yüksek olduğu ve bu birikimin en fazla kök kısımlarında olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca Pb ve Zn kirliliğine sahip topraklarda yetişen *V. faba* türlerinde glutatyon içeriğinin yüksek olduğu belirtilmiştir. Cu dışındaki diğer tüm metal uygulamalarında CAT ve POD aktivitelerinin arttığı saptanmıştır.

Yüksek konsantrasyonlarda Cr'un fotosentezden bitki beslenmesine, antioksidatif savunma sistemi enzimlerinden azot metabolizması enzimlerine kadar birbiriyle ilişkili pek çok fizyolojik süreç üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu Singh ve ark.(2013)'nın yaptığı derleme çalışmasında belirtilmiştir. Örneğin; Ali ve ark. (2013), *Hordeum vulgare* L. (Arpa) bitkisiyle yaptıkları çalışmada, farklı azot formlarının [üre, (NH₄)₂SO₄ ve Ca(NO₃)₂] ve Cr konsantrasyonlarının (75 ve 100 µM) antioksidatif savunma sistemi, Cr birikimi ve fotosentez üzerindeki etkilerini incelemiştir. Buna göre klorofil içeriğinin Cr konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak her üç N formunda da azaldığı ifade edilmiştir. Antioksidatif savunma enzimlerinden SOD, CAT ve APX' un Cr konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak her üç N formunda da arttığı vurgulanmıştır. Ayrıca Ca(NO₃)₂ formunun en az düzeyde oksidatif strese neden olduğu ve antioksidatif enzim aktivitesinde en yüksek değerlerin elde edildiği belirtilmiştir. Bitkideki Cr birikiminin de Ca(NO₃)₂ formunda yetişen örneklerde en az düzeyde olduğu ifade edilmiştir.

Mohanty ve Kumar Patra (2013) ise *Vigna radiata* L. Wilczek (Maş fasülyesi) bitkisi üzerinde 10 ve 100 µM Cr'un toksik etkilerini araştırmış olup büyüme parametrelerindeki, prolin ve klorofil içeriğindeki, ayrıca antioksidatif enzimlerinden CAT ve POX aktivitesindeki değişimi ortaya koymuştur. Araştırma sonuçlarında uygulanan Cr konsantrasyonlarının büyüme parametrelerinde negatif etkilere neden olduğu belirtilmiştir. Uygulanan Cr konsantrasyonları arttıkça kök ve dal uzunluğunun, kuru ağırlığın azaldığı vurgulanmıştır. Aynı zamanda prolin içeriğinin ve CAT, POX aktivitelerinin konsantrasyonlardaki artışa paralel olarak arttığı ifade edilmiştir. Maksimum CAT aktivitesinin, *Vigna radiata*'nın dallarında daha yüksek olduğu; maksimum POX aktivitesinin ise köklerde daha yüksek olduğu belirtilmiştir.

Kumar ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada ise, yarı sucul bir bitki olan *Barringtonia acutangula* Gaerth.'ya Cr(IV) formunda ve 1-5 mM konsantrasyonlarında

Cr uygulaması yapılmıştır. Buna göre bitki besin elementlerinden B, Cu, Fe, S, P, Mn ve Zn alınımında meydana gelen değişimler ve bitkideki Cr birikimi, yaş ve kuru ağırlığı belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarında uygulanan Cr konsantrasyonları arttıkça bitkinin kök ve dal kuru ağırlığının azaldığı, Cr birikiminin ise arttığı ifade edilmiştir. Aynı zamanda artan Cr konsantrasyonlarına bağlı olarak B, Mn ve Zn içeriğinin de arttığı, Cu ve Fe içeriğinin ise azaldığı tespit edilmiştir. Çalışma sonuçlarında, Cr' un mikro besin elementlerinin alınım yolları üzerinden bitki bünyesine alındığını, bu besin elementlerinden özellikle de Fe, S ve P ile rekabet ettiğini vurgulamıştır. Cr' un bitkiler üzerindeki toksik etkilerinin ise sahip olduğu değeriğe göre [Cr(IV) veya Cr(III)] değişiklik gösterdiği belirtilmiştir.

Arslan ve ark. (2014) tarafından Uludağ endemiği bir bitki türü olan *Verbascum olympicum* Boiss. (Sığırkuyruğu) laboratuvar koşullarında yetiştirilerek hidroponik koşullarda 7 gün boyunca 50, 100 ve 250 µM Cd uygulamasına tabi tutulmuştur. Yapılan uygulama sonucunda fidelerde antioksidatif savunma sistemi enzimlerinden SOD, CAT ve APX'in aktivitelerindeki değişimler belirlenmiş olup bununla birlikte lipid peroksidasyon oranı, büyüme parametrelerindeki (su içeriği, biyokütle ve klorofil içeriği) değişimler, azot metabolizmasına ait enzimlerden NR ve GS aktivitesindeki değişimler ve total protein içeriği belirlenmiştir. Ayrıca Cd birikimi ve bitki besin elementlerinden Cu, Mo, Mn ve Zn'nin Cd stresin altında *V. olympicum* fidelerindeki alınım durumları ortaya konmuştur. Araştırma sonuçlarında Cd uygulamalarının *V. olympicum*'un özellikle kök kısımlarında biriktiği ve toprak üstü kısımlarına Cd'un taşınımının olmadığı tespit edilmiştir. Bu durumun bitkinin kendini ağır metalin yıkıcı etkisinden koruma stratejisi olduğu vurgulanmıştır. Bununla birlikte köklerde bitki besin elementlerinden Zn ve Cu birikiminin arttığı, bunun yanı sıra Mo içeriğinin azaldığı belirtilmiştir. Azot metabolizması enzimlerinin aktivitesinde ise Cd konsantrasyonlarındaki artışa bağlı bir azalış meydana geldiği vurgulanmıştır. Ayrıca lipid peroksidasyon oranının ve antioksidatif enzim aktivitelerinin (SOD, CAT ve APX) Cd konsantrasyonları ve uygulama süresine bağlı olarak arttığı ortaya konmuştur.

Akpınar ve ark. (2015) tarafından laboratuvar koşullarında yetiştirilen *Verbascum olympicum* Boiss. (Sığırkuyruğu) fidelerine farklı konsantrasyon (50 ve 100 µM) ve sürelerde (1, 3 ve 10 gün) Ni uygulaması yapılmıştır. Buna bağlı olarak bitki

kısımlarındaki (kök ve yaprak) Ni birikimi ile bazı bitki besin elementlerinin (B, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo ve Zn) içeriği ve büyüme parametrelerindeki (biyokütle, su içeriği ve klorofil içeriği) değişimler ortaya konmuştur. Aynı zamanda Ni uygulamasına bağlı olarak azot metabolizması enzimlerinden NR ve GS aktivitesindeki değişimler ve lipid peroksidasyonu ve antioksidatif enzimlerden SOD, CAT ve APX aktivitesindeki değişimleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlarda, uygulanan Ni konsantrasyonları arttıkça Ni birikiminin de arttığı, incelenen bitki besin elementlerinin ise azaldığı tespit edilmiştir. Ni birikiminin kök kısımlarında daha fazla olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca büyüme parametrelerinin ve azot metabolizması enzimlerinin Ni konsantrasyonları ve uygulama süresindeki artış ile ilişkili olarak azaldığı belirtilmiştir. Lipid peroksidasyonu ve antioksidatif enzim aktivitesinde ise uygulama süresi ve konsantrasyonlarına bağlı olarak artış gözlemlendiği ortaya konmuştur.

Gasecka ve ark. (2015) ise iki farklı mantar türünde (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. ve *Pleurotus eryngii* (D.C.) Quel.) 1.5 mM konsantrasyonlarında Se ve Zn'nun beraber uygulamasının, fenolik bileşikler ve antioksidanların içeriğinde meydana getirdiği değişimler belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarında Se+Zn uygulamasının mantar türlerinde bitki besin elementlerinin alınımını arttırdığı ifade edilmiştir. Buna ek olarak fenolik bileşikler ve antioksidan içeriğinin de arttığı vurgulanmıştır. Fenolik bileşikler ve antioksidan içeriğindeki bu artışı, bitki besin elementlerinin alınımının tetiklediği ifade edilmiştir.

Obermeier ve ark. (2015) ise hızlı büyüyen bir su bitkisi olan *Lemna minor* L.'da laboratuvar koşullarında 48, 96 ve 168 saat boyunca Cu' ın farklı konsantrasyonlarda (50 ve 100 µg/L) toksik etkilerini ve birikim durumunu incelemiştir. Araştırma sonuçlarında uygulama süresi ve konsantrasyonuna bağlı olarak bitki büyümesinin azaldığı ve yüksek oranda Cu birikiminin meydana geldiği ortaya konmuştur. Aynı zamanda bitkinin antioksidatif savunma sistemi enzimlerinin (POX ve GR) aktivitesinde artış meydana geldiği belirtilmiş olup Cu uygulamasına bağlı olarak özellikle ilk 48 saatte oksidatif stres oluştuğu vurgulanmıştır. Sonraki uygulama sürelerinde, bitkinin antioksidatif savunma sisteminin etkili olduğu ve oksidatif stres düzeyinin azaldığı belirtilmiştir. Bu nedenle çalışmada kullanılan bitkinin bitkiler ile geri kazanım tekniğinde kullanılabileceği ifade edilmiştir.

Gülyüz ve ark. (2015) ise laboratuvar koşullarında yetiştirilen *Verbascum olympicum* Boiss. (Sığırkuyruğu) fidelerine 7 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda (50, 250 ve 500 μ M) Cu uygulaması yapmış olup, bitki büyüme parametreleri ile azot metabolizmasında yer alan enzimlerin (NR ve GS) aktivitesinde ve bitki besin elementlerinin alınımında meydana gelen değişimleri incelemiştir. Araştırma sonuçlarında *V. olympicum*'da Cu birikiminin yüksek olduğu, bununla birlikte bitki besin elementlerinden Mn ve Li dışında Fe, Mo, Ni ve Zn içeriğinin Cu konsantrasyonları ve uygulama süresindeki artışa bağlı olarak arttığı vurgulanmıştır. Azot metabolizması enzimleri ile klorofil içeriği ve biyokütlenin ise Cu konsantrasyonları ve uygulama süresindeki artışa bağlı olarak azaldığı gösterilmiştir.

Laboratuvar koşullarında yetiştirilen *Verbascum olympicum* Boiss. (Sığırkuyruğu) fidelerine 7 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda (50, 250 ve 500 μ M) Cu uygulaması yapılmış olup fidelerde meydana gelen oksidatif stres ve buna karşı antioksidatif savunma sistemi enzimlerinin (SOD, CAT ve APX) aktivitesindeki değişimler Akpınar ve ark. (2016) tarafından ortaya konmuştur. Araştırma sonuçlarında Cu uygulamalarına bağlı olarak fidelerde lipid peroksidasyonunun arttığı ve oksidatif stres meydana geldiği vurgulanmıştır. Antioksidatif savunma sistemi enzimlerinde ise, 250 μ M Cu konsantrasyonuna kadar tüm enzim aktivitelerinde artış olduğu ifade edilmiştir. 500 μ M Cu konsantrasyonunun ise *V. olympicum* fideleri için toksik bir düzey olduğu ve antioksidatif savunma sistemi enzimlerinin azalmasına neden olduğu belirtilmiştir.

Morina ve ark. (2016)'nın *Verbascum thapsus* (Linn.) (Sığırkuyruğu) bitkisi ile yaptığı bir çalışmada Zn ve Cu metalleri bakımından kirlenmiş alanlardan alınan *Verbascum thapsus* örnekleri ile kirlenmemiş alandan alınan fideler kontrollü koşullarda laboratuvar ortamında 2 hafta yetiştirilmiştir. Ardından farklı Cu (30 ve 100 μ M) ve Zn (0,3 ve 1 mM) konsantrasyonlarına maruz bırakılmış ve büyüme, fotosentez ve metal birikim süreçleri incelenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre kirlenmiş alanlardan alınan örneklerde metal birikiminin daha az olduğu belirtilmiş ve bu alandan alınan örneklerin Cu ve Zn uygulamalarına karşı daha dirençli olduğu vurgulanmıştır. Bunun dışında Zn birikiminin *V. thapsus* türlerinde dallarda daha fazla olduğu gösterilmiştir. Büyüme ve fotosentez sürecinde her iki metalde de artan metal konsantrasyonlarına bağlı olarak

olumsuz etkilerin arttığı ve fidelerde Fe, Mn ve Ca eksikliğine neden olduğu ifade edilmiştir.

Pan ve ark. (2016), yabancı bir ot türü olan *Spartina alterniflora* Loisel. bitkisinde farklı Zn konsantrasyonlarının (100, 500 ve 1000 µg/g) etkisini incelemiş olup buna göre bitkinin büyümesinde meydana gelen değişim ile Zn birikim oranı ve birikim yeri araştırılmıştır. 100 ve 500 µg/g Zn konsantrasyonlarında *Spartina alterniflora*'nin kuru ağırlığının uygulanan Zn konsantrasyonlarıyla orantılı olarak arttığı belirtilmiştir. 1000 µg/g Zn konsantrasyonunda ise kuru ağırlığın belirgin bir şekilde azaldığı ifade edilmiştir. Bitki dokularında Zn birikim oranının ise artan Zn konsantrasyonlarıyla orantılı olarak arttığı vurgulanmıştır. Bitki dokularında en fazla kök kısımlarında birikim olduğu belirtilmiş olup buna ait sıralama kökler>yapraklar>dallar>rizomlar olarak verilmiştir.

Marichali ve ark. (2016) tarafından *Nigella sativa* L. (Çörekotu) bitkisine 0,1, 1 ve 2 mM konsantrasyonlarında Zn uygulamaları yapılmış ve bu uygulamaların çimlenme, büyüme parametreleri (klorofil içeriği, kuru ağırlık), total protein içeriği, MDA içeriği, total fenolik bileşikler ve lipofilik antioksidanlar (β-karoten) üzerindeki etkisi ve bitki kısımlarında Zn birikimi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlarda, uygulanan Zn konsantrasyonlarının çimlenmeyi etkilemediği fakat radikal uzamayı azalttığı belirtilmiştir. Büyüme parametrelerinin (klorofil içeriği, kuru ağırlık) de uygulanan Zn konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak giderek azaldığı ve hatta yapraklarda klorosis gözlemlendiği ifade edilmiştir. Total protein içeriğinde ve MDA içeriğinde de Zn konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak belirgin bir azalış tespit edildiği vurgulanmıştır. Ayrıca kök kısımlarında total fenolik bileşiklerin arttığı, β-karoten içeriğinin ise azaldığı belirtilmiştir. *Nigella sativa*'da Zn birikiminin en çok yaprak kısımlarında olduğu ve yapraklardaki bu birikimin uygulanan konsantrasyonlardaki artışa paralel olarak arttığı vurgulanmıştır. Sonuç olarak *Nigella sativa*'nın bitkiler ile ıslah çalışmalarında alternatif bir tür olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir.

Pinus sylvestris L. (Sarıçam) bitkisinde yapılan bir çalışmada ise Ivanov ve ark. (2016) tarafından 50, 150 ve 500 µM konsantrasyonlarında Zn uygulamasının büyüme ve Mn ile Fe bitki besin elementlerinin alınımı üzerindeki etkisi, bitki kısımlarındaki Zn birikim durumu, lipid peroksidasyon düzeyi, fenolik antioksidan bileşikler (kateşin, proantosiyanidin) üzerindeki etkisi incelenmiştir. Buna göre, sukültüründe yetiştirilen 6

haftalık *Pinus sylvestris* fidelerinin büyüme parametrelerinin (kuru ağırlık, uzunluk) ve Mn alınımının uygulanan Zn konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak azaldığı belirtilmiştir. Fe alınımının ise kontrole göre arttığı fakat bu artışın uygulanan 3 konsantrasyonda da aynı olduğu vurgulanmıştır. Zn birikiminin ise konsantrasyonlardaki artışa paralel olduğu ve en çok kök kısımlarında birikim meydana geldiği belirtilmiştir. Lipid peroksidasyonunun uygulanan Zn konsantrasyonlarına bağlı olarak arttığı, bu artışın 500 µM Zn uygulamasında kontrole göre % 44 oranında olduğu ifade edilmiştir. Fenolik antioksidan bileşiklerde ise 150 µM Zn konsantrasyonlarına kadar artış gözlemlendiği, 500 µM Zn uygulamasında ise kontrole göre % 23,6 oranında azalış meydana geldiği belirtilmiştir.

Glińska ve ark. (2016) su kültüründe yetiştirdiği *Triticum aestivum* L. (Buğday) bitkisine laboratuvar koşullarında 7 gün boyunca 50 ve 300 mg/L Zn uygulaması gerçekleştirmiştir. Uygulama yapılan bitkilerde su içeriği, taze ve kuru ağırlık, mitotik indeks, Zn birikimi ve mikroelementlerin analizi gerçekleştirilmiştir. Buna göre 50 mg/L Zn uygulamasında istatistik olarak anlamlı bir Zn birikimi tespit edildiği fakat morfolojik veya sitolojik olarak herhangi bir değişikliğe raslatlanmadığı belirtilmiştir. 300 mg/L Zn uygulamasında ise uygulama süresinin 1. gününden itibaren *Triticum aestivum*'un büyümesinde azalış meydana geldiği, bu azalışın 7. günde % 85 oranında olduğu belirtilmiştir. Aynı Zn konsantrasyonunun uygulamanın 7.gününde *Triticum aestivum*'un su içeriğini %78 oranında azalttığı ifade edilmiştir. Benzer şekilde 50 mg/L Zn uygulamasının mitotik indekste de herhangi bir değişiklik yaratmadığı, 300 mg/L Zn uygulamasının ise 1. günde % 64 oranında 7. günde % 83 oranında azalışa neden olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca bitkinin kök kısımlarında Zn birikiminin daha fazla olduğu belirtilmiştir. Zn uygulamalarındaki artışa paralel olarak Cu ve Fe içeriğinin arttığı, Mn içeriğinin ise azaldığı ifade edilmiştir. Elde edilen bu araştırma sonuçları doğrultusunda *Triticum aestivum*'un Zn stresine toleranslı bir tür olduğu vurgulanmıştır.

Barrameda-Medina ve ark. (2016) ise *Lactuca sativa* L. (Marul) ve *Brassica oleracea* L. (Lahana) bitkilerinde 0,5 mM konsantrasyonlarında Zn'nun etkisini araştırmıştır. 35 gün boyunca laboratuvar koşullarında su kültüründe yetiştirilen bitkilere Zn uygulaması yapıldıktan sonra bu kültür bitkilerinin fizyolojik durumunda meydana gelen değişimi karboksilat metabolizmasını araştırarak ortaya koymuştur. Buna göre her iki bitki türünde

de kuru ağırlığın Zn uygulamasına bağlı olarak azaldığı ve her iki türde de kök kısımlarında Zn birikiminin fazla olduğu belirtilmiştir. *Lactuca sativa*'da fumeraz ve sitrat sentetaz aktivitesinin uygulama sonucunda azaldığı, malat dehidrojenaz ve fosfoenolprüvat karboksilaz aktivitesinin arttığı buna bağlı olarak da oksalat ve sitrat miktarının arttığı, malat miktarının ise azaldığı ifade edilmiştir. *B. oleracea*' da ise malat, sitrat ve oksalat miktarının arttığı buna bağlı olarak da sitrat sentetaz aktivitesinin değişmediği, fumeraz ve fosfoenolprüvat karboksilaz aktivitesinin arttığı, malat dehidrojenaz aktivitesinin ise azaldığı vurgulanmıştır. Elde edilen sonuçlarda *B. oleracea* bitkisinin Zn' ye daha toleranslı olduğu ifade edilmiştir.

Feigl ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada ise laboratuvar koşullarında yetiştirilen *Brassica juncea* (L.) Czern. ve *Brassica napus* L. bitkilerine 14 gün boyunca 50, 150 ve 300 μM Zn uygulaması gerçekleştirilmiştir. Buna bağlı olarak bitkinin kuru ağırlığı, element içeriği (Fe, Mn, B, Cu, Mo ve Ni), Zn birikim durumu, pigment içeriği, lipid peroksidasyonu ve antioksidatif enzim aktivitesindeki değişimler (SOD, APX) incelenmiştir. Araştırma sonuçlarında; her iki bitki türünde de kuru ağırlığın uygulanan Zn konsantrasyonlarına bağlı olarak azaldığı ve Zn birikiminin kök kısımlarında daha fazla olduğu ifade edilmiştir. Bitki besin element içeriğinde, her iki türde de Zn uygulamalarına bağlı olarak Cu içeriğinin arttığı Mn içeriğinin ise azaldığı gösterilmiştir. Mo içeriğinin ise her iki türde de dallarda arttığı kök kısımlarında ise değişmediği belirtilmiştir. Ni konsantrasyonlarının ise Zn konsantrasyonlarından etkilenmediği tespit edilmiştir. Her iki türün dallarında da Fe içeriğinin azaldığı, *B. juncea*'nın kök kısımlarında Fe içeriğinin arttığı, *B. napus*'un kök kısımlarında ise Fe içeriğinin değişmediği ifade edilmiştir. İncelenen türlerdeki pigment içeriğinin, Fe içeriğindeki değişim ile orantılı olduğu belirtilmiştir. Her iki türün de kök kısımlarında SOD aktivitesinin uygulanan Zn konsantrasyonlarındaki artışa paralel olarak arttığı, dallardaki SOD aktivitesinin ise 150 μM Zn konsantrasyonunda maksimum düzeye ulaştığı ifade edilmiştir. APX aktivitesinin ise her iki türde de hem kök hem de dallarda kontrole göre azaldığı vurgulanmıştır. Lipid peroksidasyonunda her iki türün kök kısımlarında uygulanan tüm Zn konsantrasyonlarında kontrole göre artış gözlemlendiği, dallarda ise sadece 150 μM Zn konsantrasyonunda kontrol değerinin üzerine çıktığı belirtilmiştir. Buna göre, *B. juncea*'nın diğer türe göre Zn' ye daha toleranslı olduğu ifade edilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Uludağ endemiği olan *Verbascum olympicum* Boiss. (Sığırkuyruğu) (Davis 1978) türünün laboratuvarında kontrollü koşullarda yetiştirilen fideleri çalışmamızın materyalini oluşturmaktadır. Scrophulariaceae familyasına ait iki yıllık bir bitki olan *V. olympicum* çok dallanmış ve kalın gövdeli, rozet yapraklı ve sarı çiçeklidir (Şekil 3.1.1). Çiçeklenme zamanı Haziran-Ağustos aylarıdır. Uludağ'ın hem sub-alpin hem de alpin kuşağındaki yol ve bina kenarları, terk edilmiş maden işletmesi çevresi, hayvan barınağı ya da çöp yığını gibi bozulmuş alanlara, bozulmadan sonra yerleşen ruderal bir bitki olarak nitelendirilmektedir. Bu nedenle bozulmuş alanlarda sekonder süksesyonu başlatan öncü tür olarak kabul edilir (Rehder ve ark. 1994).



Şekil 3.1.1. *Verbascum olympicum* Boiss.'in genel görünüşü

3.2. Bitki Yetiştirme

Verbascum olympicum tohumları, Uludağ'ın 1850-1900 m yüksekliğinden 14.09.2011 tarihinde toplanmıştır. Denemelerde tek bir bireyden toplanan tohumlar kullanılmıştır.



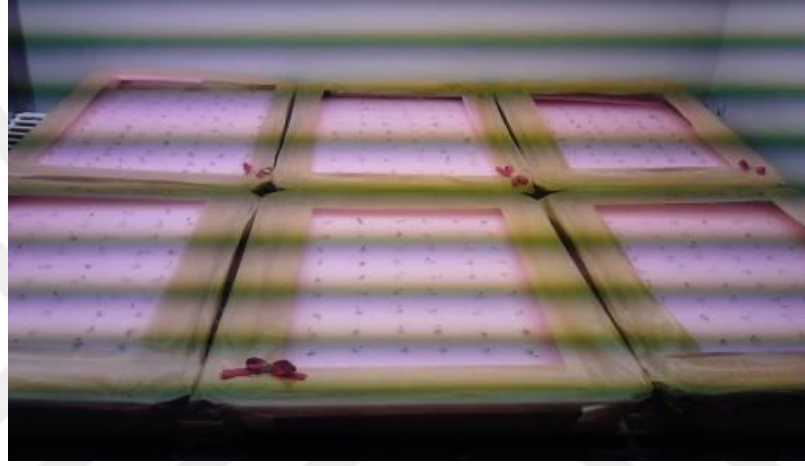
Şekil 3.2.1. Uludağ'dan *V. olympicum* tohumlarının toplanması

Tohumlar % 5'lik sodyum hipokloritte 3 dk bekletildikten sonra distile su ile yıkanarak yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Steril hale getirilen tohumlar, nemli filtre kâğıdı içeren petrilere ekilerek 20°C ye ayarlanmış inkübatörde karanlık koşullarda çimlenmeye bırakılmıştır.



Şekil 3.2.2. Steril petrilere ekim yapılan *V.olympicum* tohumları

Çimlenen tohumlar 10. günde iklimlendirme kabinine (Heraeus Vötsch HPS500) alınmıştır. *V. olympicum* fidelerinin yetiştirildiği ortamda gece/gündüz sıcaklığı 15°C/25°C olup, 16 saat ışık/8 saat karanlık periyot uygulanmıştır. İki kotiledonlu fideler %10'luk Hoagland besin çözeltisi (Hoagland ve Arnon 1950) içeren 25x35x5 cm boyutlarındaki plastik kaplara aktarılmıştır (Şekil 3.2.3.). Hoagland besin çözeltisi gün aşırı değiştirilerek solüsyonun içeriğinde meydana gelebilecek değişimler minimize edilmiştir. Ayrıca kök kısımlarının ışık görmemesi için kaplar dış yüzeyinden siyah boya ile boyanmıştır.



Şekil 3.2.3. %10'luk Hoagland besin çözeltisine alınan iki kotiledonlu fideler

Kaplardaki Hoagland çözeltisinin (pH:6.0) oranı bir hafta arayla %10 arttırılarak 8 hafta boyunca bir yetiştirme ortamı oluşturulmuştur.



Şekil 3.2.4. a; 8 haftalık fidelerin toprak üstü kısımları, **b;** 8 haftalık fidelerin toprakaltı kısımları

3.3. Ağır Metal Uygulamaları

8 hafta sonunda benzer morfolojik yapıya sahip (8 yapraklı) fideler seçilip % 80'lik Hoagland besin çözeltisinde Cd, Cr, Cu, Ni, Zn stresine maruz bırakılmıştır. Çizelge 3.3.1.'de ağır metallerin uygulama formu, konsantrasyonu ve uygulama süresi verilmiş olup seçilen metal konsantrasyonları ve süreleri yapılan ön denemelerde bitkinin dayanım durumuna göre belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak kullanılan fideler aynı koşullarda metal uygulaması yapılmadan yetiştirilmiştir. Yetiştirme kapları dış yüzeylerinden koyu renkli boya ile boyanarak ışık geçirgenliği engellenmiştir.

Çizelge 3.3.1. *V.olypticum* fidelerine uygulanan metallerin (Cd, Cr, Cu, Ni, Zn) uygulama şekli, konsantrasyonları ve uygulama süreleri

Uygulanan metal	Form	Konsantrasyon	Süre
Cd	CdSO ₄	50, 100 ve 250 µM	1, 3 ve 7 gün
Cr	Cr ₂ (SO ₄) ₃	50, 100 ve 200 µM	1, 3 ve 10 gün
Cu	CuSO ₄	50, 250 ve 500 µM	1, 3 ve 7 gün
Ni	NiSO ₄	50 ve 100 µM	1, 3 ve 10 gün
Zn	ZnSO ₄	50, 200 ve 500 µM	1, 3 ve 10 gün

3.4. Bitkilerin Analiz için Hazırlanması

Analizler için öncelikle tüm bitki hasat edilmiş, ardından hasat edilen fideler önce musluk suyu daha sonra de-iyonize su ile yıkandıktan sonra kök ve yaprak kısımlarına ayrılmıştır. Kontrol ve metal uygulanmış fidelerin yaprak ve kök kısımları tartılarak yaş ağırlıkları belirlenmiştir. Biyokütle, su içeriği, klorofil ve malondialdehit (MDA) içeriği, hücre membran zararı, iyon sızıntısı ve azot metabolizması enzimlerinden biri olan nitrat redüktaz (NR) aktivitesinin belirlenmesinde bu taze bitki materyalinin bir kısmı kullanılmıştır. Kalan bitki materyali ise antioksidan enzim aktivitelerinin [süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX)], protein içeriğinin ve azot metabolizması enzimlerinden bir diğeri olan glutamin sentetaz (GS) aktivitesinin belirlenmesi için sıvı azot içerisinde dondurularak etiketlenmiş kese kâğıtları içerisinde -70°C de muhafaza edilmiştir.

3.5. Biyokütle ve Su İçeriğinin Belirlenmesi

Taze yaprak kısımlarından 0,5 gr, kök kısımlarından ise 0,1 gr yaş örnek alınarak 80°C de ağırlıkları sabitleşinceye kadar etüvde kurutulmuş ve örneklerin kuru ağırlıkları (A) tartılarak kaydedilmiştir. Fidelerin yaprak ve kök kısımlarına ait ortalama toplam kuru ağırlığı orantı kurularak hesaplanmış olup mg KA olarak belirlenmiştir.

$$\text{Biyokütle (mg KA): } [(\text{Toplam bitki yaş ağırlığı} \times A) / B] \times 1000$$

A: Örneklerin kuru ağırlıkları (gr)

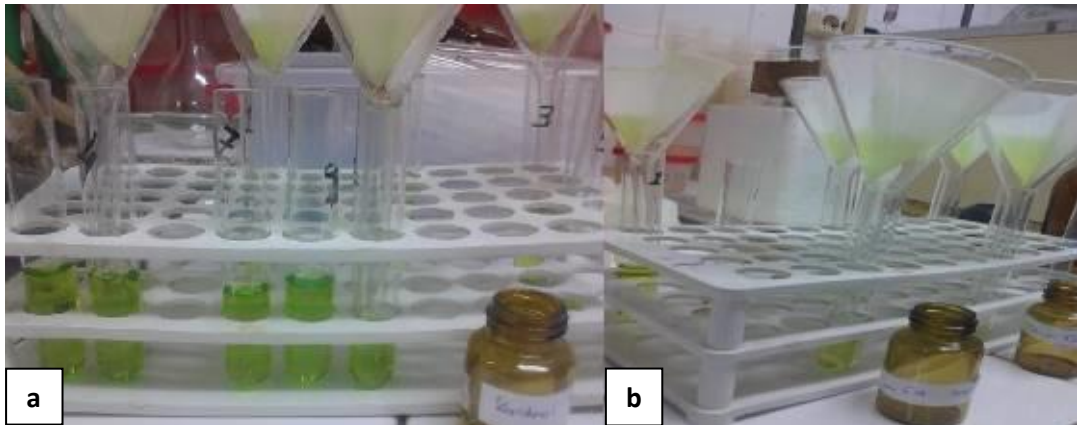
B: Yaş ağırlıklar (Yapraklar için 0,5 gr, Kökler için 0,1 gr)

Kontrol ve metal uygulanmış fidelerin yaprak ve kök kısımlarına ait su içeriği, yukarıda belirtilen değerler kullanılarak yüzde (%) olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Su içeriği(\%): } [(\text{Toplam bitki yaş ağırlığı} - \text{biyokütle}) * 100] / \text{Toplam bitki yaş ağırlığı}$$

3.6. Klorofil İçeriğinin Belirlenmesi

Spektrofotometrik olarak belirlenen bu yöntemde Arnon (1949)'un metodu kullanılmıştır. 0,05 gr taze yaprak örneği alınarak % 80'lik 15 ml aseton ile homojen hale getirilmiştir. Elde edilen homojenat filtre kâğıdından süzülerek 645 nm ve 663 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçülmüştür (Novaspec II, LKB Biochrom Spectrophotometer).



Şekil 3.6.1. a; Uygulama yapılmamış fidelerin yapraklarından elde edilen homojenat **b;** Metal (Cd) uygulaması yapılmış fidelerin yapraklarından elde edilen homojenat

Klorofil ekstraktının iki farklı dalga boyunda yapılan optik yoğunluk (D) ölçümlerinden elde edilen değerlerin aşağıda verilen eşitliklerde yerine konması ile bitki yaprak dokusunun 0,05 gr'ında bulunan klorofil *a*, *b* ve total klorofil içeriği mg YA olarak belirlenmiştir (Witham ve ark. 1971).

$$\text{Klorofil } a: [12,7 (D_{663}) - 2,69 (D_{645})] (V/1000W)$$

$$\text{Klorofil } b: [22,9 (D_{645}) - 4,68 (D_{663})] (V/1000W)$$

$$\text{Total Klorofil: } [20,2 (D_{645}) + 8,02 (D_{663})] (V/1000W)$$

D: Klorofil ekstraktının belirtilen dalga boyundaki optik yoğunluğu (Absorbans değeri)

V: % 80' lik aseton hacmi (15 ml)

W: Ekstre edilen dokunun g olarak yaş ağırlığı (0,05 gr)

3.7. Malondialdehit (MDA) İçeriğinin Belirlenmesi

Heath ve Packer (1968)'in tanımladığı metoda göre Tiobarbiturik asitin (TBA) reaksiyonu ile belirlenen malondialdehit (MDA) içeriği 2 aşamada gerçekleştirilmiştir. 1.aşamada; 0,1 g taze bitki materyali 5 ml (% 0,1 w/v) Trikloroasetik asit (TCA) ile homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat 15 000 g de 10 dk santrifüj edilmiştir. 2.aşamada; 0,5 ml süpernatant, 1,5 ml karışım çözeltisi (% 20 TCA içeren % 0,5 TBA w/v) ile 95°C de 30 dk kaynatılarak inkübasyona bırakılmıştır. Bu karışım 15 000 g de 5 dk 4 °C de tekrar santrifüj edilmiştir 532 ve 600 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak (Novaspec II, LKB Biochrom) absorbansları okunmuştur.

İki farklı dalga boyunda yapılan optik yoğunluk (D) ölçümlerinden elde edilen değerlerin aşağıda verilen eşitliklerde yerine konması ile MDA içeriği (nmol/g YA) hesaplanmıştır (ϵ ; 155 mM cm⁻¹):

$$\text{MDA: } (Abs_{523} - Abs_{600}) \times \text{Ekstrakt hacmi (ml)} / \epsilon \times \text{Örnek miktarı}$$

3.8. Hücre Membran Zararı ve İyon Sızıntısının Belirlenmesi

Hücre membran zararı ve iyon sızıntısının belirlenmesinde Masood ve ark. (2006) tarafından tanımlanan ve Sivritepe ve ark. (2009) tarafından modifiye edilmiş bir yöntem kullanılmıştır. Bitki kısımları (0,5 gr taze yaprak, 0,25 gr taze kök) 5 mm uzunluğunda

parçalarına ayrılmıştır. Her bir örnek 20 ml de-iyonize su içeren cam tüplere yerleştirilerek tüplerin ağzı sıkıca kapatılmıştır. Örnekler 2 saat boyunca su banyosunda inkübasyona (32°C) bırakıldıktan sonra elektriksel iletkenlik düzeyi (EC₁) ölçülmüştür (Şekil 3.8.1.a). Daha sonra örnekler 120 °C de 20 dk otoklavlanmıştır. Örnekler 25°C ye kadar soğumaya bırakılmıştır. Son elektriksel iletkenlik düzeyleri (EC₂) ölçülmüştür (Şekil 3.8.1.b.).



Şekil 3.8.1. a; 2 saat boyunca su banyosunda inkübasyona bırakılan örneklerde EC₁ değerlerinin ölçümü **b;** Otoklavlanan örneklerde EC₂ değerlerinin ölçümü

Hücre membranlarındaki iyon sızıntısı aşağıdaki formüle göre yüzde (%) olarak ifade edilmiştir;

$$\text{İyon sızıntısı (\%): } (EC_1/EC_2) \times 100$$

Hücre membran zararı ise Shibli ve ark. (2007) tarafından belirlenen aşağıdaki formüle göre yüzde (%) olarak hesaplanmıştır;

$$\text{Hücre membran zararı (\%): } 1 - (1 - EC_1/EC_2) / (1 - EC_1^*/EC_2^*)$$

E*, kontrolün elektriksel iletkenlik değerini içerir.

3.9. Azot Metabolizması Enzimlerinin Aktivitesinin Belirlenmesi

3.9.1. Nitrat Redüktaz Aktivitesinin (NRA) Tayini

Nitrat redüktaz aktivitesinin tayini için kullanılan yöntem Hageman ve Hucklesby (1971) ve Jaworski (1971) tarafından tanımlanan ve Gebauer ve ark. (1984) tarafından modifiye edilmiş in-vivo bir yöntemdir. Yöntemin esası inkübasyon ortamında nitratın

indirgenmesiyle oluşan nitritin spektrofotometre ile ölçümüne dayanmaktadır. Nitrat redüktazın çabuk bozulan bir enzim olması nedeniyle nitrat redüktaz aktivite (NRA) testi için taze bitki materyali kullanılmıştır. Yıkanmış olan bitki materyalleri 8-10 mm lik parçalara ayrılmıştır (Şekil 3.9.1.1.a.). Elde edilen bitki parçaları, içerisinde 5 ml tampon çözeltisi bulunan (tampon çözelti: 0,08M KNO₃, 0,25M KH₂PO₄, % 1,5' lik n-propanol, pH: 7,5) ve inkübasyon plağına monte edilmiş kahverengi şişeler içerisine konulmuştur (Şekil 3.9.1.1.b.). Oksijensiz bir ortam hazırlamak için inkübasyon plağına vakumlama işlemi uygulanmıştır (6 mm Hg; 30 s). Daha sonra gaz halinde azot verilerek inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. İnkübasyon karanlık ve oksijensiz ortamda 30°C deki su banyosunda 2 saat süreyle yapılmıştır. Bitki parçaları su banyosunda inkübe edilirken, deney tüplerinin içerisine 0,4 ml saf su ve 0,6 ml sülfanilamid (% 5) ve α -naftiletilediamin (% 0,1) karışımı eklenmiştir. İnkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra su banyosundan çıkarılan şişelerdeki solüsyondan 1 ml alınarak hazırlanan deney tüplerine sırası bozulmayacak şekilde konmuştur (Şekil 3.9.1.1.c.). Tüpler 20 dk karanlık bir ortamda bekletildikten sonra 540 nm de spektrofotometrik olarak (Novaspec II, LKB Biochrom) absorbansları ölçülmüştür. İnkübe edilen şişelerde bulunan bitki parçaları ise suyu süzülerek petrilere alınmıştır ve ağırlıkları sabitleşinceye kadar (105°C de 24 saat) kurumaya bırakılmıştır (Şekil 3.9.1.1.d.). Kuruyan bitki parçaları tartılarak kuru ağırlıkları (KA) kaydedilmiştir.



Şekil 3.9.1.1. Ağır metal uygulanmış fidelerde NR aktivite tayini **a**; Parçalara ayrılmış bitki kısımları **b**; İnkübasyon plağı **c**; inkübasyon plağından deney tüplerine aktarılan solüsyon **d**; inkübasyon plağından çıkarılıp kurutulan bitki materyalleri

Çizelge 3.9.1.1. NRA Standartının Hazırlanması

Standartlar	100 μM stok NaNO_2 (μL)	dH_2O (mL)	Reaksiyon karışımı (mL)
Kör	0	1,4	0,6
0,5 nmol	5	1,395	0,6
1 nmol	10	1,39	0,6
2 nmol	20	1,38	0,6
5 nmol	50	1,35	0,6
10 nmol	100	1,3	0,6
20 nmol	200	1,2	0,6
30 nmol	300	1,1	0,6
40 nmol	400	1	0,6

Standart olarak sodyum nitrit (NaNO_2) kullanılmıştır. Çizelge 3.9.1.1.'de belirtildiği gibi 100 μM NaNO_2 stoğundan 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300 ve 400 μL alınarak bir standart grafiği elde edilmiştir. Grafikten elde edilen denklem ($y = 0,0726x - 0,0892$ $R^2 = 0,99$),

kuru ağırlık ve absorbans değerleri kullanılarak NR aktivite ($\mu\text{mol NO}_2^- \text{gKA}^{-1} \text{ saat}^{-1}$) değerleri hesaplanmıştır (Gebauer ve ark. 1984).

3.9.2. Glutamin Sentetaz Aktivitesinin (GS) Tayini

Bitki materyalinin ekstre edilmesinde Viégas ve Silveira (1999)' nın belirlediği yöntem kullanılmıştır. 1 g sıvı azotta dondurulmuş bitki materyali 6 mL 10 mM mercaptoethanol, 5 mM EDTA ve % 5 PVP içeren 250 mM Tris-HCl (pH: 7.6) tamponu içerisinde havanda homojenize edilmiştir. 20.000g de 30 dk 4°C de santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatant temiz ependorf tüplerine alınmıştır. Enzim aktivitesi tayini için örnekler -80°C de saklanarak muhafaza edilmiştir.

Glutamin sentetaz aktivitesinin tayini için, Farnden ve Robertson (1980)'un belirlediği yöntem bazı modifikasyonlar yapılarak kullanılmıştır. Hazırlanan test tüplerine reaksiyon karışımı (0,6 ml 25 mM Tris-HCl (pH:7.0), 0,2 ml 30 mM ATP, 0,2 ml 500 mM MgSO₄, 0,2 ml 50 mM L-glutamate) konulduktan sonra 0,5 ml süpernatant eklenmiştir. Aynı tüpler içerisine 1:1 oranında 1M NH₂OH.HCl ve 1M NaOH karışımından 0,2 ml eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. 30°C de 30 dk lık inkübasyondan sonra 1:1:1 oranında % 10 FeCl₂, % 24 TCA ve % 50 HCl içeren karışımdan 0,5 ml eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Daha sonra tüpler 7.000 g de 10 dk santrifüj edilmiştir. Örneklerin absorbans değerleri 540 nm dalga boyunda (Novaspec II, LKB Biochrom) okunarak elde edilmiştir.

3.10. Total Eriyebilir Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Örneklerin protein konsantrasyonu Bradford (1976) tarafından geliştirilen yöntemle göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Bu yöntemin temeli Coomassie Brilliant Blue G250 (CBB) boyasının protein molekülü ile kompleks oluşturmasına dayanmaktadır. Ortamdaki protein miktarı arttıkça oluşan renk açık maviden koyu maviye doğru değişmektedir. Analiz için kullanılan stok boya çözeltisi için; 500 mg CBB 250 ml % 96 etanol içerisinde çözülerek üzerine 500 ml % 85 fosforik asit (H₃PO₄) eklenmiştir. Elde edilen çözeltiliye son hacmi 1 litre olacak şekilde saf su ilave edilmiştir. Bu çözelti siyah bantlı süzgeç kağıdından süzülerek koyu renkli şişede 4°C' de saklanmıştır. Analiz için kullanılan çözelti 1:5 oranında distile su ile seyreltilerek kullanılmıştır. Standart olarak

bovine serum albumin (BSA) kullanılmıştır. 1 mg/mL BSA stoğundan 5, 10, 15, 20, 30 ve 35 µL alınarak son hacim 500 µL olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır (Çizelge 3.10.1.). Bu karışıma son hacim 5 mL olacak şekilde Bradford ayıracı eklenmiştir. Absorbans değerleri 595 nm de belirlenmiştir. Standartlara ait absorbans değerleri kullanılarak bir grafik elde edilmiştir. Grafikten elde edilen denklem ($y = 0,0316x + 0,0516$ $R^2=0,9998$) yardımı ile protein konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin konsantrasyonları formülden tespit edilmiştir. Denklemden x eğim, y ise örneklerin Bradford sonucu ölçülen absorbans değerlerini temsil etmektedir. Hesaplamaya dilüsyon faktörü olarak 100 katsayısı da dâhil edilmiştir.

Çizelge 3.10.1. Bradford Standartının Hazırlanması

Standartlar	1 mg/mL stok BSA (µL)	dH ₂ O (µL)	Bradford Ayıracı (mL)
Kör	0	500	5
0,2 mg/mL	5	495	5
0,4 mg/mL	10	490	5
0,6 mg/mL	15	485	5
0,8 mg/mL	20	480	5
0,12 mg/mL	30	470	5
0,14 mg/mL	35	465	5

3.11. Antioksidatif Enzim (SOD, CAT, APX) Aktivitesi Tayini

3.11.1. Bitki Materyalinin Ekstraksiyonu

Bitki materyalinin ekstraksiyonu, Ardıç ve ark. (2009) tarafından uygulanmış yöntemle yapılmıştır. 1 gram dondurulmuş bitki dokusuna 3 mL tampon çözelti (Tampon Çözelti: 1 mM EDTA ve % 2 PVP içeren 50 mM Na-fosfat tamponu (pH: 7,8) konularak buzlu havanda homojenize edilmiştir. 14.000g de 40 dk 4°C de santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatant temiz ependorf tüplerine alınmıştır. Hemen enzim aktivitesi ölçülemeyen örnekler -70°C de saklanarak muhafaza edilmiştir. Bu ekstraksiyon işlemi süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktivitesinin belirlenmesinde

kullanılmıştır. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin tayininde ise bitkinin ekstraksiyonunda kullanılan tampon çözeltinin içerisinde 2 mM askorbat ilave edilmiştir.

3.11.2. Süperoksitdismütaz (SOD) Aktivitesi Tayini

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi tayininde Beuchamp ve Fridovich (1971) tarafından belirlenmiş bir yöntem kullanılmıştır. 20 mM sodyum fosfat tamponu pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 10 mM metionin, 0,1 mM p-Nitro Blue Tetrazolium (NBT), 5 µM riboflavin den oluşan reaksiyon karışımına 50 µM enzim ektratu eklenerek tüpler 15 dakika süre ile $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışığa maruz bırakılmıştır. Kontrol olarak enzim içermeyen test tüpü kullanılmıştır. Örneklerin absorbans değerleri 560 nm' de spektrofotometrede (Novaspec II LKB Biochrom) okunmuştur ve % inhibisyon değerlerinin hesaplaması için kaydedilmiştir. Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır;

$$\% \text{ inhibisyon} = (\text{Kontrolün Abs.} - \text{Örneğin Abs.}) \times 100 / \text{Kontrolün Abs.}$$

Örneklerdeki SOD konsantrasyonlarının belirlenmesi için SOD standartları hazırlanmıştır. Standartların hazırlanmasında sığır eritrositlerinden elde edilmiş bir SOD kiti (SOD S7446, Sigma-Aldrich, USA) kullanılmıştır. Çizelge 3.11.2.1.'de belirtildiği gibi 0.01 mg/mL stoktan 1, 2, 4, 6, 8, 10 ve 20 µL alınarak bir standart grafiği oluşturulmuştur. Grafikten elde edilen formül ($y = 0,1962 + 9,1306 R^2 = 0,9746$) kullanılarak SOD konsantrasyonları bilinmeyen uygulamaların enzim konsantrasyonları belirlenmiştir. Formülde y değeri % inhibisyonu, x ise SOD konsantrasyonunu ng/mL cinsinden belirtmektedir. Bir SOD ünitesi ise % 50 inhibisyon sağlayan enzim miktarı olarak tanımlandığı için konsantrasyon değerleri üniteye çevrilmiştir. Elde edilen ünite değerleri, total protein içeriğine oranlanmış ve enzim aktivitesi U/mg protein olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.11.2.1. SOD Standartının Hazırlanması

Standartlar	10 mM sodyum fosfat (pH 7.5) (µL)	0.01 mg/mL SOD stoğu (µL)	Reaksiyon karışımı(mL)
Kör	500	0	2,5
20 mg/mL	499	1	2,5
40 mg/mL	498	2	2,5
80 mg/mL	496	4	2,5
120 mg/mL	494	6	2,5
160 mg/mL	492	8	2,5
200 mg/mL	490	10	2,5
400 mg/mL	482	20	2,5

3.11.3. Katalaz (CAT) Aktivitesi Tayini

Katalaz aktivitesinin belirlenmesinde Lester ve ark. (2004)' na ait modifiye bir yöntem kullanılmıştır. Bu yöntem hidrojen peroksitin katalaz enziminin etkisi ile su ve oksijene parçalanması sonucu 240 nm dalga boyunda meydana gelen absorbans düşüşünün spektrofotometrede izlenmesi esasına dayanmaktadır. Aktivite tayin ortamında 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 6,8) ve 15 mM H₂O₂ (Fluka % 3'lük H₂O₂) bulunmaktadır. 0,1 mL enzim ekstraktı konularak başlatılan enzim aktivitesi ölçümünde 3 dk içerisinde meydana gelen absorbans azalışı tespit edilmiştir. Reaksiyon 240 nm dalga boyunda (Shimadzu UV-2100) ölçülmüştür. Reaksiyonun başlangıç ve bitiş anındaki absorbans değerleri kaydedilmiştir. CAT enzim aktivitesi aşağıdaki formüle göre total protein içeriğine oranlanarak U/mg protein olarak belirlenmiştir (Ekstriksiyon katsayısı, ϵ , 40 mmol/L.cm).

$$\text{CAT Aktivitesi: } [(\Delta\text{Abs} \times V_{\text{toplam}}) / \epsilon \times t \times V_{\text{enzim}} \times I] / \text{TP}$$

ϵ : 40 mmol/L.cm

V_{toplam} : Toplam hacim (3ml)

V_{enzim} : Reaksiyona konulan enzim hacmi (0,1 ml)

t: Reaksiyonun gerçekleştiği süre (3 dk)

l: Küvete ait ışık yolu (1 cm)

TP: Total protein miktarı (mg protein)

3.11.4. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi Tayini

Askorbat peroksidaz aktivitesinin tayininde Lester ve ark.(2004) tarafından verilen yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde 50 mM potasyum fosfat (pH 6,6), 0,25 mM askorbat ve 1 mM H₂O₂ (Fluka % 3' lük H₂O₂) dan oluşan reaksiyon karışımı kullanılmıştır. Bu karışıma 1 mL enzim ekstraktı eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Askorbat ve H₂O₂ ışıktan etkilendikleri için stok hazırlamakta amber şişeler kullanılmıştır. Enzim aktivite ölçümleri 3 dakika boyunca spektrofotometrede (Shimadzu UV-2100) 290 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonun başlangıç ve bitiş absorbans değerleri kaydedilmiştir. APX enzim aktivitesi aşağıdaki formüle göre total protein içeriğine oranlanarak U/mg protein olarak belirlenmiştir (Ekstriksiyon katsayısı of 2,8 mM⁻¹cm⁻¹).

$$\text{APX Aktivitesi: } [(\Delta \text{Abs} \times V_{\text{toplam}}) / \epsilon \times t \times V_{\text{enzim}} \times l] / \text{TP}$$

ϵ : 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹

V_{toplam}: Toplam hacim (3 mL)

V_{enzim}: Reaksiyona konulan enzim hacmi (1 mL)

t: Reaksiyonun gerçekleştiği süre (3 dk)

l: Küvete ait ışık yolu (1 cm)

TP: Total protein miktarı (mg protein)

3.12. Bulguların Değerlendirilmesi ve İstatistik Analizler

Her bir örnekleme döneminde kontrol grubu ve metal uygulanan serilere ait 5 birey analizler için kullanılmıştır (n=5). Metal konsantrasyonlarına ve uygulama süresine bağlı olarak ortalama biyokütle, su içeriği, klorofil ve total eriyebilir protein içeriği, NR ve GS, MDA, iyon sızıntısı, hücre membran zararı, SOD, CAT, APX aktivite değerleri arasındaki farklılıklar İki-Yönlü (Two-Way ANOVA) varyans ile sınanmıştır. İstatistik analizler Statistica 6.0 paket programı (StatSoft Inc, 1984-1995) ile α : 0,05 anlamlılık düzeyinde gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

Cd, Cu, Cr, Ni ve Zn uygulanan *V. olympicum* Boiss. fidelerinin biyokütle (mg KA) ve su (%), klorofil (klorofil *a*, *b* ve total klorofil; mg/g YA) ve protein içeriği (mg/g YA), MDA (nmol/g YA), hücre membran zararı (%) ve iyon sızıntısı (%), nitrat özümleme (NR; $\mu\text{mol NO}_2^- \text{gKA}^{-1} \text{saat}^{-1}$ ve GS; U/mg protein) ve antioksidatif enzim (SOD, CAT, APX; U/mg protein) aktivitelerindeki konsantrasyona ve süreye bağlı değişimler şekil ve çizelgeler ile gösterilmiştir.

4.1. Kadmiyum (Cd)

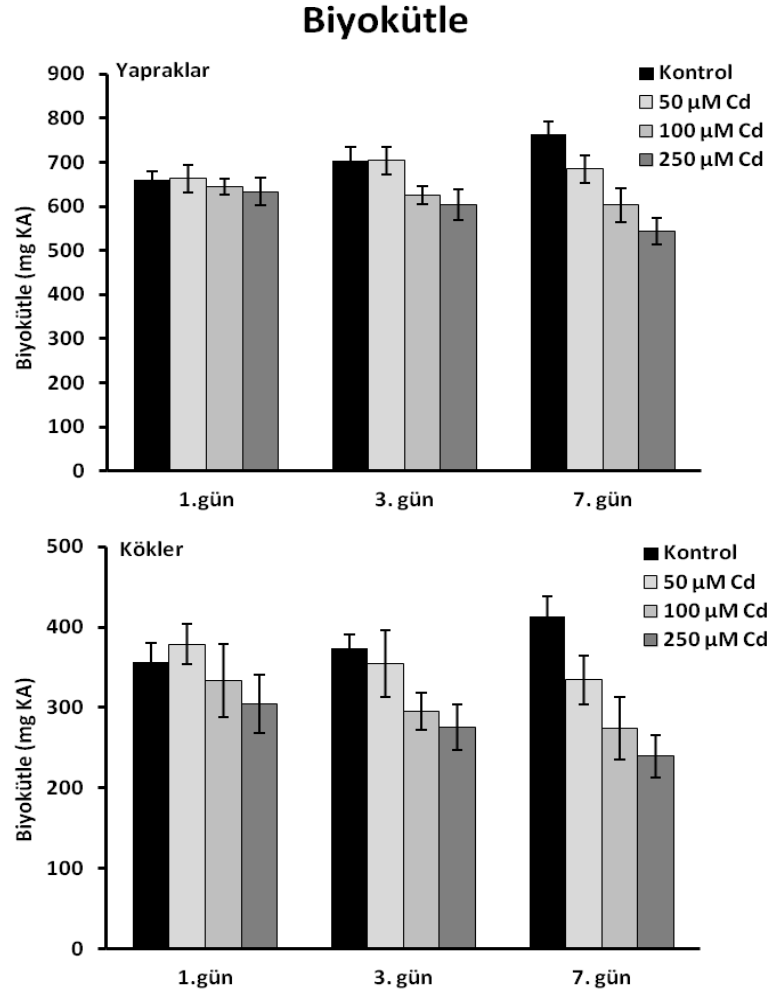
4.1.1. Cd Uygulanmış Fidelerde Büyüme Parametreleri (Biyokütle, Su İçeriği ve Klorofil İçeriği)

50, 100 ve 250 μM konsantrasyonlarında Cd uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen ortalama biyokütle değerlerinin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.1.1.1 ve Şekil 4.1.1.1' de verilmiştir. Buna göre hem kök hem de yapraklarda Cd konsantrasyonları ve uygulama süresine bağlı olarak biyokütlerde anlamlı bir azalış olduğu tespit edilmiştir ($P < 0,05$).

Çizelge 4.1.1.1. Cd uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama biyokütle değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi ($n=5$; Ort. \pm Std. sapma).

		Biyokütle (mg KA)		
Konsantrasyonlar		1.gün	3.gün	7.gün
Yapraklar	Kontrol	660,5 \pm 18,3	703,0 \pm 31,7	763,3 \pm 29,5
	50 μM Cd	662,7 \pm 31,6	703,6 \pm 32,0	684,6 \pm 31,1
	100 μM Cd	643,7 \pm 17,7	625,5 \pm 20,5	602,7 \pm 38,3
	250 μM Cd	633,0 \pm 31,3	603,6 \pm 34,2	543,7 \pm 30,0
Kökler	Kontrol	355,9 \pm 24,5	373,0 \pm 17,3	413,8 \pm 25,0
	50 μM Cd	378,8 \pm 25,4	354,0 \pm 41,6	334,6 \pm 30,3
	100 μM Cd	333,5 \pm 44,9	295,2 \pm 23,2	273,7 \pm 38,9
	250 μM Cd	304,7 \pm 35,9	275,4 \pm 28,9	239,4 \pm 26,2

Fidelerde belirlenen en düşük biyokütle değeri, hem kök hem de yapraklar için 7. günde 250 μM Cd uygulanmış örneklerde tespit edilmiştir. Bu değerler sırasıyla kökler için $239,4 \pm 26,2$ mg KA; yapraklar için $543,7 \pm 30,0$ mg KA'dır. En yüksek ortalama biyokütle değeri hem kök hem de yapraklar için 7. güne ait kontrol örneklerinde elde edilmiştir. Bu değerler kökler için $413,8 \pm 25,0$ mg KA, yapraklar için $763,3 \pm 29,5$ mg KA'dır (Çizelge 4.1.1.1).



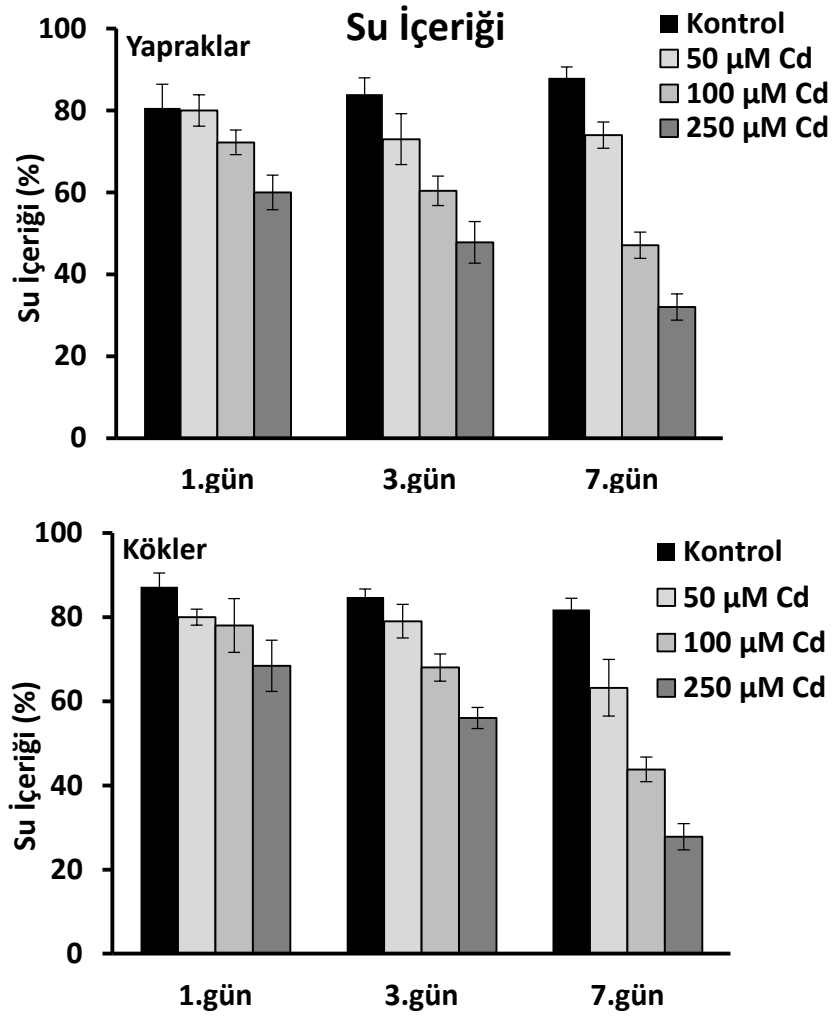
Şekil 4.1.1.1. Cd uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama biyokütle değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Farklı konsantrasyonlarda Cd uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen ortalama su içeriğinin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.1.1.2 ve Şekil 4.1.1.2' de verilmiştir. Uygulama süresi ve Cd konsantrasyonlarına göre su içeriğinde anlamlı bir azalış olduğu tespit edilmiştir ($P < 0,05$).

Çizelge 4.1.1.2. Cd uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama su içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma).

		Su içeriği (%)		
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	7.gün
Yapraklar	Kontrol	80,6 \pm 5,8	84,0 \pm 4,0	88,0 \pm 2,6
	50 μM Cd	80,0 \pm 3,8	73,0 \pm 6,2	74,0 \pm 3,2
	100 μM Cd	72,2 \pm 3,0	60,4 \pm 3,6	47,1 \pm 3,2
	250 μM Cd	60,0 \pm 4,2	47,8 \pm 5,1	32,0 \pm 3,2
Kökler	Kontrol	87,2 \pm 3,3	84,8 \pm 1,9	81,8 \pm 2,7
	50 μM Cd	80,0 \pm 1,9	79,0 \pm 4,0	63,2 \pm 6,7
	100 μM Cd	78,0 \pm 6,4	68,0 \pm 3,2	43,8 \pm 2,9
	250 μM Cd	68,4 \pm 6,1	56,0 \pm 2,5	27,8 \pm 3,1

Çizelge 4.1.1.2' ye göre yapraklarda belirlenen en yüksek su içeriği 7. gündeki kontrol örneklerinde tespit edilmiştir (% 88,0 \pm 2,6). Yapraklardaki en düşük su içeriği ise, 7. gün boyunca 250 μ M Cd uygulanmış örneklerde elde edilmiş olup % 32,0 \pm 3,2 olarak belirlenmiştir. Köklerdeki en yüksek su içeriği 1. gündeki kontrol örneklerinde elde edilmiştir. Bu değer % 87,2 \pm 3,3 dir. Köklere ait en düşük su içeriği ise, 7 gün boyunca 250 μ M Cd uygulanmış örneklerde elde edilmiştir (% 27,8 \pm 3,1). Bununla birlikte Cd uygulanmış fidelerin kök kısımlarında belirlenen su içeriğindeki azalışın yapraklara göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.



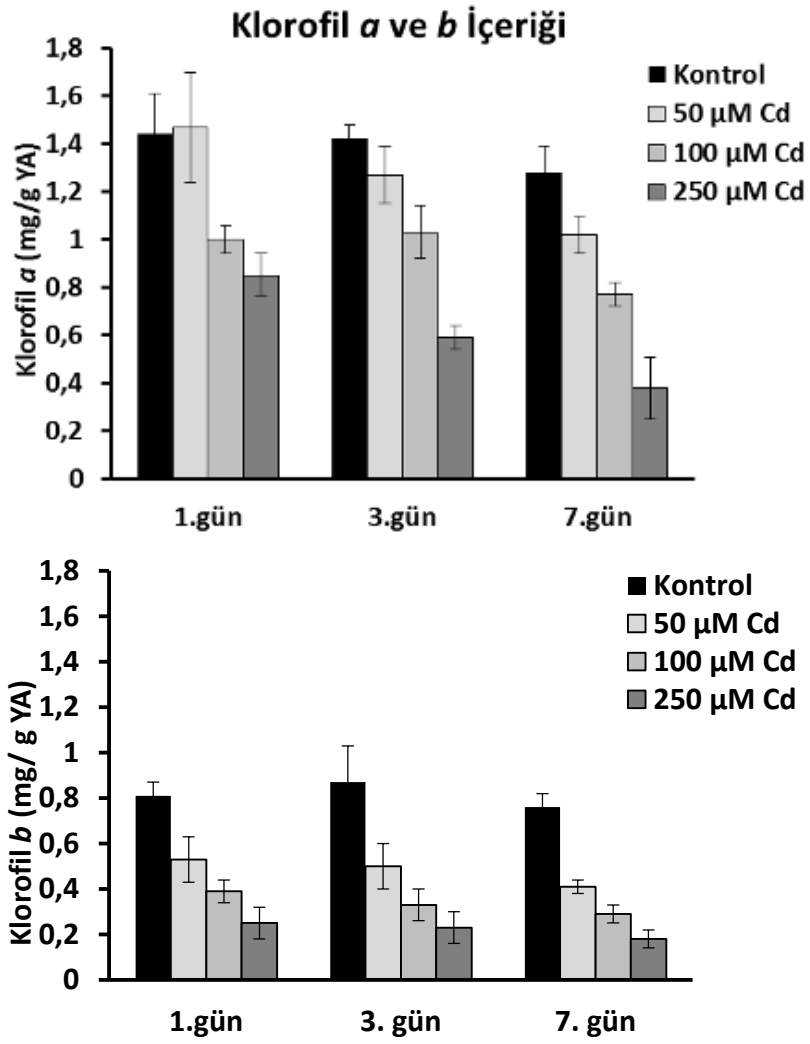
Şekil 4.1.1.2. Cd uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama su içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Çizelge 4.1.1.3 ve Şekil 4.1.1.3’de farklı konsantrasyonlarda Cd uygulanmış fidelerin yaprak kısımlarında belirlenen ortalama klorofil *a* ve *b* içeriğinin uygulama süresine göre değişimi yer almaktadır. Buna göre Cd konsantrasyonlarının uygulama süresine bağlı olarak klorofil *a* içeriğinde anlamlı bir azalış meydana getirdiği tespit edilmiştir ($P<0,05$). Fakat Cd konsantrasyonlarının uygulama süresine bağlı olarak klorofil *b* içeriğinde meydana getirdiği azalışın anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($P<0,05$).

Çizelge 4.1.1.3. Cd uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama klorofil *a* ve *b* içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5, Ort. ± Std. Sapma).

Klorofil <i>a</i> ve <i>b</i> İçeriği (mg/g YA)				
Konsantrasyonlar		1.gün	3.gün	7.gün
Klorofil <i>a</i>	Kontrol	1,44 ± 0,17	1,42 ± 0,06	1,28 ± 0,11
	50 µM Cd	1,47 ± 0,23	1,27 ± 0,12	1,02 ± 0,08
	100 µM Cd	1,00 ± 0,06	1,03 ± 0,11	0,77 ± 0,05
	250 µM Cd	0,85 ± 0,09	0,59 ± 0,05	0,38 ± 0,13
Klorofil <i>b</i>	Kontrol	0,81 ± 0,06	0,87 ± 0,16	0,76 ± 0,06
	50 µM Cd	0,53 ± 0,10	0,50 ± 0,10	0,41 ± 0,03
	100 µM Cd	0,39 ± 0,05	0,33 ± 0,07	0,29 ± 0,04
	250 µM Cd	0,25 ± 0,07	0,23 ± 0,07	0,18 ± 0,04

Çizelge 4.1.1.3'e göre belirlenen en düşük klorofil *a* ve *b* değeri 7 gün boyunca 250 µM Cd'a maruz bırakılmış örneklerde elde edilmiştir. Bu uygulama süresi ve konsantrasyonda klorofil *a* içeriğindeki azalış kontrole göre yaklaşık olarak 3 kat iken (0,38 ± 0,13 mg/g YA), aynı konsantrasyon ve uygulama süresinde klorofil *b* içeriğinde meydana gelen azalış kontrole göre yaklaşık olarak 4 kattır (0,18 ± 0,04 mg/g YA).



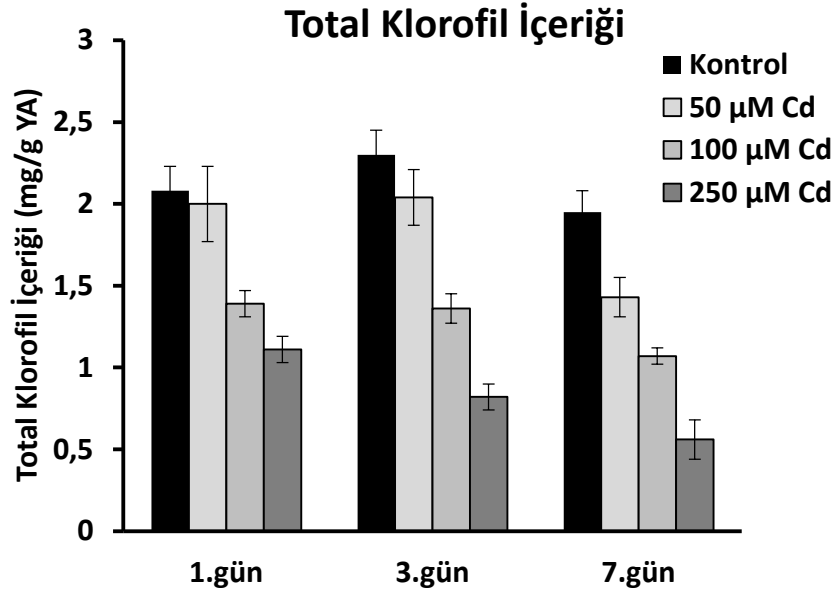
Şekil 4.1.1.3. Cd uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama klorofil a ve b içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5).

Farklı konsantrasyonlarda Cd uygulanmış fidelerin yapraklarında belirlenen ortalama total klorofil içeriğinin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.1.1.4 ve Şekil 4.1.1.4' de gösterilmiştir. Buna göre artan Cd konsantrasyonları ve uygulama süresine bağlı olarak ortalama total klorofil içeriğinde anlamlı bir azalış olduğu tespit edilmiştir ($P < 0,05$). Elde edilen en düşük total klorofil içeriği 7 gün boyunca 250 µM Cd uygulanmış örneklerde elde edilmiştir ($0,56 \pm 0,12$ mg/g YA). Çizelge 4.1.1.4' de 50 µM Cd konsantrasyonunun 1. ve 3. günlerde total klorofil içeriğinde benzer bir etkiye neden olduğu görülmektedir. Aynı durum 100 µM Cd uygulamasında da meydana gelmiştir.

Çizelge 4.1.1.4. Cd uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama total klorofil içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5, Ort. ± Std. Sapma).

Total Klorofil İçeriği (mg/g YA)				
	Konsantrasyon	1.gün	3.gün	7.gün
Total Klorofil	Kontrol	2,08 ± 0,15	2,30 ± 0,15	1,95 ± 0,13
	50 µM Cd	2,00 ± 0,23	2,04 ± 0,17	1,43 ± 0,12
	100 µM Cd	1,39 ± 0,08	1,36 ± 0,09	1,07 ± 0,05
	250 µM Cd	1,11 ± 0,08	0,82 ± 0,08	0,56 ± 0,12

250 µM Cd konsantrasyonunda ise uygulama süresine bağlı olarak total klorofil içeriğinin tüm uygulama sürelerinde azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.1.1.4. Cd uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama total klorofil içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5).

Farklı konsantrasyonlarda Cd uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen büyüme parametrelerine ait (biyokütle, su içeriği, klorofil *a*, *b* ve total klorofil içeriği) ortalama değerlerin uygulama süresine göre değişimi iki yönlü ANOVA testi ile analiz edilmiştir. Elde edilen istatistiksel veriler Çizelge 4.1.1.5' de yer almaktadır.

Çizelge 4.1.1.5. Biyokütle, su ve klorofil değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Cd) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].

Faktör	Biyokütle		Su İçeriği		Klorofil <i>a</i> İçeriği		Klorofil <i>b</i> İçeriği		Total Klorofil İçeriği		
	<i>df</i>	F	<i>P</i>	F	<i>P</i>	F	<i>P</i>	F	<i>P</i>	F	<i>P</i>
Kökler											
Konsantrasyonlar	3	37,53	0,000	166,84	0,000						
Uygulama süresi	2	4,14	0,022	167,48	0,000						
Konsantrasyon x Süre	6	4,37	0,001	18,21	0,000						
Hata	48										
Yapraklar											
Konsantrasyonlar	3	48,84	0,000	236,86	0,000	116,27	0,000	151,98	0,000	273,51	0,000
Uygulama süresi	2	0,73	0,486	46,28	0,000	41,51	0,000	8,291	0,001	55,90	0,000
Konsantrasyon x Süre	6	10,51	0,000	19,97	0,000	4,39	0,001	1,30	0,277	5,27	0,000
Hata	48										

4.1.2. Cd Uygulanmış Fidelerde Azot Metabolizması Enzimlerinin (NR ve GS) Aktivitesi ve Eriyebilir Protein İçeriği

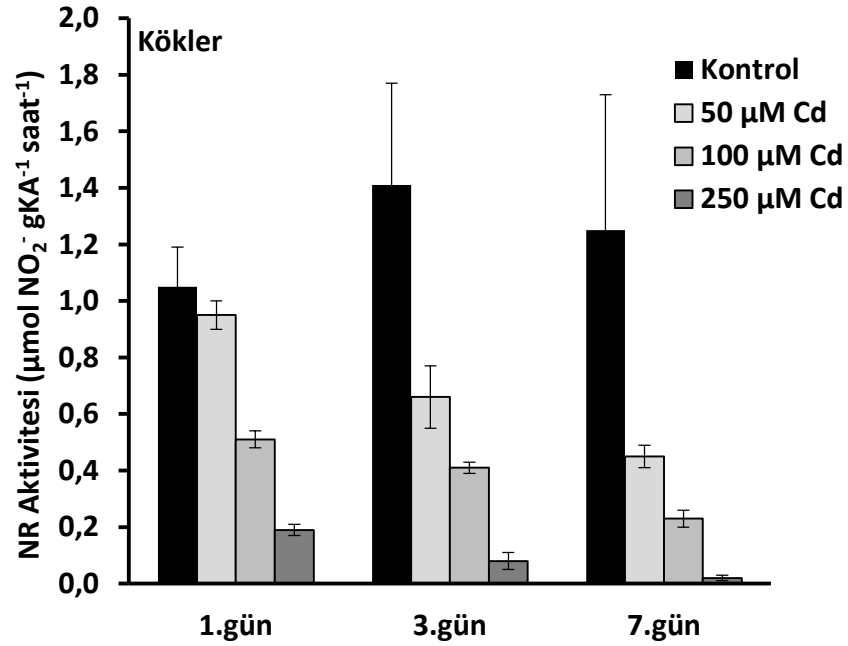
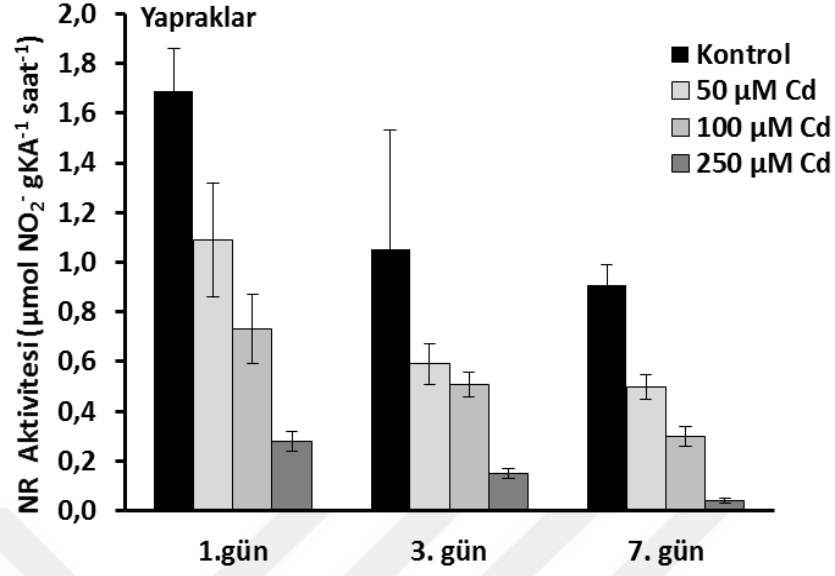
Farklı konsantrasyonlarda Cd uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen azot metabolizması enzimlerinden nitrat redüktaz (NR) aktivitesinin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.1.2.1 ve Şekil 4.1.2.1' de gösterilmiştir. Buna göre hem kök hem de yapraklarda ortalama NR aktivitesinin uygulama süresine ve Cd konsantrasyonlarına bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir ($P < 0,05$). Yapraklardaki en yüksek NR aktivitesi 1. güne ait kontrol örneklerinde ($1,69 \pm 0,17 \mu\text{mol NO}_2^- \text{gKA}^{-1}.\text{saat}^{-1}$) tespit edilmiştir. Yapraklardaki en düşük NR aktivitesi ise 7 gün boyunca $250 \mu\text{M}$ Cd uygulanmış örneklerde elde edilmiş olup bu değer $0,04 \pm 0,01 \mu\text{mol NO}_2^- \text{gKA}^{-1}.\text{saat}^{-1}$ dir (Şekil 4.1.2.1).

Çizelge 4.1.2.1. Cd uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama NR aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi ($n=5$; Ort. \pm Std. Sapma).

		NR Aktivitesi ($\mu\text{mol NO}_2^- \text{gKA}^{-1}.\text{saat}^{-1}$)		
Konsantrasyonlar		1.gün	3.gün	7.gün
Yapraklar	Kontrol	$1,69 \pm 0,17$	$1,05 \pm 0,48$	$0,91 \pm 0,08$
	$50 \mu\text{M Cd}$	$1,09 \pm 0,23$	$0,59 \pm 0,08$	$0,50 \pm 0,05$
	$100 \mu\text{M Cd}$	$0,73 \pm 0,14$	$0,51 \pm 0,05$	$0,30 \pm 0,04$
	$250 \mu\text{M Cd}$	$0,28 \pm 0,04$	$0,15 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,01$
Kökler	Kontrol	$1,05 \pm 0,14$	$1,41 \pm 0,36$	$1,25 \pm 0,48$
	$50 \mu\text{M Cd}$	$0,95 \pm 0,05$	$0,66 \pm 0,11$	$0,45 \pm 0,04$
	$100 \mu\text{M Cd}$	$0,51 \pm 0,03$	$0,41 \pm 0,02$	$0,23 \pm 0,03$
	$250 \mu\text{M Cd}$	$0,19 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,03$	$0,02 \pm 0,01$

Köklerde de yapraklara benzer bir azalış görülmektedir. Köklerde belirlenen en düşük NR aktivitesi 7. günde $250 \mu\text{M Cd}$ uygulanmış örneklerde elde edilmiştir ($0,02 \pm 0,01 \mu\text{mol NO}_2^- \text{gKA}^{-1}.\text{saat}^{-1}$). Fakat köklerdeki en yüksek NR aktivitesi 3. güne ait kontrol örneklerinde tespit edilmiştir ($1,41 \pm 0,36 \mu\text{mol NO}_2^- \text{gKA}^{-1}.\text{saat}^{-1}$).

Nitrat Redüktaz (NR) Aktivitesi



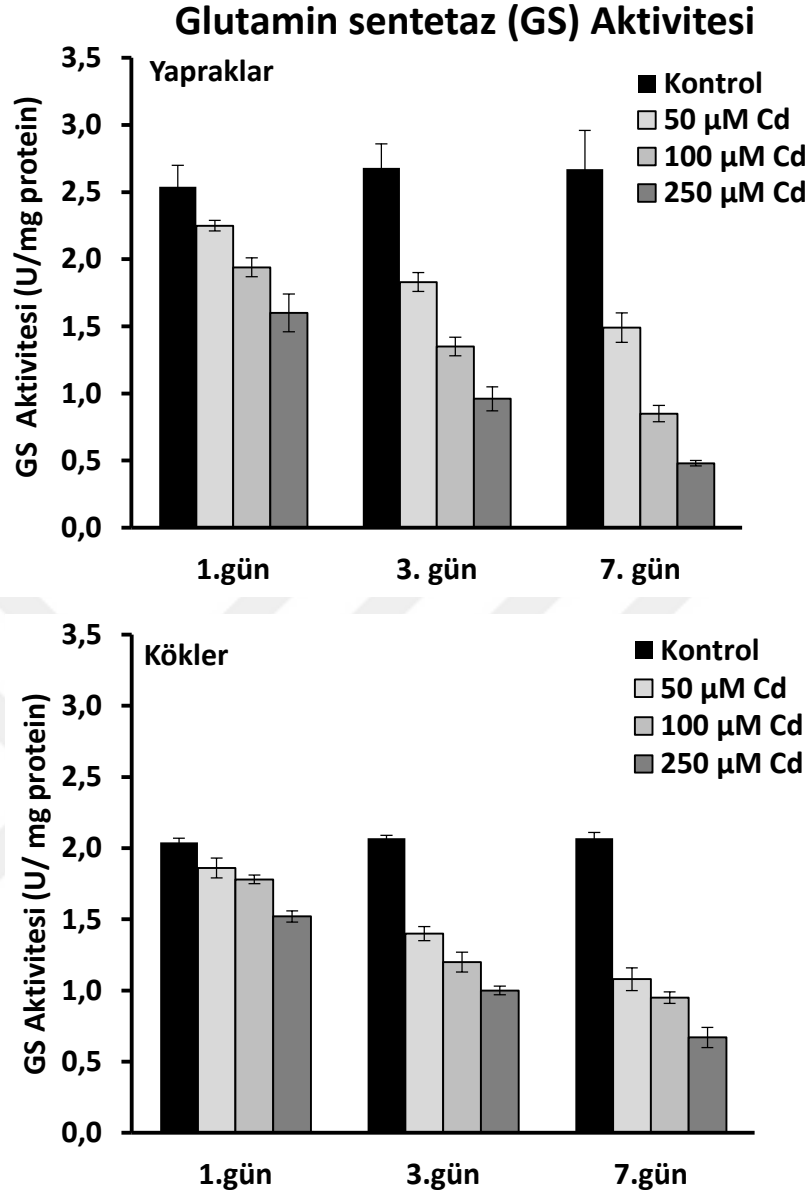
Şekil 4.1.2.1. Cd uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama NR aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Azot metabolizmasına ait bir diğer enzim olan glutamin sentetaz (GS) aktivitesinin farklı konsantrasyonlarda Cd uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen ortalama değerlerinin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.1.2.2 ve Şekil 4.1.2.2' de verilmiştir. Buna göre hem kök hem de yaprak kısımlarında belirlenen GS aktivitesine ait değerlerde uygulama süresi ve Cd konsantrasyonlarına bağlı olarak anlamlı fark ($P<0,05$) bulunmuştur.

Çizelge 4.1.2.2. Cd uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama GS aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. Sapma).

GS Aktivitesi (U/mg protein)				
Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	7.gün	
Yapraklar	Kontrol	2,54 ± 0,16	2,68 ± 0,18	2,67 ± 0,29
	50 µM Cd	2,25 ± 0,04	1,83 ± 0,07	1,49 ± 0,11
	100 µM Cd	1,94 ± 0,07	1,35 ± 0,07	0,85 ± 0,06
	250 µM Cd	1,60 ± 0,14	0,96 ± 0,09	0,48 ± 0,02
Kökler	Kontrol	2,04 ± 0,03	2,07 ± 0,02	2,07 ± 0,04
	50 µM Cd	1,86 ± 0,07	1,40 ± 0,05	1,08 ± 0,08
	100 µM Cd	1,78 ± 0,03	1,20 ± 0,07	0,95 ± 0,04
	250 µM Cd	1,52 ± 0,04	1,00 ± 0,03	0,67 ± 0,07

Çizelge 4.1.2.2' e göre GS aktivitesinin, tüm Cd konsantrasyonlarından negatif yönde etkilendiği görülmektedir. Buna göre yapraklarda belirlenen en düşük GS aktivitesi 7 gün boyunca 250 µM Cd uygulanmış örneklerde belirlenmiştir (0,48 ± 0,02 U/mg protein). Köklerde belirlenen GS aktivitesinde de yapraklardakine benzer bir azalış görülmektedir. Köklerde belirlenen en düşük GS aktivitesi 7 gün boyunca 250 µM Cd uygulanmış örneklerde tespit edilmiştir. Bu değer 0,67 ± 0,07 U/mg protein' dir ve kontrole göre yaklaşık olarak % 60 oranında bir azalış meydana geldiği görülmektedir.



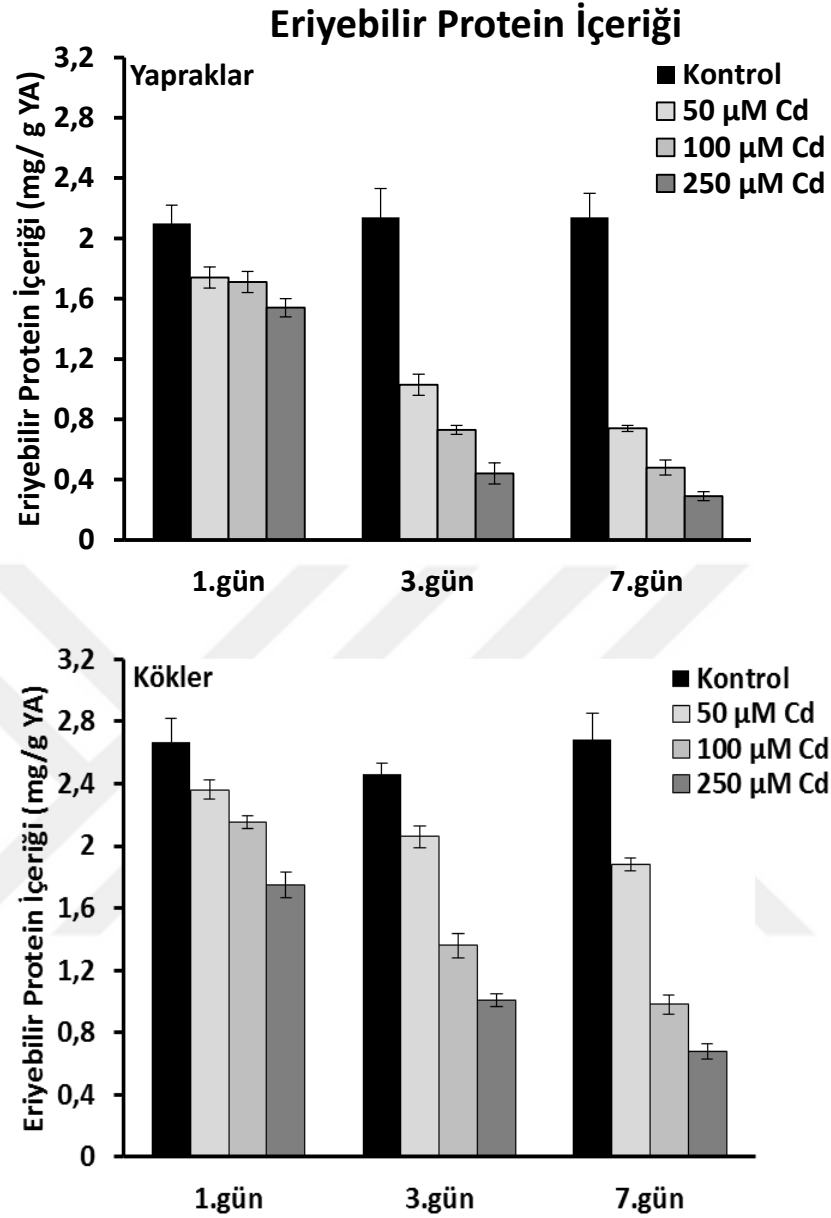
Şekil 4.1.2.2. Cd uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama GS aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Şekil 4.1.2.3' de farklı konsantrasyonlarda Cd uygulanmış fidelerin kök ve yapraklarında belirlenen ortalama eriyebilir protein (mg/g YA) içeriğinin uygulama süresine göre değişimi yer almaktadır. Buna göre hem kök hem de yapraklarda belirlenen ortalama eriyebilir protein içeriğinde uygulama süresi ve Cd konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($P < 0,05$). Buna göre fidelerin kök ve yapraklarında belirlenen protein içeriğinin farklı konsantrasyonlarda Cd uygulamasıyla birlikte uygulama süresine bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1.2.3. Cd uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama eriyebilir protein içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. Sapma).

		Eriyebilir Protein İçeriği (mg/g YA)		
Konsantrasyonlar		1.gün	3.gün	7.gün
Yapraklar	Kontrol	2,10 ± 0,12	2,14 ± 0,19	2,14 ± 0,16
	50 µM Cd	1,74 ± 0,07	1,03 ± 0,07	0,74 ± 0,02
	100 µM Cd	1,71 ± 0,07	0,73 ± 0,03	0,48 ± 0,05
	250 µM Cd	1,54 ± 0,06	0,44 ± 0,07	0,29 ± 0,03
Kökler	Kontrol	2,67 ± 0,15	2,46 ± 0,07	2,68 ± 0,17
	50 µM Cd	2,36 ± 0,06	2,06 ± 0,07	1,88 ± 0,04
	100 µM Cd	2,15 ± 0,04	1,36 ± 0,08	0,98 ± 0,06
	250 µM Cd	1,75 ± 0,08	1,01 ± 0,04	0,68 ± 0,05

Yapraklarda belirlenen en yüksek ortalama eriyebilir protein içeriği kontrol örneklerinde $2,14 \pm 0,16$ mg/g YA olarak belirlenmiştir. Yapraklarda belirlenen en düşük eriyebilir protein içeriği ise 7 gün boyunca 250 µM Cd konsantrasyonuna maruz bırakılmış örneklerde belirlenmiştir ($0,29 \pm 0,03$ mg/g YA). Cd uygulanmış fidelerin köklerinde belirlenen eriyebilir protein içeriğinin de uygulama süresine bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Fakat köklerin ortalama eriyebilir protein içeriğinde belirlenen bu azalışın yapraklardaki kadar olmadığı görülmektedir (Çizelge 4.1.2.3). Köklerde belirlenen en düşük protein içeriği 7 gün boyunca 250 µM Cd uygulanmış örneklerde belirlenmiştir ve bu değer $0,68 \pm 0,05$ mg/g YA olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.1.2.3. Cd uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama eriyebilir protein içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Farklı konsantrasyonlarda Cd uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen azot metabolizması enzimlerinden NR ve GS aktivitesinin ve eriyebilir protein içeriğinin uygulama süresine göre değişimi iki yönlü ANOVA testi ile analiz edilmiştir. Elde edilen istatistiksel veriler Çizelge 4.1.2.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.1.2.4. Azot metabolizması enzimlerine ait (NR ve GS) ortalama aktivite değerleri ve eriyebilir protein içeriği değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Cd) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].

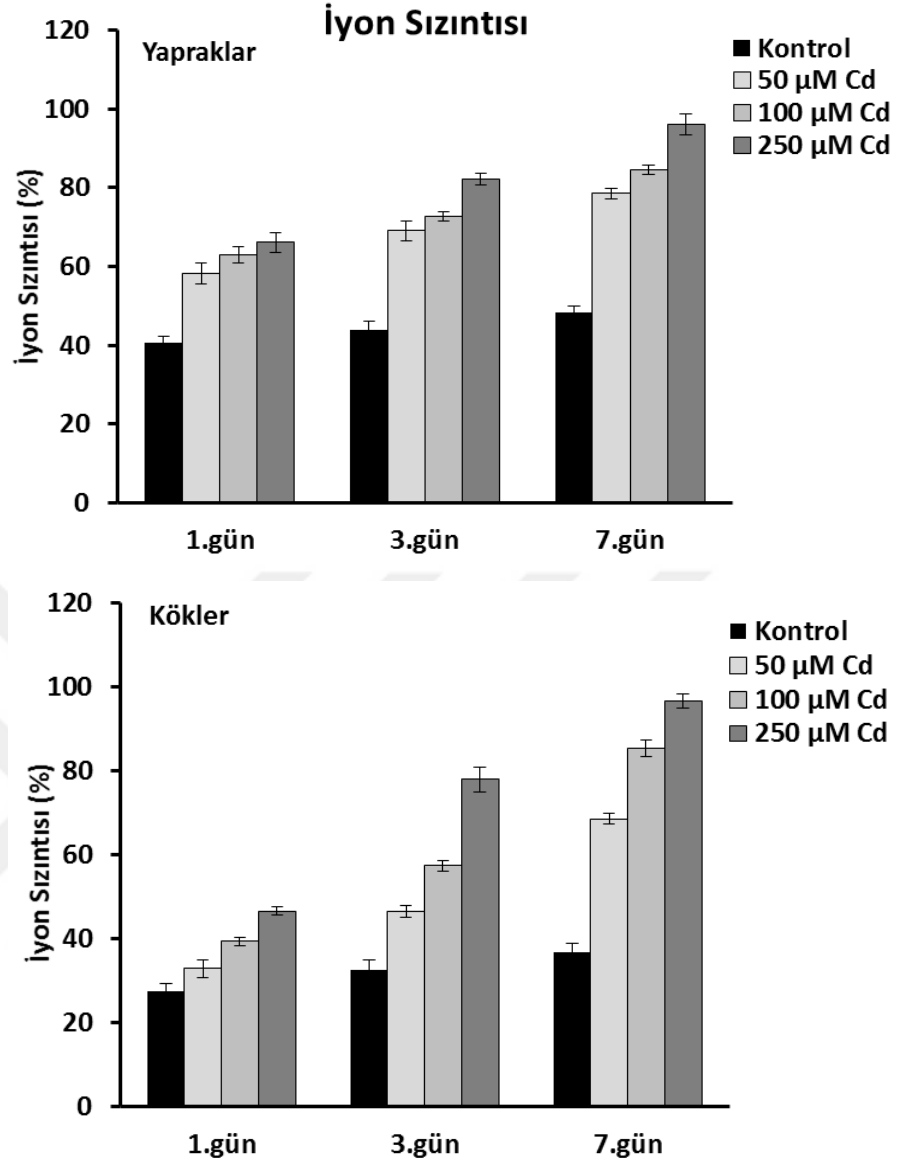
Faktör	NR Aktivitesi		GS Aktivitesi		Eriyebilir Protein İçeriği	
	<i>df</i>	F P	F P	F P	F P	
Kökler						
Konsantrasyonlar	3	102,88 0,000	865,63 0,000	786,98 0,000		
Uygulama süresi	2	5,92 0,005	594,88 0,000	315,25 0,000		
Konsantrasyon x Süre	6	4,01 0,002	75,67 0,000	49,13 0,000		
Hata	48					
Yapraklar						
Konsantrasyonlar	3	98,64 0,000	418,03 0,000	605,07 0,000		
Uygulama süresi	2	46,62 0,000	146,45 0,000	459,98 0,000		
Konsantrasyon x Süre	6	3,19 0,010	25,11 0,000	60,02 0,000		
Hata	48					

4.1.3. Cd Uygulanmış Fidelerde İyon sızıntısı, Hücre Membran Zararı ve Malondialdehit (MDA) içeriği

Farklı konsantrasyonlarda Cd uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen iyon sızıntısına ait ortalama değerlerin (%) uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.1.3.1 ve Şekil 4.1.3.1' de verilmiştir. Buna göre, hem kök hem de yapraklarda belirlenen iyon sızıntısına ait ortalama değerlerde Cd konsantrasyonları ve uygulama süresine bağlı olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($P < 0,05$). Uygulama süresine bağlı olarak Cd konsantrasyonları arttıkça membranlardaki iyon sızıntısında artış olduğu belirlenmiştir. Köklerde elde edilen en yüksek değer, 7 gün boyunca 250 μ M Cd stresine maruz kalmış örneklerde tespit edilmiştir ($96,6 \pm 1,7$). Yapraklarda da köklerdeki benzer bir artış görülmektedir (Çizelge 4.1.3.1). Buna göre elde edilen yapraklarda belirlenen en yüksek değer 7 gün boyunca 250 μ M Cd stresine maruz kalmış örneklerde belirlenmiştir ($96,0 \pm 2,6$).

Çizelge 4.1.3.1. Cd uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama iyon sızıntısı değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma).

		İyon sızıntısı (%)		
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	7.gün
Yapraklar	Kontrol	40,7 \pm 1,5	43,9 \pm 2,2	48,4 \pm 1,5
	50 μM Cd	58,3 \pm 2,6	69,1 \pm 2,5	78,5 \pm 1,4
	100 μM Cd	62,9 \pm 2,0	72,7 \pm 1,3	84,6 \pm 1,2
	250 μM Cd	66,1 \pm 2,5	82,1 \pm 1,5	96,0 \pm 2,6
Kökler	Kontrol	27,4 \pm 2,0	32,5 \pm 2,3	36,6 \pm 2,3
	50 μM Cd	32,8 \pm 2,2	46,4 \pm 1,4	68,5 \pm 1,2
	100 μM Cd	39,3 \pm 1,0	57,3 \pm 1,3	85,3 \pm 2,1
	250 μM Cd	46,5 \pm 1,0	77,9 \pm 2,9	96,6 \pm 1,7



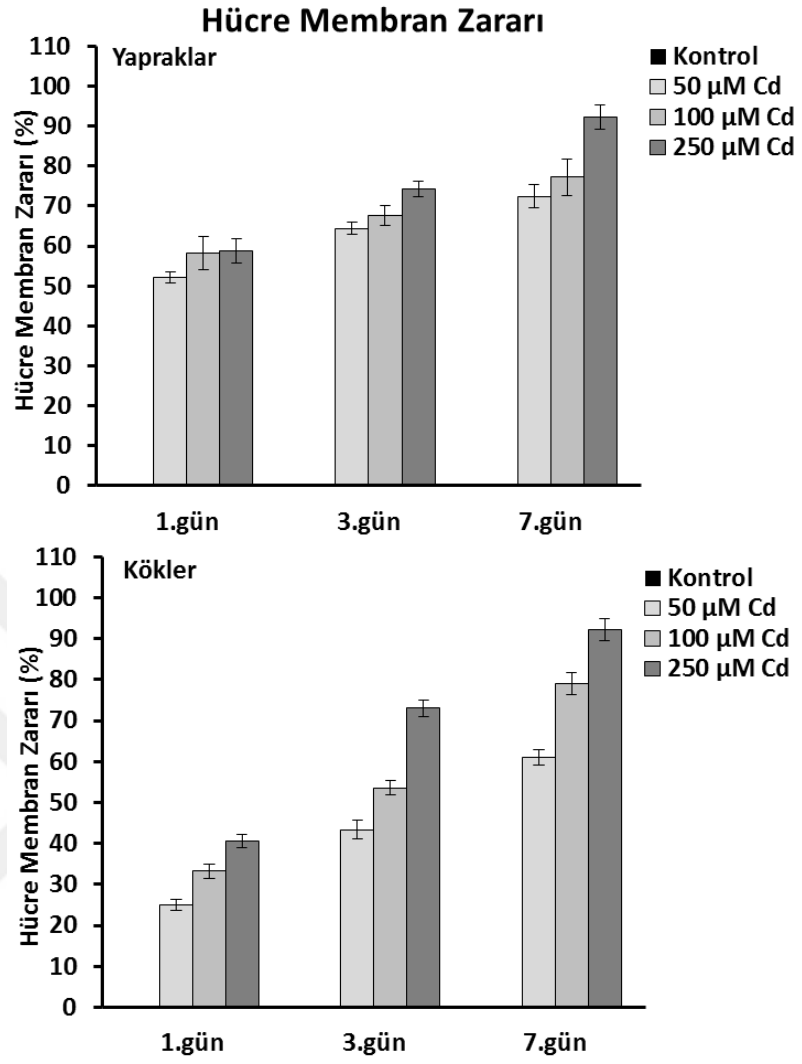
Şekil 4.1.3.1. Cd uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama iyon sızıntısı değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Farklı konsantrasyonlarda Cd uygulanmış fidelerin kök ve yapraklarında belirlenen hücre membran zararına ait ortalama değerlerin uygulama süresine göre değişimleri Çizelge 4.1.3.2 ve Şekil 4.1.3.2’de yer almaktadır. Buna göre hücre membran zararına ait değerlerde uygulama süresi ve Cd konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($P<0,05$). İyon sızıntısı değerlerine paralel olarak hücre membran zararında da hem kök hem de yapraklarda uygulama süresi ve Cd konsantrasyonlarına bağlı olarak artış olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1.3.2.). Hücre membran zararına ait elde edilen en yüksek değer hem kök hem de yaprak kısımlarında 7 gün boyunca 250 µM Cd uygulanmış örneklerde tespit edilmiştir. Ayrıca 1. günde fidelerin yaprak kısımlarında

belirlenen hücre membran zararında 100 ve 250 µM Cd konsantrasyonlarının benzer etkiye neden olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.1.3.2. Cd uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama hücre membran zararının konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma).

Hücre Membran Zararı (%)				
Konsantrasyonlar		1.gün	3.gün	7.gün
Yapraklar	Kontrol	0	0	0
	50 µM Cd	52,0 ± 1,4	64,4 ± 1,5	72,4 ± 2,9
	100 µM Cd	58,2 ± 4,1	67,6 ± 2,5	77,2 ± 4,6
	250 µM Cd	58,8 ± 3,1	74,2 ± 2,0	92,2 ± 3,0
Kökler	Kontrol	0	0	0
	50 µM Cd	25,0 ± 1,4	43,4 ± 2,4	61,0 ± 2,0
	100 µM Cd	33,2 ± 1,8	53,6 ± 1,8	79,0 ± 2,7
	250 µM Cd	40,6 ± 1,7	73,0 ± 2,0	92,2 ± 2,8

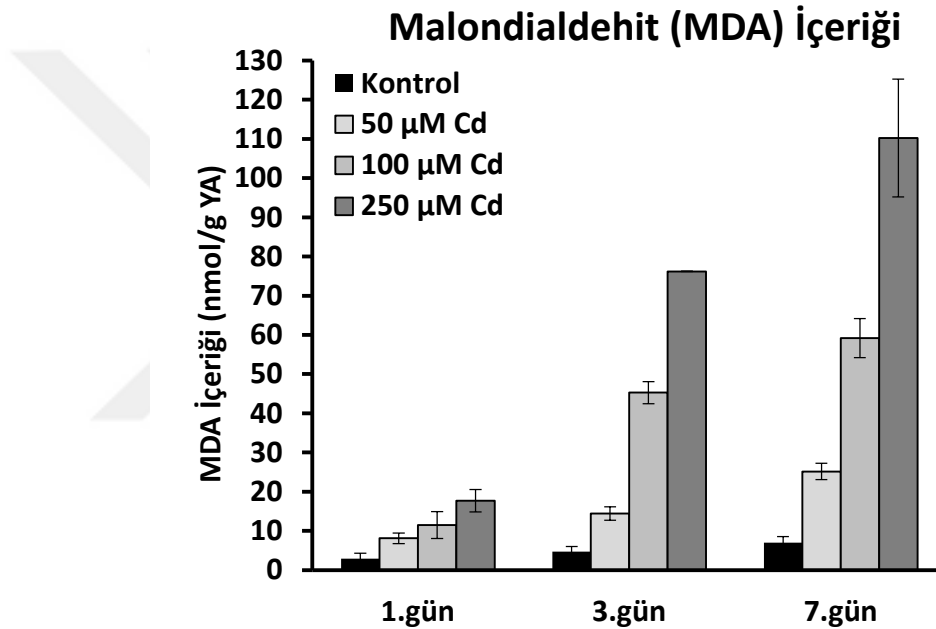


Şekil 4.1.3.2. Cd uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama hücre membran zararının konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Çizelge 4.1.3.3 ve Şekil 4.1.3.3’ de farklı konsantrasyonlarda Cd uygulanmış fidelerin yaprak kısımlarında belirlenen ortalama MDA içeriğinin uygulama süresine göre değişimi yer almaktadır.

Çizelge 4.1.3.3. Cd uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama MDA içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. Sapma)

		MDA İçeriği (nmol/g YA)		
Konsantrasyonlar		1.gün	3.gün	7.gün
Yapraklar	Kontrol	2,92 ± 1,40	4,71 ± 1,27	6,98 ± 1,57
	50 µM Cd	8,09 ± 1,34	14,43 ± 1,73	25,16 ± 2,08
	100 µM Cd	11,45 ± 3,43	45,27 ± 2,82	59,20 ± 4,97
	250 µM Cd	17,70 ± 2,85	76,20 ± 0,03	110,24 ± 15,03



Şekil 4.1.3.3. Cd uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama MDA içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Şekil 4.1.3.3' e göre MDA içeriğinde uygulama süresi ve Cd konsantrasyonlarına bağlı olarak anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir ($P < 0,05$). En yüksek MDA içeriği 7 gün boyunca 250 µM Cd uygulanmış örneklerin yapraklarında elde edilmiştir. Bu değer yaklaşık olarak kontrolden 16 kat daha yüksektir.

Farklı konsantrasyonlarda Cd uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen iyon sızıntısı ve hücre membran zararı ile yaprak kısımlarında belirlenen MDA içeriğinin uygulama süresine göre değişimi iki yönlü ANOVA testi ile analiz edilmiştir. Elde edilen istatistiksel veriler Çizelge 4.1.3.4' de yer almaktadır.

Çizelge 4.1.3.4. İyon sızıntısı, hücre membran zararı ve yaprak kısımlarında belirlenen MDA değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Cd) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].

Faktör	İyon sızıntısı			Hücre membran zararı		MDA İçeriği	
	<i>df</i>	F	P	F	P	F	P
Kökler							
Konsantrasyonlar	3	1309,18	0,000	4399,66	0,000		
Uygulama süresi	2	1748,89	0,000	1858,79	0,000		
Konsantrasyon x Süre	6	132,25	0,000	232,3	0,000		
Hata	48						
Yapraklar							
Konsantrasyonlar	3	965,04	0,000	2703,15	0,000	470,97	0,000
Uygulama süresi	2	496,69	0,000	248,78	0,000	334,49	0,000
Konsantrasyon x Süre	6	27,04	0,000	36,06	0,000	81,31	0,000
Hata	48						

4.1.4. Cd Uygulanmış Fidelerde Antioksidatif Enzim Aktivitesi (SOD, CAT, APX)

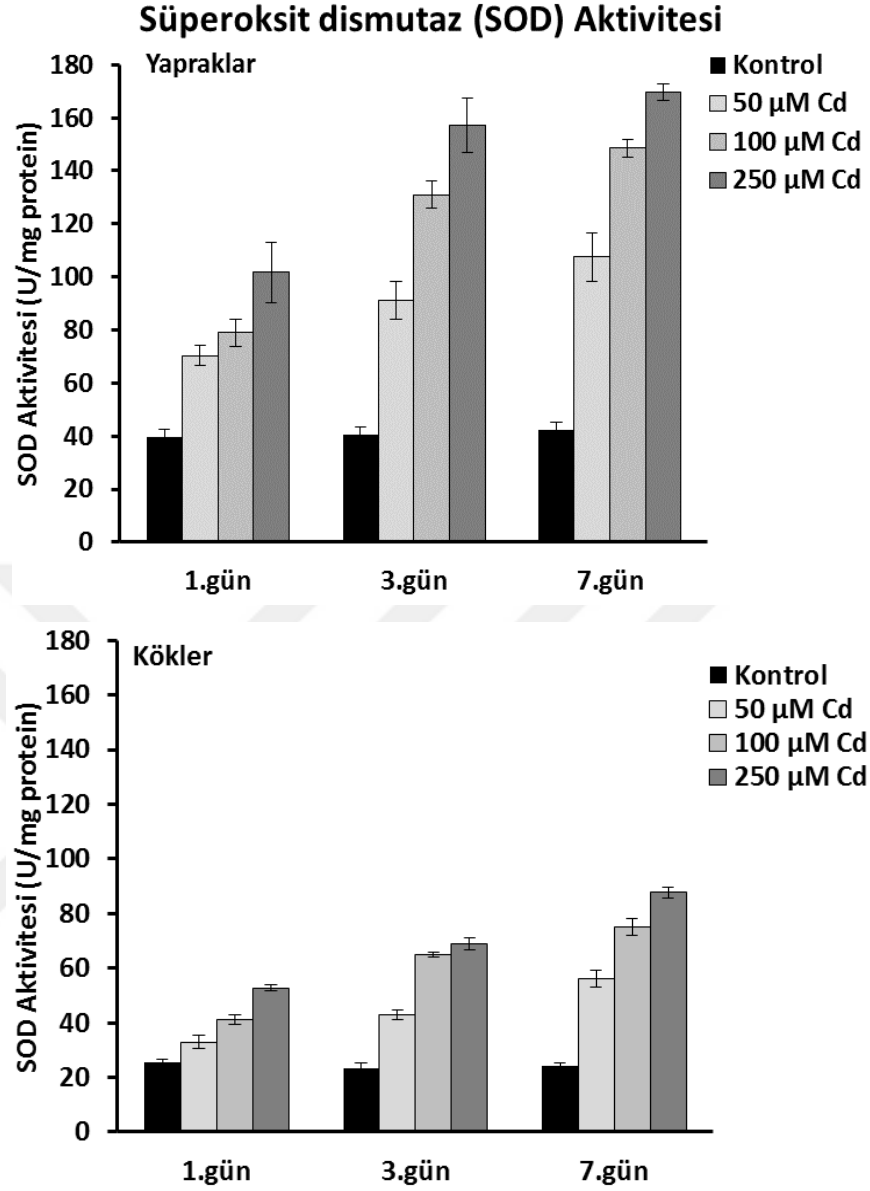
50, 100 ve 250 μ M konsantrasyonlarında Cd uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yapraklarında belirlenen ortalama süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.1.4.1 ve Şekil 4.1.4.1' de verilmiştir. Buna göre hem kök hem de yapraklarda belirlenen SOD aktivitesinde uygulama süresi ve Cd konsantrasyonlarına bağlı olarak anlamlı bir fark ($P < 0,05$) bulunmuştur.

Çizelge 4.1.4.1. Cd uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama SOD aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5, Ort. ± Std. Sapma).

		SOD Aktivitesi (U/mg protein)		
Konsantrasyonlar		1.gün	3.gün	7.gün
Yapraklar	Kontrol	39,87 ± 2,72	40,38 ± 2,91	42,30 ± 3,16
	50 µM Cd	70,32 ± 3,88	91,15 ± 7,09	107,47 ± 9,28
	100 µM Cd	78,94 ± 5,09	130,99 ± 5,22	148,47 ± 3,13
	250 µM Cd	101,72 ± 11,37	157,13 ± 10,11	169,71 ± 3,05
Kökler	Kontrol	25,43 ± 1,19	23,53 ± 1,76	24,23 ± 0,91
	50 µM Cd	32,87 ± 2,43	42,81 ± 1,87	56,30 ± 3,07
	100 µM Cd	41,31 ± 1,73	64,91 ± 1,03	74,96 ± 3,13
	250 µM Cd	52,72 ± 1,16	68,96 ± 2,27	87,68 ± 2,12

Çizelge 4.1.4.1’ de belirtildiği gibi Cd konsantrasyonlarındaki artışa paralel olarak SOD aktivitesinin tüm uygulama sürelerinde arttığı tespit edilmiştir. 7 gün boyunca 250 µM Cd uygulanmış fidelerin yapraklarında belirlenen SOD aktivitesi 169,7 ± 3,5 U/mg protein değerine ulaşmakta olup bu değer yapraklarda elde edilen en yüksek değerdir.

Yapraklarda olduğu gibi köklerde de SOD aktivitesinin artan Cd konsantrasyonlarına ve uygulama süresine bağlı olarak arttığı görülmektedir. Köklerde elde edilen en yüksek SOD aktivitesi 7. günde 250 µM Cd uygulamasında belirlenmiştir ve bu değer 87,68 ± 2,12 U/mg protein’ dir. Fakat yapraklarda belirlenen SOD aktivitesindeki artışın köklere göre daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1.4.1).



Şekil 4.1.4.1. Cd uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama SOD aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

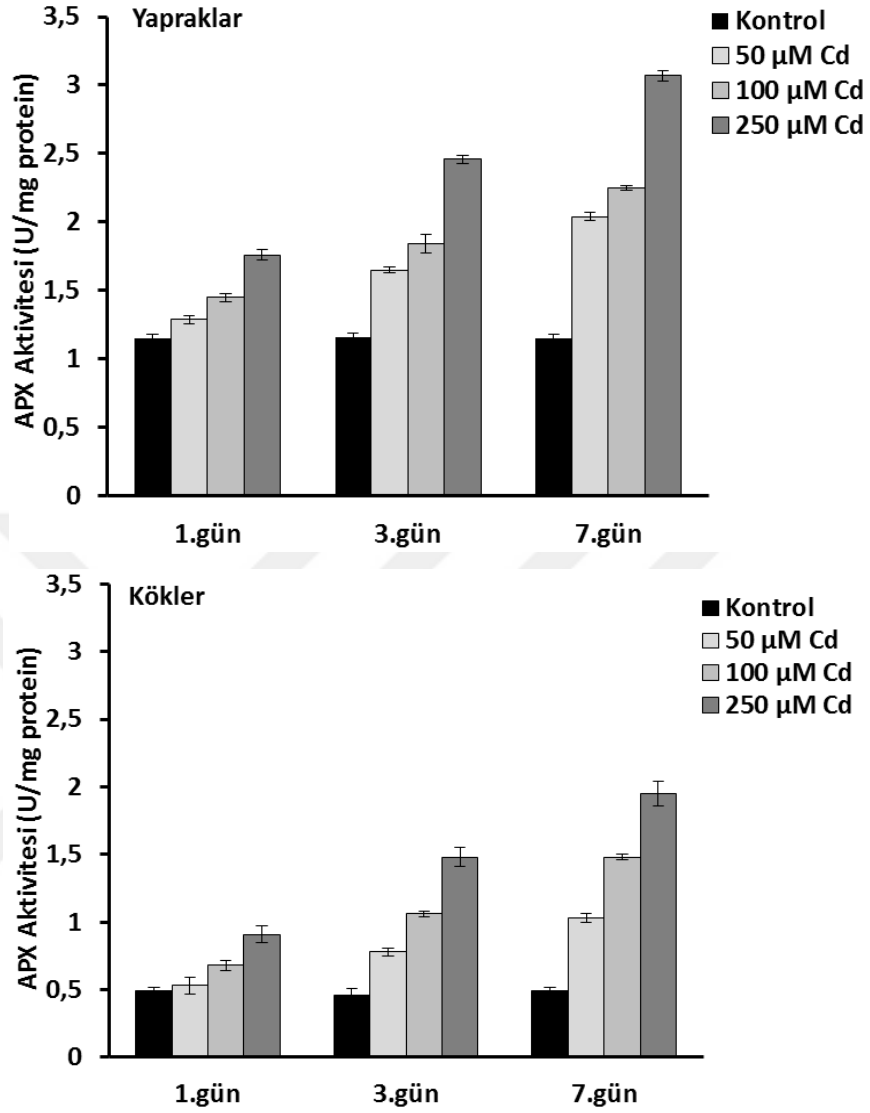
50, 100 ve 250 µM konsantrasyonlarında Cd uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yapraklarında belirlenen ortalama askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.1.4.2 ve Şekil 4.1.4.2’ de verilmiştir. Ortalama APX aktivitesi açısından hem kök hem de yapraklarda Cd konsantrasyonları ve uygulama süresine bağlı olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($P < 0,05$).

Çizelge 4.1.4.2. Cd uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama APX aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5, Ort. ± Std. Sapma).

		APX Aktivitesi (U/mg protein)		
Konsantrasyonlar		1.gün	3.gün	7.gün
Yapraklar	Kontrol	1,15 ± 0,03	1,16 ± 0,03	1,15 ± 0,03
	50 µM Cd	1,29 ± 0,03	1,65 ± 0,02	2,04 ± 0,03
	100 µM Cd	1,45 ± 0,03	1,84 ± 0,07	2,25 ± 0,02
	250 µM Cd	1,76 ± 0,04	2,46 ± 0,03	3,07 ± 0,04
Kökler	Kontrol	0,49 ± 0,03	0,46 ± 0,05	0,49 ± 0,03
	50 µM Cd	0,53 ± 0,06	0,78 ± 0,03	1,03 ± 0,03
	100 µM Cd	0,68 ± 0,04	1,06 ± 0,02	1,48 ± 0,02
	250 µM Cd	0,91 ± 0,06	1,48 ± 0,07	1,95 ± 0,09

Yapraklarda belirlenen en düşük APX aktivitesi kontrol örneklerinde tespit edilmiştir. En yüksek APX aktivitesi ise 7 gün boyunca 250 µM Cd uygulanmış örneklerde belirlenmiştir. Bu değer ise 3,07 ± 0,04 U/mg protein' dir. Köklerde de Cd uygulamalarına bağlı olarak APX aktivitesinde meydana gelen değişikliklerin yapraklardakine benzer olduğu tespit edilmiştir. Buna göre köklerde belirlenen en yüksek APX aktivitesi, 7 gün boyunca 250 µM Cd konsantrasyonuna maruz bırakılmış örneklerde belirlenmiştir (1,95 ± 0,09 U/mg protein) ve bu değer kontrol örneklerine göre yaklaşık 4 kat daha yüksektir (Şekil 4.1.4.2). Ayrıca yapraklarda belirlenen APX aktivitesinin köklerdeki göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Askorbat peroksidaz (APX) Aktivitesi



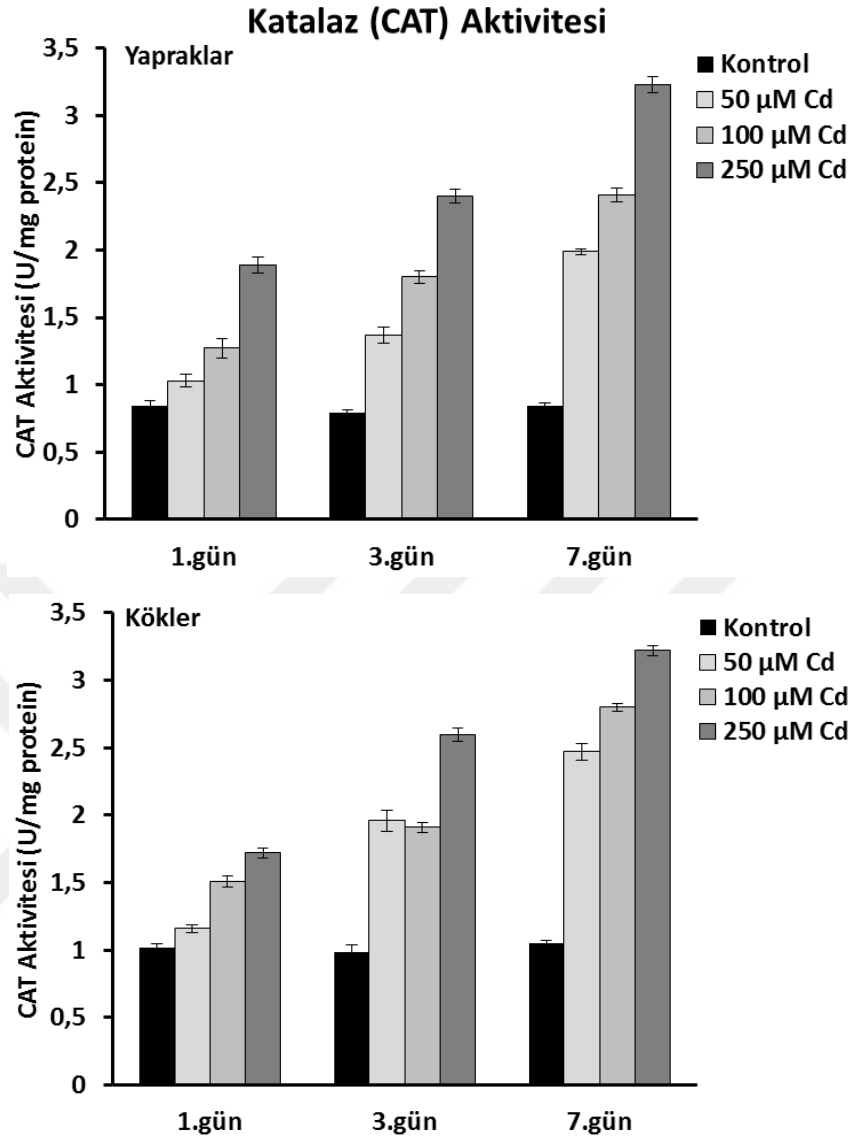
Şekil 4.1.4.2. Cd uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama APX aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Çizelge 4.1.4.3 ve Şekil 4.1.4.3’ de 50, 100 ve 250 µM konsantrasyonlarında Cd uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yapraklarında belirlenen ortalama CAT aktivitesinin uygulama süresine göre değişimi yer almaktadır. Buna göre ortalama CAT aktivitesinde hem kök hem de yapraklarda uygulama süresi ve Cd konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($P<0,05$). Tüm Cd konsantrasyonlarında hem kök hem de yapraklarda CAT aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.1.4.3). Fakat köklerde belirlenen CAT aktivitesindeki artışın yapraklardakine göre daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.1.4.3. Cd uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama CAT aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5, Ort. ± Std. Sapma).

CAT Aktivitesi (U/mg protein)				
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	7.gün
Yapraklar	Kontrol	0,84 ± 0,04	0,79 ± 0,02	0,84 ± 0,02
	50 µM Cd	1,03 ± 0,05	1,37 ± 0,06	1,99 ± 0,02
	100 µM Cd	1,27 ± 0,07	1,80 ± 0,05	2,41 ± 0,05
	250 µM Cd	1,89 ± 0,06	2,40 ± 0,05	3,23 ± 0,06
	Kontrol	1,02 ± 0,03	0,99 ± 0,05	1,05 ± 0,02
Kökler	50 µM Cd	1,16 ± 0,03	1,96 ± 0,08	2,47 ± 0,06
	100 µM Cd	1,51 ± 0,04	1,91 ± 0,04	2,80 ± 0,03
	250 µM Cd	1,72 ± 0,04	2,60 ± 0,05	3,22 ± 0,04

Yapraklarda belirlenen en yüksek CAT aktivitesi, 7 gün boyunca 250 µM Cd uygulanmış örneklerde elde edilmiştir. Bu değer 3,23 ± 0,06 U/mg protein' dir. Köklerde de yapraklara benzer bir eğilim söz konusu olup en yüksek CAT aktivitesi 7 gün boyunca 250 µM Cd uygulanmış örneklerde elde edilmiştir ve bu değer 3,22 ± 0,04 U/mg protein'dir.



Şekil 4.1.4.3. Cd uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama CAT aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Farklı konsantrasyonlarda Cd uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen antioksidatif savunma sistemi enzimlerine (SOD, CAT, APX) ait ortalama aktivite değerlerinin uygulama süresine göre değişimi iki yönlü ANOVA testi ile analiz edilmiştir. Elde edilen istatistiksel veriler Çizelge 4.1.4.4' de yer almaktadır.

Çizelge 4.1.4.4. Antioksidatif savunma sistemi enzimlerine (SOD, CAT, APX) ait ortalama aktivite değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Cd) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].

Faktör	df	SOD Aktivitesi		CAT Aktivitesi		APX Aktivitesi	
		F	P	F	P	F	P
Kökler							
Konsantrasyonlar	3	1453,99	0,000	2636,40	0,000	1100,34	0,000
Uygulama süresi	2	629,89	0,000	2369,16	0,000	693,91	0,000
Konsantrasyon x Süre	6	92,53	0,000	279,61	0,000	110,62	0,000
Hata	48						
Yapraklar							
Konsantrasyonlar	3	773,26	0,000	2934,96	0,000	3140,43	0,000
Uygulama süresi	2	260,91	0,000	1497,60	0,000	1913,80	0,000
Konsantrasyon x Süre	6	36,10	0,000	174,75	0,000	273,61	0,000
Hata	48						

4.2. Bakır (Cu)

4.2.1. Cu Uygulanmış Fidelerde Büyüme Parametreleri (Biyokütle, Su İçeriği ve Klorofil İçeriği)

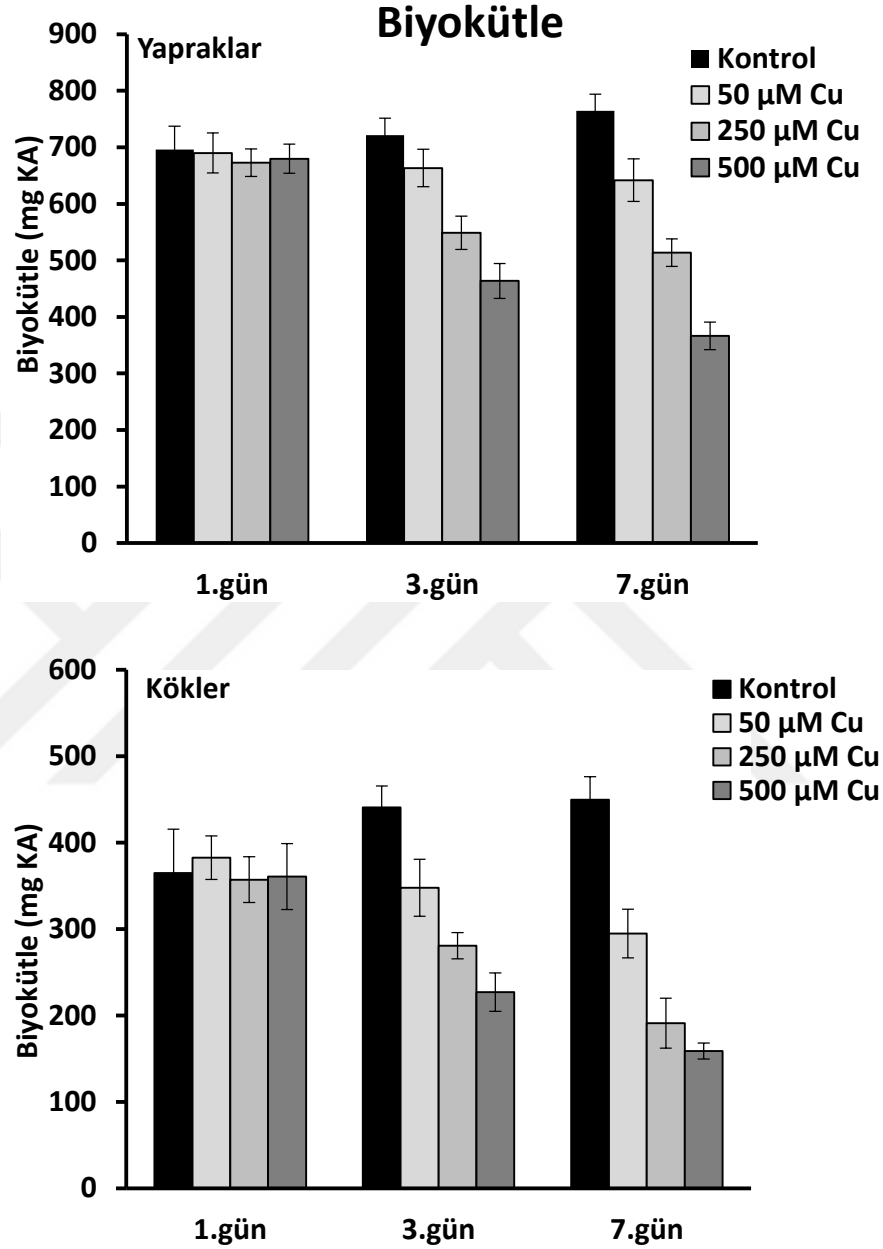
Çizelge 4.2.1.1 ve Şekil 4.2.1.1’ de 50, 250 ve 500 μM konsantrasyonlarında Cu uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen ortalama biyokütle değerlerinin uygulama süresine göre değişimi verilmiştir. Hem kök hem de yapraklarda Cu konsantrasyonları ve uygulama süresindeki artışa bağlı olarak biyokütlede anlamlı bir azalış olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$). Ayrıca kök kısımlarında belirlenen biyokütledeki azalışın yapraklara göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2.1.1. Cu uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama biyokütle değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi ($n=5$; Ort. \pm Std. sapma).

Biyokütle (mg KA)				
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	7.gün
Yapraklar	Kontrol	696,0 \pm 41,3	721,6 \pm 30,1	764,5 \pm 29,3
	50 μM Cu	689,9 \pm 35,5	663,3 \pm 33,0	641,9 \pm 37,9
	250 μM Cu	672,8 \pm 24,5	548,6 \pm 29,5	513,6 \pm 24,5
	500 μM Cu	679,8 \pm 25,7	463,6 \pm 30,7	366,6 \pm 24,5
Kökler	Kontrol	364,9 \pm 50,5	440,8 \pm 24,7	449,8 \pm 26,7
	50 μM Cu	382,6 \pm 25,3	347,7 \pm 32,9	294,7 \pm 28,1
	250 μM Cu	357,2 \pm 26,6	280,6 \pm 15,1	191,2 \pm 28,9
	500 μM Cu	360,7 \pm 38,2	226,9 \pm 22,3	158,8 \pm 9,1

Çizelge 4.2.1.1’e göre yapraklarda belirlenen en düşük biyokütle değerleri, 7 gün boyunca 500 μM Cu uygulanmış örneklerde elde edilmiştir. Köklerde belirlenen en düşük biyokütle değerlerinin de yapraklardaki gibi 7 gün boyunca 500 μM Cu uygulanmış örneklerde elde edildiği görülmektedir (Çizelge 4.2.1.1). Bu değerler sırasıyla yapraklar için 366,6 \pm 24,5 mg KA, kökler için 158,8 \pm 9,1 mg KA’ dır. En yüksek biyokütle değerleri ise hem kök hem de yapraklar için 7. güne ait kontrol örneklerinde elde edilmiştir. Bu değerler kökler için 449,8 \pm 26,7 mg KA, yapraklar için 764,5 \pm 29,3 mg

KA'dır. Ayrıca Şekil 4.2.1.1.'de 50 μM Cu konsantrasyonunun 1. günde köklerin biyokütlesinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir.



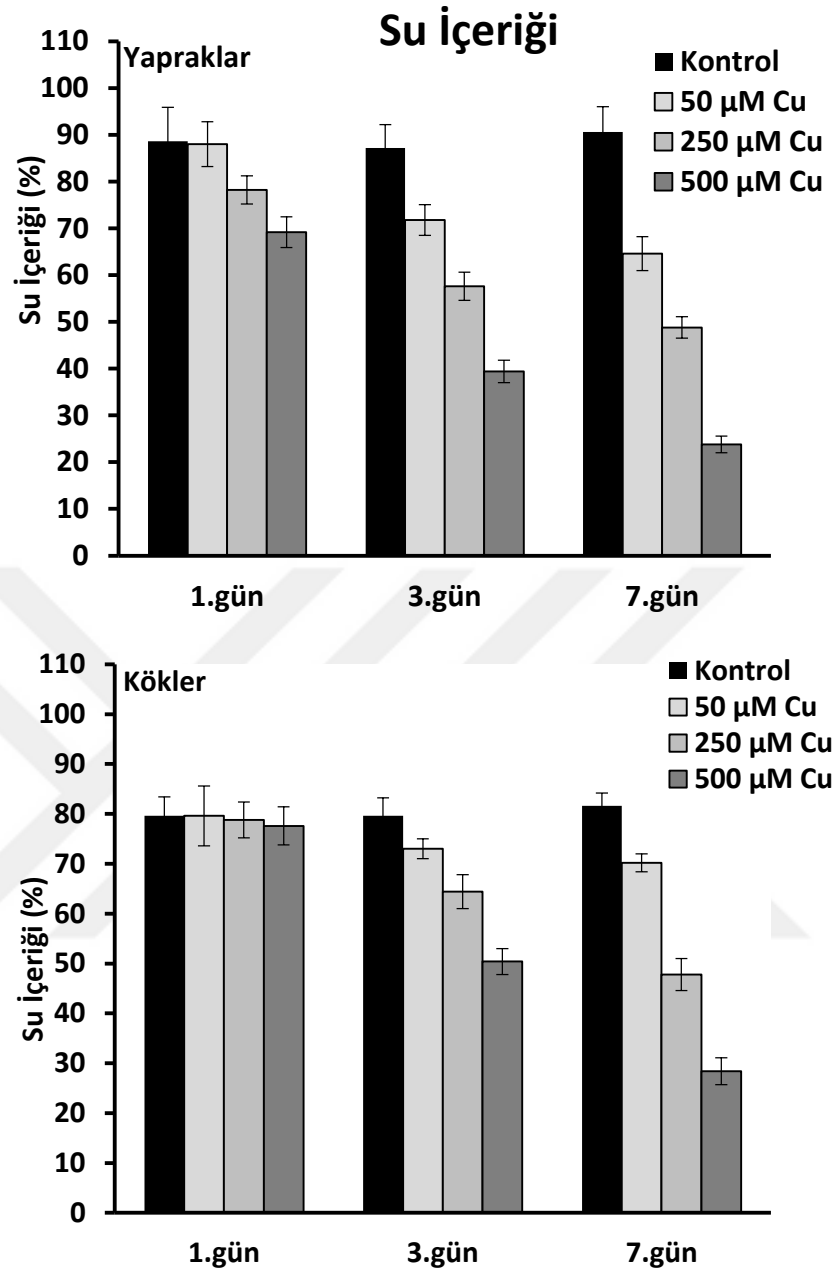
Şekil 4.2.1.1. Cu uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama biyokütle değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

50, 250 ve 500 μM konsantrasyonlarında Cu uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yapraklarında belirlenen ortalama su içeriğinin (%) uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.2.1.2 ve Şekil 4.2.1.2' de verilmiştir. Buna göre uygulama süresindeki ve Cu konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak su içeriğinde anlamlı bir azalış olduğu görülmektedir ($P < 0,05$).

Çizelge 4.2.1.2. Cu uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama su içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma).

		Su içeriği (%)		
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	7.gün
Yapraklar	Kontrol	88,6 \pm 7,3	87,2 \pm 5,0	90,6 \pm 5,4
	50 μ M Cu	88,0 \pm 4,8	71,8 \pm 3,3	64,6 \pm 3,6
	250 μ M Cu	78,2 \pm 3,0	57,6 \pm 3,0	48,8 \pm 2,3
	500 μ M Cu	69,2 \pm 3,3	39,4 \pm 2,4	23,8 \pm 1,8
Kökler	Kontrol	79,6 \pm 3,8	79,6 \pm 3,6	81,6 \pm 2,6
	50 μ M Cu	79,6 \pm 6,0	73,0 \pm 2,0	70,2 \pm 1,8
	250 μ M Cu	78,8 \pm 3,6	64,4 \pm 3,4	47,8 \pm 3,2
	500 μ M Cu	77,6 \pm 3,8	50,4 \pm 2,6	28,4 \pm 2,7

Yapraklarda belirlenen en yüksek su içeriği % 90,6 \pm 5,4 olarak belirlenmiştir ve bu değer Cu uygulamalarının 7. gününde hasat edilen kontrol örneklerinde elde edilmiştir. Yapraklardaki en düşük su içeriği ise 7. gün boyunca 500 μ M Cu uygulanmış örneklerde tespit edilmiştir (% 23,8 \pm 1,8). Köklerde belirlenen su içeriğindeki değişimler yapraklardakine benzerdir (Çizelge 4.2.1.2). Köklerdeki en yüksek su içeriği 7. gündeki kontrol örneklerinde elde edilmiş olup bu değer % 81,6 \pm 2,6 olarak belirlenmiştir. En düşük su içeriği ise 7 gün boyunca 500 μ M Cu uygulanmış örneklerde elde edilmiştir (% 28,4 \pm 2,7).



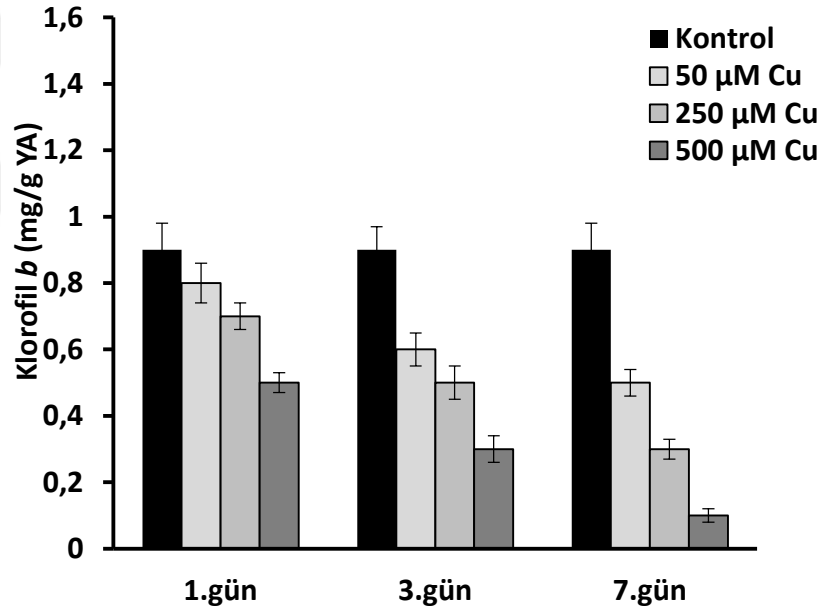
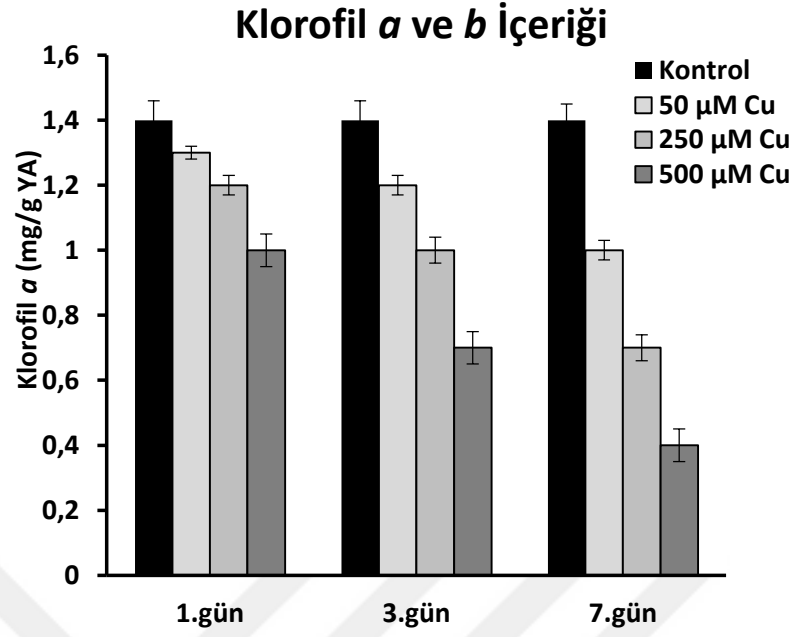
Şekil 4.2.1.2. Cu uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama su içeriği değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Farklı konsantrasyonlarda Cu uygulanmış fidelerin yapraklarında belirlenen ortalama klorofil *a* ve *b* içeriğinin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.2.1.3 ve Şekil 4.2.1.3’de verilmiştir. Buna göre artan Cu konsantrasyonları ve uygulama süresine bağlı olarak klorofil *a* ve *b* içeriğinde anlamlı bir azalış belirlenmiştir ($P < 0,05$).

Çizelge 4.2.1.3. Cu uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama klorofil *a* ve *b* içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5, Ort. ± Std. Sapma).

		Klorofil <i>a</i> ve <i>b</i> İçeriği (mg/g YA)		
Konsantrasyonlar		1.gün	3.gün	7.gün
Klorofil <i>a</i>	Kontrol	1,4 ± 0,06	1,4 ± 0,06	1,4 ± 0,05
	50 µM Cu	1,3 ± 0,02	1,2 ± 0,03	1,0 ± 0,03
	250 µM Cu	1,2 ± 0,03	1,0 ± 0,04	0,7 ± 0,04
	500 µM Cu	1,0 ± 0,05	0,7 ± 0,05	0,4 ± 0,05
Klorofil <i>b</i>	Kontrol	0,9 ± 0,08	0,9 ± 0,07	0,9 ± 0,08
	50 µM Cu	0,8 ± 0,06	0,6 ± 0,05	0,5 ± 0,04
	250 µM Cu	0,7 ± 0,04	0,5 ± 0,05	0,3 ± 0,03
	500 µM Cu	0,5 ± 0,03	0,3 ± 0,04	0,1 ± 0,02

Çizelge 4.2.1.3' de belirtildiği gibi en düşük klorofil *a* içeriği 7 gün boyunca 500 µM Cu uygulanmış örneklerde elde edilmiştir (0,4 ± 0,05 mg/g YA). Klorofil *a* içeriğindeki bu azalış kontrole göre yaklaşık 3,5 kat' tır. Klorofil *a* içeriğindeki en yüksek değer ise kontrol örneklerinde elde edilmiş olup 1,4 ± 0,05 mg/g YA' dır. Klorofil *b* içeriğinde ise belirlenen en düşük değer yine 7 gün boyunca 500 µM Cu uygulanmış örneklerde elde edilmiş olup (0,1 ± 0,02 mg/g YA), bu azalış kontrole göre yaklaşık 9 kattır. Klorofil *b* içeriğindeki en yüksek değer ise kontrol örneklerinde elde edilmiş olup 0,9 ± 0,08 mg/g YA' dır.



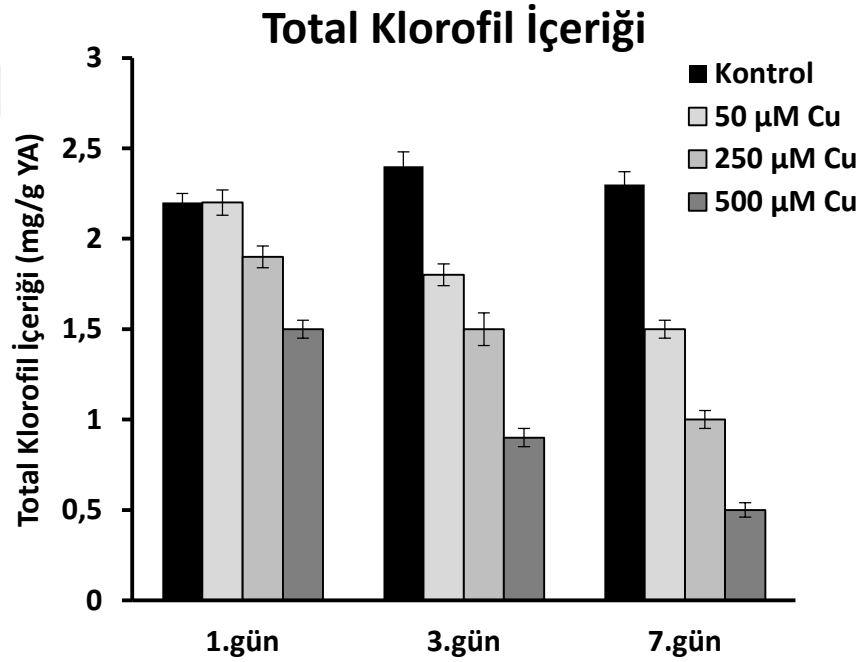
Şekil 4.2.1.3. Cu uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama klorofil *a* ve *b* içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Farklı konsantrasyonlarda Cu uygulanmış fidelerin yapraklarında belirlenen ortalama total klorofil içeriğinin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.2.1.4 ve Şekil 4.2.1.4' de verilmiştir. Buna göre artan Cu konsantrasyonları ve uygulama süresine bağlı olarak total klorofil içeriğinde anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($P < 0,05$).

Çizelge 4.2.1.4. Cu uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama total klorofil içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5, Ort. ± Std. Sapma).

Total Klorofil İçeriği (mg/g YA)				
Konsantrasyonlar		1.gün	3.gün	7.gün
Total Klorofil	Kontrol	2,2 ± 0,05	2,4 ± 0,08	2,3 ± 0,07
	50 µM Cu	2,2 ± 0,07	1,8 ± 0,06	1,5 ± 0,05
	250 µM Cu	1,9 ± 0,06	1,5 ± 0,09	1,0 ± 0,05
	500 µM Cu	1,5 ± 0,05	0,9 ± 0,05	0,5 ± 0,04

Farklı konsantrasyonlarda Cu uygulanmış fidelerin yapraklarında belirlenen total klorofil içeriğinin uygulanan Cu konsantrasyonlarının tümünden etkilenerek uygulama süresindeki artışa bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir. En düşük total klorofil içeriği 7 gün boyunca 500 µM Cu uygulanmış örneklerde $0,5 \pm 0,04$ mg/g YA olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.2.1.4).



Şekil 4.2.1.4. Cu uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama total klorofil içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Farklı konsantrasyonlarda Cu uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen büyüme parametrelerine ait (biyokütle, su içeriği, klorofil *a*, *b* ve total klorofil içeriği) ortalama değerlerin uygulama süresine göre değişimi iki yönlü ANOVA testi ile analiz edilmiştir. Elde edilen istatistiksel veriler Çizelge 4.2.1.5’de yer almaktadır.

Çizelge 4.2.1.5. Biyokütle, su ve klorofil değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Cu) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].

Faktör	Biyokütle		Su İçeriği		Klorofil <i>a</i> İçeriği		Klorofil <i>b</i> İçeriği		Total Klorofil İçeriği		
	<i>df</i>	F	<i>P</i>	F	<i>P</i>	F	<i>P</i>	F	<i>P</i>	F	<i>P</i>
Kökler											
Konsantrasyonlar	3	100,79	0,000	194,19	0,000						
Uygulama süresi	2	50,69	0,000	203,33	0,000						
Konsantrasyon x Süre	6	25,39	0,000	55,14	0,000						
Hata	48										
Yapraklar											
Konsantrasyonlar	3	150,15	0,000	327,02	0,000	607,44	0,000	323,39	0,000	1113,5	0,000
Uygulama süresi	2	72,09	0,000	183,69	0,000	264,63	0,000	119,18	0,000	448,10	0,000
Konsantrasyon x Süre	6	35,70	0,000	29,54	0,000	41,52	0,000	18,06	0,000	66,68	0,000
Hata	48										

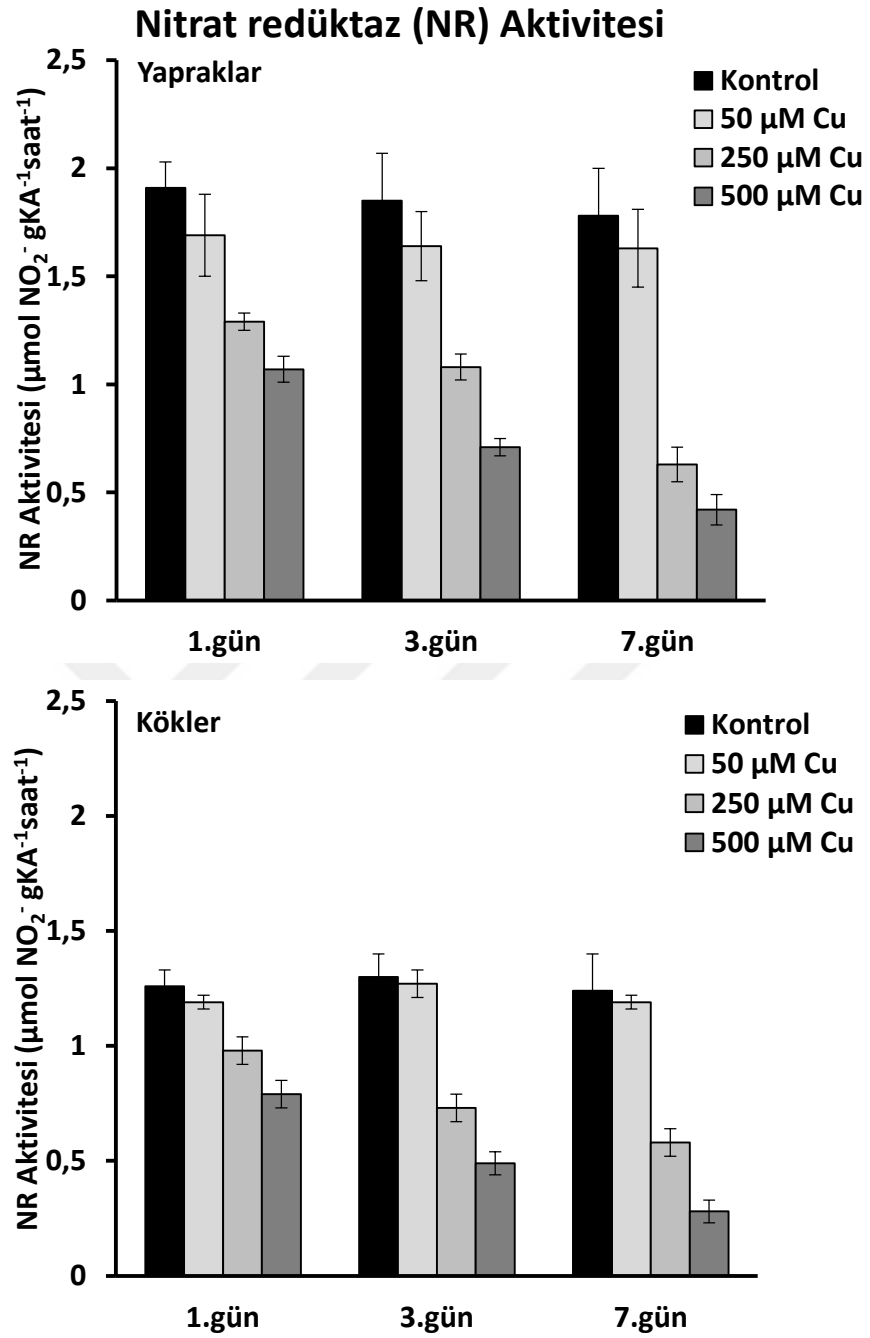
4.2.2. Cu Uygulanmış Fidelerde Azot Metabolizması Enzimlerinin (NR ve GS) Aktivitesi ve Protein İçeriği

Farklı konsantrasyonlarda Cu uygulanmış fidelerin azot metabolizması enzimlerinden nitrat redüktaz (NR; $\mu\text{mol NO}_2^- \text{gKA}^{-1} \cdot \text{saat}^{-1}$) aktivitesine ait ortalama değerlerin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.2.2.1 ve Şekil 4.2.2.1’ de yer almaktadır. Hem kök hem de yapraklarda ortalama NR aktivitesi açısından uygulama süresi ve Cu konsantrasyonları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($P < 0,05$). Kök ve yapraklardaki en yüksek NR aktivitesi kontrol örneklerinde elde edilmiştir. Uygulanan Cu konsantrasyonlarındaki artış ile birlikte her bir uygulama süresinde ortalama NR aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.2.2.1. Cu uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama NR aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi ($n=5$; Ort. \pm Std. Sapma).

		NR Aktivitesi ($\mu\text{mol NO}_2^- \text{gKA}^{-1} \text{ saat}^{-1}$)		
Konsantrasyonlar		1.gün	3.gün	7.gün
Yapraklar	Kontrol	1,91 \pm 0,12	1,85 \pm 0,22	1,78 \pm 0,22
	50 μM Cu	1,69 \pm 0,19	1,64 \pm 0,16	1,63 \pm 0,18
	250 μM Cu	1,29 \pm 0,04	1,08 \pm 0,06	0,63 \pm 0,08
	500 μM Cu	1,07 \pm 0,06	0,71 \pm 0,04	0,42 \pm 0,07
Kökler	Kontrol	1,26 \pm 0,07	1,30 \pm 0,10	1,24 \pm 0,16
	50 μM Cu	1,19 \pm 0,03	1,27 \pm 0,06	1,19 \pm 0,03
	250 μM Cu	0,98 \pm 0,06	0,73 \pm 0,06	0,58 \pm 0,06
	500 μM Cu	0,79 \pm 0,06	0,49 \pm 0,05	0,28 \pm 0,05

En düşük NR aktivitesi tüm bitki kısımlarında 7 gün boyunca 500 μM Cu uygulanmış örneklerde tespit edilmiştir. Bu değerler kökler için $0,28 \pm 0,05 \mu\text{mol NO}_2^- \text{g KA}^{-1} \text{saat}^{-1}$, yapraklar için $0,42 \pm 0,07 \mu\text{mol NO}_2^- \text{gKA}^{-1} \text{ saat}^{-1}$ ’dir. Ayrıca Cu uygulanmış fidelerin yaprak kısımlarında belirlenen NR aktivitesinin kök kısımlarındakine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.



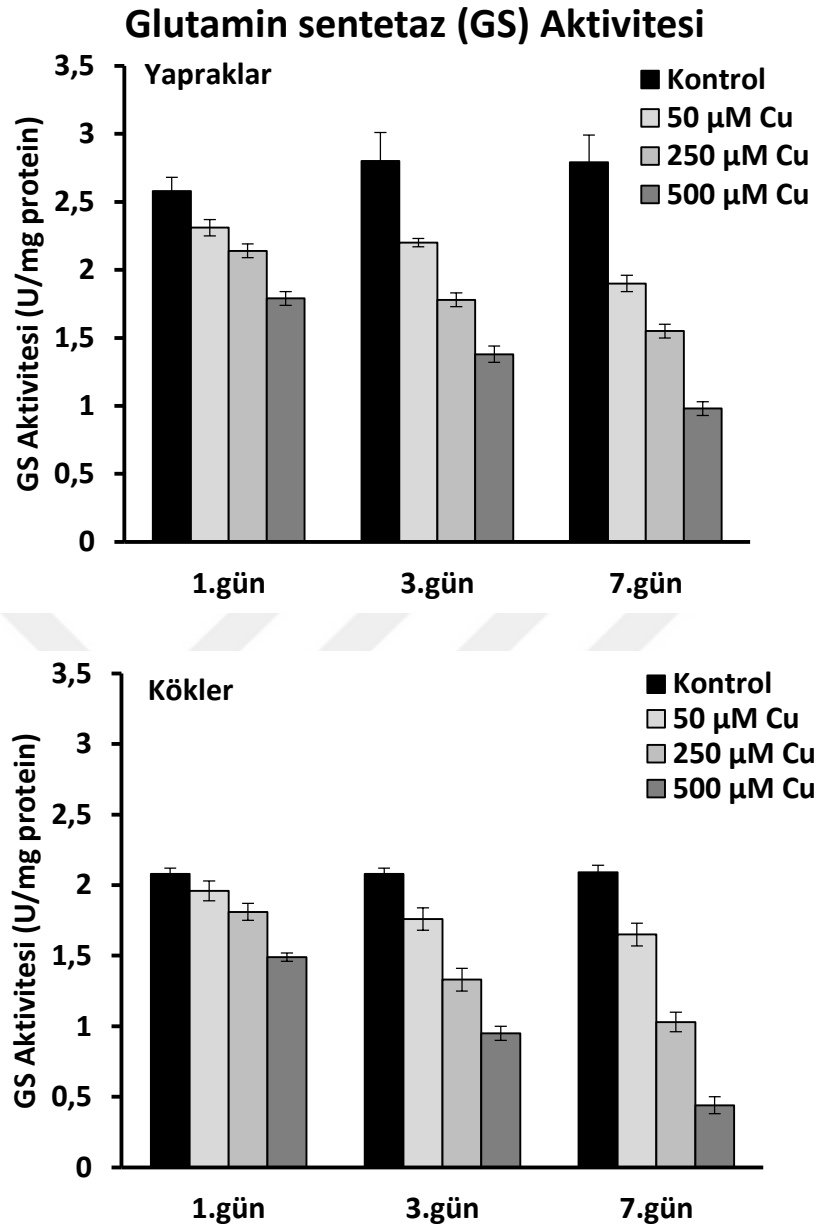
Şekil 4.2.2.1. Cu uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama NR aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Azot metabolizmasının ait bir diğer enzim olan GS aktivitesine ait farklı konsantrasyonlarda Cu uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında elde edilen ortalama değerlerin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.2.2.2 ve Şekil 4.2.2.2’de verilmiştir. Buna göre hem kök hem de yaprak kısımlarında belirlenen GS aktivitesinde uygulama süresi ve konsantrasyonlara bağlı olarak anlamlı fark bulunmuştur ($P < 0,05$).

Çizelge 4.2.2.2. Cu uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama GS aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. Sapma).

GS Aktivitesi (U/mg protein)				
Konsantrasyonlar		1.gün	3.gün	7.gün
Yapraklar	Kontrol	2,58 ± 0,10	2,80 ± 0,21	2,79 ± 0,20
	50 µM Cu	2,31 ± 0,06	2,20 ± 0,03	1,90 ± 0,06
	250 µM Cu	2,14 ± 0,05	1,78 ± 0,05	1,55 ± 0,05
	500 µM Cu	1,79 ± 0,05	1,38 ± 0,06	0,98 ± 0,05
Kökler	Kontrol	2,08 ± 0,04	2,08 ± 0,04	2,09 ± 0,05
	50 µM Cu	1,96 ± 0,07	1,76 ± 0,08	1,65 ± 0,08
	250 µM Cu	1,81 ± 0,06	1,33 ± 0,08	1,03 ± 0,07
	500 µM Cu	1,49 ± 0,03	0,95 ± 0,05	0,44 ± 0,06

Farklı konsantrasyonlarda Cu uygulanmış fidelerin kök ve yapraklarında belirlenen GS aktivitesinin, kontrol örnekleriyle karşılaştırıldığında tüm Cu konsantrasyonlarından negatif yönde etkilendiği görülmektedir (Şekil 4.2.2.2). 7 gün boyunca 500 µM Cu uygulanmış fidelerin yapraklarında belirlenen GS aktivitesinin kontrolüne göre yaklaşık 3 kat azaldığı belirlenmiştir. Yapraklardaki bu eğilim köklerde de görülmesine rağmen köklerde belirlenen GS aktivitesindeki azalışın yapraklardan daha yüksek olduğu görülmektedir. Köklerde belirlenen en düşük GS aktivitesinin yine 7 gün boyunca 500 µM Cu uygulanmış örneklerde tespit edilmiştir ve bu azalışın kontrole göre yaklaşık olarak 5 kat olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2.2.2).



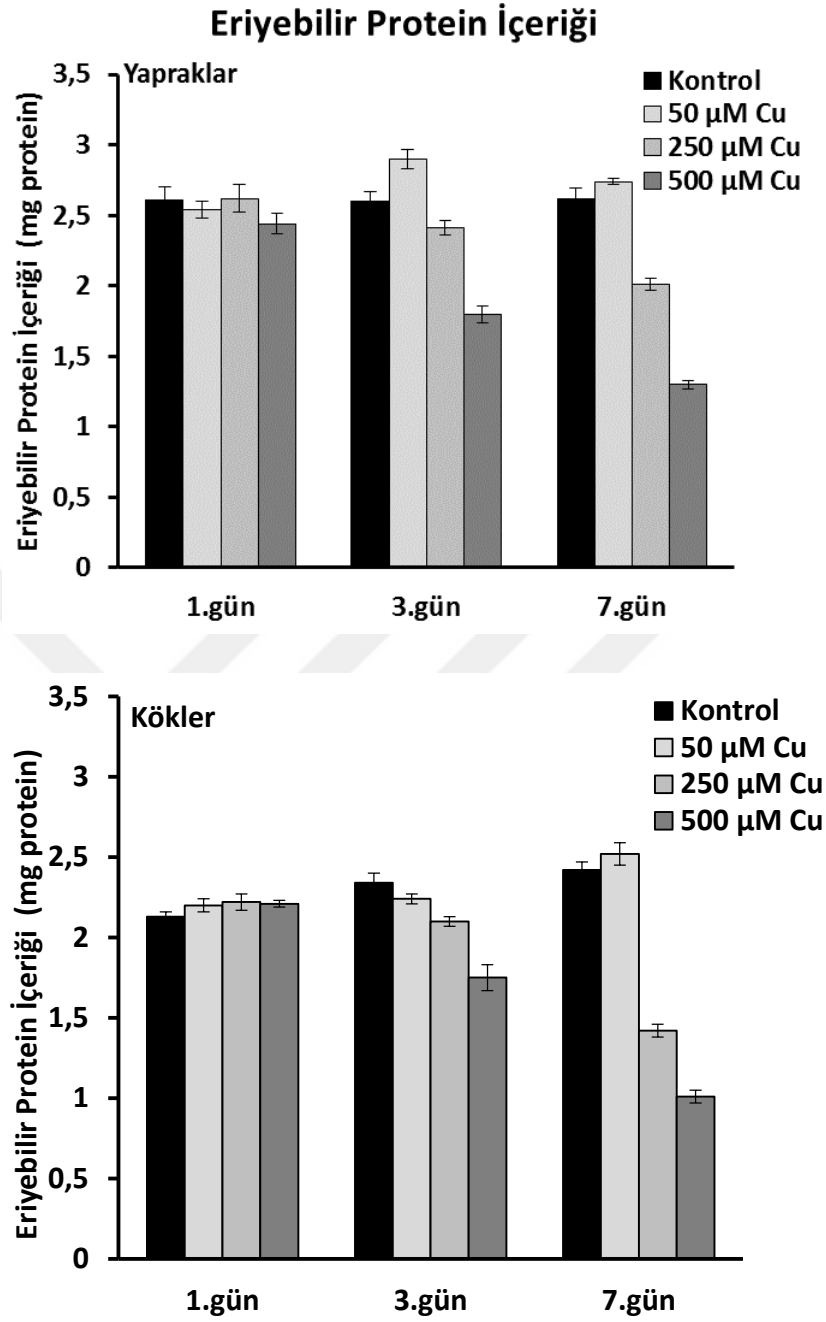
Şekil 4.2.2.2. Cu uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama GS aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Çizelge 4.2.2.3 ve Şekil 4.2.2.3’de farklı konsantrasyonlarda Cu uygulanmış fidelerin kök ve yapraklarında belirlenen ortalama eriyebilir protein içeriğinin (mg/g YA) uygulama süresine göre değişimi yer almaktadır. Buna göre hem kök hem de yapraklarda belirlenen ortalama eriyebilir protein içeriğinde uygulama süresi ve Cu konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($P<0,05$).

Çizelge 4.2.2.3. Cu uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama eriyebilir protein içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. Sapma).

		Eriyebilir Protein İçeriği (mg/g YA)		
Konsantrasyon		1.gün	3.gün	7.gün
Yapraklar	Kontrol	2,61 ± 0,09	2,60 ± 0,07	2,62 ± 0,07
	50 µM Cu	2,54 ± 0,06	2,90 ± 0,07	2,74 ± 0,02
	250 µM Cu	2,62 ± 0,10	2,41 ± 0,05	2,01 ± 0,04
	500 µM Cu	2,44 ± 0,07	1,80 ± 0,06	1,30 ± 0,03
Kökler	Kontrol	2,13 ± 0,03	2,34 ± 0,06	2,42 ± 0,05
	50 µM Cu	2,20 ± 0,04	2,24 ± 0,03	2,52 ± 0,07
	250 µM Cu	2,22 ± 0,05	2,10 ± 0,03	1,42 ± 0,04
	500 µM Cu	2,21 ± 0,02	1,75 ± 0,08	1,01 ± 0,04

Buna göre Cu uygulanmış fidelerin kök ve yapraklarında belirlenen eriyebilir protein içeriğinin farklı konsantrasyonlarda Cu uygulamasıyla birlikte uygulama süresine bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. En yüksek ortalama eriyebilir protein içeriği 3 gün boyunca 50 µM Cu uygulanmış fidelerin yapraklarında $2,90 \pm 0,07$ mg/g YA olarak belirlenmiştir. Yapraklarda belirlenen en düşük protein içeriği ise 7 gün boyunca 500 µM Cu konsantrasyonuna maruz bırakılmış fidelerde belirlenmiştir ($1,30 \pm 0,03$ mg/g YA). Köklerde 1. günde tüm Cu uygulamalarının kontrole göre eriyebilir protein içeriğini arttırdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2.2.3). Diğer günlerde ise uygulanan tüm Cu konsantrasyonlarında kontrole göre eriyebilir protein içeriğinin azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca köklerde belirlenen en düşük protein içeriği 7 gün boyunca 500 µM Cu uygulanmış örneklerde belirlenmiştir ve bu değer $1,0 \pm 0,04$ mg/g YA olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.2.2.3. Cu uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama eriyebilir protein içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Farklı konsantrasyonlarda Cu uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen azot metabolizması enzimlerine ait (NR ve GS) ortalama aktivite değerleri ve ortalama eriyebilir protein içeriğinin uygulama süresine göre değişimi iki yönlü ANOVA testi ile analiz edilmiştir. Elde edilen istatistiksel veriler Çizelge 4.2.2.4.' de yer almaktadır.

Çizelge 4.2.2.4. Azot metabolizması enzimlerine ait ortalama aktivite değerleri ve ortalama eriyebilir protein içeriği değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Cu) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].

Faktör	df	NR Aktivitesi		GS Aktivitesi		Eriyebilir Protein İçeriği	
		F	P	F	P	F	P
Kökler							
Konsantrasyonlar	3	358,81	0,000	919,33	0,000	640,62	0,000
Uygulama süresi	2	49,79	0,000	375,59	0,000	269,91	0,000
Konsantrasyon x Süre	6	16,88	0,000	73,28	0,000	328,31	0,000
Hata	48						
Yapraklar							
Konsantrasyonlar	3	217,70	0,000	468,33	0,000	499,92	0,000
Uygulama süresi	2	36,46	0,000	79,51	0,000	166,58	0,000
Konsantrasyon x Süre	6	7,37	0,000	24,39	0,000	111,09	0,000
Hata	48						

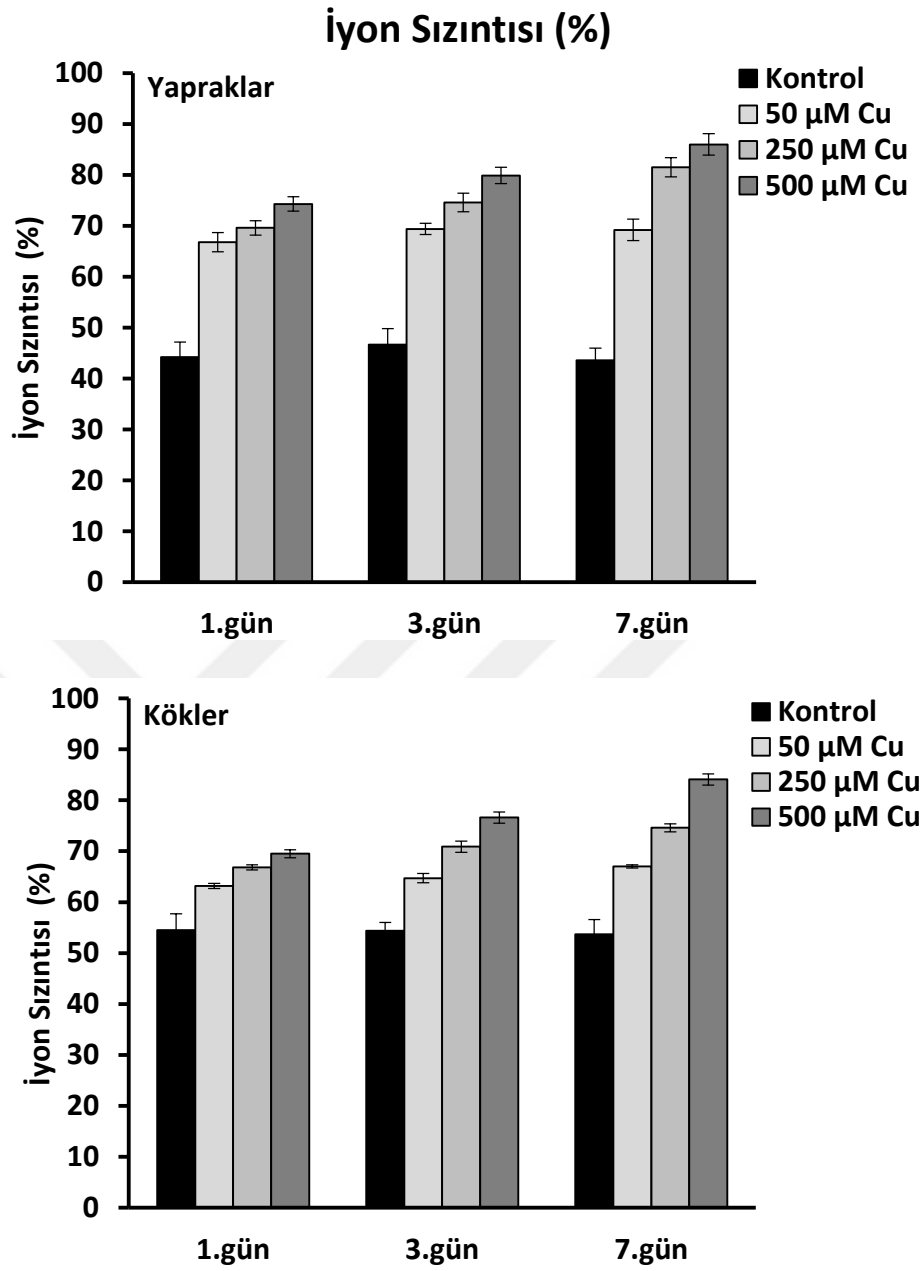
4.2.3. Cu Uygulanmış Fidelerde İyon Sızıntısı, Hücre Membran Zararı ve Malondialdehit (MDA) İçeriği

50, 250 ve 500 μ M konsantrasyonlarında Cu uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yapraklarında belirlenen iyon sızıntısına ait ortalama değerlerin (%) uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.2.3.1 ve Şekil 4.2.3.1’ de verilmiştir. Buna göre, hem kök hem de yapraklarda belirlenen iyon sızıntısına ait değerlerin Cu konsantrasyonları ve uygulama süresi arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($P < 0,05$).

Çizelge 4.2.3.1. Cu uygulanan *V. olympicum* fidelerinde belirlenen iyon sızıntısına ait ortalama değerlerin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma).

		İyon sızıntısı (%)		
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	7.gün
Yapraklar	Kontrol	44,2 ± 3,0	46,7 ± 3,1	43,6 ± 2,4
	50 µM Cu	66,8 ± 1,9	69,4 ± 1,1	69,2 ± 2,1
	250 µM Cu	69,6 ± 1,4	74,6 ± 1,8	81,5 ± 1,9
	500 µM Cu	74,3 ± 1,4	79,9 ± 1,6	86,0 ± 2,1
Kökler	Kontrol	54,5 ± 3,2	54,4 ± 1,6	53,7 ± 2,9
	50 µM Cu	63,2 ± 0,5	64,7 ± 0,9	67,0 ± 0,3
	250 µM Cu	66,8 ± 0,5	70,9 ± 1,1	74,6 ± 0,8
	500 µM Cu	69,5 ± 0,8	76,6 ± 1,1	84,1 ± 1,1

Farklı konsantrasyonlarda Cu uygulanmış fidelerin kök ve yapraklarında uygulama süresine bağlı olarak Cu konsantrasyonları arttıkça hücre membranlarındaki iyon sızıntısında artış olduğu belirlenmiştir. Köklerde elde edilen en yüksek değer, 7 gün boyunca 500 µM Cu stresine maruz kalmış örneklerde tespit edilmiştir (% 84,1 ± 1,1). Yapraklarda da köklerdeki benzer bir eğilim olduğu görülmektedir (Çizelge 4.2.3.1). Buna göre elde edilen en yüksek değer yapraklarda da 7 gün boyunca 500 µM Cu uygulanmış örneklerde belirlenmiştir (% 86,0 ± 2,1).



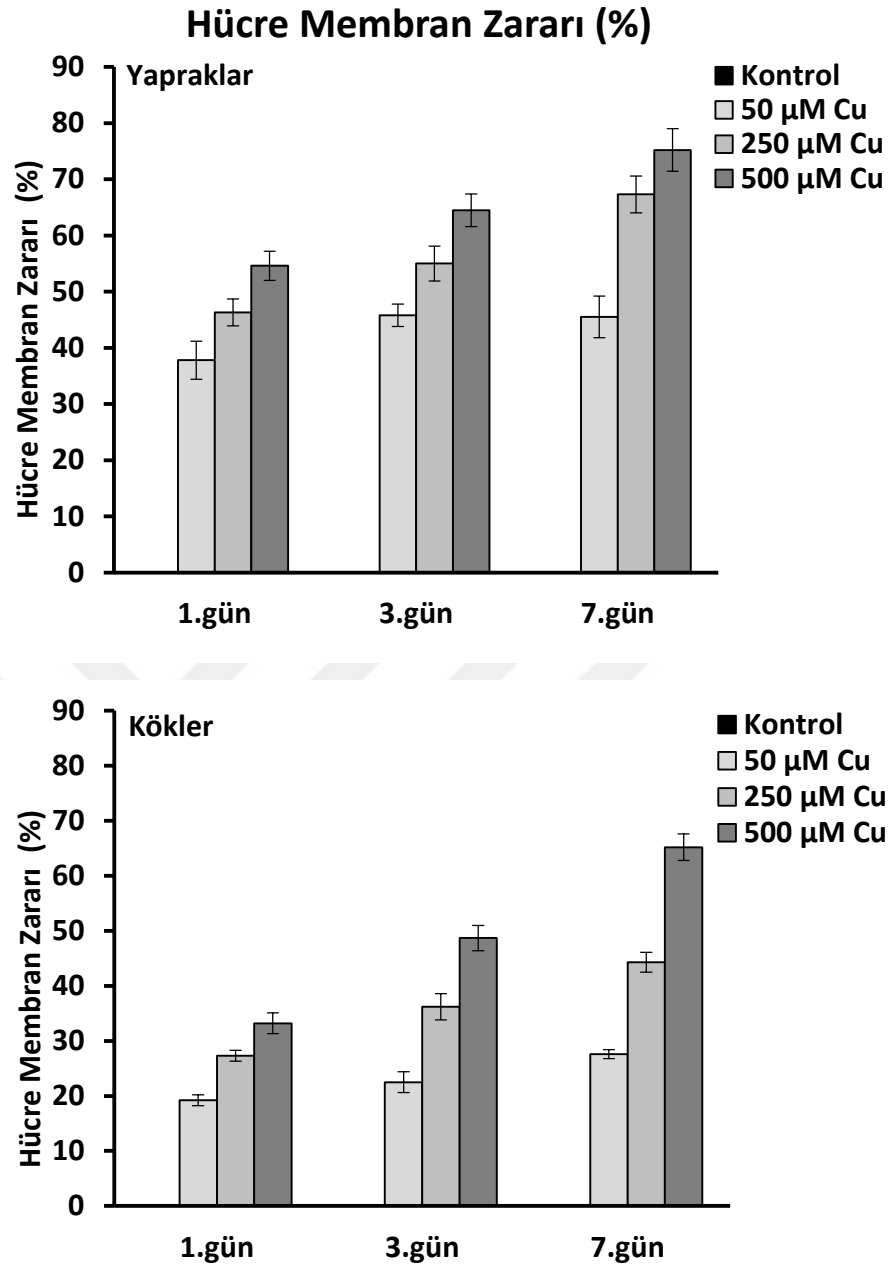
Şekil 4.2.3.1. Cu uygulanan *V. olympicum* fidelerinde belirlenen iyon sızıntısına ait ortalama değerlerin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Çizelge 4.2.3.2 ve Şekil 4.2.3.2’de farklı konsantrasyonlarda Cu uygulanmış fidelerin kök ve yapraklarında belirlenen hücre membran zararına ait ortalama değerlerin (%) uygulama süresine göre değişimi bulunmaktadır. Buna göre hücre membran zararına ait değerlerde uygulama süresi ve Cu konsantrasyonlarına bağlı olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($P<0,05$).

Çizelge 4.2.3.2. Cu uygulanan *V. olympicum* fidelerinde belirlenen hücre membran zararına ait ortalama değerlerin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma).

Hücre Membran Zararı (%)				
Konsantrasyonlar		1.gün	3.gün	7.gün
Yapraklar	Kontrol	0	0	0
	50 µM Cu	37,8 ± 3,4	45,8 ± 2,0	45,5 ± 3,7
	250 µM Cu	46,3 ± 2,4	55,0 ± 3,1	67,3 ± 3,3
	500 µM Cu	54,6 ± 2,6	64,5 ± 2,9	75,2 ± 3,8
Kökler	Kontrol	0	0	0
	50 µM Cu	19,2 ± 1,0	22,5 ± 1,9	27,6 ± 0,8
	250 µM Cu	27,3 ± 1,0	36,2 ± 2,4	44,3 ± 1,8
	500 µM Cu	33,2 ± 1,9	48,7 ± 2,3	65,2 ± 2,4

Elektrolit sızıntısı değerleriyle paralel olarak hem kök hem de yapraklarda uygulama süresi ve Cu konsantrasyonları arttıkça hücre membran zararında da artış olduğu belirlenmiştir. Elde edilen en yüksek değer hem kök hem de yaprak kısımlarında 7 gün boyunca 500 µM Cu uygulanmış fidelerde tespit edilmiştir. Bu değerler kökler için % 65,2 ± 2,4, yapraklar için % 75,2 ± 3,8' dir.



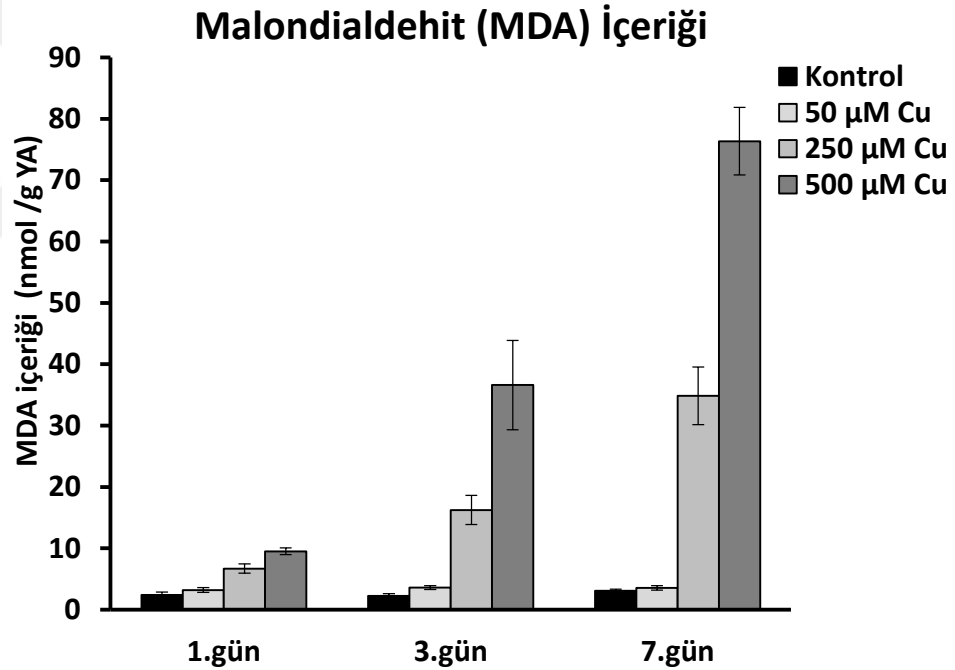
Şekil 4.2.3.2. Cu uygulanan *V. olympicum* fidelerinde belirlenen hücre membran zararına ait ortalama değerlerin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Çizelge 4.2.3.3 ve Şekil 4.2.3.3’de farklı konsantrasyonlarda Cu uygulanmış fidelerin yapraklarında belirlenen ortalama MDA içeriğinin uygulama süresine göre değişimi yer almaktadır. Buna göre uygulama süresi ve Cu konsantrasyonları arasında yapraklarda belirlenen MDA içeriğinde anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($P<0,05$).

Çizelge 4.2.3.3. Cu uygulanan *V. olympicum* fidelerinde belirlenen ortalama MDA içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. Sapma)

MDA İçeriği (nmol/g YA)				
Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	7.gün	
Kontrol	2,42 ± 0,45	2,25 ± 0,34	3,10 ± 0,26	
50 µM Cu	3,21 ± 0,41	3,60 ± 0,30	3,56 ± 0,35	
250 µM Cu	6,70 ± 0,76	16,25 ± 2,36	34,85 ± 4,71	
500 µM Cu	9,50 ± 0,55	36,62 ± 7,28	76,35 ± 5,51	

Çizelge 4.2.3.3' e göre Cu uygulanmış fidelerde belirlenen en yüksek MDA içeriği 7 gün boyunca 500 µM Cu uygulanmış örneklerin yapraklarında elde edilmiştir. Bu değer yaklaşık olarak kontrolden 25 kat daha yüksektir.



Şekil 4.2.3.3. Cu uygulanan *V. olympicum* fidelerinde belirlenen ortalama MDA içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Farklı konsantrasyonlarda Cu uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen hücre membran zararı ve iyon sızıntısına ait ortalama değerler ile yapraklarda belirlenen MDA içeriğinin uygulama süresine göre değişimi iki yönlü ANOVA testi ile analiz edilmiştir. Elde edilen istatistiksel veriler Çizelge 4.2.3.4' de yer almaktadır.

Çizelge 4.2.3.4. İyon sızıntısı, hücre membran zararı ve yaprak kısımlarında belirlenen MDA değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Cu) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].

Faktör	İyon sızıntısı			Hücre membran zararı		MDA İçeriği	
	<i>df</i>	F	P	F	P	F	P
Kökler							
Konsantrasyonlar	3	606,89	0,000	2592,07	0,000		
Uygulama süresi	2	87,46	0,000	406,28	0,000		
Konsantrasyon X Süre	6	23,42	0,000	92,7	0,000		
Hata	48						
Yapraklar							
Konsantrasyonlar	3	851,31	0,000	1735,23	0,000	512,33	0,000
Uygulama süresi	2	55,70	0,000	106,82	0,000	312,38	0,000
Konsantrasyon X Süre	6	12,06	0,000	20,08	0,000	132,8	0,000
Hata	48						

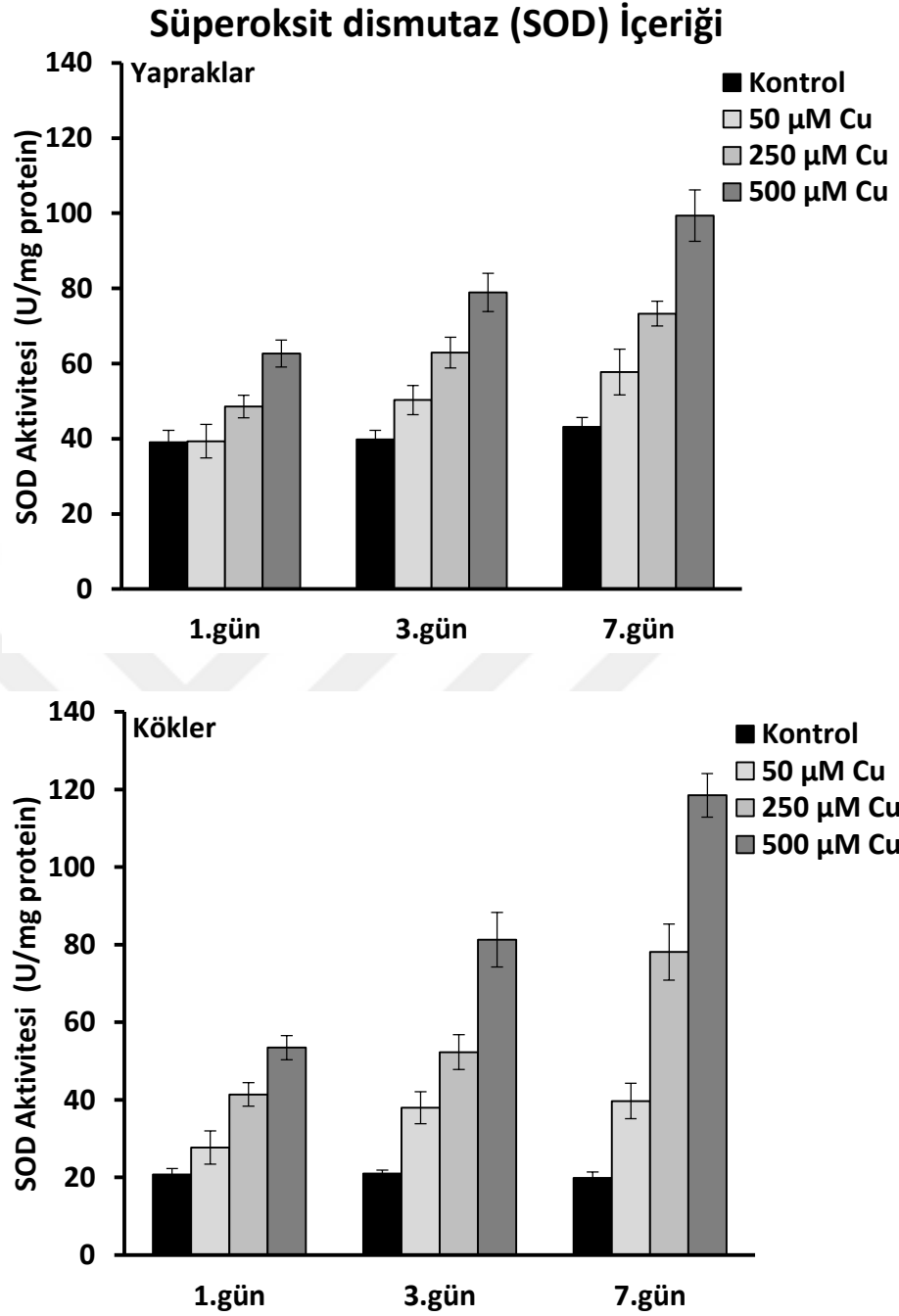
4.2.4. Cu Uygulanmış Fidelerde Antioksidatif Enzim Aktivitesi (SOD, CAT, APX)

50, 250 ve 500 μ M konsantrasyonlarında Cu uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yapraklarında belirlenen ortalama superoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.2.4.1 ve Şekil 4.2.4.1’ de verilmiştir. SOD aktivitesi açısından hem kök hem de yapraklarda uygulama süresi ve Cu konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark ($P < 0,05$) bulunmuştur. Buna göre Cu konsantrasyonlarındaki artışa paralel olarak SOD aktivitesinin tüm uygulama sürelerinde arttığı tespit edilmiştir. 7 gün boyunca 500 μ M Cu uygulanmış örneklerin yapraklarında belirlenen SOD aktivitesi kontrole göre 2,5 kat artmış olup bu değer yapraklarda elde edilen en yüksek değerdir. Yapraklarda olduğu gibi köklerde de SOD aktivitesinin artan Cu konsantrasyonlarına ve uygulama süresine bağlı olarak arttığı görülmektedir.

Çizelge 4.2.4.1. Cu uygulanan *V. olympicum* fidelerinde belirlenen ortalama SOD aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5, Ort. ± Std. Sapma).

		SOD Aktivitesi (U/mg protein)		
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	7.gün
Yapraklar	Kontrol	39,03 ± 3,20	39,83 ± 2,45	43,15 ± 2,47
	50 µM Cu	39,35 ± 4,44	50,29 ± 3,90	57,77 ± 6,07
	250 µM Cu	48,60 ± 2,99	62,93 ± 4,11	73,28 ± 3,29
	500 µM Cu	62,68 ± 3,62	78,94 ± 5,10	99,38 ± 6,83
Kökler	Kontrol	20,75 ± 1,56	21,01 ± 0,85	19,82 ± 1,59
	50 µM Cu	27,68 ± 4,27	37,98 ± 4,11	39,69 ± 4,57
	250 µM Cu	41,38 ± 3,04	52,29 ± 4,50	78,10 ± 7,22
	500 µM Cu	53,45 ± 3,12	81,26 ± 7,05	118,48 ± 5,63

Köklerde elde edilen en yüksek SOD aktivitesinin kontrole göre 5 kat arttığı ve bu değer 7. günde 500 µM Cu uygulanmış örneklerde elde edildiği tespit edilmiştir. Aynı zamanda köklerde belirlenen SOD aktivitesindeki artışın yapraklara göre daha fazla olduğu belirlenmiştir.



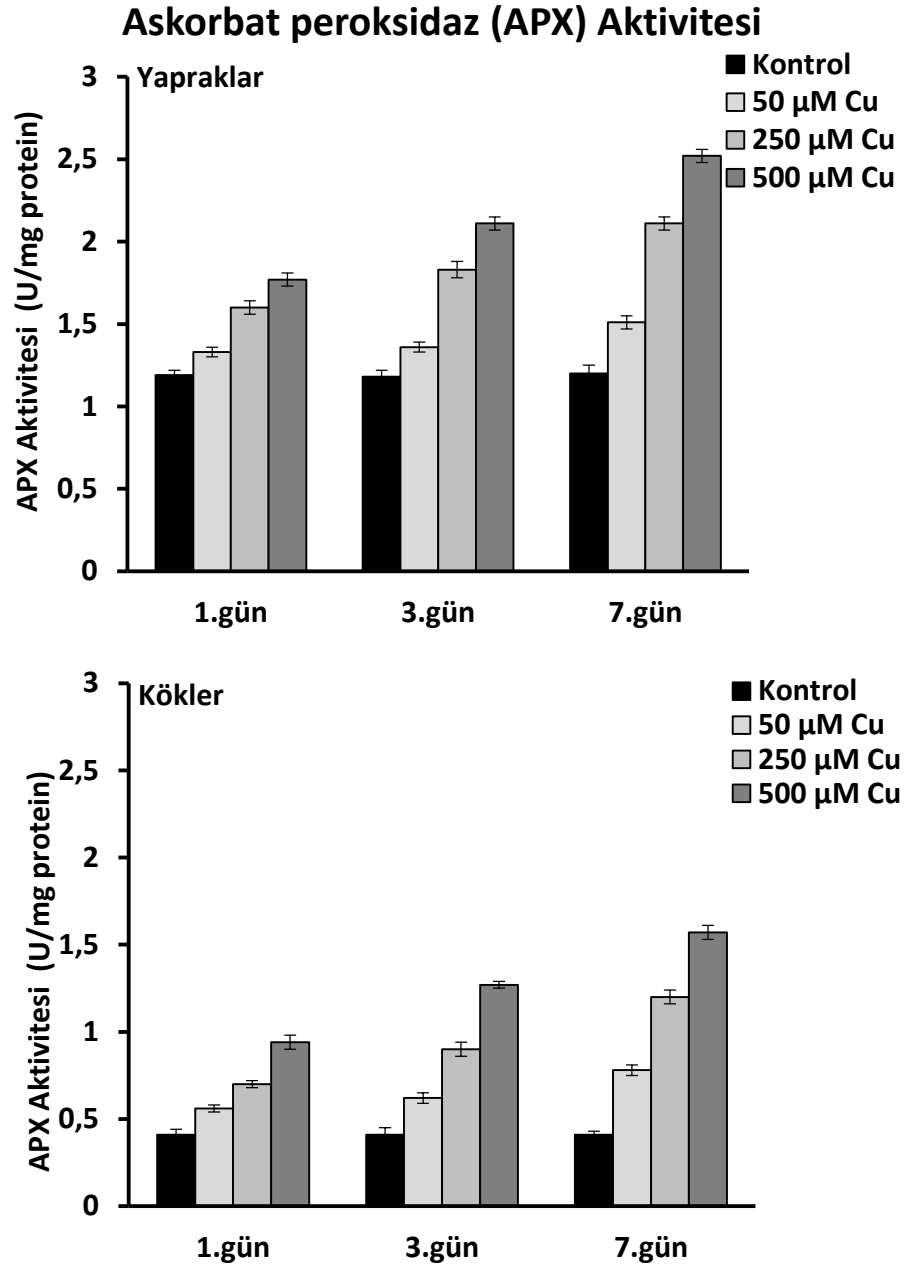
Şekil 4.2.4.1. Cu uygulanan *V. olympicum* fidelerinde belirlenen ortalama SOD aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Farklı konsantrasyonlarda Cu uygulanmış fidelerin kök ve yapraklarında belirlenen ortalama APX aktivitesinin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.2.4.2 ve Şekil 4.2.4.2' de verilmiştir. Ortalama APX aktivitesi açısından hem kök hem de yapraklarda uygulama süresi ve Cu konsantrasyonlarına göre anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($P < 0,05$).

Çizelge 4.2.4.2. Cu uygulanan *V. olympicum* fidelerinde belirlenen ortalama APX aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5, Ort. ± Std. Sapma).

		APX Aktivitesi (U/mg protein)		
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	7.gün
Yapraklar	Kontrol	1,19 ± 0,03	1,18 ± 0,04	1,20 ± 0,05
	50 µM Cu	1,33 ± 0,03	1,36 ± 0,03	1,51 ± 0,04
	250 µM Cu	1,60 ± 0,04	1,83 ± 0,05	2,11 ± 0,04
	500 µM Cu	1,77 ± 0,04	2,11 ± 0,04	2,52 ± 0,04
Kökler	Kontrol	0,41 ± 0,03	0,41 ± 0,04	0,41 ± 0,02
	50 µM Cu	0,56 ± 0,02	0,62 ± 0,03	0,78 ± 0,03
	250 µM Cu	0,70 ± 0,02	0,90 ± 0,04	1,20 ± 0,04
	500 µM Cu	0,94 ± 0,04	1,27 ± 0,02	1,57 ± 0,04

Çizelge 4.2.4.2' e göre en düşük APX aktivitesi kontrol örneklerinin köklerinde tespit edilmiştir. Köklerde elde edilen en yüksek APX aktivitesi ise 7 gün boyunca 500 µM Cu uygulanmış örneklerde belirlenmiştir. Bu değer ise $1,57 \pm 0,04$ U/mg protein'dir. Cu uygulamasına bağlı olarak yapraklarda APX aktivitesinde meydana gelen değişiklikler köklerdekine benzer bir şekilde artmıştır. 7 gün boyunca 500 µM Cu konsantrasyonuna maruz bırakılmış fidelerin yaprak kısımlarında belirlenen APX aktivitesinin, kontrol örneklerine göre yaklaşık 2 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2.4.2). Ayrıca yapraklarda belirlenen APX aktivitesinin köklerdekine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.



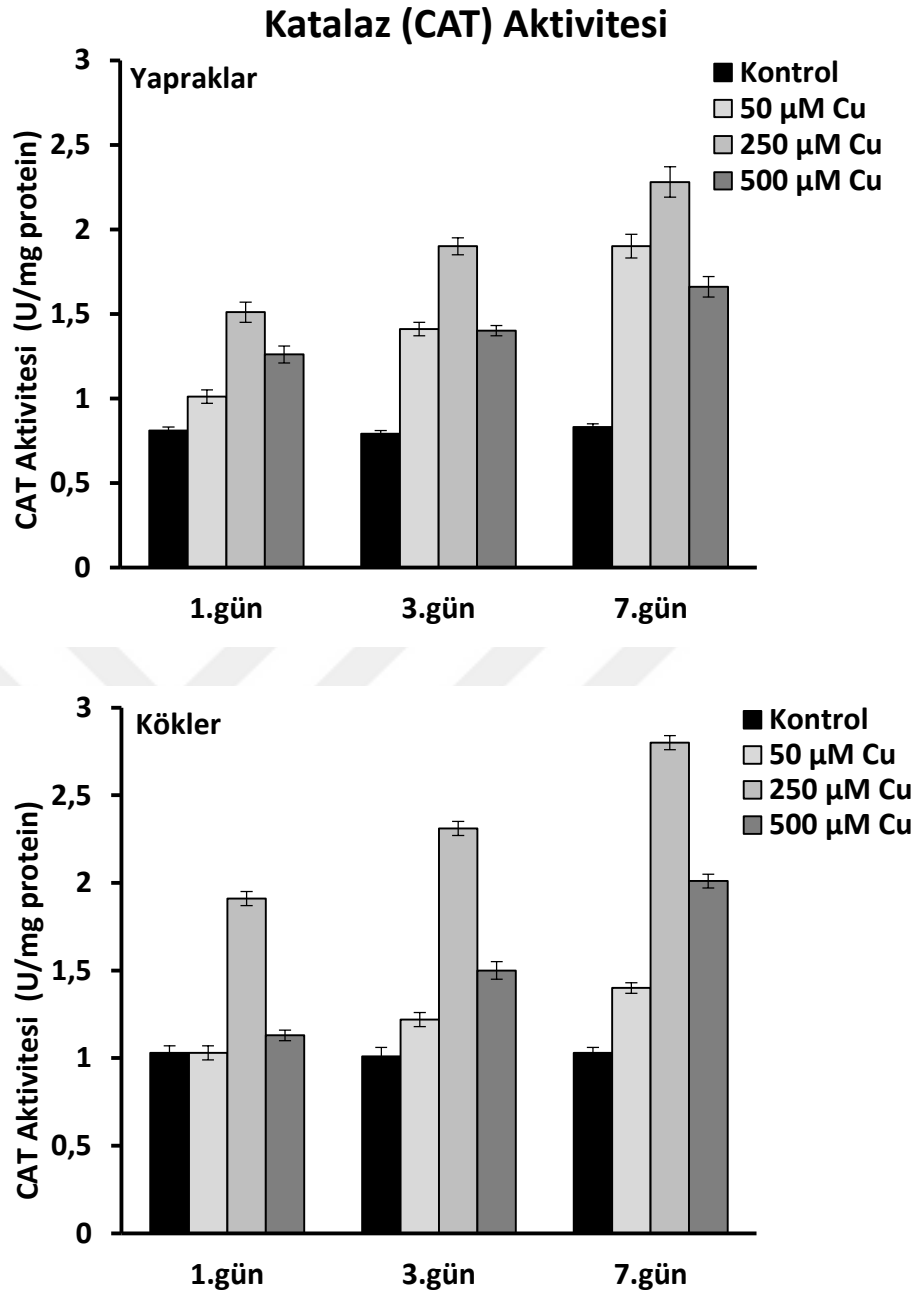
Şekil 4.2.4.2. Cu uygulanan *V. olympicum* fidelerinde belirlenen ortalama APX aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Çizelge 4.2.4.3 ve Şekil 4.2.4.3’de farklı konsantrasyonlarda Cu uygulanmış fidelerin kök ve yapraklarında belirlenen ortalama CAT aktivitesinin uygulama süresine göre değişimi yer almaktadır. Buna göre ortalama CAT aktivitesinde hem kök hem de yapraklarda uygulama süresi ve Cu konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark ($P<0,05$) bulunmuştur.

Çizelge 4.2.4.3. Cu uygulanan *V. olympicum* fidelerinde belirlenen ortalama CAT aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5, Ort. ± Std. Sapma).

CAT Aktivitesi (U/mg protein)				
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	7.gün
Yapraklar	Kontrol	0,81 ± 0,02	0,79 ± 0,02	0,83 ± 0,02
	50 µM Cu	1,01 ± 0,04	1,41 ± 0,04	1,90 ± 0,07
	250 µM Cu	1,51 ± 0,06	1,90 ± 0,05	2,28 ± 0,09
	500 µM Cu	1,26 ± 0,05	1,40 ± 0,03	1,66 ± 0,06
	Kontrol	1,03 ± 0,04	1,01 ± 0,05	1,03 ± 0,03
Kökler	50 µM Cu	1,03 ± 0,04	1,22 ± 0,04	1,40 ± 0,03
	250 µM Cu	1,91 ± 0,04	2,31 ± 0,04	2,80 ± 0,04
	500 µM Cu	1,13 ± 0,03	1,50 ± 0,05	2,01 ± 0,04

Çizelge 4.2.4.3' e göre tüm Cu konsantrasyonlarında bitkinin hem kök hem de yaprak kısımlarında CAT aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2.4.3). Fakat köklerde belirlenen CAT aktivitesindeki artışın yapraklardakine göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 250 µM Cu uygulamasının hem kök hem de yaprak kısımlarında en yüksek CAT aktivitesine neden olduğu görülmektedir. Bu değer yapraklarda $2,28 \pm 0,09$ U/mg protein, köklerde ise $2,80 \pm 0,04$ U/ mg protein olarak belirlenmiştir. 7 gün boyunca 500 µM Cu uygulanmış örneklerin yapraklarında belirlenen CAT aktivitesine ait en yüksek değer ise $1,6 \pm 0,06$ U/mg protein' dir.



Şekil 4.2.4.3. Cu uygulanan *V. olympicum* fidelerinde belirlenen ortalama CAT aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Farklı konsantrasyonlarda Cu uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen antioksidatif savunma sistemi enzimlerine (SOD, CAT, APX) ait ortalama aktivite değerlerinin uygulama süresine göre değişimi iki yönlü ANOVA testi ile analiz edilmiştir. Elde edilen istatistiksel veriler Çizelge 4.2.4.4' de yer almaktadır.

Çizelge 4.2.4.4. Antioksidatif savunma sistemi enzimlerine (SOD, CAT, APX) ait ortalama aktivite değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Cu) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].

Faktör	SOD Aktivitesi			CAT Aktivitesi		APX Aktivitesi	
	<i>df</i>	F	P	F	P	F	P
Kökler							
Konsantrasyonlar	3	594,48	0,000	2943,23	0,000	1767,20	0,000
Uygulama süresi	2	204,57	0,000	829,50	0,000	516,54	0,000
Konsantrasyon x Süre	6	56,52	0,000	137,60	0,000	89,95	0,000
Hata	48						
Yapraklar							
Konsantrasyonlar	3	246,71	0,000	1208,40	0,000	1707,99	0,000
Uygulama süresi	2	121,93	0,000	544,20	0,000	409,64	0,000
Konsantrasyon x Süre	6	13,13	0,000	76,13	0,000	91,73	0,000
Hata	48						

4.3. Krom (Cr)

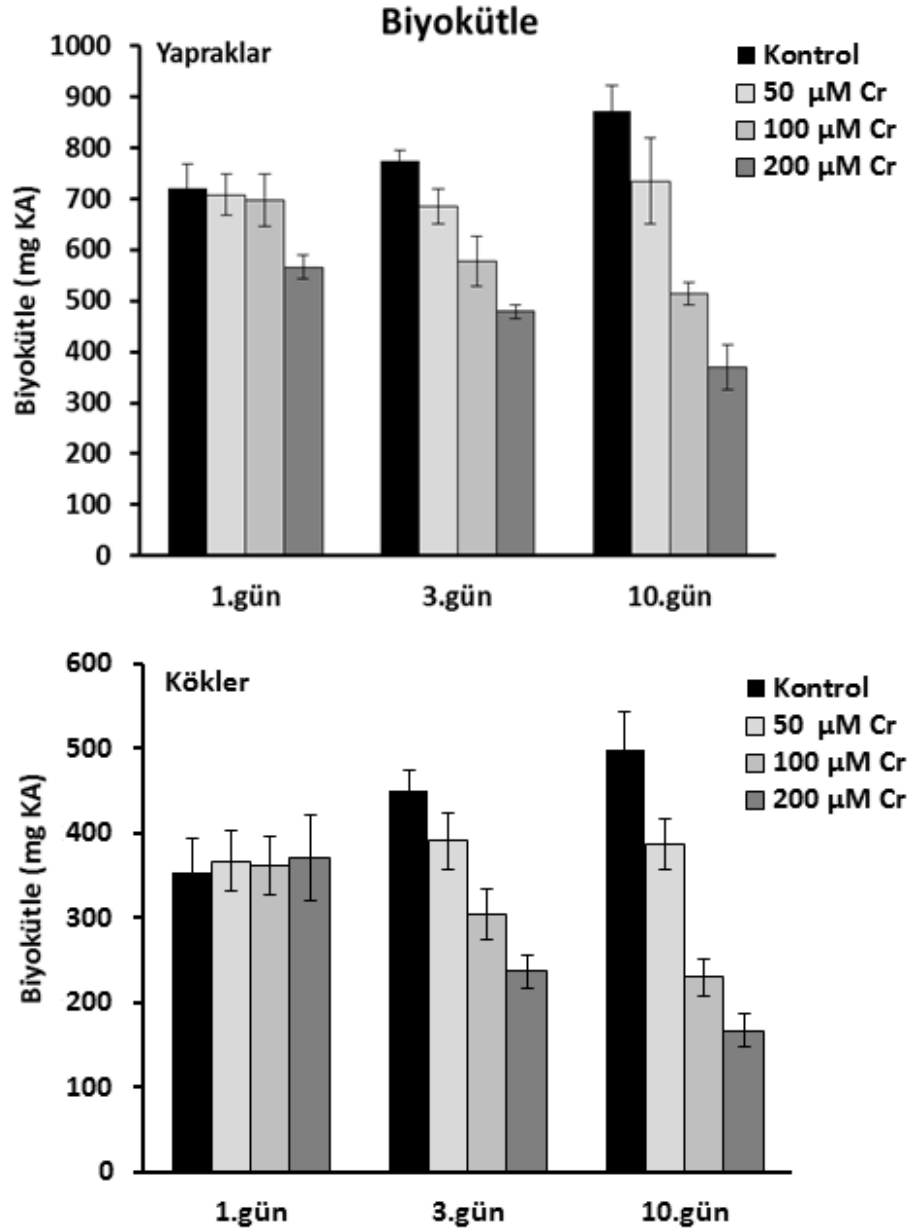
4.3.1. Cr Uygulanmış Fidelerde Büyüme Parametreleri (Biyokütle, Su İçeriği ve Klorofil İçeriği)

50, 100 ve 200 μM konsantrasyonlarında Cr uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen ortalama biyokütle değerlerinin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.3.1.1 ve Şekil 4.3.1.1’ de verilmiştir. Buna göre hem kök hem de yapraklarda Cr konsantrasyonları ve uygulama süresine bağlı olarak biyokütlede anlamlı bir azalış olduğu tespit edilmiştir ($P < 0,05$).

Çizelge 4.3.1.1. Cr uygulanan *V. olympicum* fidelerinde biyokütle değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi ($n=5$; Ort. \pm Std. sapma).

		Biyokütle (mg KA)		
Konsantrasyonlar		1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	720,8 \pm 47,2	773,4 \pm 19,9	871,8 \pm 49,0
	50 μM Cr	706,9 \pm 40,4	684,8 \pm 34,5	734,3 \pm 84,5
	100 μM Cr	696,7 \pm 50,4	577,6 \pm 49,1	512,6 \pm 22,0
	200 μM Cr	565,6 \pm 22,7	478,5 \pm 13,7	370,8 \pm 43,9
Kökler	Kontrol	354,4 \pm 40,0	449,3 \pm 24,7	499,5 \pm 43,2
	50 μM Cr	366,8 \pm 36,1	390,8 \pm 32,9	387,1 \pm 30,0
	100 μM Cr	361,3 \pm 33,8	304,5 \pm 30,4	230,1 \pm 21,8
	200 μM Cr	371,2 \pm 50,9	236,5 \pm 19,6	167,3 \pm 19,9

Fidelerde belirlenen en düşük biyokütle değeri, hem kök hem de yapraklar için 10 gün boyunca 200 μM Cr uygulanmış örneklerde tespit edilmiştir. Bu değerler sırasıyla kökler için 167,3 \pm 19,9 mg KA; yapraklar için 370,8 \pm 43,9 mg KA’ dır. En yüksek ortalama biyokütle değeri hem kök hem de yapraklar için 10. güne ait kontrol örneklerinde elde edilmiştir. Bu değerler kökler için 499,5 \pm 43,2 mg KA, yapraklar için 871,8 \pm 49,0 mg KA’ dır (Çizelge 4.3.1.1).



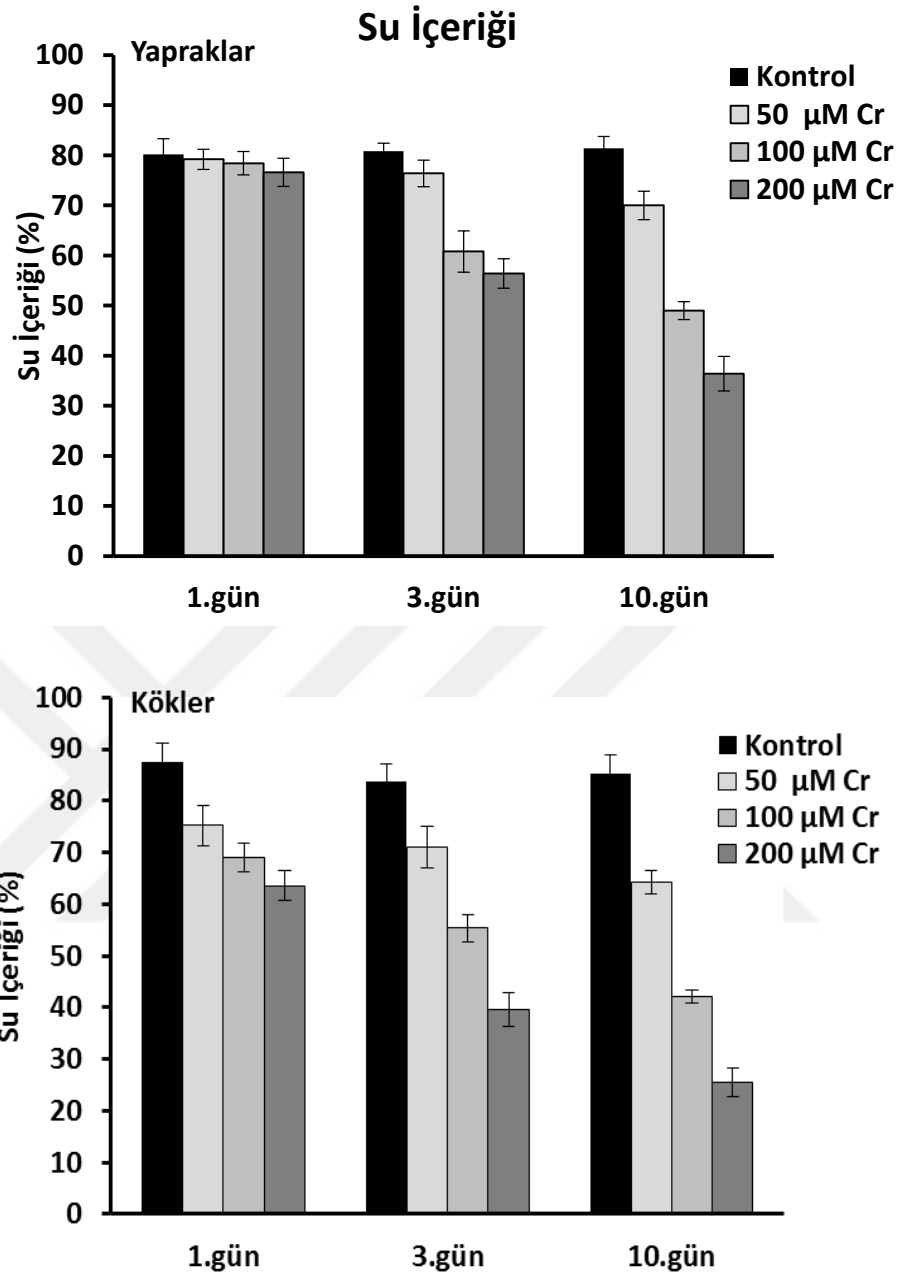
Şekil 4.3.1.1. Cr uygulanan *V. olympicum* fidelerinde biyokütle değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Farklı konsantrasyonlarda Cr uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen ortalama su içeriğinin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.3.1.2 ve Şekil 4.3.1.2’ de verilmiştir. Uygulama süresi ve Cr konsantrasyonlarına göre su içeriğinde anlamlı bir azalış olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$).

Çizelge 4.3.1.2. Cr uygulanan *V. olympicum* fidelerinde su içeriği değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma).

		Su içeriği (%)		
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	80,2 \pm 3,1	80,8 \pm 1,6	81,4 \pm 2,3
	50 μ M Cr	79,2 \pm 2,0	76,4 \pm 2,7	70,0 \pm 2,8
	100 μ M Cr	78,4 \pm 2,3	60,8 \pm 4,1	49,0 \pm 1,8
	200 μ M Cr	76,6 \pm 2,8	56,4 \pm 2,9	36,4 \pm 3,4
Kökler	Kontrol	87,6 \pm 3,4	83,6 \pm 3,4	85,2 \pm 3,7
	50 μ M Cr	75,2 \pm 4,0	71,0 \pm 4,0	64,2 \pm 2,2
	100 μ M Cr	69,0 \pm 2,7	55,4 \pm 2,7	42,0 \pm 1,3
	200 μ M Cr	63,6 \pm 2,9	39,6 \pm 3,4	25,6 \pm 2,7

Çizelge 4.3.1.2' ye göre yapraklarda belirlenen en yüksek su içeriği 10. gündeki kontrol örneklerinde tespit edilmiştir (% 81,4 \pm 2,3). Yapraklardaki en düşük su içeriği ise, 10. gün boyunca 200 μ M Cr uygulanmış örneklerde elde edilmiş olup % 36,4 \pm 3,4 olarak belirlenmiştir. Köklerdeki en yüksek su içeriği 1. gündeki kontrol örneklerinde elde edilmiştir. Bu değer % 87,6 \pm 3,4' dir. Köklere ait en düşük su içeriği ise, 10 gün boyunca 200 μ M Cr uygulanmış örneklerde elde edilmiştir (% 25,6 \pm 2,7). Bununla birlikte Cr uygulanmış fidelerin kök kısımlarında belirlenen su içeriğindeki azalışın yapraklara göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.



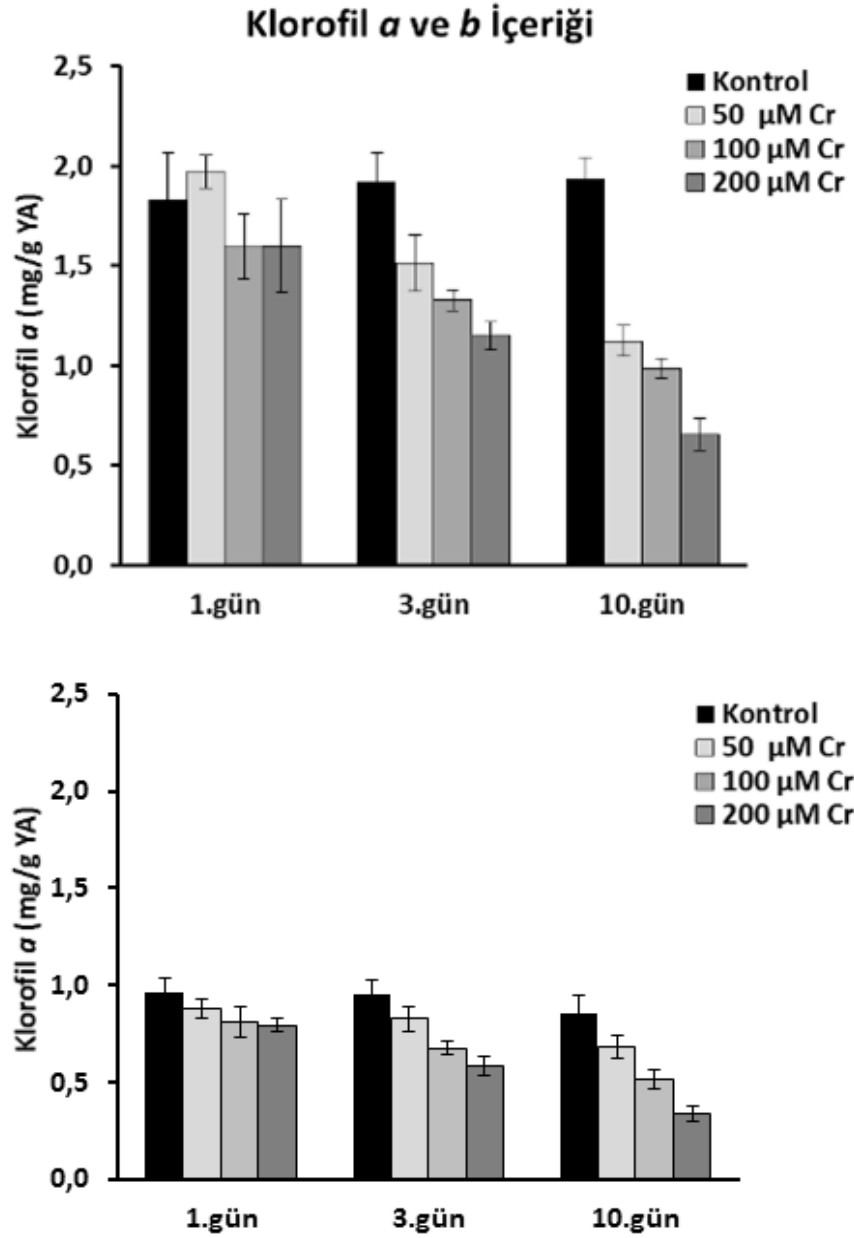
Şekil 4.3.1.2. Cr uygulanan *V. olympicum* fidelerinde su içeriği değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Çizelge 4.3.1.3 ve Şekil 4.3.1.3’de 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarında Cr uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin yaprak kısımlarında belirlenen ortalama klorofil *a* ve *b* içeriğinin uygulama süresine göre değişimi yer almaktadır. Buna göre Cr konsantrasyonlarının uygulama süresine bağlı olarak klorofil *a* ve *b* içeriğinde anlamlı bir azalış meydana getirdiği tespit edilmiştir (P<0,05).

Çizelge 4.3.1.3. Cr uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama klorofil *a* ve *b* içeriği değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5, Ort. ± Std. Sapma).

Klorofil <i>a</i> ve <i>b</i> İçeriği (mg/g YA)				
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	10.gün
Klorofil <i>a</i>	Kontrol	1,83 ± 0,24	1,92 ± 0,14	1,93 ± 0,10
	50 µM Cr	1,97 ± 0,08	1,51 ± 0,14	1,12 ± 0,08
	100 µM Cr	1,60 ± 0,16	1,33 ± 0,05	0,99 ± 0,05
	200 µM Cr	1,60 ± 0,23	1,15 ± 0,07	0,66 ± 0,08
	Kontrol	0,96 ± 0,07	0,95 ± 0,07	0,86 ± 0,09
Klorofil <i>b</i>	50 µM Cr	0,88 ± 0,05	0,83 ± 0,06	0,69 ± 0,06
	100 µM Cr	0,81 ± 0,08	0,68 ± 0,03	0,51 ± 0,05
	200 µM Cr	0,79 ± 0,03	0,59 ± 0,05	0,34 ± 0,04

Çizelge 4.3.1.3' e göre belirlenen en düşük klorofil *a* ve *b* değeri 10 gün boyunca 200 µM Cr'a maruz bırakılmış örneklerde elde edilmiştir. Bu uygulama süresi ve konsantrasyonda klorofil *a* içeriğindeki azalış kontrole göre yaklaşık olarak 3 kat iken (0,66 ± 0,08 mg/g YA), aynı konsantrasyon ve uygulama süresinde klorofil *b* içeriğinde meydana gelen azalış kontrole göre yaklaşık olarak 2.5 kattır (0,34 ± 0,04 mg/g YA).



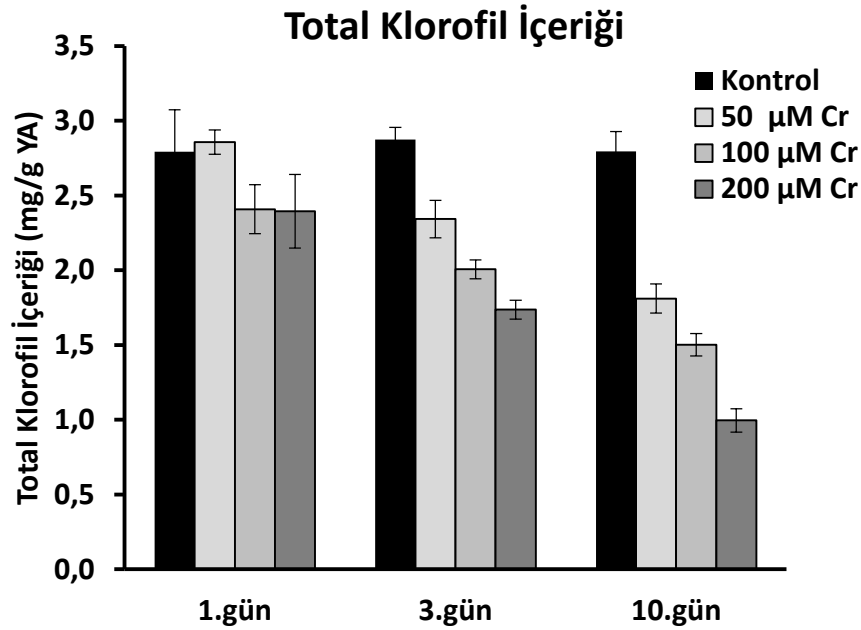
Şekil 4.3.1.3. Cr uygulanan *V. olympicum* fidelerinde klorofil *a* ve *b* içeriği değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5).

Farklı konsantrasyonlarda Cr uygulanmış fidelerin yapraklarında belirlenen ortalama total klorofil içeriğinin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.3.1.4 ve Şekil 4.3.1.4’ de gösterilmiştir. Buna göre artan Cr konsantrasyonları ve uygulama süresine bağlı olarak ortalama total klorofil içeriğinde anlamlı bir azalış olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$).

Çizelge 4.3.1.4. Cr uygulanan *V. olympicum* fidelerinde total klorofil içeriği değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5, Ort. ± Std. Sapma).

Total Klorofil İçeriği (mg/g YA)				
Konsantrasyonlar		1.gün	3.gün	10.gün
Total Klorofil	Kontrol	2,79 ± 0,28	2,87 ± 0,08	2,79 ± 0,13
	50 µM Cr	2,86 ± 0,08	2,34 ± 0,12	1,81 ± 0,10
	100 µM Cr	2,41 ± 0,16	2,01 ± 0,06	1,50 ± 0,07
	200 µM Cr	2,39 ± 0,25	1,74 ± 0,06	1,00 ± 0,08

Elde edilen en düşük total klorofil içeriği 10 gün boyunca 200 µM Cr uygulanmış örneklerde elde edilmiştir (1,00 ± 0,08 mg/g YA).



Şekil 4.3.1.4. Cr uygulanan *V. olympicum* fidelerinde total klorofil içeriği değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5).

Farklı konsantrasyonlarda Cr uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen büyüme parametrelerine ait (biyokütle, su içeriği, klorofil *a*, *b* ve total klorofil içeriği) ortalama değerlerin uygulama süresine göre değişimi iki yönlü ANOVA testi ile analiz edilmiştir. Elde edilen istatistiksel veriler Çizelge 4.3.1.5' de yer almaktadır.

Çizelge 4.3.1.5. Biyokütle, su ve klorofil değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Cr) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].

Faktör	Biyokütle		Su İçeriği		Klorofil <i>a</i> İçeriği		Klorofil <i>b</i> İçeriği		Total Klorofil İçeriği		
	<i>df</i>	F	<i>P</i>	F	<i>P</i>	F	<i>P</i>	F	<i>P</i>	F	<i>P</i>
Kökler											
Konsantrasyonlar	3	68,64	0,000	414,18	0,000						
Uygulama süresi	2	6,55	0,003	158,39	0,000						
Konsantrasyon x Süre	6	22,75	0,000	27,05	0,000						
Hata	48										
Yapraklar											
Konsantrasyonlar	3	118,94	0,000	197,47	0,000	71,33	0,000	79,06	0,000	138,36	0,000
Uygulama süresi	2	6,22	0,004	198,84	0,000	72,58	0,000	78,40	0,000	139,83	0,000
Konsantrasyon x Süre	6	15,09	0,000	47,36	0,000	12,42	0,000	6,39	0,000	17,74	0,000
Hata	48										

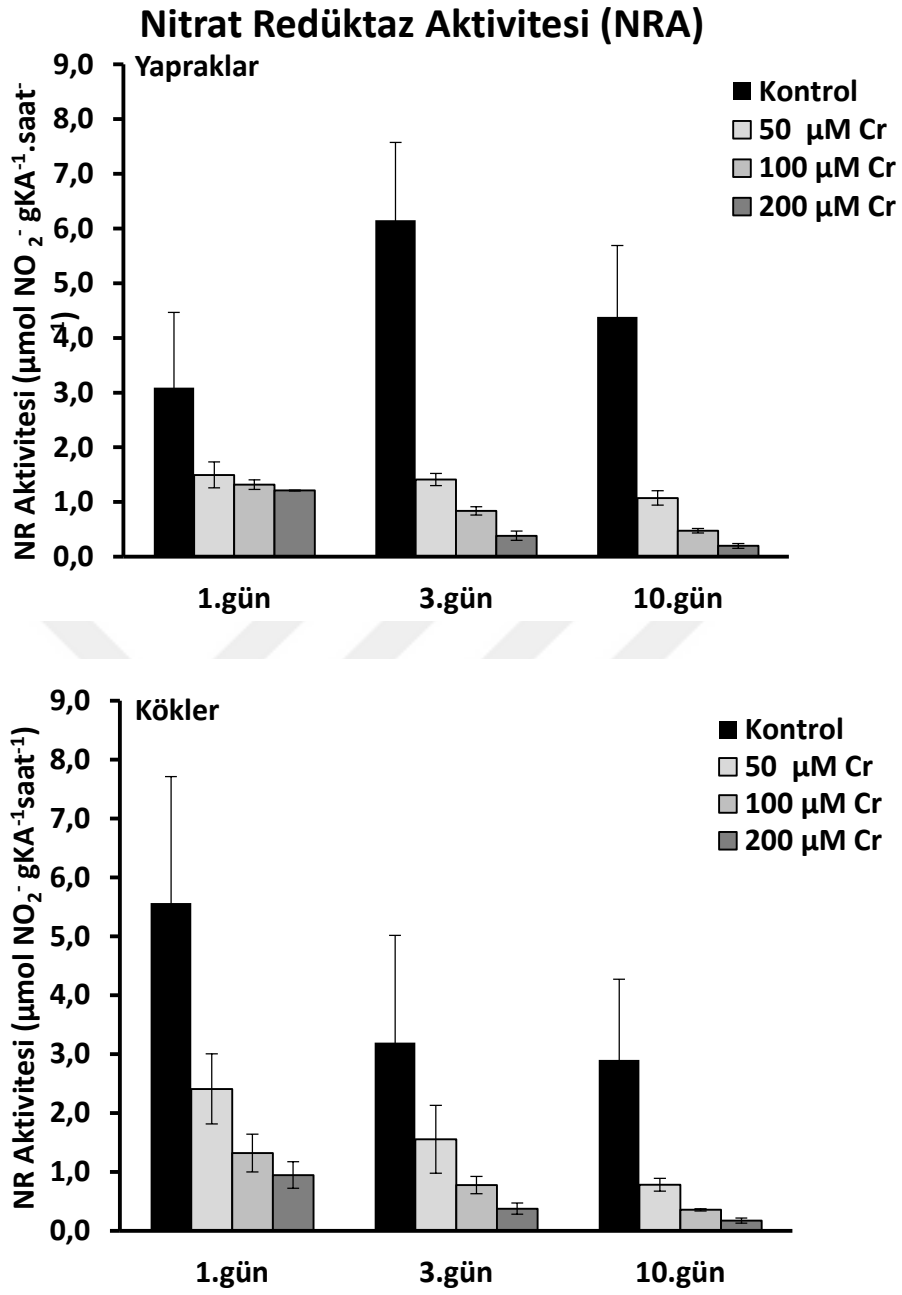
4.3.2. Cr Uygulanmış Fidelerde Azot Metabolizması Enzimlerinin (NR ve GS) Aktivitesi ve Eriyebilir Protein İçeriği

50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarında Cr uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen azot metabolizması enzimlerinden NR aktivitesinin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.3.2.1 ve Şekil 4.3.2.1’ de gösterilmiştir. Buna göre yapraklarda ortalama NR aktivitesinin uygulama süresine ve Cr konsantrasyonlarına bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir ($P < 0,05$). Yapraklardaki en yüksek NR aktivitesi kontrol örneklerinde tespit edilmiştir. Yapraklardaki en düşük NR aktivitesi ise 10 gün boyunca 200 µM Cr uygulanmış örneklerde elde edilmiş olup bu değer $0,20 \pm 0,04 \mu\text{mol NO}_2^- \text{gKA}^{-1} \cdot \text{saat}^{-1}$ dir (Çizelge 4.3.2.1).

Çizelge 4.3.2.1. Cr uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama NR aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi ($n=5$; Ort. \pm Std. Sapma).

		NR Aktivitesi ($\mu\text{mol NO}_2^- \text{gKA}^{-1} \cdot \text{saat}^{-1}$)		
Konsantrasyonlar		1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	$3,09 \pm 1,37$	$6,15 \pm 1,42$	$4,38 \pm 1,31$
	50 µM Cr	$1,50 \pm 0,24$	$1,41 \pm 0,11$	$1,07 \pm 0,13$
	100 µM Cr	$1,32 \pm 0,09$	$0,84 \pm 0,08$	$0,47 \pm 0,04$
	200 µM Cr	$1,21 \pm 0,01$	$0,38 \pm 0,08$	$0,20 \pm 0,04$
Kökler	Kontrol	$5,57 \pm 2,14$	$3,19 \pm 1,82$	$2,90 \pm 1,37$
	50 µM Cr	$2,41 \pm 0,60$	$1,55 \pm 0,58$	$0,78 \pm 0,11$
	100 µM Cr	$1,32 \pm 0,32$	$0,77 \pm 0,15$	$0,35 \pm 0,02$
	200 µM Cr	$0,95 \pm 0,23$	$0,37 \pm 0,10$	$0,17 \pm 0,05$

Köklerde de yapraklara benzer bir azalış görülmektedir. Fakat köklerde ortalama NR aktivitesinin uygulama süresine ve Cr konsantrasyonlarına bağlı olarak azalışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P < 0,05$). Köklerde belirlenen en düşük NR aktivitesi 10. günde 200 µM Cr uygulanmış örneklerde elde edilmiştir ($0,17 \pm 0,05 \mu\text{mol NO}_2^- \text{gKA}^{-1} \cdot \text{saat}^{-1}$).



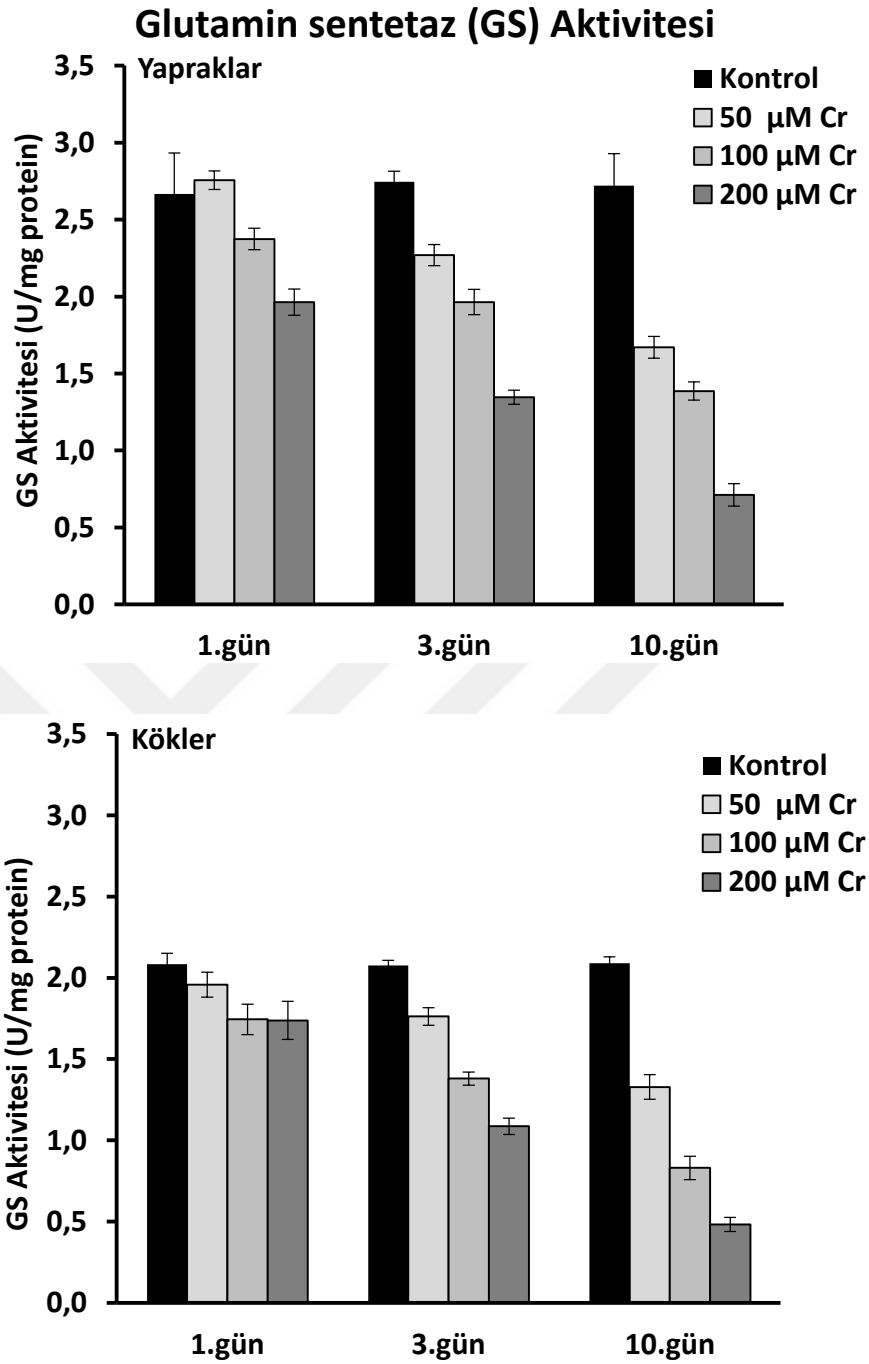
Şekil 4.3.2.1. Cr uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama NR aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

GS aktivitesinin farklı konsantrasyonlarda Cr uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen ortalama değerlerinin uygulama süresine göre değişimi ise Çizelge 4.3.2.2 ve Şekil 4.3.2.2’de verilmiştir. Buna göre hem kök hem de yaprak kısımlarında belirlenen GS aktivitesine ait değerlerde uygulama süresi ve Cr konsantrasyonlarına bağlı olarak anlamlı fark bulunmuştur ($P<0,05$).

Çizelge 4.3.2.2. Cr uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama GS aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. Sapma).

GS Aktivitesi (U/mg protein)				
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	2,67 ± 0,27	2,75 ± 0,07	2,72 ± 0,21
	50 µM Cr	2,76 ± 0,06	2,27 ± 0,07	1,67 ± 0,07
	100 µM Cr	2,37 ± 0,07	1,96 ± 0,08	1,39 ± 0,06
	200 µM Cr	1,96 ± 0,09	1,35 ± 0,05	0,71 ± 0,07
Kökler	Kontrol	2,08 ± 0,07	2,08 ± 0,03	2,09 ± 0,04
	50 µM Cr	1,96 ± 0,08	1,76 ± 0,05	1,33 ± 0,08
	100 µM Cr	1,74 ± 0,09	1,38 ± 0,04	0,83 ± 0,07
	200 µM Cr	1,74 ± 0,12	1,09 ± 0,05	0,48 ± 0,04

Çizelge 4.3.2.2' e göre GS aktivitesinin, tüm Cr konsantrasyonlarından negatif yönde etkilendiği görülmektedir. Buna göre yapraklarda belirlenen en düşük GS aktivitesi 10 gün boyunca 200 µM Cr uygulanmış örneklerde belirlenmiştir (0,71 ± 0,07 U/mg protein). Köklerde belirlenen GS aktivitesinde de yapraklardakine benzer bir azalış görülmektedir. Köklerde belirlenen en düşük GS aktivitesi 10 gün boyunca 200 µM Cr uygulanmış örneklerde tespit edilmiştir. Bu değer 0,48 ± 0,04 U/mg protein' dir.



Şekil 4.3.2.2. Cr uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama GS aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

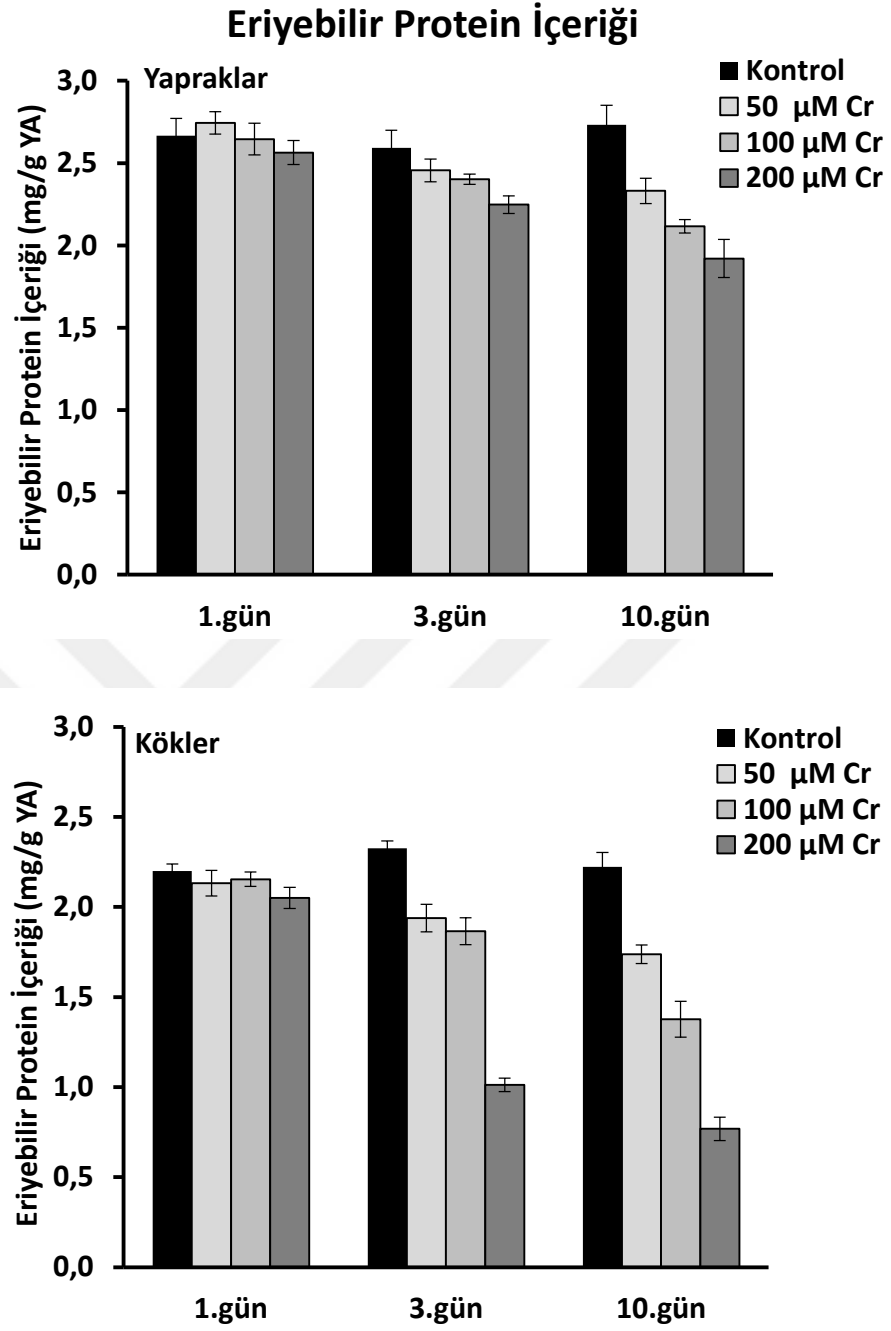
Şekil 4.3.2.3' de farklı konsantrasyonlarda Cr uygulanmış fidelerin kök ve yapraklarında belirlenen ortalama eriyebilir protein (mg/g YA) içeriğinin uygulama süresine göre değişimi yer almaktadır. Buna göre hem kök hem de yapraklarda belirlenen ortalama eriyebilir protein içeriğinde uygulama süresi ve Cr konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($P < 0,05$). Buna göre fidelerin kök ve yapraklarında belirlenen protein

içeriğinin farklı konsantrasyonlarda Cr uygulamasıyla birlikte uygulama süresine bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3.2.3. Cr uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama eriyebilir protein içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. Sapma).

		Eriyebilir Protein İçeriği (mg/g YA)		
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	2,67 ± 0,11	2,59 ± 0,11	2,73 ± 0,12
	50 µM Cr	2,74 ± 0,07	2,46 ± 0,07	2,33 ± 0,08
	100 µM Cr	2,65 ± 0,10	2,40 ± 0,03	2,12 ± 0,04
	200 µM Cr	2,56 ± 0,07	2,25 ± 0,05	1,92 ± 0,12
Kökler	Kontrol	2,20 ± 0,04	2,33 ± 0,04	2,22 ± 0,08
	50 µM Cr	2,13 ± 0,07	1,94 ± 0,08	1,74 ± 0,05
	100 µM Cr	2,15 ± 0,04	1,87 ± 0,07	1,38 ± 0,10
	200 µM Cr	2,05 ± 0,06	1,01 ± 0,04	0,77 ± 0,07

Yapraklarda belirlenen en yüksek ortalama eriyebilir protein içeriği kontrol örneklerinde $2,73 \pm 0,12$ mg/g YA olarak belirlenmiştir. Yapraklarda belirlenen en düşük eriyebilir protein içeriği ise 10 gün boyunca 200 µM Cr konsantrasyonuna maruz bırakılmış örneklerde belirlenmiştir ($1,92 \pm 0,12$ mg/g YA). Cr uygulanmış fidelerin köklerinde belirlenen eriyebilir protein içeriğinin de uygulama süresine bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Köklerde belirlenen en düşük protein içeriği 10 gün boyunca 200 µM Cr uygulanmış örneklerde belirlenmiştir ve bu değer $0,77 \pm 0,07$ mg/g YA olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.3.2.3. Cr uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama eriyebilir protein içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Cr uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen azot metabolizması enzimlerinden NR ve GS aktivitesinin ve eriyebilir protein içeriğinin uygulama süresine göre değişimi iki yönlü ANOVA testi ile analiz edilmiştir. Elde edilen istatistiksel veriler Çizelge 4.3.2.4’ de verilmiştir.

Çizelge 4.3.2.4. Azot metabolizması enzimlerine ait (NR ve GS) ortalama aktivite değerleri ve eriyebilir protein içeriğinin için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Cr) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].

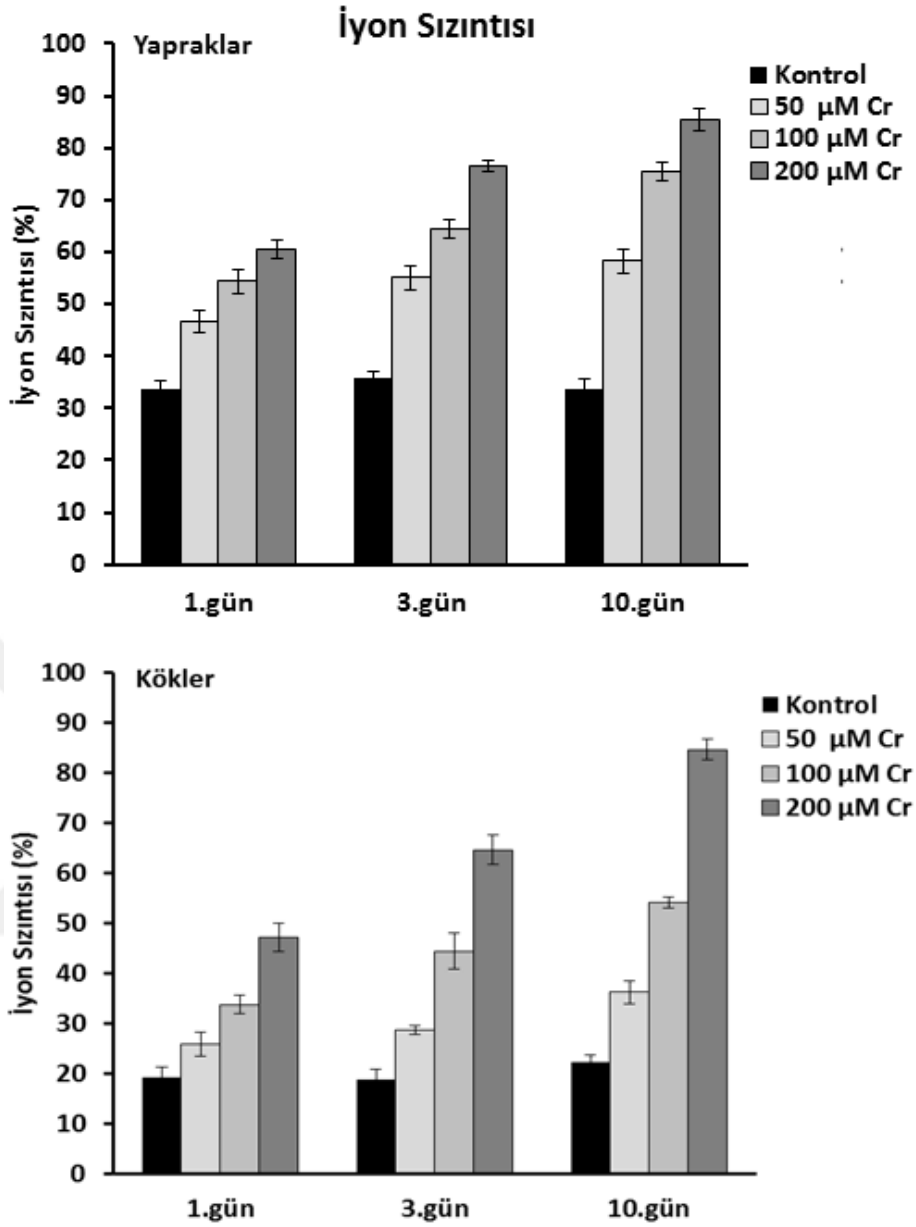
Faktör	NR Aktivitesi			GS Aktivitesi		Eriyebilir Protein İçeriği	
	<i>df</i>	F	<i>P</i>	F	<i>P</i>	F	<i>P</i>
Kökler							
Konsantrasyonlar	3	31,58	0,000	484,85	0,000	478,68	0,000
Uygulama süresi	2	10,86	0,000	427,34	0,000	361,23	0,000
Konsantrasyon x Süre	6	1,16	0,344	63,83	0,000	93,52	0,000
Hata	48						
Yapraklar							
Konsantrasyonlar	3	84,26	0,000	292,95	0,000	53,51	0,000
Uygulama süresi	2	3,77	0,030	198,42	0,000	82,17	0,000
Konsantrasyon x Süre	6	6,79	0,000	25,90	0,000	14,40	0,000
Hata	48						

4.3.3. Cr Uygulanmış Fidelerde İyon sızıntısı, Hücre Membran Zararı ve Malondialdehit (MDA) içeriği

50, 100 ve 200 μ M konsantrasyonlarında Cr uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen iyon sızıntısına ait ortalama değerlerin (%) uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.3.3.1 ve Şekil 4.3.3.1' de verilmiştir. Buna göre, hem kök hem de yapraklarda belirlenen iyon sızıntısına ait ortalama değerlerde Cr konsantrasyonları ve uygulama süresine bağlı olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($P < 0,05$). Uygulama süresine bağlı olarak Cr konsantrasyonları arttıkça membranlardaki iyon sızıntısında artış olduğu belirlenmiştir. Köklerde elde edilen en yüksek değer, 10 gün boyunca 200 μ M Cr stresine maruz kalmış örneklerde tespit edilmiştir (% 84,6 \pm 2,1). Yapraklarda da köklerdeki benzer bir artış görülmektedir (Çizelge 4.3.3.1). Buna göre yapraklarda belirlenen en yüksek değer 10 gün boyunca 200 μ M Cr stresine maruz kalmış örneklerde belirlenmiştir (% 85,4 \pm 2,0).

Çizelge 4.3.3.1. Cr uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama iyon sızıntısı değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma).

		İyon Sızıntısı (%)		
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	33,7 \pm 1,6	35,9 \pm 1,1	33,7 \pm 1,7
	50 μ M Cr	46,5 \pm 2,1	55,0 \pm 2,4	58,2 \pm 2,3
	100 μ M Cr	54,4 \pm 2,3	64,4 \pm 1,7	75,4 \pm 1,9
	200 μ M Cr	60,5 \pm 1,9	76,5 \pm 1,0	85,4 \pm 2,0
Kökler	Kontrol	19,3 \pm 2,0	18,7 \pm 2,1	22,2 \pm 1,4
	50 μ M Cr	25,8 \pm 2,4	28,8 \pm 0,8	36,2 \pm 2,3
	100 μ M Cr	33,8 \pm 1,9	44,4 \pm 3,6	54,1 \pm 1,1
	200 μ M Cr	47,1 \pm 2,8	64,6 \pm 2,9	84,6 \pm 2,1



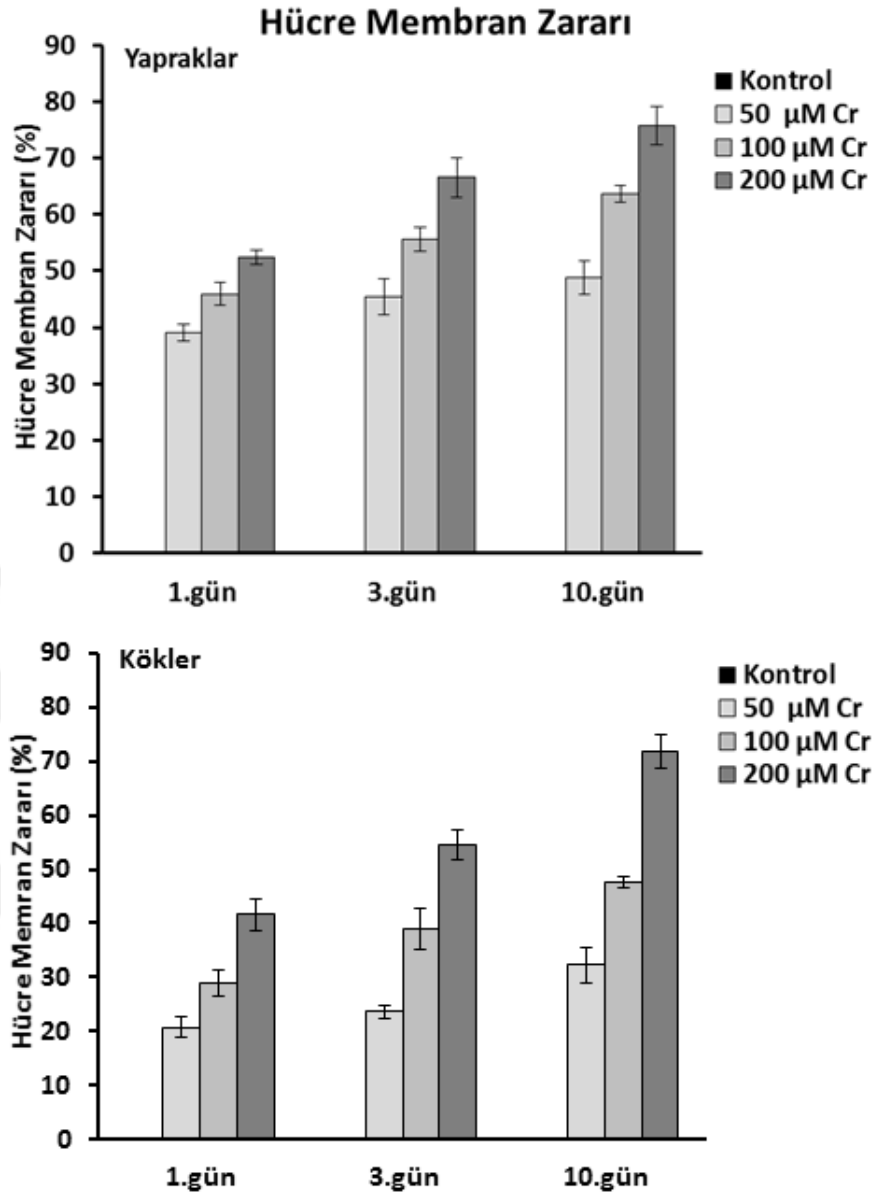
Şekil 4.3.3.1. Cr uygulanan *V. olympicum* fidelerinde iyon sızıntısına ait ortalama değerlerin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarında Cr uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yapraklarında belirlenen hücre membran zararına ait ortalama değerlerin uygulama süresine göre değişimleri Çizelge 4.3.3.2 ve Şekil 4.3.3.2’ de yer almaktadır. Buna göre hücre membran zararına ait değerlerde uygulama süresi ve Cr konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($P < 0,05$).

Çizelge 4.3.3.2. Cr uygulanan *V. olympicum* fidelerinde hücre membran zararına ait ortalama değerlerin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma).

Hücre Membran Zararı (%)				
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	0	0	0
	50 µM Cr	39,0 ± 1,5	45,4 ± 3,3	48,8 ± 2,9
	100 µM Cr	45,9 ± 2,0	55,5 ± 2,1	63,6 ± 1,4
	200 µM Cr	52,4 ± 1,3	66,5 ± 3,5	75,7 ± 3,4
	Kontrol	0	0	0
Kökler	50 µM Cr	20,7 ± 1,9	23,6 ± 1,2	32,3 ± 3,4
	100 µM Cr	28,9 ± 2,4	38,8 ± 3,8	47,5 ± 0,9
	200 µM Cr	41,5 ± 2,9	54,5 ± 2,9	71,6 ± 3,0

Hücre membran zararında da hem kök hem de yapraklarda uygulama süresi ve Cr konsantrasyonlarına bağlı olarak artış olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3.3.2.). Hücre membran zararına ait elde edilen en yüksek değer hem kök hem de yaprak kısımlarında 10 gün boyunca 200 µM Cr uygulanmış örneklerde tespit edilmiştir. Bu değerler kökler için % 71,6 ± 3,0 yapraklar için % 75,7 ± 3,4' dir.

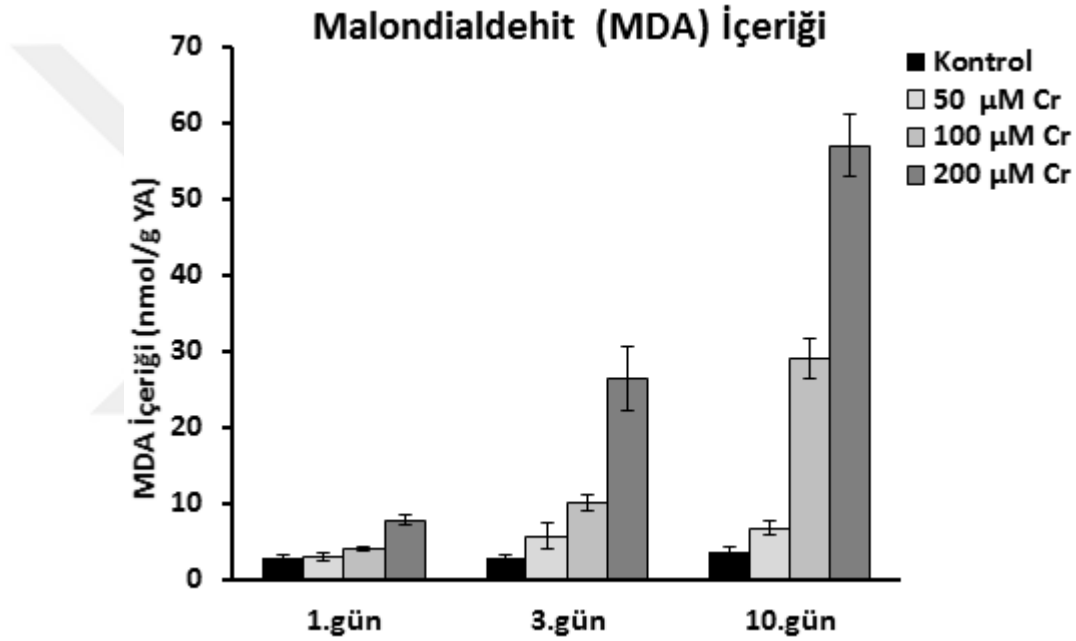


Şekil 4.3.3.2. Cr uygulanan *V. olympicum* fidelerinde hücre membran zararına ait ortalama değerlerin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Çizelge 4.3.3.3 ve Şekil 4.3.3.3' de farklı konsantrasyonlarda Cr uygulanmış fidelerin yaprak kısımlarında belirlenen ortalama MDA içeriğinin uygulama süresine göre değişimi yer almaktadır.

Çizelge 4.3.3.3. Cr uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama MDA içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. Sapma)

		MDA İçeriği (nmol/g YA)		
Konsantrasyonlar		1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	2,78 ± 0,40	2,80 ± 0,36	3,76 ± 0,62
	50 µM Cr	2,98 ± 0,49	5,74 ± 1,65	6,81 ± 0,95
	100 µM Cr	3,96 ± 0,25	10,09 ± 1,00	29,08 ± 2,53
	200 µM Cr	7,86 ± 0,68	26,44 ± 4,24	57,03 ± 4,07



Şekil 4.3.3.3. Cr uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama MDA içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Şekil 4.3.3.3' e göre MDA içeriğinde uygulama süresi ve Cr konsantrasyonlarına bağlı olarak anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir (P<0,05). En yüksek MDA içeriği 10 gün boyunca 200 µM Cr uygulanmış örneklerin yapraklarında elde edilmiştir. Bu değer 57,03 ± 4,07 nmol/g YA' dır.

Farklı konsantrasyonlarda Cr uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen iyon sızıntısı ve hücre membran zararı ile yaprak kısımlarında belirlenen MDA içeriğinin uygulama süresine göre değişimi iki yönlü ANOVA testi ile analiz edilmiştir. Elde edilen istatistiksel veriler Çizelge 4.3.3.4' de yer almaktadır.

Çizelge 4.3.3.4. İyon sızıntısı, hücre membran zararı ve yaprak kısımlarında belirlenen MDA değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Cr) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].

Faktör	İyon sızıntısı			Hücre membran zararı		MDA İçeriği	
	<i>df</i>	F	P	F	P	F	P
Kökler							
Konsantrasyonlar	3	902,92	0,000	1240,55	0,000		
Uygulama süresi	2	248,77	0,000	170,92	0,000		
Konsantrasyon x Süre	6	44,09	0,000	30,43	0,000		
Hata	48						
Yapraklar							
Konsantrasyonlar	3	981,53	0,000	2027,77	0,000	474,69	0,000
Uygulama süresi	2	239,73	0,000	133,94	0,000	411,70	0,000
Konsantrasyon x Süre	6	35,44	0,000	21,36	0,000	132,44	0,000
Hata	48						

4.3.4. Cr Uygulanmış Fidelerde Antioksidatif Enzim Aktivitesi (SOD, CAT, APX)

50, 100 ve 200 μ M konsantrasyonlarında Cr uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yapraklarında belirlenen ortalama süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.3.4.1 ve Şekil 4.3.4.1' de verilmiştir. Buna göre hem kök hem de yapraklarda belirlenen SOD aktivitesinde uygulama süresi ve Cr konsantrasyonlarına bağlı olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($P < 0,05$).

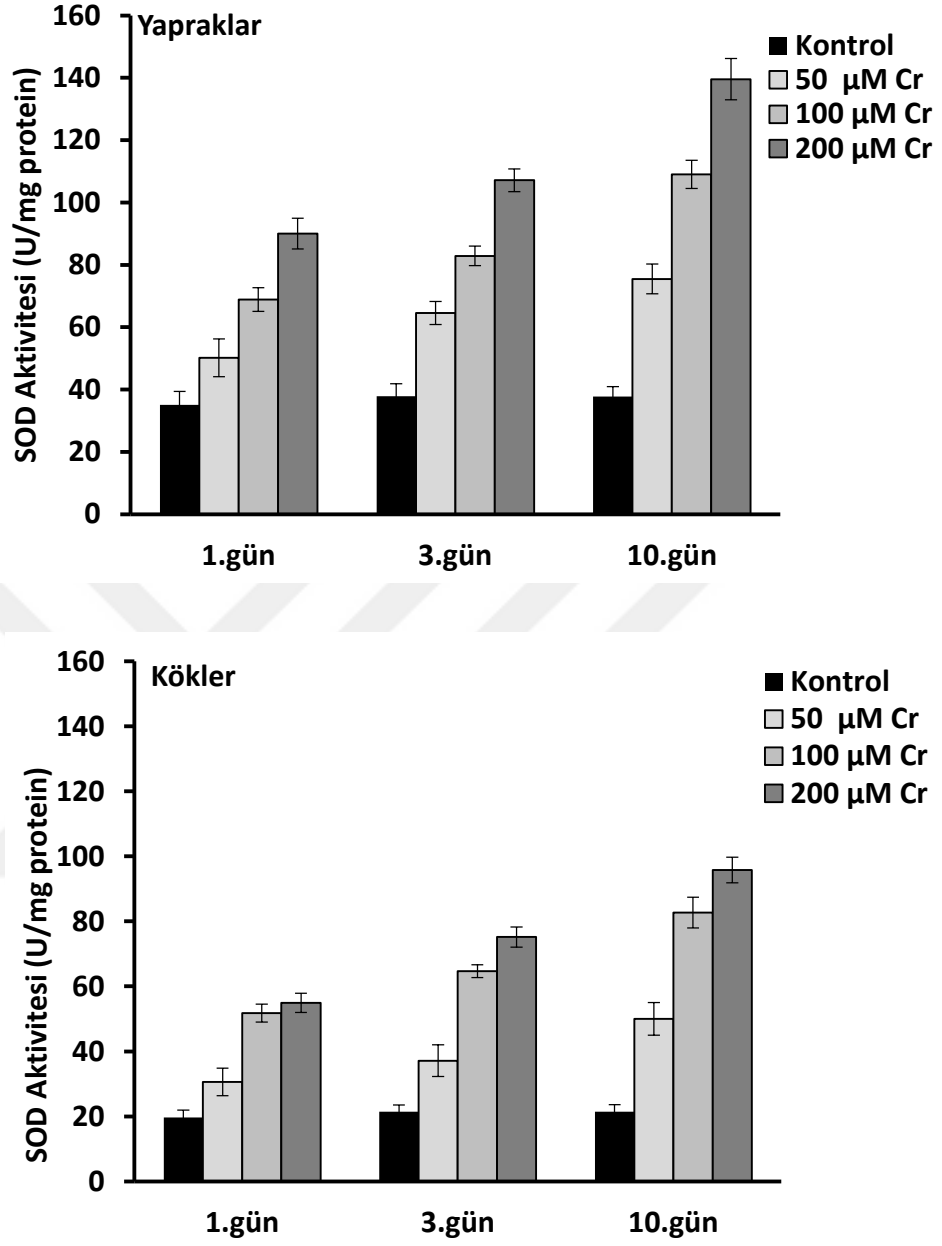
Çizelge 4.3.4.1. Cr uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama SOD aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5, Ort. ± Std. Sapma).

		SOD Aktivitesi (U/mg protein)		
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	35,12 ± 4,27	37,88 ± 4,01	37,73 ± 3,19
	50 µM Cr	50,18 ± 6,10	64,57 ± 3,66	75,50 ± 4,77
	100 µM Cr	68,89 ± 3,80	82,89 ± 3,18	109,01 ± 4,50
	200 µM Cr	90,02 ± 4,92	107,14 ± 3,67	139,57 ± 6,65
Kökler	Kontrol	19,69 ± 2,22	21,46 ± 2,08	21,42 ± 2,20
	50 µM Cr	30,57 ± 4,24	37,11 ± 4,87	49,98 ± 5,01
	100 µM Cr	51,77 ± 2,74	64,66 ± 2,00	82,73 ± 4,71
	200 µM Cr	54,92 ± 2,99	75,18 ± 3,11	95,80 ± 3,98

Çizelge 4.3.4.1’ de belirtildiği gibi Cr konsantrasyonları arttıkça SOD aktivitesinde de tüm uygulama sürelerinde artış olduğu tespit edilmiştir. 10 gün boyunca 200 µM Cr uygulanmış fidelerin yapraklarında belirlenen SOD aktivitesi 139,57 ± 6,65 U/mg protein değerine ulaşmakta olup bu değer yapraklarda elde edilen en yüksek değerdir.

Yapraklarda olduğu gibi köklerde de SOD aktivitesinin artan Cr konsantrasyonlarına ve uygulama süresine bağlı olarak arttığı görülmektedir. Köklerde elde edilen en yüksek SOD aktivitesi 10. günde 200 µM Cr uygulamasında belirlenmiştir ve bu değer 95,80 ± 3,98 U/mg protein’ dir. Ayrıca yapraklarda belirlenen SOD aktivitesindeki artışın köklere göre daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3.4.1).

Süperoksit dismutaz (SOD) Aktivitesi



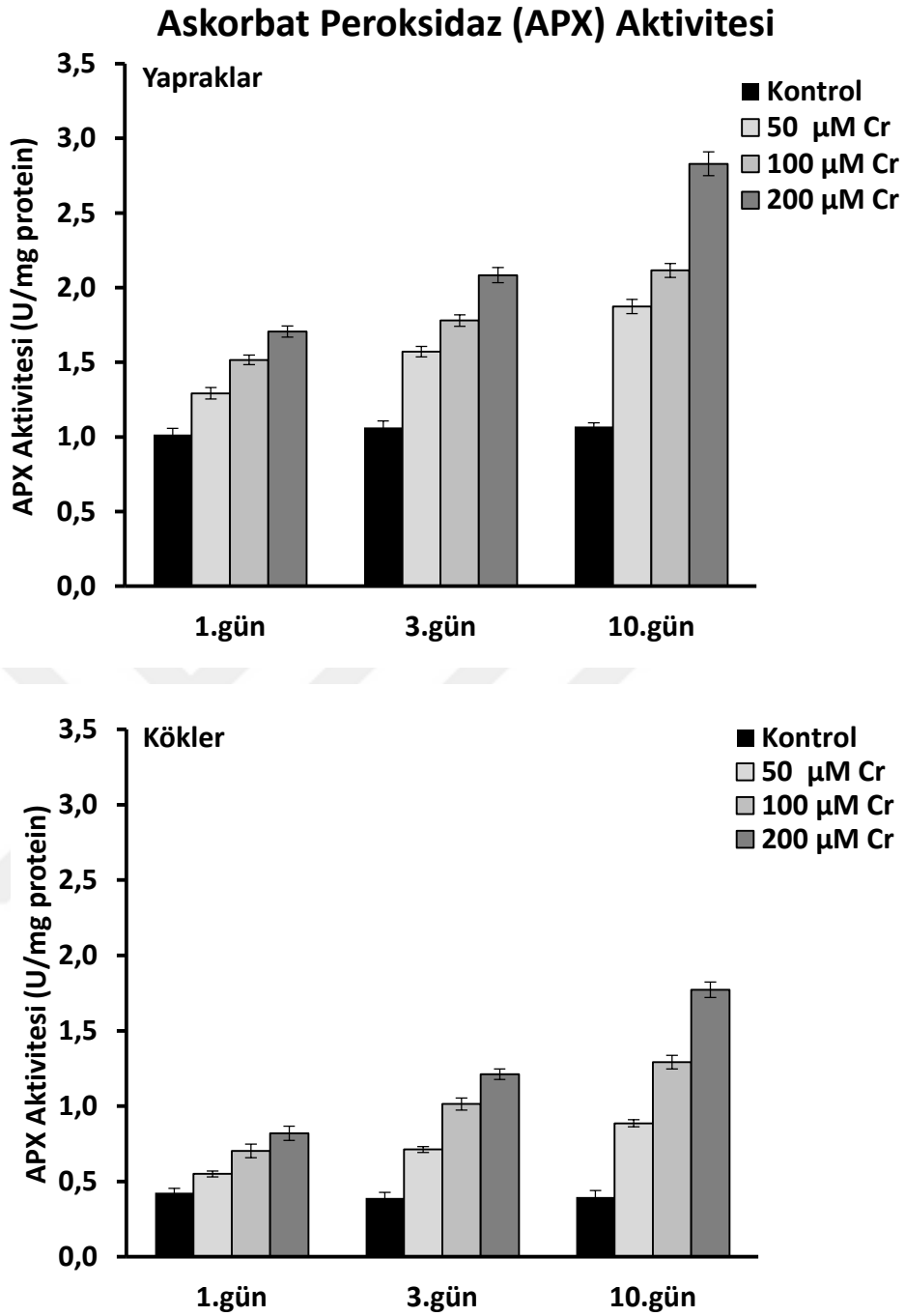
Şekil 4.3.4.1. Cr uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama SOD aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarında Cr uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yapraklarında belirlenen ortalama APX aktivitesinin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.3.4.2 ve Şekil 4.3.4.2’ de verilmiştir. Ortalama APX aktivitesi açısından hem kök hem de yapraklarda Cr konsantrasyonları ve uygulama süresine bağlı olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($P < 0,05$).

Çizelge 4.3.4.2. Cr uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama APX aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5, Ort. ± Std. Sapma).

APX Aktivitesi (U/mg protein)				
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	1,02 ± 0,04	1,06 ± 0,04	1,07 ± 0,02
	50 µM Cr	1,29 ± 0,04	1,57 ± 0,04	1,87 ± 0,05
	100 µM Cr	1,52 ± 0,03	1,78 ± 0,04	2,12 ± 0,05
	200 µM Cr	1,71 ± 0,04	2,08 ± 0,05	2,83 ± 0,08
Kökler	Kontrol	0,43 ± 0,03	0,39 ± 0,04	0,40 ± 0,04
	50 µM Cr	0,55 ± 0,02	0,71 ± 0,02	0,89 ± 0,02
	100 µM Cr	0,70 ± 0,04	1,01 ± 0,04	1,29 ± 0,04
	200 µM Cr	0,82 ± 0,05	1,21 ± 0,04	1,77 ± 0,05

Yapraklarda belirlenen en düşük APX aktivitesi kontrol örneklerinde tespit edilmesine rağmen en yüksek APX aktivitesi 10 gün boyunca 200 µM Cr uygulanmış örneklerde belirlenmiştir. Bu değer $2,83 \pm 0,08$ U/mg protein olarak belirlenmiştir. Köklerde de APX aktivitesinde meydana gelen değişikliklerin yapraklardakine benzer bir şekilde uygulama süresi ve Cr konsantrasyonlarına bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Buna göre köklerde belirlenen en yüksek APX aktivitesi, 10 gün boyunca 200 µM Cr konsantrasyonuna maruz bırakılmış örneklerde belirlenmiştir ($1,77 \pm 0,05$ U/mg protein). Ayrıca yapraklarda belirlenen APX aktivitesinin köklere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.3.4.2. Cr uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama APX aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

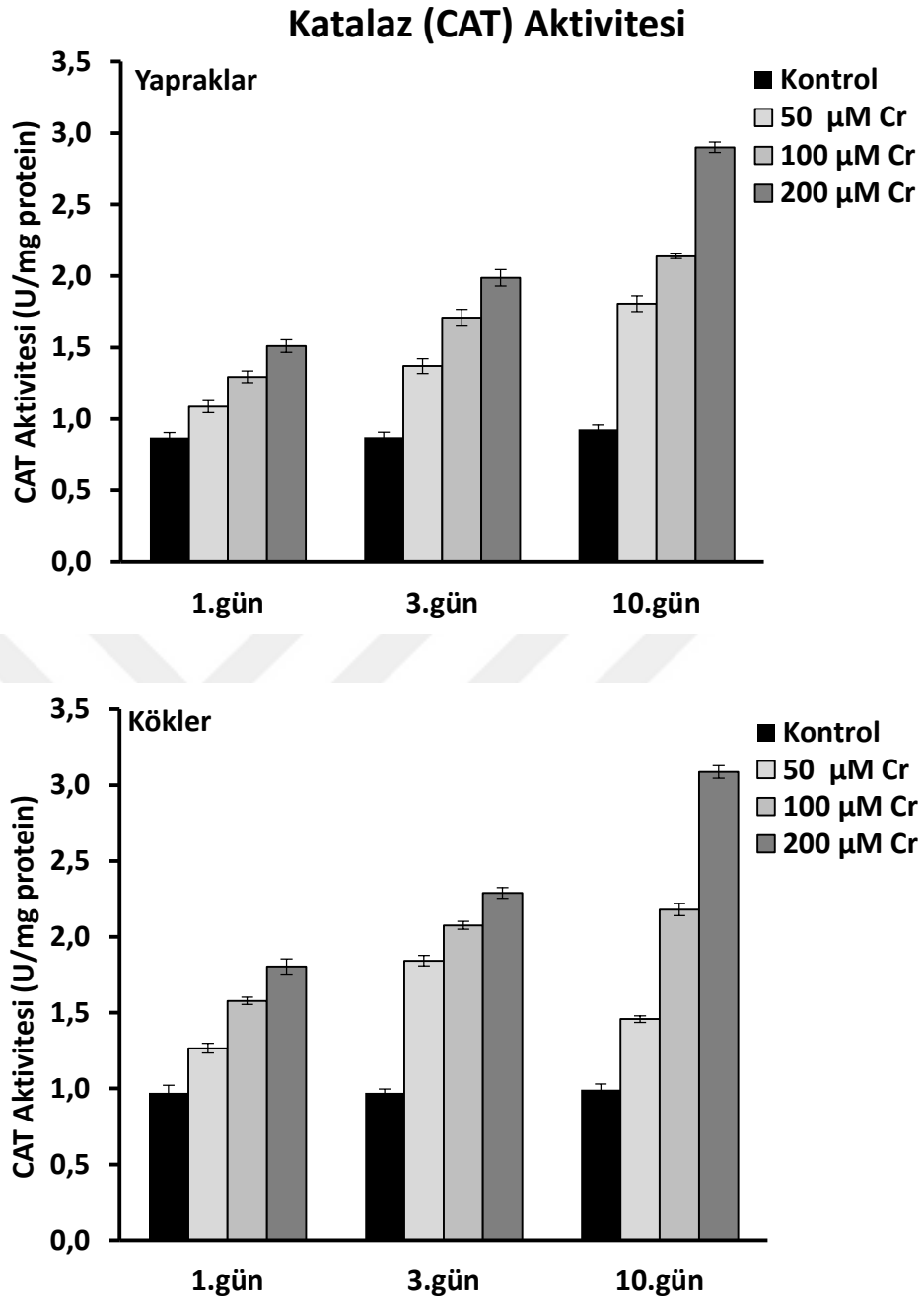
Çizelge 4.3.4.3 ve Şekil 4.3.4.3' de farklı konsantrasyonlarda Cr uygulanmış fidelerin kök ve yapraklarında belirlenen ortalama CAT aktivitesinin uygulama süresine göre değişimi yer almaktadır. Buna göre ortalama CAT aktivitesinde hem kök hem de yapraklarda uygulama süresi ve Cr konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($P < 0,05$). Tüm Cr konsantrasyonlarında hem kök hem de yapraklarda CAT

aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.3.4.3). Aynı zamanda köklerde belirlenen CAT aktivitesindeki artışın yapraklardakine göre daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.3.4.3. Cr uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama CAT aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5, Ort. ± Std. Sapma).

		CAT Aktivitesi (U/mg protein)		
Konsantrasyonlar		1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	0,87 ± 0,04	0,87 ± 0,04	0,93 ± 0,03
	50 µM Cr	1,09 ± 0,04	1,37 ± 0,05	1,81 ± 0,06
	100 µM Cr	1,29 ± 0,04	1,71 ± 0,06	2,14 ± 0,02
	200 µM Cr	1,51 ± 0,04	1,99 ± 0,06	2,90 ± 0,04
Kökler	Kontrol	0,97 ± 0,05	0,97 ± 0,02	0,99 ± 0,04
	50 µM Cr	1,27 ± 0,03	1,84 ± 0,03	1,46 ± 0,02
	100 µM Cr	1,58 ± 0,02	2,08 ± 0,03	2,18 ± 0,04
	200 µM Cr	1,80 ± 0,05	2,29 ± 0,04	3,09 ± 0,04

Yapraklarda belirlenen en yüksek CAT aktivitesi, 10 gün boyunca 200 µM Cr uygulanmış örneklerde elde edilmiştir. Bu değer 2,90 ± 0,04 U/mg protein' dir. Köklerde de yapraklara benzer bir eğilim söz konusu olup en yüksek CAT aktivitesi 10 gün boyunca 200 µM Cr uygulanmış örneklerde elde edilmiştir ve bu değer 3,09 ± 0,04 U/mg protein' dir.



Şekil 4.3.4.3. Cr uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama CAT aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Farklı konsantrasyonlarda Cr uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen antioksidatif savunma sistemi enzimlerine (SOD, CAT, APX) ait ortalama aktivite değerlerinin uygulama süresine göre değişimi iki yönlü ANOVA testi ile analiz edilmiştir. Elde edilen istatistiksel veriler Çizelge 4.3.4.4’ de yer almaktadır.

Çizelge 4.3.4.4. Antioksidatif savunma sistemi enzimlerine (SOD, CAT, APX) ait ortalama aktivite değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Cr) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].

Faktör	SOD Aktivitesi			CAT Aktivitesi		APX Aktivitesi	
	<i>df</i>	F	P	F	P	F	P
Köklər							
Konsantrasyonlar	3	592,70	0,000	3498,00	0,000	1154,05	0,000
Uygulama süresi	2	186,35	0,000	854,72	0,000	595,77	0,000
Konsantrasyon x Süre	6	24,57	0,000	249,05	0,000	120,98	0,000
Hata	48						
Yapraklar							
Konsantrasyonlar	3	611,54	0,000	1700,14	0,000	1373,48	0,000
Uygulama süresi	2	171,53	0,000	1194,12	0,000	692,02	0,000
Konsantrasyon x Süre	6	22,13	0,000	162,07	0,000	99,27	0,000
Hata	48						

4.4. Nikel (Ni)

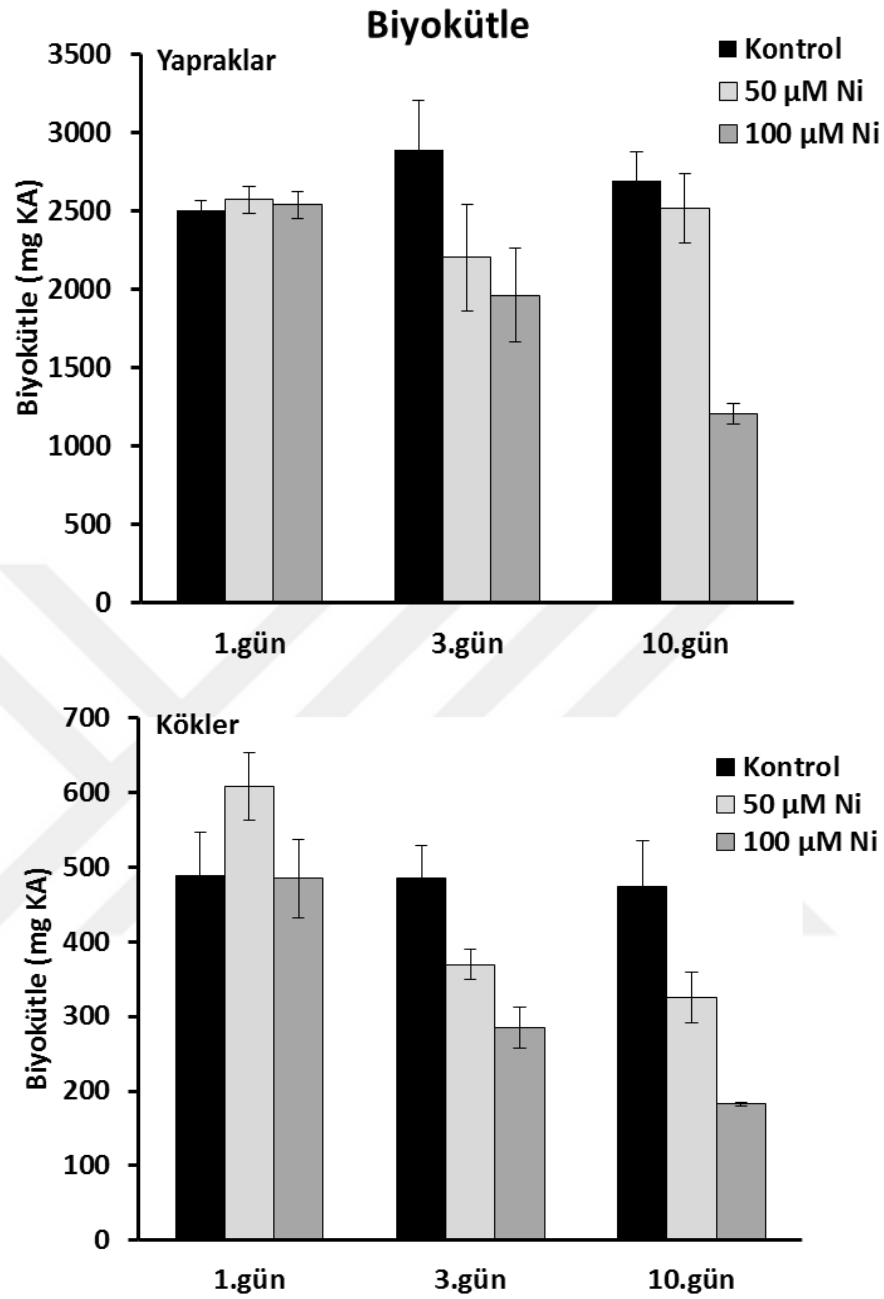
4.4.1. Ni Uygulanmış Fidelerde Büyüme Parametreleri (Biyokütle, Su İçeriği ve Klorofil İçeriği)

Çizelge 4.4.1.1 ve Şekil 4.4.1.1’ de 50 ve 100 μM konsantrasyonlarında Ni uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin yaprak ve köklerinde belirlenen ortalama biyokütle değerleri (mg KA) verilmiştir. Buna göre hem yaprak hem de köklerde belirlenen ortalama biyokütle değerlerinde uygulama süresi ve Ni konsantrasyonlarına bağlı olarak anlamlı fark bulunmuştur ($P < 0,05$).

Çizelge 4.4.1.1. Ni uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama biyokütle değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi ($n=5$; Ort. \pm Std. sapma).

		Biyokütle (mg KA)		
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	2501,4 \pm 66,3	2889,8 \pm 318,7	2689,7 \pm 187,5
	50 μM Ni	2571,5 \pm 83,6	2202,4 \pm 341,4	2516,8 \pm 218,3
	100 μM Ni	2538,3 \pm 84,4	1961,1 \pm 297,7	1208,5 \pm 65,4
Kökler	Kontrol	487,4 \pm 58,3	484,9 \pm 44,1	474,2 \pm 60,7
	50 μM Ni	608,1 \pm 45,3	369,1 \pm 19,8	325,0 \pm 33,5
	100 μM Ni	484,5 \pm 52,6	284,9 \pm 27,2	182,3 \pm 2,9

Çizelge 4.4.1.1’e göre 50 μM Ni uygulamasının 1. günde köklerin biyokütlesinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Diğer uygulama sürelerinde ise Ni konsantrasyonu arttıkça her iki bitki kısmında da biyokütlenin kontrole göre azaldığı belirlenmiştir. Yaprakların biyokütlesinde ise 1. günde uygulanan Ni konsantrasyonlarının belirgin bir fark oluşturmadığı, fakat 3 ve 10. günlerde uygulama süresindeki artış ile birlikte yapraklardaki biyokütlenin azaldığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda biyokütledeki en büyük azalış hem kök hem de yaprak kısımları için 10 gün boyunca 100 μM Ni uygulanmış örneklerde elde edilmiştir (Şekil 4.4.1.1).



Şekil 4.4.1.1. Ni uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama biyokütle değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5).

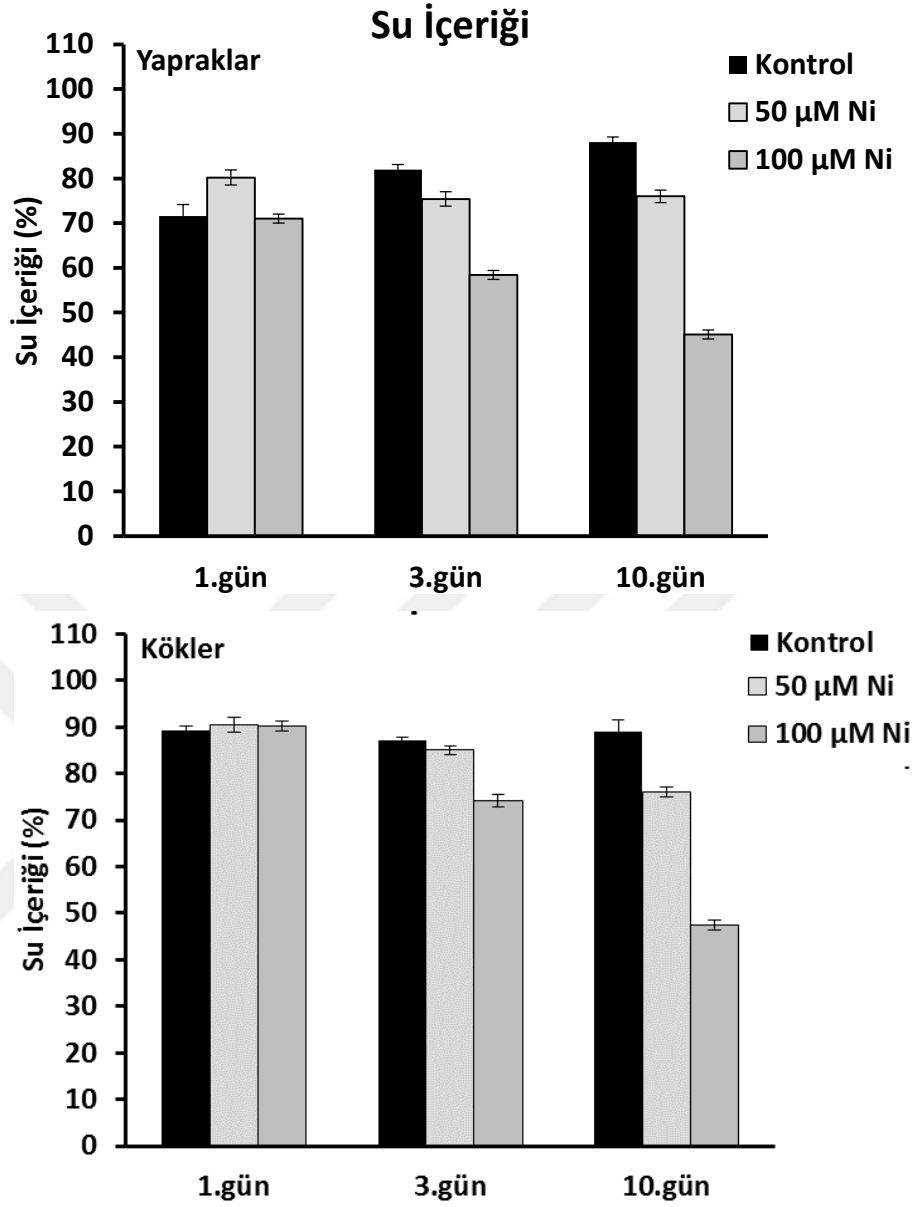
V. olympicum fidelerinin yaprak ve kök kısımlarında belirlenen ortalama su içeriğinde uygulanan Ni konsantrasyonlarına ve uygulama süresine bağlı olarak meydana gelen değişimler Çizelge 4.4.1.2 ve Şekil 4.4.1.2' de verilmiştir. Buna göre uygulama süresi ve Ni konsantrasyonları arasında su içeriğinde anlamlı bir azalış olduğu görülmektedir ($P<0,05$).

Çizelge 4.4.1.2. Ni uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama su içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma).

		Su içeriği (%)		
	Konsantrasyon	1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	71,6 \pm 2,6	82,0 \pm 1,1	88,1 \pm 1,2
	50 μ M Ni	80,2 \pm 1,7	75,4 \pm 1,6	76,0 \pm 1,4
	100 μ M Ni	71,0 \pm 1,0	58,4 \pm 1,0	45,1 \pm 1,0
Kökler	Kontrol	89,3 \pm 1,0	87,0 \pm 0,7	89,0 \pm 2,4
	50 μ M Ni	90,4 \pm 1,7	85,0 \pm 1,0	76,1 \pm 1,1
	100 μ M Ni	90,1 \pm 1,1	74,1 \pm 1,4	47,4 \pm 1,0

1. günde köklerin su içeriğinde Ni konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak herhangi bir değişim meydana gelmediği, ancak 3 ve 10. günlerde Ni konsantrasyonlarındaki artışın köklerin su içeriğinde azalışa neden olduğu tespit edilmiştir. Buna göre köklerdeki en düşük su içeriği 10 gün boyunca 100 μ M Ni uygulanmış örneklerde elde edilmiştir (Şekil 4.4.1.2). Bu değer, % 47,4 \pm 1,0 olarak belirlenmiştir.

Yapraklarda ise uygulamanın ilk gününde 50 μ M Ni konsantrasyonunun su içeriğini arttırdığı tespit edilmiştir. Diğer uygulama sürelerinde ise köklerdeki benzer olarak artan Ni konsantrasyonlarının yapraklardaki su içeriğini azalttığı belirlenmiştir. Yapraklardaki en düşük su içeriği, yine 10. gün boyunca 100 μ M Ni uygulanmış örneklerde tespit edilmiştir. Elde edilen bu değer % 45,1 \pm 1,0 dir.



Şekil 4.4.1.2. Ni uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama su içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

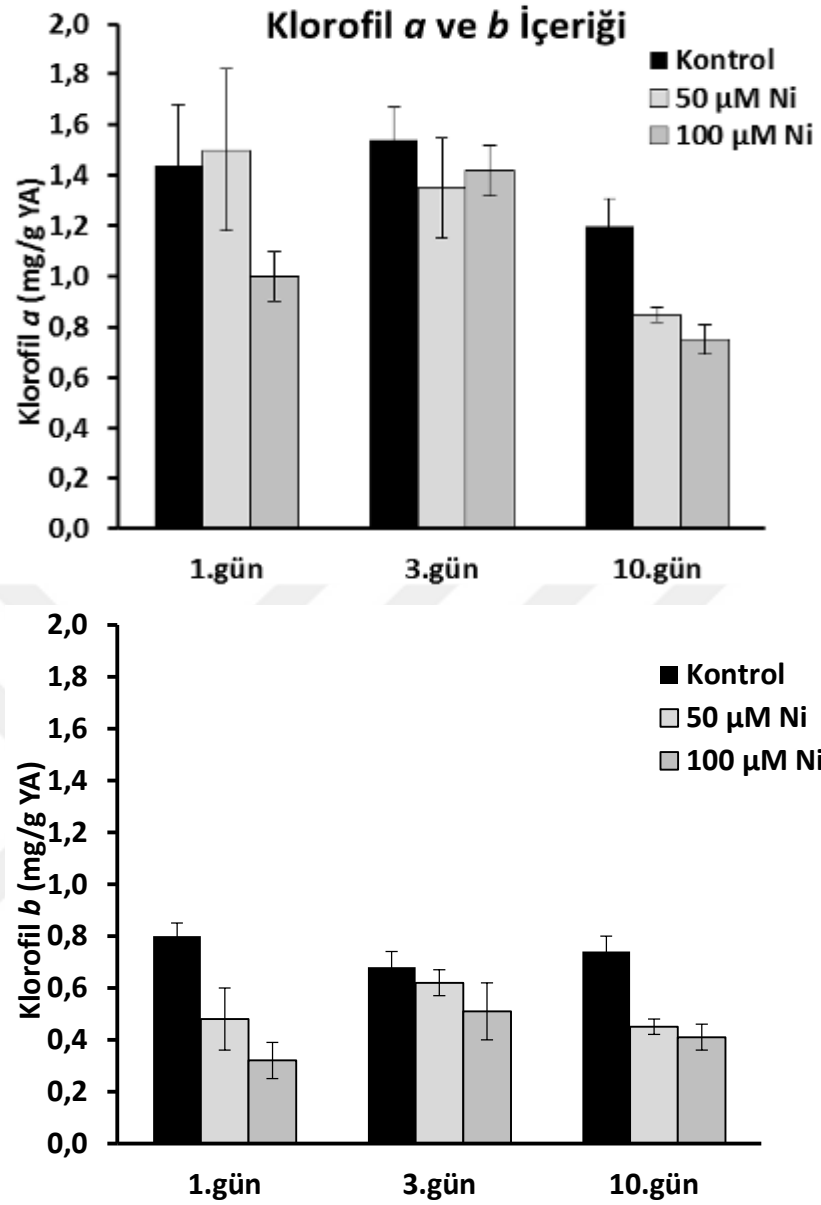
50 ve 100 µM konsantrasyonlarında Ni uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin yapraklarında belirlenen ortalama klorofil *a* ve *b* içeriğinin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.4.1.3 ve Şekil 4.4.1.3' de verilmiştir. Buna göre ortalama klorofil *a* ve *b* içeriğinde uygulama süresi ve Ni konsantrasyonlarına bağlı olarak anlamlı fark bulunmuştur ($P < 0,05$). Buna göre *V. olympicum* fidelerinde belirlenen klorofil *a* ve *b* içeriğinin artan Ni konsantrasyonları ve uygulama süresine bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Elde edilen en düşük klorofil *a* ve *b* içeriği 10 gün boyunca 100 µM Ni stresine

maruz bırakılmış örneklerde belirlenmiştir. Bu değer klorofil *a* için $0,75 \pm 0,06$ mg/g YA ve klorofil *b* için $0,41 \pm 0,05$ mg/g YA' dir.

Çizelge 4.4.1.3. Ni uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama klorofil *a* ve *b* içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5, Ort. \pm Std. Sapma).

Klorofil <i>a</i> ve <i>b</i> İçeriği (mg/g YA)				
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	10.gün
Klorofil <i>a</i>	Kontrol	1,44 \pm 0,24	1,54 \pm 0,13	1,20 \pm 0,11
	50 μM Ni	1,50 \pm 0,32	1,35 \pm 0,20	0,85 \pm 0,03
	100 μM Ni	1,00 \pm 0,10	1,42 \pm 0,10	0,75 \pm 0,06
Klorofil <i>b</i>	Kontrol	0,80 \pm 0,05	0,68 \pm 0,06	0,74 \pm 0,06
	50 μM Ni	0,48 \pm 0,12	0,62 \pm 0,05	0,45 \pm 0,03
	100 μM Ni	0,32 \pm 0,07	0,51 \pm 0,11	0,41 \pm 0,05

Ayrıca uygulamanın 3. gününde 100 μ M Ni konsantrasyonunda belirlenen klorofil *a* içeriğinin aynı konsantrasyonda 1. gündeki klorofil *a* içeriğine kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.4.1.3). Bu değer $1,42 \pm 0,10$ mg/g YA olarak belirlenmiştir. Klorofil *b* içeriğinde de buna benzer olarak uygulama süreleri arasında 50 ve 100 μ M Ni uygulamasında 3. günde klorofil *b* içeriğinin arttığı tespit edilmiştir. Elde edilen değerler 50 μ M Ni için $0,62 \pm 0,05$ mg/g YA, 100 μ M Ni için $0,51 \pm 0,11$ mg/g YA' dır.



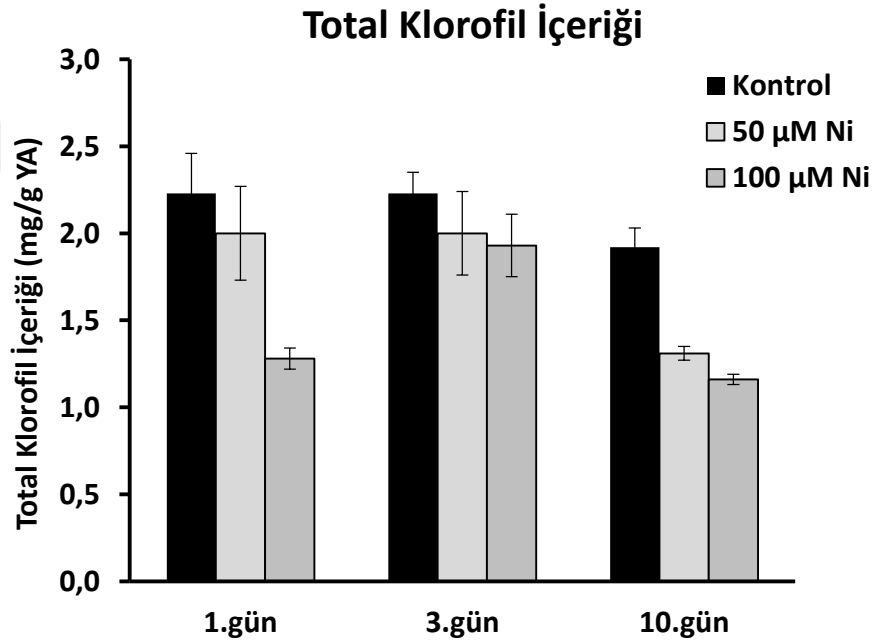
Şekil 4.4.1.3. Ni uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama klorofil *a* ve *b* içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5, Ort. ± Std. Sapma).

50 ve 100 μM konsantrasyonlarında Ni uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin yapraklarında belirlenen ortalama total klorofil içeriğinin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.4.1.4 ve Şekil 4.4.1.4' de verilmiştir. Buna göre ortalama total klorofil içeriği açısından uygulama süresi ve metal konsantrasyonları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($P < 0,05$).

Çizelge 4.4.1.4. Ni uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama total klorofil içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5).

Total Klorofil İçeriği (mg/g YA)				
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	10.gün
Total	Kontrol	2,23 ± 0,23	2,23 ± 0,12	1,92 ± 0,11
Klorofil	50 µM Ni	2,00 ± 0,27	2,00 ± 0,24	1,31 ± 0,04
	100 µM Ni	1,28 ± 0,06	1,93 ± 0,18	1,16 ± 0,03

Çizelge 4.4.1.4' e göre 50 µM Ni konsantrasyonunun 1. ve 3. günlerde total klorofil içeriğinde meydana getirdiği etkinin benzer olduğu tespit edilmiştir. 10. günde ise aynı Ni konsantrasyonunun total klorofil içeriğinde kontrole göre daha büyük bir azalış meydana getirdiği belirlenmiştir. Ayrıca uygulama süresine bağlı olarak 100 µM Ni konsantrasyonu 3. günde total klorofil içeriğinde artışa neden olmuştur (Çizelge 4.4.1.4.).



Şekil 4.4.1.4. Ni uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama total klorofil içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5, Ort. ± Std. Sapma).

Farklı konsantrasyonlarda Ni uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen büyüme parametrelerine ait (biyokütle, su içeriği, klorofil *a*, *b* ve total klorofil içeriği) ortalama değerlerin uygulama süresine göre değişimi iki yönlü ANOVA testi ile analiz edilmiştir. Elde edilen istatistiksel veriler Çizelge 4.4.1.4' de yer almaktadır.

Çizelge 4.4.1.5. Biyokütle, su ve klorofil değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Ni) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].

Faktör	Biyokütle		Su İçeriği		Klorofil <i>a</i> İçeriği		Klorofil <i>b</i> İçeriği		Total Klorofil İçeriği		
	<i>df</i>	F	<i>P</i>	F	<i>P</i>	F	<i>P</i>	F	<i>P</i>	F	<i>P</i>
Kökler											
Konsantrasyonlar	2	12,06	0,000	141,08	0,000						
Uygulama süresi	2	17,92	0,000	147,72	0,000						
Konsantrasyon x Süre	4	4,13	0,007	67,33	0,000						
Hata	36										
Yapraklar											
Konsantrasyonlar	2	10,62	0,000	195,60	0,000	5,14	0,002	6,67	0,000	8,20	0,000
Uygulama süresi	2	2,61	0,088	6,94	0,003	15,62	0,000	76,12	0,000	59,58	0,000
Konsantrasyon x Süre	4	4,39	0,005	51,58	0,000	37,41	0,000	4,86	0,014	46,54	0,000
Hata	36										

4.4.2. Ni Uygulanmış Fidelerde Azot Metabolizması Enzimlerinin (NR ve GS) Aktivitesi ve Eriyebilir Protein İçeriği

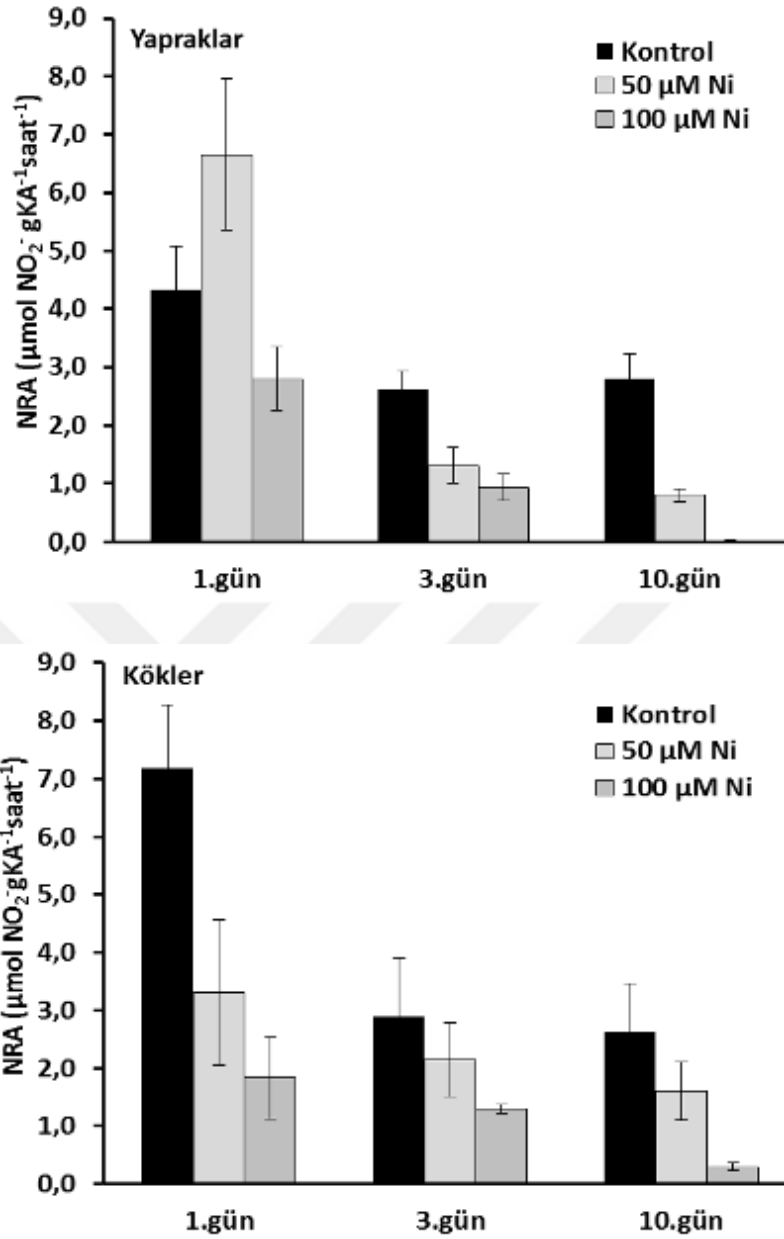
50 ve 100 μM konsantrasyonlarında Ni uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen azot metabolizması enzimlerinden NR aktivitesine ait ortalama değerlerin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.4.2.1 ve Şekil 4.4.2.1' de verilmiştir. Buna göre ortalama NR aktivitesi açısından uygulama süresi ve Ni konsantrasyonları arasında hem yaprak hem de köklerde anlamlı fark ($P < 0,05$) bulunmuştur.

Çizelge 4.4.2.1. Ni uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama NR aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi ($n=5$; Ort. \pm Std. Sapma).

		NR Aktivitesi ($\mu\text{mol NO}_2^- \text{gKA}^{-1} \text{.saat}^{-1}$)		
	Konsantrasyon	1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	4,34 \pm 0,73	2,63 \pm 0,30	2,80 \pm 0,43
	50 $\mu\text{M Ni}$	6,65 \pm 1,30	1,31 \pm 0,31	0,80 \pm 0,11
	100 $\mu\text{M Ni}$	2,80 \pm 0,54	0,93 \pm 0,23	0,02 \pm 0,01
Kökler	Kontrol	7,18 \pm 1,10	2,90 \pm 1,00	2,63 \pm 0,83
	50 $\mu\text{M Ni}$	3,31 \pm 1,25	2,15 \pm 0,64	1,61 \pm 0,50
	100 $\mu\text{M Ni}$	1,83 \pm 0,70	1,30 \pm 0,07	0,30 \pm 0,07

Artan Ni konsantrasyonları ve uygulama süresi her iki bitki kısmında da NR aktivitesinde azalışa neden olmuştur. Sadece 1. günde 50 $\mu\text{M Ni}$ uygulamasının yaprak kısımlarına ait NR aktivitesinde bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.4.2.1). En düşük NR aktivitesinin her iki bitki kısmında da 10 gün boyunca 100 $\mu\text{M Ni}$ uygulanmış örneklerde elde edilmiştir. Bu değerler yapraklar için $0,02 \pm 0,01 \mu\text{mol NO}_2^- \text{gKA}^{-1} \text{ saat}^{-1}$, kökler için $0,30 \pm 0,07 \mu\text{mol NO}_2^- \text{gKA}^{-1} \text{ saat}^{-1}$ 'dir.

Nitrat Redüktaz (NR) Aktivitesi



Şekil 4.4.2.1. Ni uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama NR aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

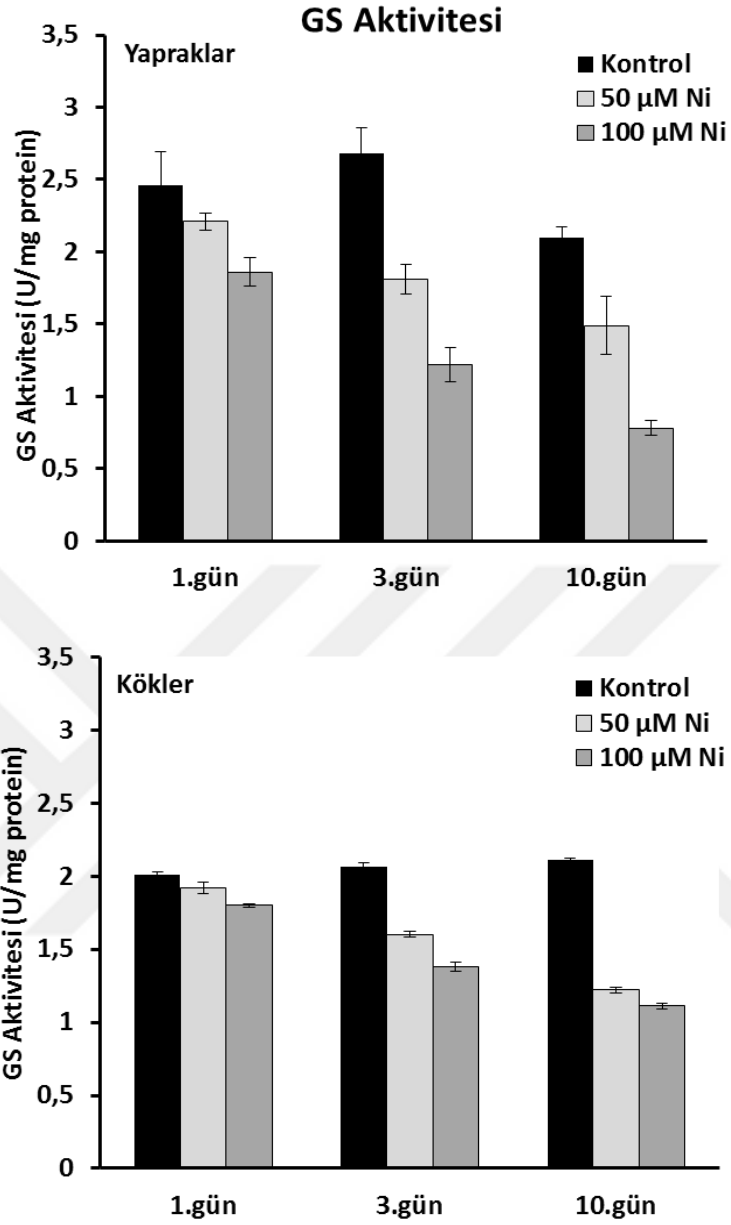
Farklı konsantrasyonlarda Ni uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen ortalama GS aktivitesinin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.4.2.2 ve Şekil 4.4.2.2' de verilmiştir. Buna göre ortalama GS aktivitesinde uygulama süresi ve Ni konsantrasyonları arasında hem yaprak hem de köklerde anlamlı fark bulunmuştur ($P < 0,05$).

Çizelge 4.4.2.2. Ni uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama GS aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. Sapma).

		GS Aktivitesi (U/mg protein)		
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	2,46 ± 0,23	2,68 ± 0,18	2,10 ± 0,07
	50 µM Ni	2,21 ± 0,06	1,81 ± 0,10	1,49 ± 0,20
	100 µM Ni	1,86 ± 0,10	1,22 ± 0,12	0,78 ± 0,05
Kökler	Kontrol	2,01 ± 0,02	2,06 ± 0,03	2,11 ± 0,01
	50 µM Ni	1,92 ± 0,04	1,60 ± 0,02	1,22 ± 0,02
	100 µM Ni	1,80 ± 0,01	1,38 ± 0,03	1,11 ± 0,02

50 ve 100 µM konsantrasyonlarında Ni uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen GS aktivitesinin artan Ni konsantrasyonları ve uygulama süresi ile birlikte azaldığı tespit edilmiştir. Buna göre 10 gün boyunca 100 µM Ni uygulanmış fidelerin yapraklarında belirlenen GS aktivitesinin kontrole göre % 62,8 oranında azaldığı, köklerde belirlenen GS aktivitesinin ise % 47,4 oranında azaldığı belirlenmiştir (Çizelge 4.4.2.2.).

Ayrıca yaprak kısımlarına ait GS aktivitesinde meydana gelen azalışın köklere göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. En düşük GS aktivitesi her iki bitki kısmında da 10 gün boyunca 100 µM Ni uygulanmış örneklerde elde edilmiştir. Bu değerler yapraklar için $0,78 \pm 0,05$ U/mg protein, kökler için $1,11 \pm 0,02$ U/mg protein'dir.



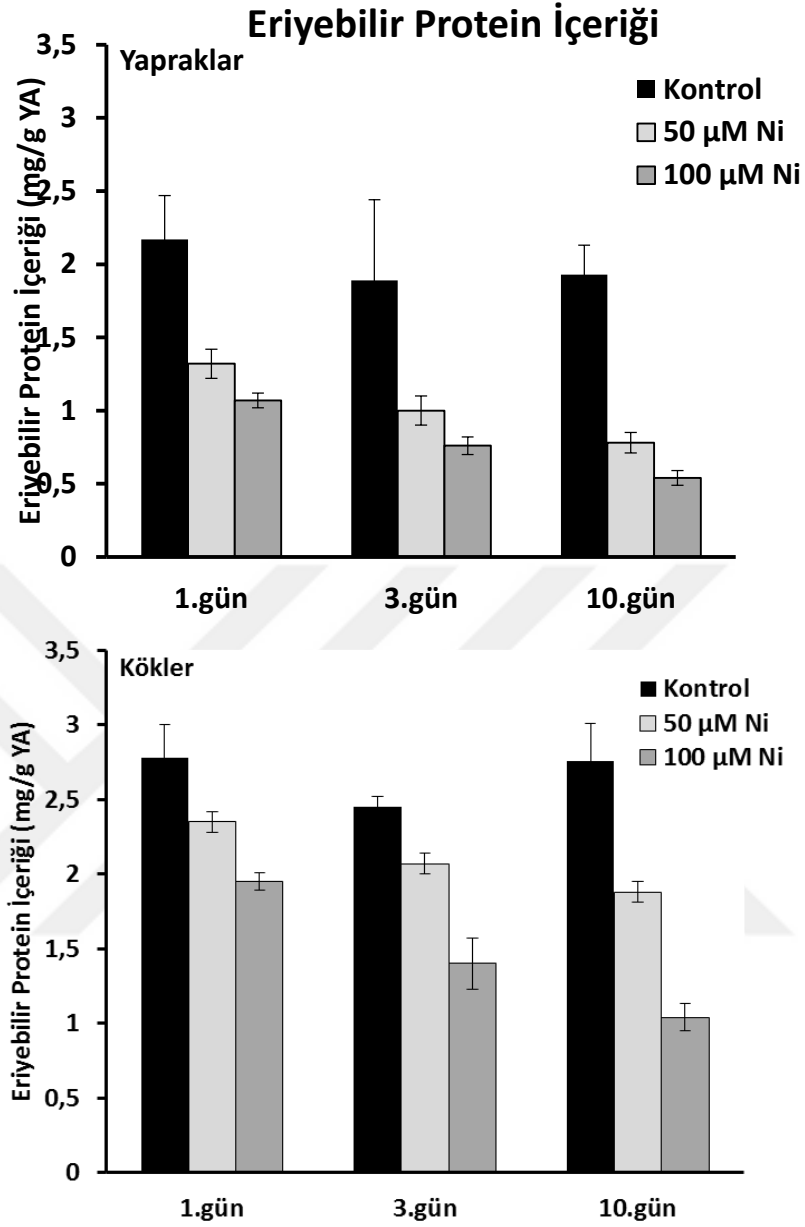
Şekil 4.4.2.2. Ni uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama GS aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Çizelge 4.4.2.3 ve Şekil 4.4.2.3’ de Ni uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarından elde edilen ortalama eriyebilir protein içeriğinin uygulama süresine göre değişimi yer almaktadır. Buna göre ortalama eriyebilir protein içeriği açısından uygulama süresi ve Ni konsantrasyonları arasında hem yaprak hem de köklerde anlamlı fark ($P<0,05$) bulunmuştur. NR ve GS aktivitesindeki sonuçlara paralel olarak artan Ni konsantrasyonlarının ve uygulama süresinin eriyebilir protein içeriğini azalttığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.4.2.3).

Çizelge 4.4.2.3. Ni uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama eriyebilir protein içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. Sapma).

		Eriyebilir Protein İçeriği (mg/g YA)		
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	2,17 ± 0,30	1,89 ± 0,55	1,93 ± 0,20
	50 µM Ni	1,32 ± 0,10	1,00 ± 0,10	0,78 ± 0,07
	100 µM Ni	1,07 ± 0,05	0,76 ± 0,06	0,54 ± 0,05
Kökler	Kontrol	2,78 ± 0,22	2,45 ± 0,07	2,76 ± 0,25
	50 µM Ni	2,35 ± 0,07	2,07 ± 0,07	1,88 ± 0,07
	100 µM Ni	1,95 ± 0,06	1,40 ± 0,17	1,04 ± 0,09

Ayrıca köklerde belirlenen eriyebilir protein içeriğinin yapraklara göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Örneğin; köklerde $2,78 \pm 0,22$ mg/g YA olarak belirlenen protein içeriği yapraklarda $2,17 \pm 0,30$ mg/g YA'dır. Bununla birlikte kök kısımlarının protein içeriğindeki azalışın yapraklardaki kadar olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.4.2.3). Hem kök hem de yaprak kısımlarında belirlenen en düşük protein içeriği 10 gün boyunca 100 µM Ni uygulanmış örneklerle aittir. Bu değerler yapraklar için $0,54 \pm 0,05$ mg/g YA, kökler için $1,04 \pm 0,09$ mg/g YA olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.4.2.3. Ni uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama eriyebilir protein içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Farklı konsantrasyonlarda Ni uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen azot metabolizması enzimlerine ait (NR ve GS) ortalama aktivite değerlerinin ve eriyebilir protein içeriğinin uygulama süresine göre değişimi iki yönlü ANOVA testi ile analiz edilmiştir. Elde edilen istatistiksel veriler Çizelge 4.4.2.4' de verilmiştir.

Çizelge 4.4.2.4. Azot metabolizması enzimlerine ait (NR ve GS) ortalama aktivite değerleri ve eriyebilir protein içeriğinin için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Ni) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].

Faktör	df	NR Aktivitesi		GS Aktivitesi		Eriyebilir Protein İçeriği	
		F	P	F	P	F	P
Kökler							
Konsantrasyonlar	2	58,42	0,000	2229,53	0,000	281,39	0,000
Uygulama süresi	2	44,31	0,000	947,28	0,000	48,56	0,000
Konsantrasyon x Süre	4	9,41	0,000	357,21	0,000	14,49	0,000
Hata	36						
Yapraklar							
Konsantrasyonlar	2	52,68	0,000	246,76	0,000	120,60	0,000
Uygulama süresi	2	154,93	0,000	107,36	0,000	14,90	0,000
Konsantrasyon x Süre	4	23,98	0,000	14,87	0,000	0,84	0,511
Hata	36						

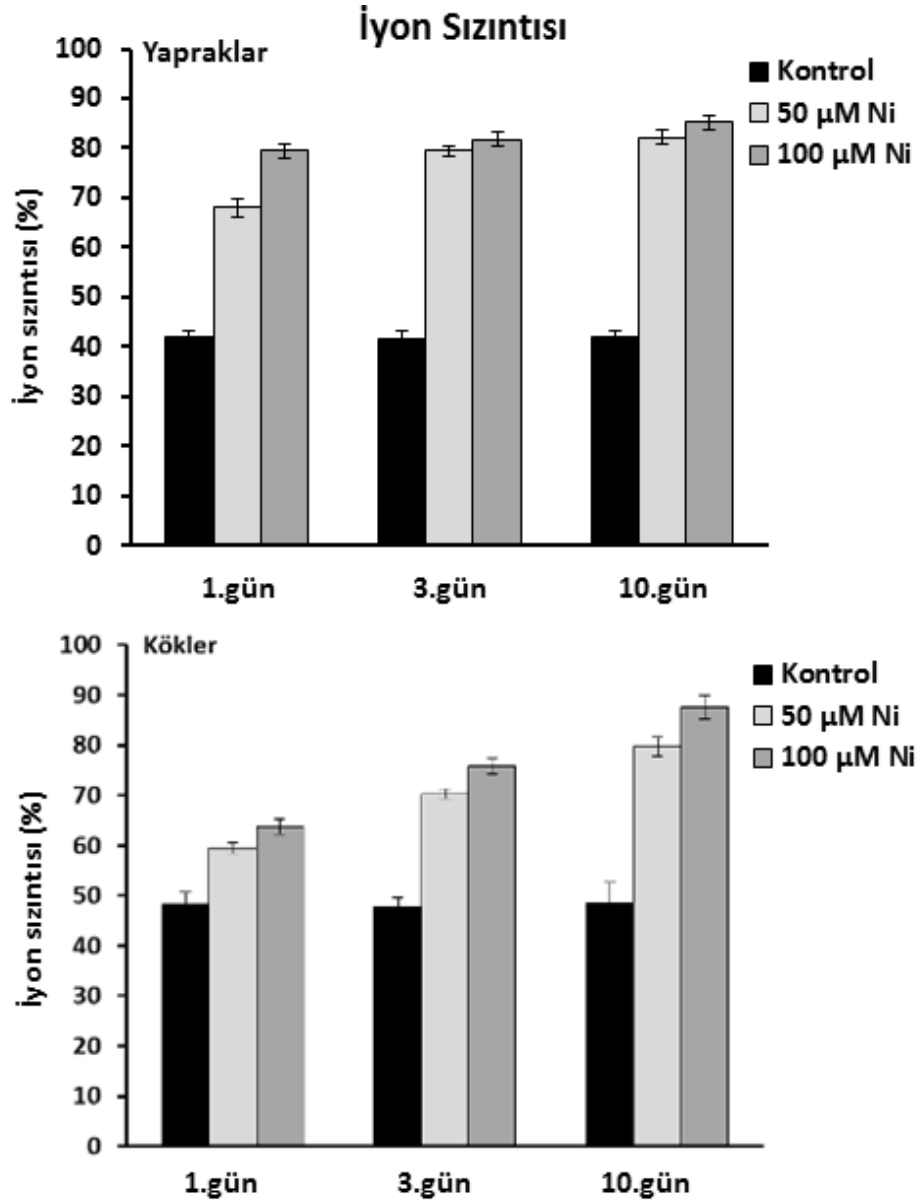
4.4.3. Ni Uygulanmış Fidelerde İyon sızıntısı, Hücre Membran Zararı ve Malondialdehit (MDA) içeriği

50 ve 100 µM konsantrasyonlarında Ni uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen iyon sızıntısına ait ortalama değerlerin (%) uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.4.3.1 ve Şekil 4.4.3.1’ de yer almaktadır. Buna göre Ni konsantrasyonları ve uygulama süresine bağlı olarak iyon sızıntısına ait % değerlerinde anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir ($P < 0,05$).

Çizelge 4.4.3.1. Ni uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama iyon sızıntısı değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma).

		İyon sızıntısı (%)		
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	41,9 ± 1,3	41,6 ± 1,7	42,1 ± 1,0
	50 µM Ni	68,1 ± 1,8	79,5 ± 1,1	82,2 ± 1,4
	100 µM Ni	79,4 ± 1,3	81,7 ± 1,5	85,1 ± 1,5
Kökler	Kontrol	48,4 ± 2,3	47,7 ± 1,9	48,6 ± 4,0
	50 µM Ni	59,5 ± 1,0	70,3 ± 1,0	79,7 ± 2,0
	100 µM Ni	63,8 ± 1,4	75,9 ± 1,5	87,7 ± 2,4

Çizelge 4.4.3.1’ de artan Ni konsantrasyonlarının kök ve yaprak hücrelerindeki membranlarda meydana gelen iyon sızıntısını uygulama süresine bağlı olarak arttırdığı görülmektedir. Elde edilen en yüksek değer tüm bitki kısımları için 10 gün boyunca 100 µM Ni uygulanmış örneklerde belirlenmiştir. Bu değerler kök için % 87,7 ± 2,4 yaprak için % 85,1 ± 1,5’ dir.



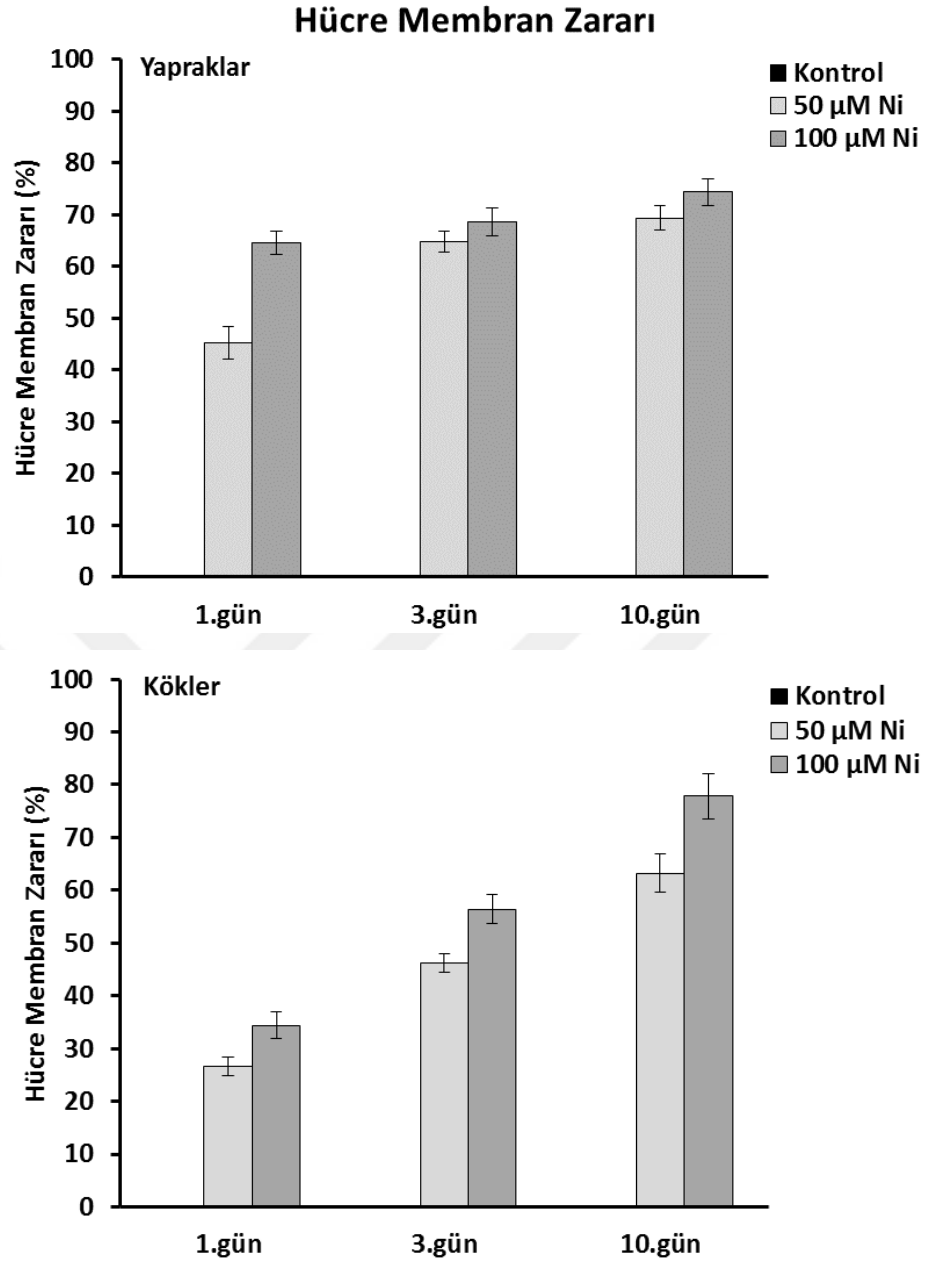
Şekil 4.4.3.1. Ni uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama iyon sızıntısı değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Çizelge 4.4.3.2 ve Şekil 4.4.3.2’de 50 ve 100 µM konsantrasyonlarında Ni uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yapraklarında belirlenen hücre membran zararına ait ortalama değerlerin uygulama süresine göre değişimi yer almaktadır. Buna göre hücre membran zararı açısından uygulama süresi ve Ni konsantrasyonları arasında hem kök hem de yapraklarda anlamlı bir fark bulunmuştur ($P<0,05$). Ni konsantrasyonlarında ve uygulama süresindeki artış ile birlikte hücre membran zararının arttığı görülmektedir.

Çizelge 4.4.3.2. Ni uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama hücre membran zararının konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. \pm Std. sapma).

		Hücre Membran Zararı (%)		
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	0	0	0
	50 μ M Ni	45,2 \pm 3,1	64,8 \pm 2,0	69,4 \pm 2,4
	100 μ M Ni	64,6 \pm 2,3	68,6 \pm 2,6	74,4 \pm 2,6
Kökler	Kontrol	0	0	0
	50 μ M Ni	26,6 \pm 1,7	46,2 \pm 1,8	63,2 \pm 3,6
	100 μ M Ni	34,4 \pm 2,6	56,4 \pm 2,7	77,8 \pm 4,3

Çizelge 4.4.3.2' ye göre hücre membran zararına ait elde edilen en yüksek değerler 10 gün boyunca 100 μ M Ni stresine maruz bırakılmış fidelerin kök ve yapraklarında elde edilmiştir. Bu değerler yapraklar için % 74,4 \pm 2,6 kökler için % 77,8 \pm 4,3' dir. Ayrıca iki farklı konsantrasyondaki Ni uygulamasında 1. günde yaprak kısımlarına ait hücre membranlarında meydana gelen zararın köklere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. 10. günde ise 50 μ M Ni uygulamasında yapraklarda ve 100 μ M Ni uygulamasında ise kök kısımlarında belirlenen hücre membran zararının daha fazla olduğu belirlenmiştir.

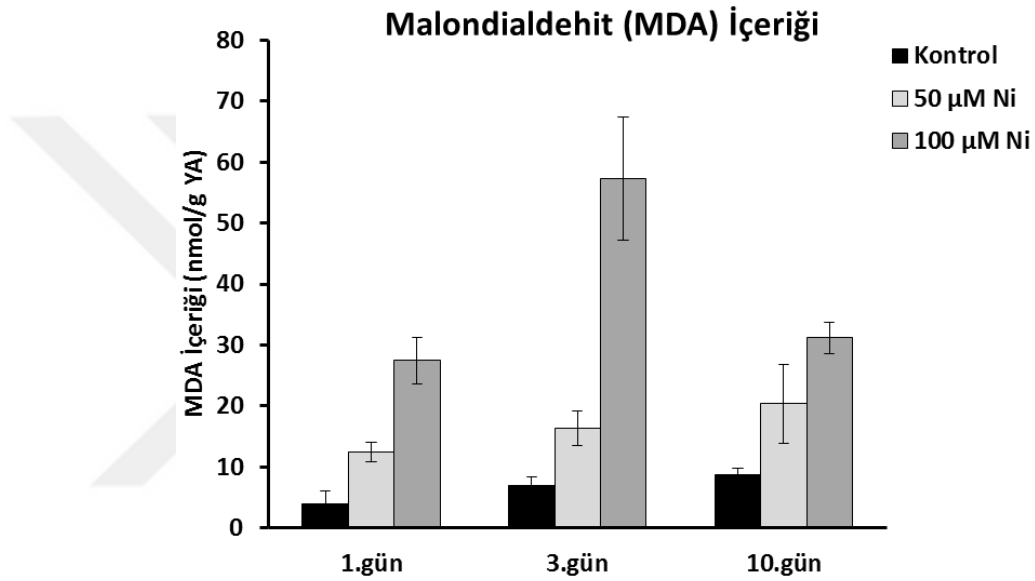


Şekil 4.4.3.2. Ni uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama hücre membran zararının konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Çizelge 4.4.3.3 ve Şekil 4.4.3.3’de farklı konsantrasyonlarda Ni uygulanmış fidelerin yaprak kısımlarında belirlenen ortalama MDA içeriğinin (nmol/g YA) uygulama süresine göre değişimi yer almaktadır. Uygulama süresi ve Ni konsantrasyonlarına bağlı olarak Ni uygulanmış fidelerin yapraklarda belirlenen MDA içeriğinde anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir ($P < 0,05$). En yüksek MDA içeriğinin 100 µM Ni uygulamasında ve 3. günde olduğu görülmektedir. Bu değer; $57,30 \pm 10,14$ nmol/g YA’dır.

Çizelge 4.4.3.3. Ni uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama MDA içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. Sapma)

		MDA İçeriği (nmol/g YA)		
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	3,92 ± 2,23	6,91 ± 1,47	8,66 ± 1,19
	50 µM Ni	12,50 ± 1,61	16,36 ± 2,76	20,36 ± 6,41
	100 µM Ni	27,46 ± 3,85	57,30 ± 10,14	31,18 ± 2,61



Şekil 4.4.3.3. Ni uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama MDA içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Farklı konsantrasyonlarda Ni uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen iyon sızıntısı ve hücre membran zararına ait ortalama değerler ile yaprak kısımlarında belirlenen ortalama MDA içeriğine ait değerlerin uygulama süresine göre değişimi iki yönlü ANOVA testi ile analiz edilmiştir. Elde edilen istatistiksel veriler Çizelge 4.4.3.4’ de yer almaktadır.

Çizelge 4.4.3.4. İyon sızıntısı, hücre membran zararı ve yaprak kısımlarında belirlenen MDA değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Ni) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].

Faktör	İyon sızıntısı			Hücre membran zararı		MDA İçeriği	
	<i>df</i>	F	P	F	P	F	P
Kökler							
Konsantrasyonlar	2	1309,18	0,000	4399,66	0,000		
Uygulama süresi	2	1748,89	0,000	1858,79	0,000		
Konsantrasyon x Süre	4	132,25	0,000	232,3	0,000		
Hata	36						
Yapraklar							
Konsantrasyonlar	2	965,04	0,000	2703,15	0,000	470,97	0,000
Uygulama süresi	2	496,69	0,000	248,78	0,000	334,49	0,000
Konsantrasyon x Süre	4	27,04	0,000	36,06	0,000	81,31	0,000
Hata	36						

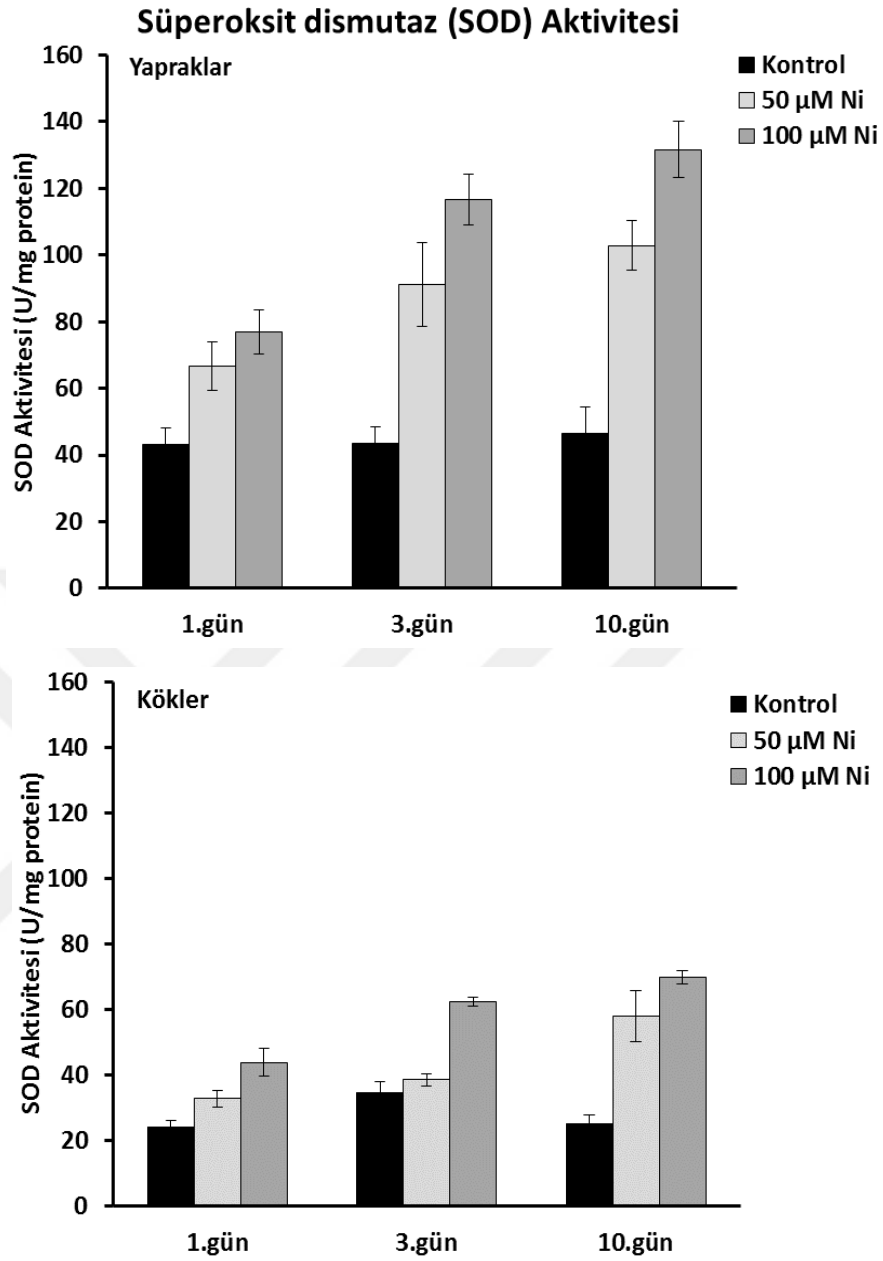
4.4.4. Ni Uygulanmış Fidelerde Antioksidatif Enzim Aktivitesi (SOD, CAT, APX)

50 ve 100 μM konsantrasyonlarında Ni uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yaprak kısımlarından elde edilen antioksidatif savunma sistemi enzimlerinden SOD aktivitesine ait değerlerin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.4.4.1 ve Şekil 4.4.4.1’ de verilmiştir. Buna göre ortalama SOD aktivitesi açısından uygulama süresi ve Ni konsantrasyonları arasında hem yaprak hem de köklerde anlamlı fark ($P<0,05$) bulunmuştur.

Çizelge 4.4.4.1. Ni uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama SOD aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi ($n=5$; Ort. \pm Std. Sapma)

		SOD Aktivitesi (U/mg protein)		
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	43,31 \pm 4,81	43,58 \pm 4,90	46,47 \pm 7,87
	50 μM Ni	66,65 \pm 7,35	91,15 \pm 12,46	102,87 \pm 7,47
	100 μM Ni	76,94 \pm 6,61	116,62 \pm 7,47	131,67 \pm 8,30
Kökler	Kontrol	24,20 \pm 1,95	34,53 \pm 3,48	25,18 \pm 2,70
	50 μM Ni	32,87 \pm 2,45	38,63 \pm 1,76	58,08 \pm 7,65
	100 μM Ni	43,88 \pm 4,23	62,47 \pm 1,37	69,96 \pm 2,00

Çizelge 4.4.4.1’ de hem kök hem de yaprak kısımlarında uygulama süresi ve artan Ni konsantrasyonlarıyla beraber SOD aktivitesinde bir artış meydana geldiği gösterilmiştir. Örneğin; en yüksek SOD aktivitesi 10 gün boyunca 100 μM Ni uygulanmış fidelerin yaprak ve kök kısımlarında belirlenmiştir. Ayrıca bitkinin yaprak kısımlarına ait SOD değerlerinin kök kısımlarıyla karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Örneğin; yapraklarda kontrole göre SOD değeri 100 μM Ni konsantrasyonunda 10. günde 131,7 \pm 8,3 U/mg protein değerlerine ulaşırken köklerde aynı konsantrasyon ve uygulama süresinde bu değer 69,9 \pm 2,0 U/mg protein olduğu görülmektedir.



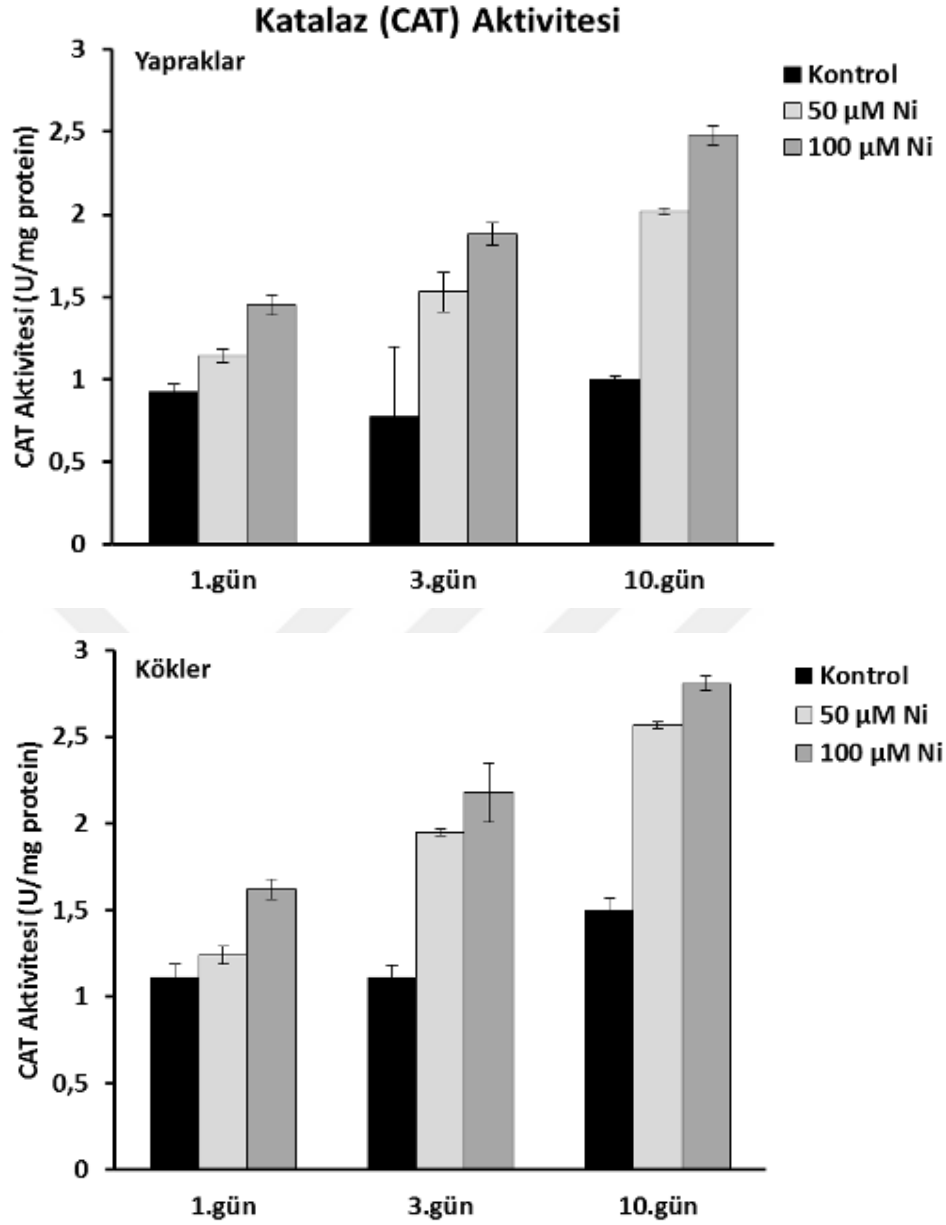
Şekil 4.4.4.1. Ni uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama SOD aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5).

Antioksidatif savunma sistemine ait diğer enzimlerden biri de CAT' dır. Çizelge 4.4.4.2 ve Şekil 4.4.4.2' de 50 ve 100 µM konsantrasyonlarında Ni uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen ortalama CAT aktivitesinin uygulama süresine göre değişimine yer verilmiştir. SOD aktivitesinde olduğu gibi CAT aktivitesinde de uygulama süresi ve Ni konsantrasyonlarına bağlı olarak hem yaprak hem de köklerde anlamlı bir fark ($P<0,05$) bulunmuştur. Buna göre CAT aktivitesinin uygulama süresi ve Ni konsantrasyonlarındaki artışa paralel olarak arttığı tespit

edilmiştir. Ayrıca en yüksek CAT aktivitesi, 10 gün boyunca 100 µM Ni uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında tespit edilmiştir. Yapraklarda bu değer yaklaşık $2,48 \pm 0,06$ U /mg protein iken köklerde bu değer $2,81 \pm 0,04$ U/mg protein olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4.4.2. Ni uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama CAT aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

		CAT Aktivitesi (U/mg protein)		
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	$0,92 \pm 0,05$	$0,77 \pm 0,43$	$1,00 \pm 0,02$
	50 µM Ni	$1,14 \pm 0,04$	$1,53 \pm 0,12$	$2,02 \pm 0,02$
	100 µM Ni	$1,45 \pm 0,06$	$1,88 \pm 0,07$	$2,48 \pm 0,06$
Kökler	Kontrol	$1,11 \pm 0,08$	$1,11 \pm 0,07$	$1,50 \pm 0,07$
	50 µM Ni	$1,24 \pm 0,05$	$1,95 \pm 0,02$	$2,57 \pm 0,02$
	100 µM Ni	$1,62 \pm 0,06$	$2,18 \pm 0,17$	$2,81 \pm 0,04$



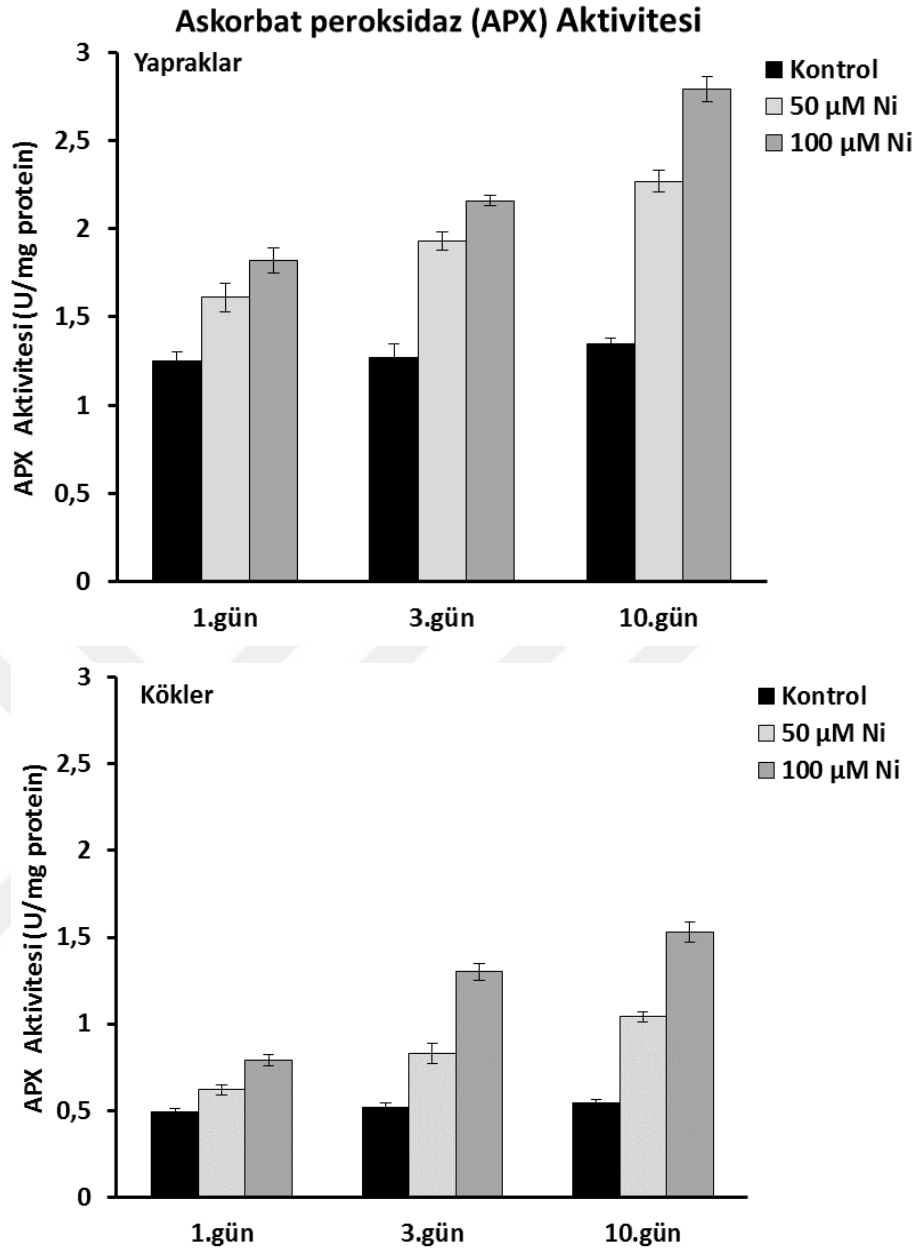
Şekil 4.4.4.2. Ni uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama CAT aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5).

50 ve 100 µM konsantrasyonlarında Ni uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yaprak kısımlarından elde edilen APX aktivitesine ait ortalama değerlerin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.4.4.3 ve Şekil 4.4.4.3' de verilmiştir. Buna göre uygulama süresi ve Ni konsantrasyonlarına bağlı olarak APX aktivitesinde hem yaprak hem de köklerde anlamlı fark bulunmuştur ($P<0,05$).

Çizelge 4.4.4.3. Ni uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama APX aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5, Ort. ± Std. Sapma).

		APX Aktivitesi (U/mg protein)		
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	1,25 ± 0,05	1,27 ± 0,08	1,35 ± 0,03
	50 µM Ni	1,61 ± 0,08	1,93 ± 0,05	2,27 ± 0,06
	100 µM Ni	1,82 ± 0,07	2,16 ± 0,03	2,79 ± 0,07
Kökler	Kontrol	0,49 ± 0,02	0,52 ± 0,02	0,54 ± 0,02
	50 µM Ni	0,62 ± 0,03	0,83 ± 0,06	1,04 ± 0,03
	100 µM Ni	0,79 ± 0,03	1,30 ± 0,05	1,53 ± 0,06

Çizelge 4.4.4.3' de artan Ni konsantrasyonlarıyla birlikte uygulama süresi arttıkça hem kök hem de yaprak kısımlarında APX aktivitesinde bir artış olduğu gözlenmiştir. Örneğin: yapraklardaki en yüksek APX aktivitesi 100 µM Ni uygulamasında 10. günde tespit edilmiş olup bu değer $2,79 \pm 0,07$ U/mg protein olarak belirlenmiştir. Köklerde de APX aktivitesinde ulaşılan en yüksek değer yine aynı Ni konsantrasyonunda ve 10. gündedir ($1,53 \pm 0,06$ U/mg protein). Ayrıca Ni uygulamasına bağlı olarak yapraklarda belirlenen APX aktivitesinin köklere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.4.4.3. Ni uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama APX aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5).

Farklı konsantrasyonlarda Ni uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen antioksidatif savunma sistemi enzimlerine (SOD, CAT, APX) ait ortalama aktivite değerlerinin uygulama süresine göre değişimi iki yönlü ANOVA testi ile analiz edilmiştir. Elde edilen istatistiksel veriler Çizelge 4.4.4.4’de yer almaktadır.

Çizelge 4.4.4.4. Antioksidatif savunma sistemi enzimlerine (SOD, CAT, APX) ait ortalama aktivite değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Ni) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].

Faktör	SOD Aktivitesi			CAT Aktivitesi		APX Aktivitesi	
	<i>df</i>	F	P	F	P	F	P
Kökler							
Konsantrasyonlar	2	278,96	0,000	578,35	0,000	1061,72	0,000
Uygulama süresi	2	92,45	0,000	561,51	0,000	372,47	0,000
Konsantrasyon x Süre	4	29,68	0,000	54,74	0,000	93,95	0,000
Hata	36						
Yapraklar							
Konsantrasyonlar	2	263,30	0,000	169,49	0,000	949,99	0,000
Uygulama süresi	2	63,94	0,000	70,04	0,000	331,02	0,000
Konsantrasyon x Süre	4	15,43	0,000	13,52	0,000	66,90	0,000
Hata	36						

4.5. Çinko (Zn)

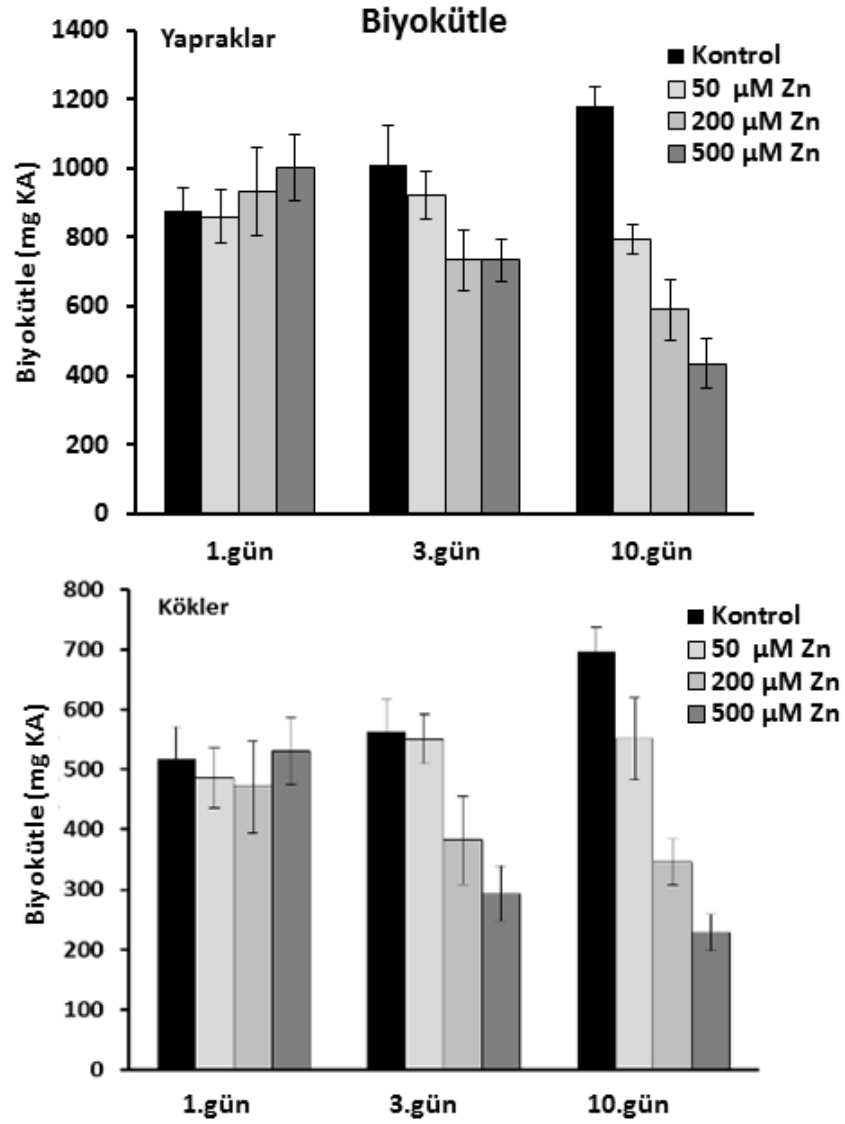
4.5.1. Zn Uygulanmış Fidelerde Büyüme Parametreleri (Biyokütle, Su İçeriği ve Klorofil İçeriği)

Çizelge 4.5.1.1 ve Şekil 4.5.1.1' de 50, 200 ve 500 µM konsantrasyonlarında Zn uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin yaprak ve köklerinde belirlenen ortalama biyokütle değerleri (mg KA) verilmiştir. Buna göre hem yaprak hem de köklerde belirlenen ortalama biyokütle değerlerinde uygulama süresi ve Zn konsantrasyonlarına bağlı olarak anlamlı fark bulunmuştur (P<0,05).

Çizelge 4.5.1.1. Zn uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama biyokütle değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma).

		Biyokütle (mg KA)		
Konsantrasyonlar		1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	875,7 ± 64,7	1012,0 ± 111,7	1178,6 ± 58,9
	50 µM Zn	859,4 ± 76,9	921,4 ± 69,8	793,4 ± 43,2
	200 µM Zn	931,7 ± 127,4	735,2 ± 87,8	590,4 ± 87,6
	500 µM Zn	1002,6 ± 96,5	733,9 ± 59,6	434,7 ± 71,1
Kökler	Kontrol	516,8 ± 54,6	562,9 ± 52,5	695,9 ± 40,7
	50 µM Zn	485,9 ± 49,5	550,8 ± 40,7	551,2 ± 67,8
	200 µM Zn	470,8 ± 76,8	382,3 ± 73,1	345,3 ± 38,6
	500 µM Zn	530,6 ± 55,9	293,4 ± 45,3	228,3 ± 30,5

Çizelge 4.5.1.1' e göre Zn uygulamaları 1. günde yaprak biyokütlesinde artışa neden olmuştur. 3. günde 200 ve 500 µM Zn konsantrasyonlarının yaprak biyokütlesinde meydana getirdiği azalışın benzer olduğu tespit edilmiştir. 10. günde ise Zn konsantrasyonu arttıkça yaprak biyokütlenin kontrole göre azaldığı belirlenmiştir. Köklerin biyokütlesinde ise tüm uygulama sürelerinde Zn konsantrasyonları arttıkça biyokütlenin azaldığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda biyokütlerdeki en büyük azalış hem kök hem de yaprak kısımları için 10 gün boyunca 500 µM Zn uygulanmış örneklerde elde edilmiştir (Şekil 4.5.1.1). Bu değerler sırasıyla 228,3 ± 30,5 mg KA ve 434,7 ± 71,1 mg KA' dır.



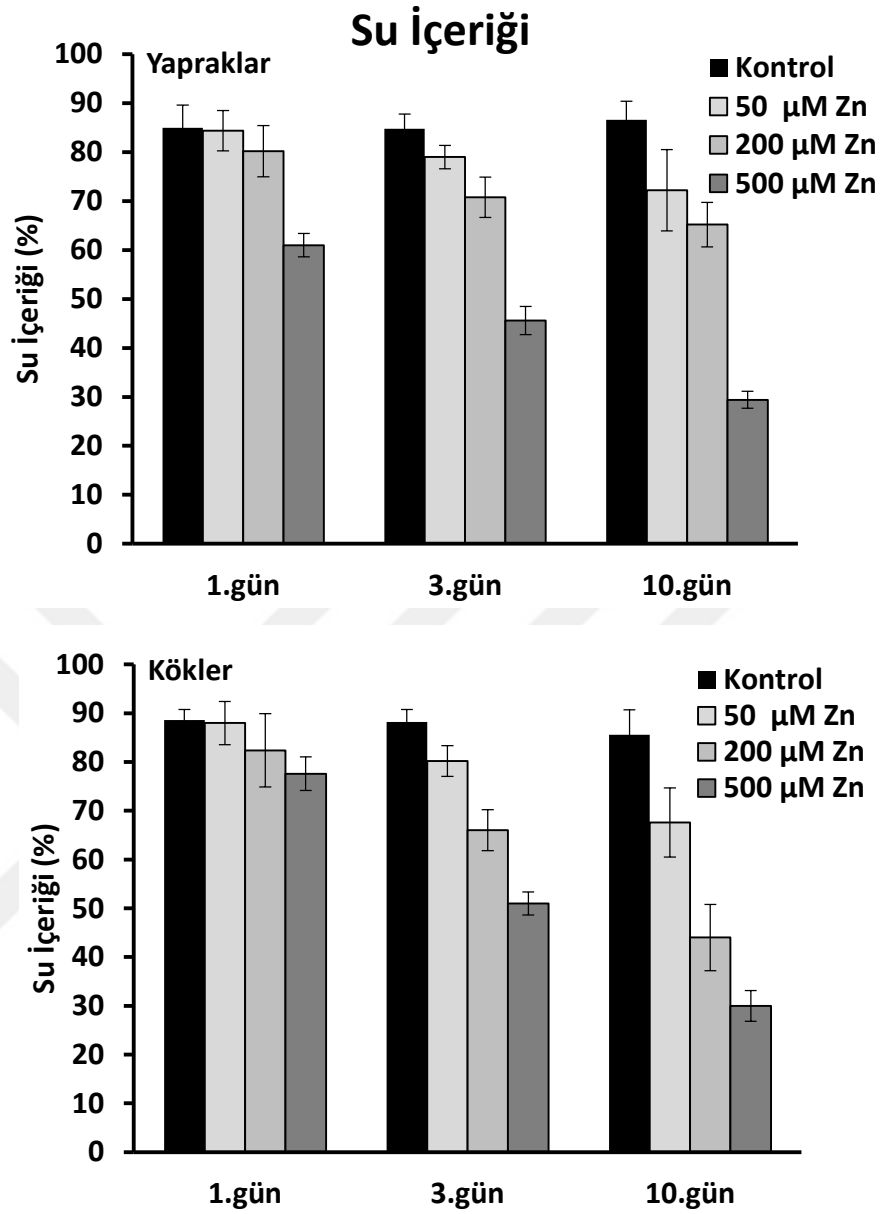
Şekil 4.5.1.1. Zn uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama biyokütle değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5).

Çizelge 4.5.1.2 ve Şekil 4.5.1.2' de *V. olympicum* fidelerinin yaprak ve kök kısımlarında belirlenen ortalama su içeriğinde uygulanan Zn konsantrasyonlarına ve uygulama süresine bağlı olarak meydana gelen değişimler yer almaktadır. Buna göre uygulama süresi ve Zn konsantrasyonları arasında su içeriğinde anlamlı bir azalış olduğu görülmektedir ($P < 0,05$).

Çizelge 4.5.1.2. Zn uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama su içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma).

		Su içeriği (%)		
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	85,0 ± 4,6	84,8 ± 2,9	86,6 ± 3,7
	50 µM Zn	84,4 ± 4,1	79,0 ± 2,3	72,2 ± 8,3
	200 µM Zn	80,2 ± 5,2	70,8 ± 4,1	65,2 ± 4,5
	500 µM Zn	61,0 ± 2,4	45,6 ± 2,9	29,4 ± 1,7
Kökler	Kontrol	88,6 ± 2,1	88,2 ± 2,6	85,6 ± 5,1
	50 µM Zn	88,0 ± 4,4	80,2 ± 3,1	67,6 ± 7,1
	200 µM Zn	82,4 ± 7,5	66,0 ± 4,2	44,0 ± 6,8
	500 µM Zn	77,6 ± 3,4	51,0 ± 2,4	30,0 ± 3,2

Yaprak ve köklerdeki en düşük su içeriği 10 gün boyunca 500 µM Zn uygulanmış örneklerde elde edilmiştir (Şekil 4.5.1.2). Bu değer, yapraklar için % 29,4 ± 1,7 kökler için % 30,0 ± 3,2 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.5.1.2. Zn uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama su içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

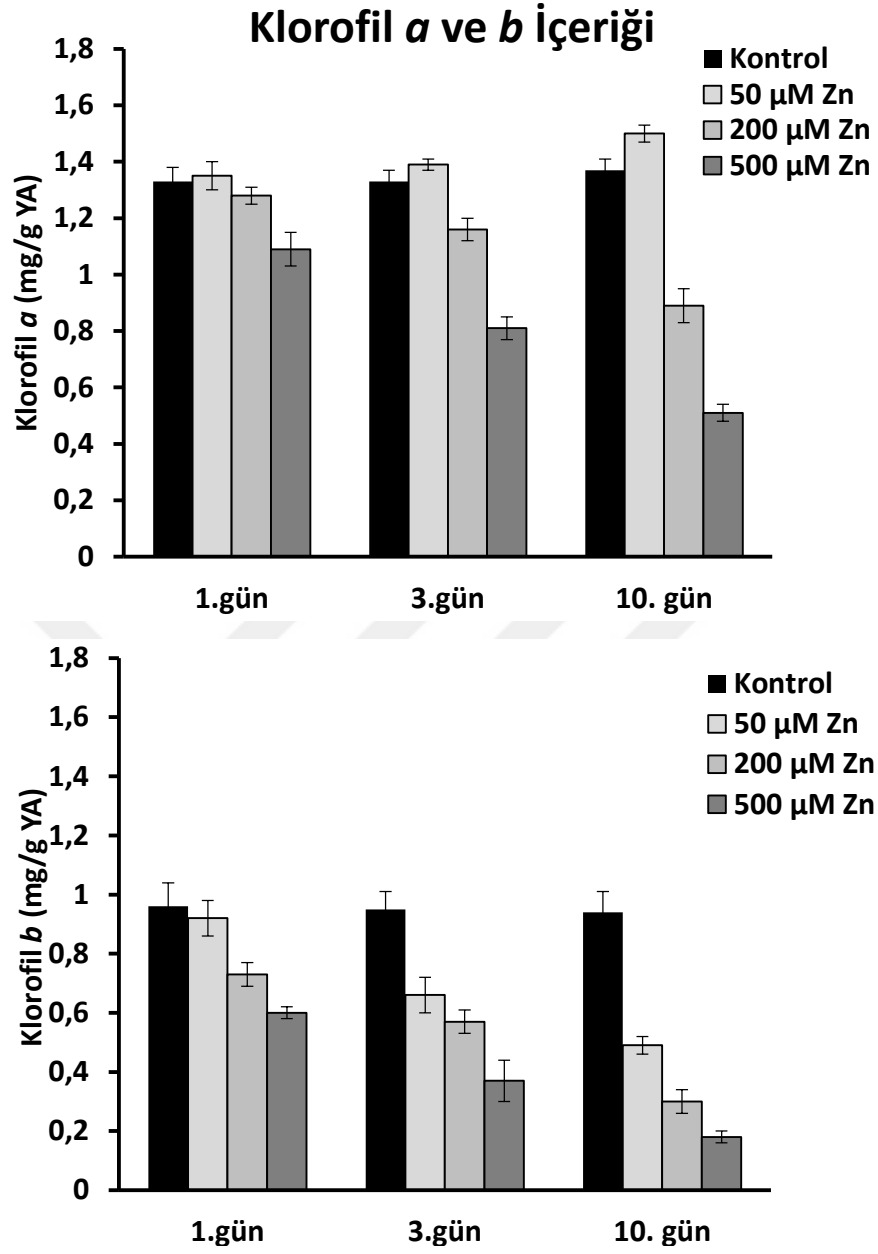
50, 200 ve 500 µM konsantrasyonlarında Zn uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin yapraklarında belirlenen ortalama klorofil *a* ve *b* içeriğinin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.5.1.3 ve Şekil 4.5.1.3' de verilmiştir. Buna göre ortalama klorofil *a* ve *b* içeriğinde uygulama süresi ve Zn konsantrasyonlarına bağlı olarak anlamlı fark bulunmuştur ($P < 0,05$). Buna göre *V. olympicum* fidelerinde belirlenen klorofil *a* ve *b* içeriğinin artan Zn konsantrasyonları ve uygulama süresine bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Elde edilen en düşük klorofil *a* ve *b* içeriği 10 gün boyunca 500 µM Zn stresine

maruz bırakılmış örneklerde belirlenmiştir. Bu değer klorofil *a* için $0,51 \pm 0,03$ mg/g YA ve klorofil *b* için $0,18 \pm 0,02$ mg/g YA' dir.

Çizelge 4.5.1.3. Zn uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama klorofil *a* ve *b* içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5, Ort. \pm Std. Sapma).

Klorofil <i>a</i> ve <i>b</i> İçeriği (mg/g YA)				
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	10.gün
Klorofil <i>a</i>	Kontrol	$1,33 \pm 0,05$	$1,33 \pm 0,04$	$1,37 \pm 0,04$
	50 μM Zn	$1,35 \pm 0,05$	$1,39 \pm 0,02$	$1,50 \pm 0,03$
	200 μM Zn	$1,28 \pm 0,03$	$1,16 \pm 0,04$	$0,89 \pm 0,06$
	500 μM Zn	$1,09 \pm 0,06$	$0,81 \pm 0,04$	$0,51 \pm 0,03$
Klorofil <i>b</i>	Kontrol	$0,96 \pm 0,08$	$0,95 \pm 0,06$	$0,94 \pm 0,07$
	50 μM Zn	$0,92 \pm 0,06$	$0,66 \pm 0,06$	$0,49 \pm 0,03$
	200 μM Zn	$0,73 \pm 0,04$	$0,57 \pm 0,04$	$0,30 \pm 0,04$
	500 μM Zn	$0,60 \pm 0,02$	$0,37 \pm 0,07$	$0,18 \pm 0,02$

Çizelge 4.5.1.3' e göre *V. olympicum* fidelerinde 50 μ M Zn uygulamasının 10. günde klorofil *a* içeriğini arttırdığı tespit edilmiştir. Bu değer $1,50 \pm 0,03$ mg/g YA olarak belirlenmiştir. Klorofil *b* içeriğinde ise 50 μ M Zn uygulaması 10. günde azalışa neden olmuştur.



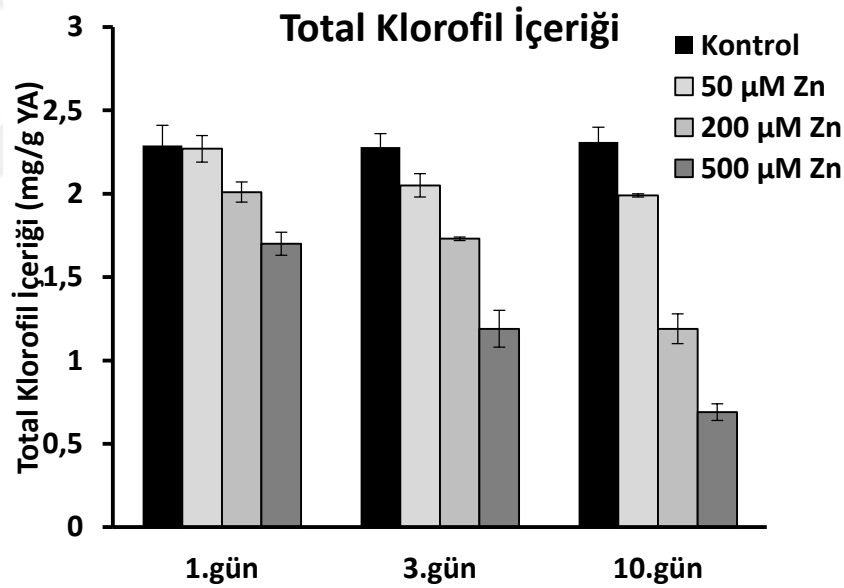
Şekil 4.5.1.3. Zn uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama klorofil *a* ve *b* içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5, Ort. \pm Std. Sapma).

50, 200 ve 500 μ M konsantrasyonlarında Zn uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin yapraklarında belirlenen ortalama total klorofil içeriğinin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.5.1.4 ve Şekil 4.5.1.4' de verilmiştir. Buna göre ortalama total klorofil içeriği açısından uygulama süresi ve metal konsantrasyonları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($P < 0,05$).

Çizelge 4.5.1.4. Zn uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama total klorofil içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5).

Total Klorofil İçeriği (mg/g YA)				
Konsantrasyonlar		1.gün	3.gün	10.gün
Total Klorofil	Kontrol	2,29 ± 0,12	2,28 ± 0,08	2,31 ± 0,09
	50 µM Zn	2,27 ± 0,08	2,05 ± 0,07	1,99 ± 0,01
	200 µM Zn	2,01 ± 0,06	1,73 ± 0,01	1,19 ± 0,09
	500 µM Zn	1,70 ± 0,07	1,19 ± 0,11	0,69 ± 0,05

Çizelge 4.5.1.4' e göre *V. olympicum* fidelerinin total klorofil içeriği Zn konsantrasyonları ve uygulama süresi arttıkça azalmıştır. 50 µM Zn konsantrasyonunun 3. ve 10. günlerde total klorofil içeriğinde meydana getirdiği etkinin benzer olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.5.1.4. Zn uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama total klorofil içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5, Ort. ± Std. Sapma).

Farklı konsantrasyonlarda Zn uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen büyüme parametrelerine ait (biyokütle, su içeriği, klorofil *a*, *b* ve total klorofil içeriği) ortalama değerlerin uygulama süresine göre değişimi iki yönlü ANOVA testi ile analiz edilmiştir. Elde edilen istatistiksel veriler Çizelge 4.5.1.4' de yer almaktadır.

Çizelge 4.5.1.5. Biyokütle, su ve klorofil değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Zn) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].

Faktör	Biyokütle		Su İçeriği		Klorofil <i>a</i> İçeriği		Klorofil <i>b</i> İçeriği		Total Klorofil İçeriği		
	<i>df</i>	F	<i>P</i>	F	<i>P</i>	F	<i>P</i>	F	<i>P</i>	F	<i>P</i>
Kökler											
Konsantrasyonlar	3	51,55	0,000	127,77	0,000						
Uygulama süresi	2	4,62	0,015	135,82	0,000						
Konsantrasyon x Süre	6	16,56	0,000	18,12	0,000						
Hata	48										
Yapraklar											
Konsantrasyonlar	3	31,89	0,000	203,36	0,000	592,14	0,000	286,81	0,000	590,79	0,000
Uygulama süresi	2	16,71	0,000	45,05	0,000	103,31	0,000	174,81	0,000	223,29	0,000
Konsantrasyon x Süre	6	21,09	0,000	10,32	0,000	82,49	0,000	18,27	0,000	48,60	0,000
Hata	48										

4.5.2. Zn Uygulanmış Fidelerde Azot Metabolizması Enzimlerinin (NR ve GS) Aktivitesi ve Eriyebilir Protein İçeriği

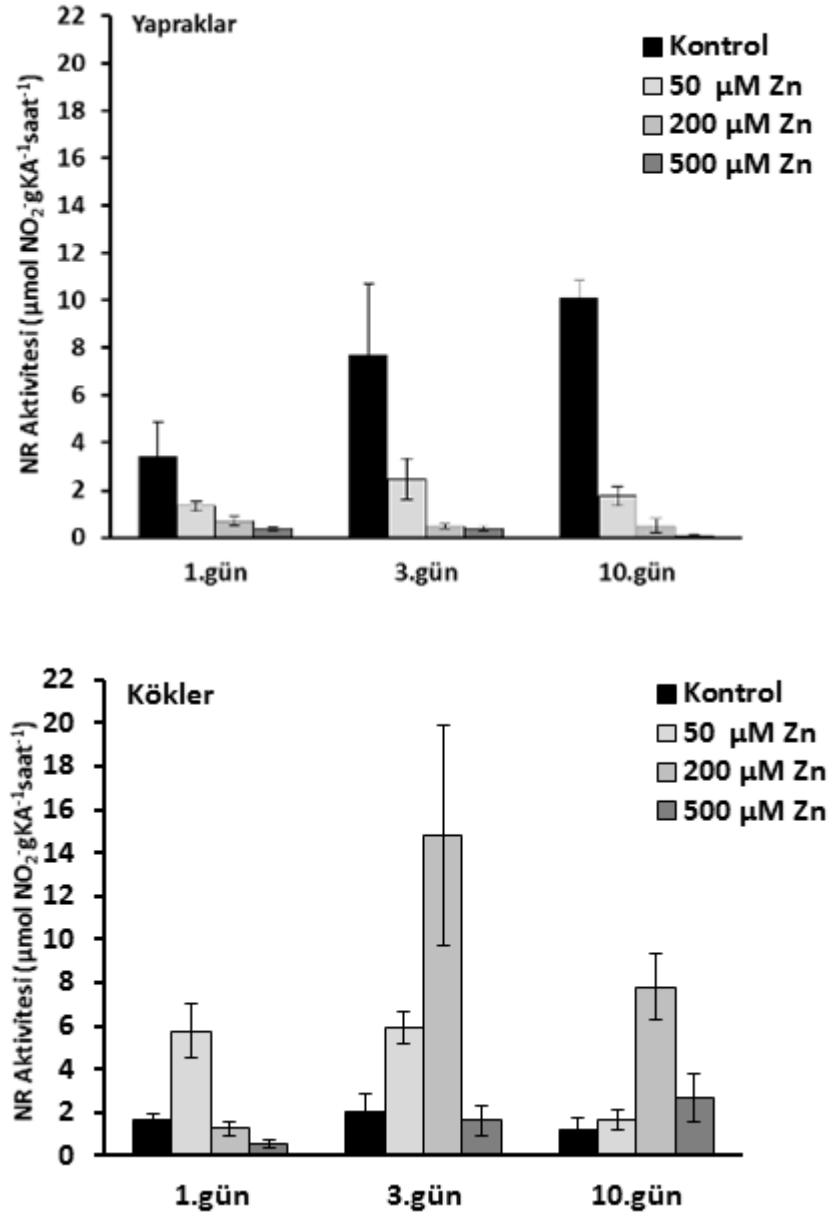
50, 200 ve 500 μM konsantrasyonlarında Zn uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen azot metabolizması enzimlerinden nitrat redüktaz (NR) aktivitesine ait ortalama değerlerin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.5.2.1 ve Şekil 4.5.2.1’ de verilmiştir. Buna göre ortalama NR aktivitesi açısından uygulama süresi ve Zn konsantrasyonları arasında hem yaprak hem de köklerde anlamlı fark ($P < 0,05$) bulunmuştur.

Çizelge 4.5.2.1. Zn uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama NR aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi ($n=5$; Ort. \pm Std. Sapma).

		NR Aktivitesi ($\mu\text{mol NO}_2^- \text{gKA}^{-1} \cdot \text{saat}^{-1}$)		
Konsantrasyonlar		1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	3,47 \pm 1,39	7,71 \pm 2,97	10,13 \pm 0,71
	50 μM Zn	1,34 \pm 0,20	2,46 \pm 0,86	1,75 \pm 0,42
	200 μM Zn	0,70 \pm 0,19	0,46 \pm 0,09	0,49 \pm 0,28
	500 μM Zn	0,38 \pm 0,07	0,40 \pm 0,09	0,07 \pm 0,04
Kökler	Kontrol	1,69 \pm 0,24	2,01 \pm 0,84	1,19 \pm 0,59
	50 μM Zn	5,75 \pm 1,24	5,92 \pm 0,71	1,65 \pm 0,49
	200 μM Zn	1,25 \pm 0,33	14,81 \pm 5,08	7,77 \pm 1,53
	500 μM Zn	0,52 \pm 0,18	1,62 \pm 0,72	2,63 \pm 1,10

V. olympicum fidelerinin yaprak kısımlarında belirlenen NR aktivitesi Zn konsantrasyonları ve uygulama süresi arttıkça azaldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.5.2.1). Köklerde ise 50 μM Zn konsantrasyonunun tüm uygulama sürelerinde kontrole göre NR aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Fakat 50 μM Zn konsantrasyonunun 10. günde *V. olympicum* fidelerinde meydana getirdiği artış minimum düzeydedir. 200 μM Zn konsantrasyonunda ise 1. günde bir azalış meydana gelirken 3 ve 10. Günlerde kontrole göre NR aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. 500 μM Zn konsantrasyonunda köklerde uygulama süresi arttıkça NR aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir.

Nitrat Redüktaz (NR) Aktivitesi



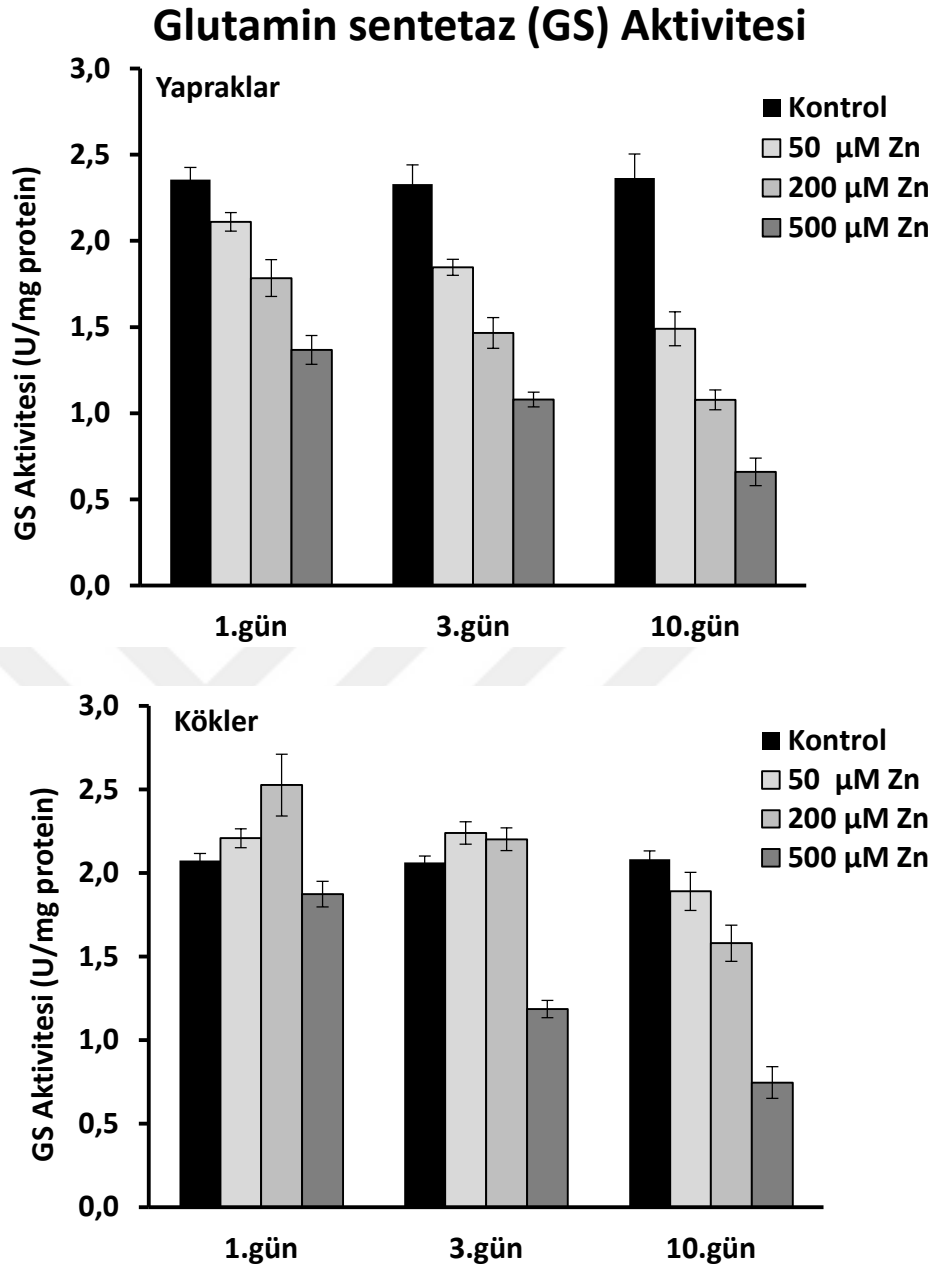
Şekil 4.5.2.1. Zn uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama NR aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

50, 200 ve 500 µM konsantrasyonlarında Zn uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen ortalama GS aktivitesinin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.5.2.2 ve Şekil 4.5.2.2’ de verilmiştir. Buna göre ortalama GS aktivitesinde uygulama süresi ve Zn konsantrasyonları arasında hem yaprak hem de köklerde anlamlı fark bulunmuştur ($P<0,05$).

Çizelge 4.5.2.2. Zn uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama GS aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. Sapma).

GS Aktivitesi (U/mg protein)				
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	2,36 ± 0,07	2,33 ± 0,11	2,36 ± 0,14
	50 µM Zn	2,11 ± 0,05	1,85 ± 0,05	1,49 ± 0,10
	200 µM Zn	1,78 ± 0,11	1,47 ± 0,09	1,08 ± 0,06
	500 µM Zn	1,37 ± 0,08	1,08 ± 0,04	0,66 ± 0,08
Kökler	Kontrol	2,07 ± 0,04	2,06 ± 0,04	2,08 ± 0,05
	50 µM Zn	2,21 ± 0,06	2,24 ± 0,07	1,89 ± 0,11
	200 µM Zn	2,53 ± 0,19	2,20 ± 0,07	1,58 ± 0,11
	500 µM Zn	1,87 ± 0,08	1,19 ± 0,05	0,75 ± 0,09

Farklı konsantrasyonlarda Zn uygulanmış fidelerin yaprak kısımlarında belirlenen GS aktivitesinin Zn konsantrasyonları ve uygulama süresindeki artış ile birlikte azaldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.5.2.2.). Buna göre en düşük GS aktivitesi 10 gün boyunca 500 µM Zn uygulanmış fidelerin yapraklarında belirlenmiştir. Bu değer $0,66 \pm 0,08$ U/mg protein’dir. Kök kısımlarında ise 50 µM Zn konsantrasyonunun 1. ve 3. günlerde GS aktivitesinde meydana getirdiği değişimin birbirine benzer olduğu görülmektedir (Çizelge 4.5.2.2.). 200 µM Zn konsantrasyonunda ise uygulama süresindeki artışa bağlı olarak kök kısımlarında belirlenen GS aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu konsantrasyonda köklerde belirlenen en düşük GS aktivitesi 10. güne ait örneklerde belirlenmiştir ($1,58 \pm 0,11$ U/mg protein). 500 µM Zn konsantrasyonunda GS aktivitesinde belirlenen değişimin de 200 µM’ a benzer olduğu gözlenmiştir. Buna göre köklerde belirlenen en düşük GS aktivitesinin 10 gün boyunca 500 µM Zn uygulanmış örneklerde elde edildiği tespit edilmiştir. Bu değer $0,75 \pm 0,09$ U/mg protein olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.5.2.2. Zn uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama GS aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

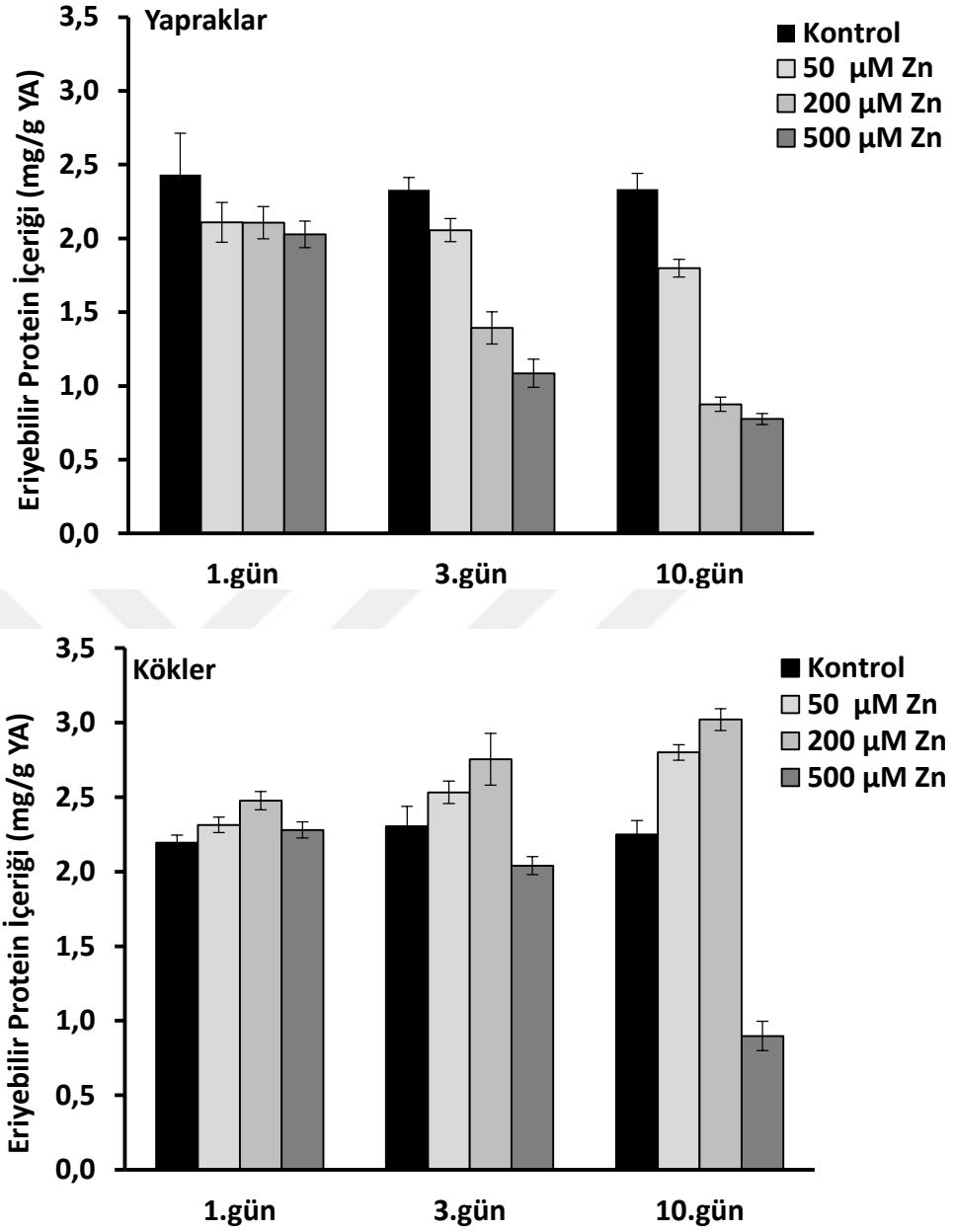
Çizelge 4.5.2.3 ve Şekil 4.5.2.3’ de Zn uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarından elde edilen ortalama eriyebilir protein içeriğinin uygulama süresine göre değişimi yer almaktadır. Buna göre ortalama eriyebilir protein içeriği açısından uygulama süresi ve Zn konsantrasyonları arasında hem yaprak hem de köklerde anlamlı fark ($P<0,05$) bulunmuştur. NR ve GS aktivitesindeki sonuçlara paralel olarak artan Zn konsantrasyonlarının ve uygulama süresinin hem kök hem de yaprak kısımlarında eriyebilir protein içeriğini azalttığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.5.2.3).

Çizelge 4.5.2.3. Zn uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama eriyebilir protein içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. Sapma).

		Eriyebilir Protein İçeriği (mg/g YA)		
Konsantrasyonlar		1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	2,43 ± 0,28	2,33 ± 0,08	2,33 ± 0,11
	50 µM Zn	2,11 ± 0,13	2,06 ± 0,08	1,80 ± 0,06
	200 µM Zn	2,11 ± 0,11	1,39 ± 0,11	0,88 ± 0,05
	500 µM Zn	2,03 ± 0,09	1,09 ± 0,09	0,78 ± 0,04
Kökler	Kontrol	2,19 ± 0,05	2,30 ± 0,13	2,25 ± 0,09
	50 µM Zn	2,31 ± 0,05	2,53 ± 0,08	2,80 ± 0,05
	200 µM Zn	2,48 ± 0,06	2,75 ± 0,17	3,02 ± 0,07
	500 µM Zn	2,28 ± 0,05	2,04 ± 0,06	0,90 ± 0,10

Çizelge 4.5.2.3.' e göre 50 ve 200 µM Zn konsantrasyonlarının 1. günde yaprak kısımlarının protein içeriğinde meydana getirdiği azalışın benzer olduğu görülmektedir. Yaprak kısımlarında belirlenen en düşük eriyebilir protein içeriği 10. günde 500 µM Zn uygulamasında elde edilmiştir. Bu değer $0,78 \pm 0,04$ mg/g YA olarak belirlenmiştir. Kök kısımlarında ise 50 ve 200 µM Zn konsantrasyonları uygulama süresindeki artışa paralel olarak eriyebilir protein içeriğini de arttırmıştır (Çizelge 4.5.2.3.). 500 µM Zn konsantrasyonunda ise uygulama süresindeki artışa bağlı olarak eriyebilir protein içeriğinin azaldığı görülmektedir. Kök kısımlarında belirlenen en düşük protein içeriği yine 10. günde 500 µM Zn uygulamasında elde edilmiştir. Bu değer $0,90 \pm 0,10$ mg/g YA' dır.

Eriyebilir Protein İçeriği



Şekil 4.5.2.3. Zn uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama eriyebilir protein içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Farklı konsantrasyonlarda Zn uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen azot metabolizması enzimlerine ait (NR ve GS) ortalama aktivite değerlerinin ve eriyebilir protein içeriğinin uygulama süresine göre değişimi iki yönlü ANOVA testi ile analiz edilmiştir. Elde edilen istatistiksel veriler Çizelge 4.5.2.4' de verilmiştir.

Çizelge 4.5.2.4. Azot metabolizması enzimlerine ait (NR ve GS) ortalama aktivite değerleri ve eriyebilir protein içeriğinin için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Zn) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].

Faktör	NR Aktivitesi			GS Aktivitesi		Eriyebilir Protein İçeriği	
	<i>df</i>	F	P	F	P	F	P
Kökler							
Konsantrasyonlar	3	39,021	0,000	261,507	0,000	290,908	0,000
Uygulama süresi	2	22,13	0,000	182,285	0,000	13,805	0,000
Konsantrasyon x Süre	6	18,089	0,000	39,522	0,000	109,48	0,000
Hata	48						
Yapraklar							
Konsantrasyonlar	3	117,563	0,000	502,369	0,000	204,087	0,000
Uygulama süresi	2	11,535	0,000	138,180	0,000	150,568	0,000
Konsantrasyon x Süre	6	11,343	0,000	16,306	0,000	28,667	0,000
Hata	48						

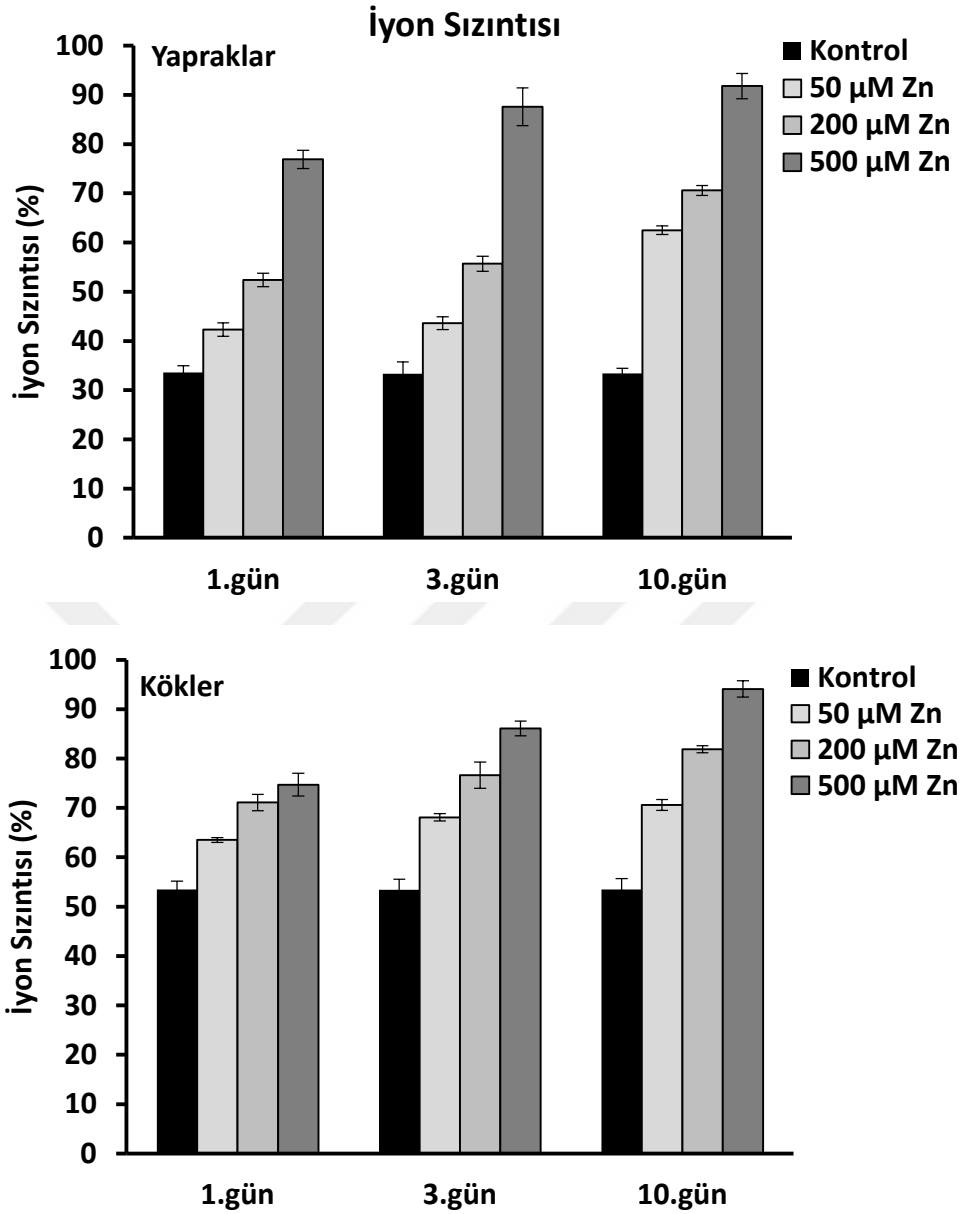
4.5.3. Zn Uygulanmış Fidelerde İyon sızıntısı, Hücre Membran Zararı ve Malondialdehit (MDA) içeriği

50, 200 ve 500 µM konsantrasyonlarında Zn uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen iyon sızıntısına ait ortalama değerlerin (%) uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.5.3.1 ve Şekil 4.5.3.1’ de yer almaktadır. Buna göre Zn konsantrasyonları ve uygulama süresine bağlı olarak iyon sızıntısına ait % değerlerinde anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir (P<0,05).

Çizelge 4.5.3.1. Zn uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama iyon sızıntısı değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma).

		İyon sızıntısı (%)		
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	33,6 ± 1,38	33,3 ± 2,44	33,4 ± 1,03
	50 µM Zn	42,3 ± 1,36	43,6 ± 1,30	62,5 ± 0,87
	200 µM Zn	52,4 ± 1,37	55,7 ± 1,53	70,6 ± 1,02
	500 µM Zn	76,9 ± 1,85	87,6 ± 3,86	91,8 ± 2,57
Kökler	Kontrol	53,5 ± 1,65	53,4 ± 2,15	53,5 ± 2,16
	50 µM Zn	63,5 ± 0,46	68,1 ± 0,72	70,6 ± 1,12
	200 µM Zn	71,1 ± 1,67	76,6 ± 2,66	81,9 ± 0,70
	500 µM Zn	74,7 ± 2,30	86,1 ± 1,51	94,1 ± 1,65

Çizelge 4.5.3.1’ de artan Zn konsantrasyonlarının kök ve yaprak hücrelerindeki membranlarda meydana gelen iyon sızıntısını uygulama süresine bağlı olarak arttırdığı görülmektedir. Elde edilen en yüksek değer tüm bitki kısımları için 10 gün boyunca 500 µM Zn uygulanmış örneklerde belirlenmiştir. Bu değerler kök için % 94,1 ± 1,65 yaprak için % 91,8 ± 2,57’ dir.



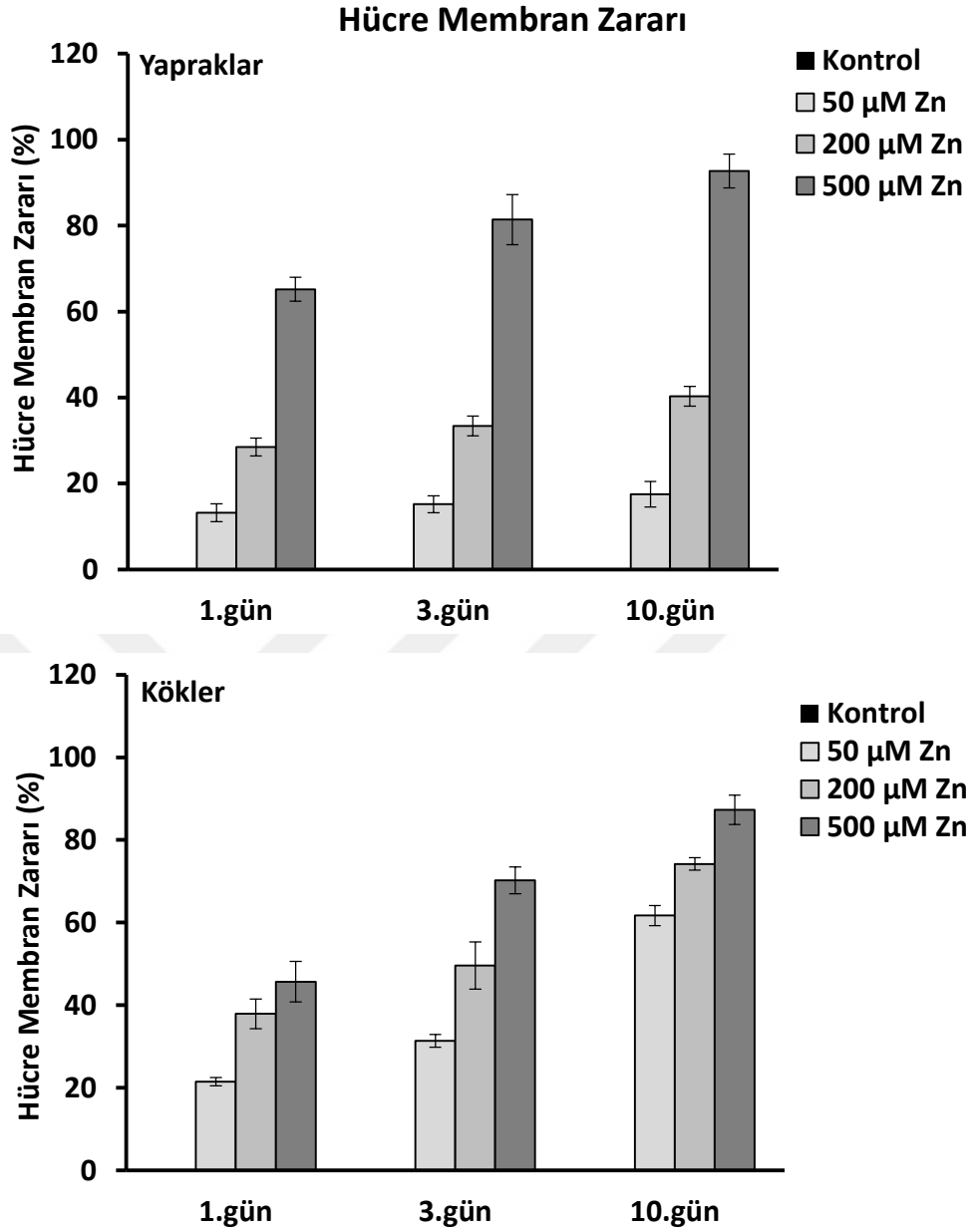
Şekil 4.5.3.1. Zn uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama iyon sızıntısı değerlerinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Çizelge 4.5.3.2 ve Şekil 4.5.3.2’ de Zn uygulanmış fidelerin kök ve yapraklarında belirlenen hücre membran zararına ait ortalama değerlerin uygulama süresine göre değişimi yer almaktadır. Buna göre hücre membran zararı açısından uygulama süresi ve Zn konsantrasyonları arasında hem kök hem de yapraklarda anlamlı bir fark bulunmuştur ($P<0,05$). Zn konsantrasyonlarında ve uygulama süresindeki artış ile birlikte hücre membran zararının arttığı görülmektedir.

Çizelge 4.5.3.2. Zn uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama hücre membran zararının konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. sapma).

		Hücre Membran Zararı (%)		
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	0	0	0
	50 µM Zn	13,2 ± 2,05	15,2 ± 1,96	17,5 ± 2,99
	200 µM Zn	28,5 ± 2,06	33,4 ± 2,30	40,3 ± 2,29
	500 µM Zn	65,2 ± 2,78	81,4 ± 5,81	92,7 ± 3,94
Kökler	Kontrol	0	0	0
	50 µM Zn	21,5 ± 0,99	31,4 ± 1,54	61,7 ± 2,41
	200 µM Zn	37,9 ± 3,59	49,6 ± 5,72	74,2 ± 1,51
	500 µM Zn	45,7 ± 4,94	70,2 ± 3,24	87,3 ± 3,55

Çizelge 4.5.3.2' ye göre hücre membran zararına ait elde edilen en yüksek değerler 10 gün boyunca 500 µM Zn stresine maruz bırakılmış fidelerin kök ve yapraklarında elde edilmiştir. Bu değerler yapraklar için % 92,7 ± 3,94 kökler için % 87,3 ± 3,55' dir.

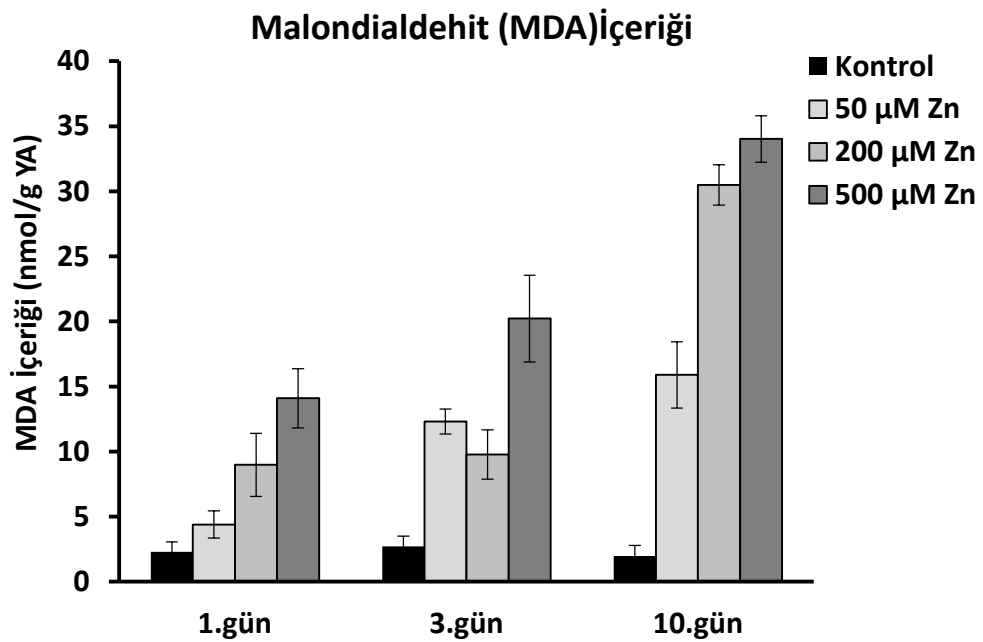


Şekil 4.5.3.2. Zn uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama hücre membran zararının konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Çizelge 4.5.3.3 ve Şekil 4.5.3.3' de 50, 200 ve 500 µM konsantrasyonlarında Zn uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin yaprak kısımlarında belirlenen ortalama MDA içeriğinin (nmol/g YA) uygulama süresine göre değişimi yer almaktadır. Uygulama süresi ve Zn konsantrasyonlarına bağlı olarak Zn uygulanmış fidelerin yapraklarda belirlenen MDA içeriğinde anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir ($P < 0,05$). En yüksek MDA içeriğinin 500 µM Zn uygulamasında ve 10. günde olduğu görülmektedir. Bu değer $34,02 \pm 1,78$ nmol/g YA' dır.

Çizelge 4.5.3.3. Zn uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama MDA içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5; Ort. ± Std. Sapma)

		MDA İçeriği (nmol/g YA)		
Konsantrasyonlar		1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	2,29 ± 0,78	2,72 ± 0,78	1,99 ± 0,81
	50 µM Zn	4,40 ± 1,04	12,32 ± 0,96	15,89 ± 2,55
	200 µM Zn	8,98 ± 2,42	9,78 ± 1,90	30,49 ± 1,56
	500 µM Zn	14,10 ± 2,28	20,22 ± 3,33	34,02 ± 1,78



Şekil 4.5.3.3. Zn uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama MDA içeriğinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n=5).

Zn uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen iyon sızıntısı ve hücre membran zararına ait ortalama değerler ile yaprak kısımlarında belirlenen ortalama MDA içeriğine ait değerlerin uygulama süresine göre değişimi iki yönlü ANOVA testi ile analiz edilmiştir. Elde edilen istatistiksel veriler Çizelge 4.5.3.4’ de yer almaktadır.

Çizelge 4.5.3.4. İyon sızıntısı, hücre membran zararı ve yaprak kısımlarında belirlenen MDA değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Zn) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].

Faktör	df	İyon sızıntısı		Hücre membran zararı		MDA İçeriği	
		F	P	F	P	F	P
Kökler							
Konsantrasyonlar	3	757,478	0,000	1159,94	0,000		
Uygulama süresi	2	121,382	0,000	185,97	0,000		
Konsantrasyon x Süre	6	22,809	0,000	35,02	0,000		
Hata	48						
Yapraklar							
Konsantrasyonlar	3	1569,04	0,000	1949,64	0,000	262,26	0,000
Uygulama süresi	2	205,84	0,000	64,84	0,000	193,71	0,000
Konsantrasyon x Süre	6	34,33	0,000	20,24	0,000	28,907	0,000
Hata	48						

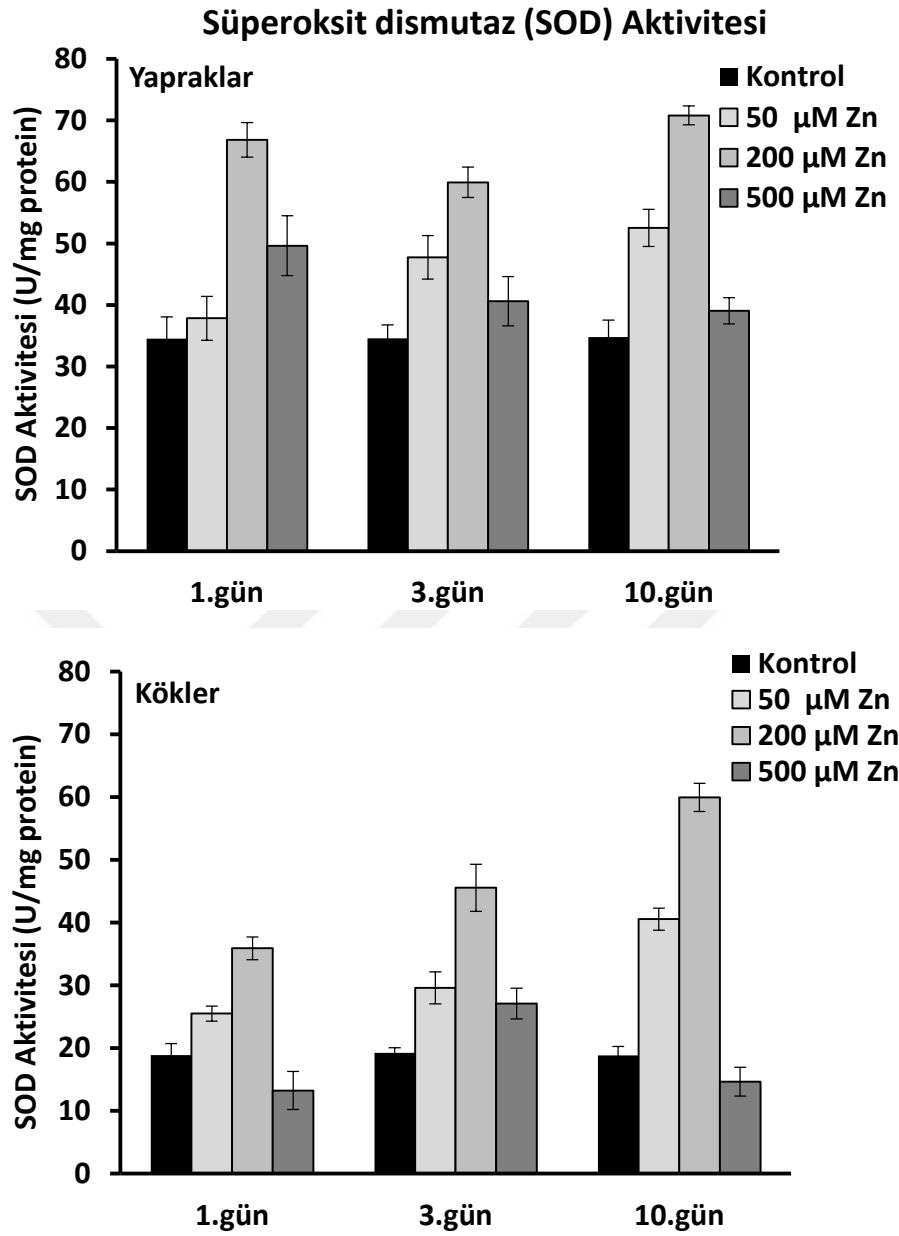
4.5.4. Zn Uygulanmış Fidelerde Antioksidatif Enzim Aktivitesi (SOD, CAT, APX)

50, 200 ve 500 μM konsantrasyonlarında Zn uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yaprak kısımlarından elde edilen antioksidatif savunma sistemi enzimlerinden SOD aktivitesine ait değerlerin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.5.4.1 ve Şekil 4.5.4.1' de verilmiştir. Buna göre ortalama SOD aktivitesi açısından uygulama süresi ve Zn konsantrasyonları arasında hem yaprak hem de köklerde anlamlı fark ($P < 0,05$) bulunmuştur.

Çizelge 4.5.4.1. Zn uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama SOD aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi ($n = 5$, Ort. \pm Std. Sapma).

		SOD Aktivitesi (U/mg protein)			
Konsantrasyonlar		1.gün	3.gün	10.gün	
Yapraklar	Kontrol	34,52 \pm 3,53	34,56 \pm 2,19	34,81 \pm 2,71	
	50 μM Zn	37,85 \pm 3,57	47,74 \pm 3,53	52,55 \pm 3,02	
	200 μM Zn	66,83 \pm 2,81	59,94 \pm 2,48	70,82 \pm 1,52	
	500 μM Zn	49,62 \pm 4,86	40,61 \pm 3,99	39,05 \pm 2,15	
Kökler	Kontrol	18,89 \pm 1,83	19,26 \pm 0,82	18,85 \pm 1,43	
	50 μM Zn	25,50 \pm 1,21	29,59 \pm 2,54	40,55 \pm 1,74	
	200 μM Zn	35,91 \pm 1,81	45,54 \pm 3,74	59,94 \pm 2,27	
	500 μM Zn	13,25 \pm 3,04	27,12 \pm 2,44	14,67 \pm 2,29	

Çizelge 4.5.4.1' de belirtildiği gibi, hem kök hem de yaprak kısımlarındaki en yüksek SOD aktivitesi 200 μM Zn konsantrasyonunda ve 10. günde elde edilmiştir. Bu değerler yapraklar için 70,82 \pm 1,52 U/mg protein, kökler için 59,94 \pm 2,27 U/mg protein' dir. 500 μM Zn konsantrasyonunda ise yapraklarda tüm uygulama sürelerinde kontrole göre bir artış meydana gelmiş olmasına rağmen elde edilen değerler 200 μM Zn konsantrasyonuna göre düşüktür. Aynı zamanda 500 μM Zn konsantrasyonunda köklerde meydana gelen değişim de yapraklardakine benzerdir.



Şekil 4.5.4.1. Zn uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama SOD aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5).

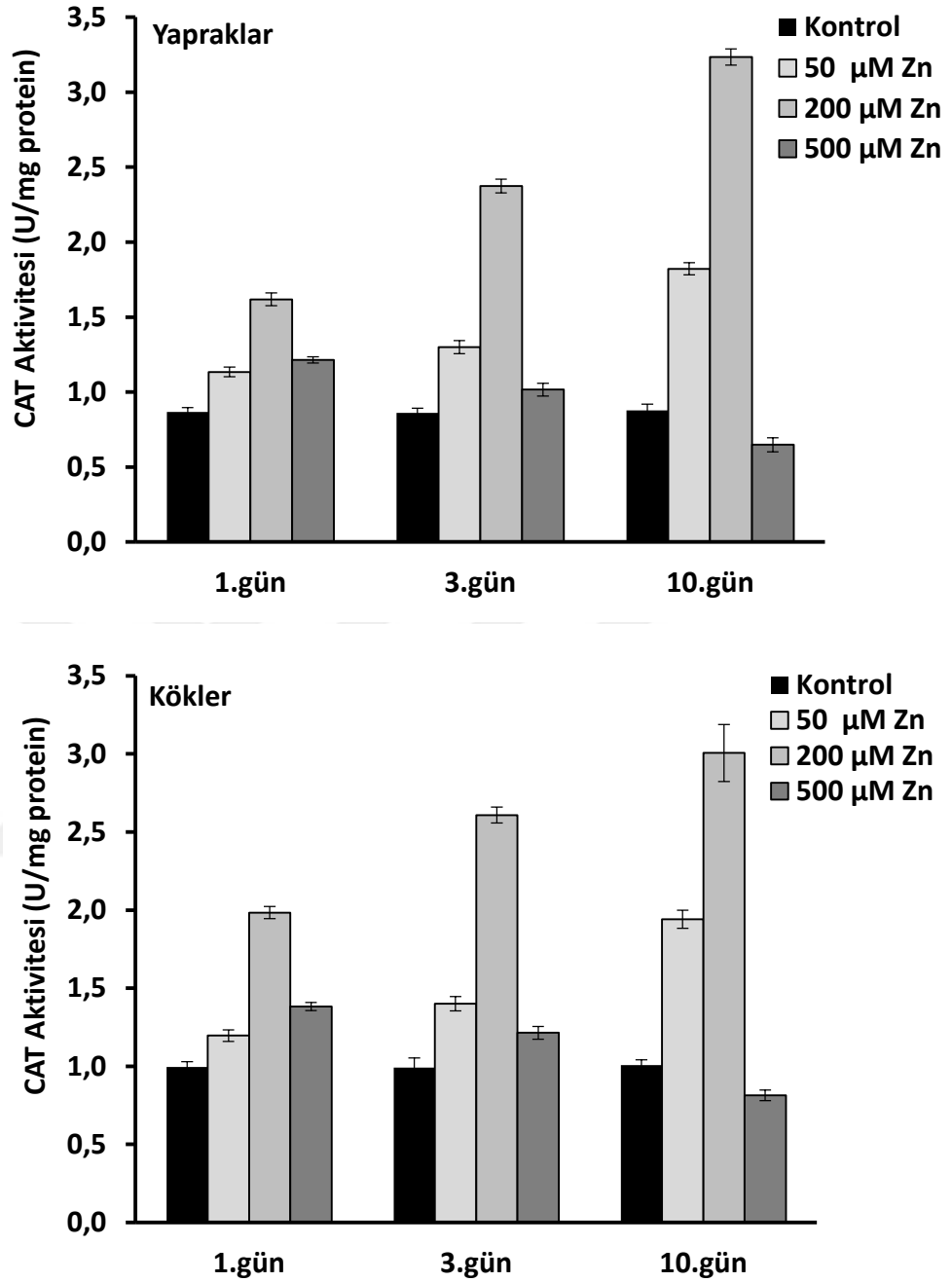
Çizelge 4.5.4.2 ve Şekil 4.5.4.2’ de 50, 200 ve 500 µM konsantrasyonlarında Zn uygulanmış fideler ile kontrol grubu fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen ortalama CAT aktivitesinin uygulama süresine göre değişimine yer verilmiştir. CAT aktivitesinde de uygulama süresi ve Zn konsantrasyonlarına bağlı olarak hem yaprak hem de köklerde anlamlı bir fark ($P<0,05$) bulunmuştur. En yüksek CAT aktivitesi, 10 gün boyunca 200 µM Zn uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında tespit edilmiştir. Yapraklarda bu değer yaklaşık $3,23 \pm 0,05$ U /mg protein iken köklerde bu değer $3,01$

$\pm 0,18$ U/mg protein olarak tespit edilmiştir. 10 gün boyunca 500 μ M Zn uygulanmış fidelerin yaprak ve kök kısımlarında elde edilen değerlerin ise kontrol örneklerinde edilen değerlerden daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.5.4.2. Zn uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama CAT aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5, Ort. \pm Std. Sapma).

CAT Aktivitesi (U/mg protein)				
	Konsantrasyonlar	1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	0,87 \pm 0,03	0,86 \pm 0,03	0,88 \pm 0,04
	50 μ M Zn	1,13 \pm 0,03	1,30 \pm 0,04	1,82 \pm 0,04
	200 μ M Zn	1,62 \pm 0,04	2,37 \pm 0,05	3,23 \pm 0,05
	500 μ M Zn	1,21 \pm 0,02	1,02 \pm 0,04	0,65 \pm 0,05
Kökler	Kontrol	1,00 \pm 0,03	0,99 \pm 0,06	1,01 \pm 0,03
	50 μ M Zn	1,20 \pm 0,04	1,40 \pm 0,05	1,94 \pm 0,06
	200 μ M Zn	1,98 \pm 0,04	2,61 \pm 0,05	3,01 \pm 0,18
	500 μ M Zn	1,38 \pm 0,03	1,21 \pm 0,04	0,81 \pm 0,03

Katalaz (CAT) Aktivitesi



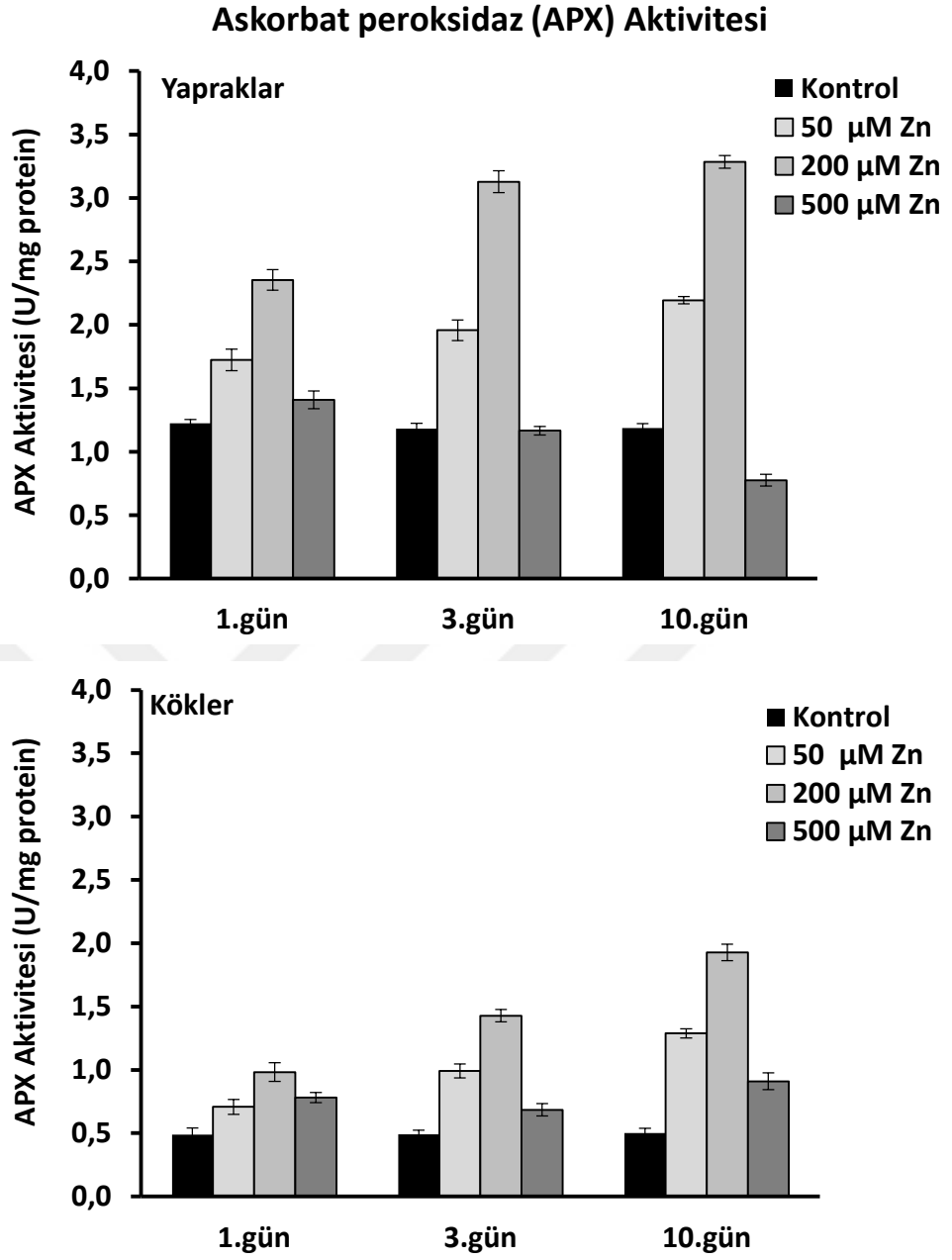
Şekil 4.5.4.2. Zn uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama CAT aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5).

Farklı konsantrasyonlarda Zn uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarından elde edilen APX aktivitesine ait ortalama değerlerin uygulama süresine göre değişimi Çizelge 4.5.4.3 ve Şekil 4.5.4.3' de verilmiştir. Buna göre uygulama süresi ve Zn konsantrasyonlarına bağlı olarak APX aktivitesinde hem yaprak hem de köklerde anlamlı fark bulunmuştur ($P<0,05$).

Çizelge 4.5.4.3. Zn uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama APX aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5, Ort. ± Std. Sapma).

		APX Aktivitesi (U/mg protein)		
Konsantrasyonlar		1.gün	3.gün	10.gün
Yapraklar	Kontrol	1,22 ± 0,03	1,18 ± 0,04	1,19 ± 0,04
	50 µM Zn	1,72 ± 0,08	1,96 ± 0,08	2,19 ± 0,03
	200 µM Zn	2,35 ± 0,08	3,13 ± 0,09	3,28 ± 0,05
	500 µM Zn	1,41 ± 0,07	1,17 ± 0,03	0,78 ± 0,05
Kökler	Kontrol	0,49 ± 0,05	0,49 ± 0,03	0,50 ± 0,04
	50 µM Zn	0,71 ± 0,06	0,99 ± 0,05	1,29 ± 0,04
	200 µM Zn	0,98 ± 0,07	1,43 ± 0,05	1,93 ± 0,06
	500 µM Zn	0,78 ± 0,04	0,68 ± 0,05	0,91 ± 0,07

Çizelge 4.2.4.3' de belirtildiği gibi, en yüksek APX aktivitesi hem kök hem de yaprak kısımlarında 10 gün boyunca 200 µM Zn konsantrasyonu uygulanmış örneklerde elde edilmiştir. Bu değerler yapraklar için $3,28 \pm 0,05$ U/mg protein, kökler için $1,93 \pm 0,06$ U/mg protein' dir. 500 µM Zn konsantrasyonunda yapraklarda uygulama süresi arttıkça APX aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir. 500 µM Zn konsantrasyonunda kök kısımlarında ise kontrole göre artış meydana gelmesine rağmen bu artışın özellikle 3. ve 10. günlerde 50 µM Zn uygulamasında elde edilen değerlerden düşük olduğu görülmektedir.



Şekil 4.5.4.3. Zn uygulanan *V. olympicum* fidelerinde ortalama APX aktivitesinin konsantrasyon ve süreye bağlı değişimi (n= 5).

Farklı konsantrasyonlarda Zn uygulanmış fidelerin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen antioksidatif savunma sistemi enzimlerine (SOD, CAT, APX) ait ortalama aktivite değerlerinin uygulama süresine göre değişimi iki yönlü ANOVA testi ile analiz edilmiştir. Elde edilen istatistiksel veriler Çizelge 4.5.4.4’ de yer almaktadır.

Çizelge 4.5.4.4. Antioksidatif savunma sistemi enzimlerine (SOD, CAT, APX) ait ortalama aktivite değerleri için iki yönlü ANOVA sonuçları [Tüm parametreler konsantrasyon (Zn) x süre için α ; 0,05 anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir].

Faktör	SOD Aktivitesi			CAT Aktivitesi		APX Aktivitesi	
	<i>df</i>	F	P	F	P	F	P
Kökler							
Konsantrasyonlar	3	440,986	0,000	1286,70	0,000	683,104	0,000
Uygulama süresi	2	85,90	0,000	82,12	0,000	251,097	0,000
Konsantrasyon x Süre	6	42,16	0,000	121,14	0,000	68,275	0,000
Hata	48						
Yapraklar							
Konsantrasyonlar	3	210,68	0,000	3672,81	0,000	2359,03	0,000
Uygulama süresi	2	5,235	0,009	475,53	0,000	48,98	0,000
Konsantrasyon x Süre	6	14,203	0,000	550,42	0,000	134,80	0,000
Hata	48						

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Araştırmamızda laboratuvar koşullarında Hoagland çözeltilinde yetiştirilen ve Cd, Cr, Cu, Ni, Zn uygulamalarına maruz bırakılan *Verbascum olympicum* Boiss. fidelerinin kök ve yaprak kısımlarına ait büyüme parametreleri (biyokütle, su ve klorofil içeriği), nitrat özümleme (NRA ve GS) ve antioksidatif savunma sistemine ait bazı enzimlerin (SOD, CAT ve APX) aktivitelerindeki değişiklikler ile lipid peroksidasyon düzeyi ve hücre membran zararı belirlenmiştir.

5.1. Kadmiyum (Cd)

Çalışma sonuçlarımız Cd uygulamalarının *V. olympicum* fidelerinin kök ve yaprak kısımlarındaki su içeriği ve biyokütle üretimini olumsuz etkilediğini göstermektedir (Çizelge 4.1.1.1. ve Çizelge 4.1.1.2.). Su içeriğindeki düşüş ağır metallerin kök tüyü oluşumu (Pál ve ark. 2006), membran geçirgenliği ve iletim demetlerinin çapı ve sayısı üzerindeki negatif etkisi (Barceló ve Poschenrieder 1990, Vaculík ve ark. 2012) ile ilişkilendirilebilir. Aynı zamanda Cd'un stomaların hareketinde önemli bir yere sahip olan K^+ ve Ca^{+2} 'un alınımını engellemesi, su içeriğinin azalmasının nedenlerinden biri olabilir (Poschenrieder ve ark. 1989). Pál ve ark. (2006) *Zea mays* L. bitkisinin kök büyümesindeki azalışın, yüksek konsantrasyonlarda Cd'un bitki su içeriği ile besin elementlerinin alınımını azaltmasından kaynaklandığını ileri sürmektedir. Nitekim Cd'un kök ve yaprak gelişimini olumsuz etkileyerek bitki biyokütlesi ile su ve bitki besin elementlerinin alınımını azalttığı farklı bitki türleriyle yapılan çalışmalarda da ifade edilmiştir (El-Shintinawy ve El-Ansary 2000, Hasan ve ark. 2009, Gajewska ve Sklodowska 2010, Sharma ve ark. 2010, Gallego ve ark. 2012). *V. olympicum* fidelerinin kök ve yaprak kısımlarında da Cd uygulamasına bağlı olarak bitki besin elementlerinin (Cu, Mn, Mo ve Zn) alınım durumu ve Cd içeriği ICP-MS (Inductively coupled plasma-MS) ile belirlenmiş olup (Arslan ve ark. 2014), Cd dozu ve uygulamasına bağlı olarak Cd, Mn, Cu ve Zn miktarlarının arttığı, yaprak Mo içeriğinin ise azaldığı ortaya konmuştur. Buna ilaveten, *V. olympicum*'un kök ve yapraklarındaki Cd içeriğinin doza ve süreye bağlı olarak bitkiler için belirlenen normal Cd konsantrasyonunun (0,03-0,5 mg/kg KA) (Maestri ve ark. 2013) çok daha üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar *V. olympicum* fidelerinin mineral beslenmesinde Cd'un etkisinin elemente göre

değiştiğini, Zn ve Cu beslenmesini olumsuz yönde etkilemediğini göstermiştir. (Arslan ve ark. 2014).

V. olympicum fidelerinin biyokütlesinde Cd uygulamalarına bağlı olarak meydana gelen azalış, fotosentez sürecinin olumsuz yönde etkilenmesi ile ilişkilendirilebilir (Şekil 4.1.1.3 ve Şekil 4.1.1.4). Klorofil *a*, klorofil *b* ve total klorofil içeriğinde belirlenen düşüş klorofil içeriğinin Cd'a oldukça duyarlı olduğunu (Møller ve ark. 2007) ve fotokimyasal aygıtın oksidasyonundan dolayı fotosentetik pigment içeriğinin azaldığını ortaya koyan çalışmaları (Somashekaraiah ve ark. 1992) desteklemektedir. Azalan pigment içeriği beraberinde fotosentez oranını da düşürmektedir (Rastgoo ve Alemzadeh 2011). Cd fotosentezin karanlık evresinde karbondioksit fiksasyonu aşamasında görevli enzimlerin (RuBisCo) aktivitesini sınırlandırarak da fotosentetik verimi düşürebilir (Benavides ve ark. 2005, Dinakar ve ark. 2009). Cd'un ayrıca kloroplastlardaki Mg' un yerini alarak klorofil yapısının bozulmasına neden olduğu öne sürülmektedir (Kupper ve ark. 2001, Nedjimi ve Daoud 2009, Yılmaz ve Parlak 2011). Benavides ve ark. (2005)'e göre kadmiyumun Fe ile antagonistik bir ilişkiye sahip olması ve aşırı Cd alınımının bitkide Fe eksikliğine yol açması nedeniyle bitkilerde klorozis meydana gelmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda Cd varlığında oluşan Fe ve P eksikliği, Mg ve Mn taşınımında meydana gelen sorunlar ve kloroplast yoğunluğu ve büyüklüğündeki değişiklikler de pigment miktarındaki ve biyokütledeki azalış ile ilişkilendirilebilir (Benavides ve ark. 2000, Baryl ve ark. 2001). Yüksek Cd konsantrasyonlarının klorofil içeriğini azalttığı ve fotosentez sürecini negatif yönde etkilediği *Atriplex halimus* subsp. *schweinfurthii* (Nedjimi ve Daoud 2009), *Groenlandia densa* (Demirezen Yılmaz ve Uruç Parlak 2011) gibi farklı bitki türlerinde de ortaya konmuştur.

Yetiştirme ortamında yüksek Cd varlığı bitkilerin azot metabolizmasını da olumsuz etkilemektedir (Chaffei ve ark. 2004). Solanki ve Dhankar (2011)'a göre bitki beslenmesinin en önemli bileşeni olan nitratın alınımı Cd tarafından engellendiğinde, nitrat varlığında aktif hale gelen NR aktivitesi de engellenmektedir. Bu durum bitkilerin temel fizyolojik süreçlerinden biri olan nitrat özümlemesinin olumsuz etkilenmesine neden olur. Kadmiyumun bitkilerin nitrat alınımını sınırlayarak NR aktivitesinde düşüşe neden olduğunu rapor eden bir takım çalışmalar (Gouia ve ark. 2000, Sharma ve Dubey 2006) bu ifadeleri destekler niteliktedir. Bizim çalışmamızda da Cd uygulanan *V.*

olympicum fidelerinde NR aktivitesi doza ve uygulama süresine bağı olarak azalmıştır (Çizelge 4.1.2.1., Şekil 4.1.2.1.). Hem kök hem de yaprak kısımlarında belirlenen NR aktivitesindeki bu düşüş kadmiyumun bitkilerde nitrat özümlemesini sınırladığını ifade eden çalışmalarla uyumludur (Wahid ve ark. 2007, Dinakar ve ark. 2009, Sharma ve ark. 2010). Kofaktör olarak molibdene (Mo) ihtiyaç duyan nitrat redüktazın (Solomonson ve Barber 1990) aktivitesi ekolojik koşullarda nitrat varlığının bir göstergesi olarak kabul edilir (Gebauer ve ark.1988, Olsson ve Falkengren-Grerup 2003, Arslan ve Güteryüz 2005). Dolayısıyla bitkideki Mo alınımı enzimin aktivitesini ortaya koyan temel özelliklerden biridir. *V. olympicum* fidelerinde kadmiyum uygulaması ile NR aktivitesinde meydana gelen azalış, enzimin kofaktörü olan bitki besin elementlerinden molibdenin eksikliğine bağlanabilir. Çünkü Cd uygulanmış *V. olympicum* fidelerinde Mo içeriğinin azaldığı daha önce tarafımızdan yapılan çalışmada tespit edilmiştir (Arslan ve ark. 2014).

Bitkilerde nitrat beslenmesinin ilk aşamasını karakterize eden anahtar niteliğindeki NR'ın aktivitesindeki değişim azot metabolizmasının sonraki basamaklarını ve bu basamaklarda yer alan enzimlerin işlevini de belirlemektedir. Nitekim azot metabolizmasına ait enzimlerden bir diğeri olan glutamin sentetaz (GS) aktivitesinde bu durum gözlenmiştir. Çalışmamızda *V. olympicum* fidelerinin kök ve yapraklarında GS aktivitesi Cd uygulamalarına bağı olarak azalmıştır (Çizelge 4.1.2.2., Şekil 4.1.2.2.). Bu durum GS'ın ATP ve NAD(P)H'a olan ihtiyacı ile açıklanabilir. Prasad (2004)'a göre Cd, fotosentetik elektron taşıma zincirine (ETS) zarar vererek metabolik enerji kaynaklarının [ATP, NAD(P)H] oluşumunu engellemektedir. Masclaux-Daubresse ve ark. (2010), fotosentez, solunum ve fotosolunum yollarının ürünleri olan ATP, Ferredoksin (Fdx) ve NAD(P)H'ın azot asimilasyonu için gerekli olduğuna işaret etmektedir. Chaffei ve ark. (2004)'da domates bitkisinde GS gibi azot metabolizması enzimlerinin ihtiyaç duyduğu enerji kaynaklarının (NAD(P)H) Cd uygulamaları ile azaldığını saptamıştır. GS aktivitesi ve amino asit biyosentezinde Cd'un neden olduğu olumsuz etkiler çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Gouia ve ark. 2000, Kevresan ve ark. 2001, Chaffei ve ark. 2004, Wang ve ark. 2008, Gajewska ve ark. 2009, Mishra ve Dubey 2011).

Glutamin sentetaz aktivitesi aynı zamanda protein miktarı ile birebir ilişkilidir (Zheng-Xun ve ark. 2007, Wang ve ark. 2004). Nitrat indirgenmesi ile oluşan amonyum, glutamin

sentetaz tarafından özellikle GS/GOGAT döngüsü ile plastid/kloroplastlarda metabolize edilir (Masclaux-Daubresse ve ark. 2010). GS, glutamin oluşturmak için amonyumu glutamat molekülüne fiske ederek protein ve diğer azotlu bileşiklerin sentezini başlatır. NR ve GS aktivitesinin olumsuz etkilendiği durumlarda, gerekli azotun sağlanamamasından dolayı protein sentezi de bu durumdan olumsuz etkilenir (Solanki ve Dhankhar 2011). Aynı zamanda Cd varlığında bitkide artan reaktif oksijen radikallerinin (ROS) amino asitlerin yan zincirlerinde oksidasyona neden olduğu ve böylece protein fonksiyonunun bozulduğu belirtilmektedir (Solanki ve Dhankhar 2011). Cd'un protein içeriğinde azalışa neden olduğu farklı bitkilerle yapılan çalışmalarda da ortaya konmuştur (El-Shintinawy ve El-Ansary 2000, Kevresan ve ark. 2001, Mishra ve ark. 2006, Hasan ve ark. 2009, Sharma ve ark. 2010). Çalışmamızda da farklı konsantrasyonlarda Cd uygulanmış *V. olympicum* fidelerinde azot metabolizmasına ait enzim aktivitelerindeki azalışla birlikte protein içeriği de azalmıştır (Çizelge 4.1.2.3., Şekil 4.1.2.3.). Bu durum azot asimilasyonunun uygulanan Cd konsantrasyonlarından olumsuz etkilendiğini göstermekte olup, *V. olympicum* fidelerinin biyokütlesinde meydana gelen azalışla da birebir ilişkilidir.

Biyokütlenin azalmasına neden olan mekanizmalardan bir diğeri de hücresel anlamda Cd konsantrasyonlarına bağlı olarak membranlarda meydana gelen değişikliklerdir (Chaoui ve El Ferjani 2004). Cd'un hücre membranlarında yer alan ATPaz gibi enzimleri yapısal olarak bozulması (Vajpayee ve ark. 2002, Prasad 2004) lipid peroksidasyonu dediğimiz metabolik yıkıma neden olur. Lipid peroksidasyonunda, hücre membranlarındaki doymamış yağ asitlerinden hidrojenin ayrılması sonucu lipid radikalleri oluşmaktadır ve bu yıkım Malondialdehit (MDA) oluşumu ile son bulur (Mishra ve ark. 2006). Bu durum beraberinde membran geçirgenliği ve stabilitesinin bozulmasıyla sonuçlanır. Çalışmamızda Cd uygulaması *V. olympicum* fidelerinde konsantrasyonuna ve uygulama süresine bağlı olarak MDA içeriğini arttırmıştır (Çizelge 4.1.3.3., Şekil 4.1.3.3.). Bununla birlikte hücre membran zararına ve iyon sızıntısına ait elde ettiğimiz değerlerin de arttığı görülmektedir (Şekil 4.1.3.1., Şekil 4.1.3.2.). MDA içeriğinin ve hücre membran zararının Cd uygulamalarına bağlı olarak arttığını ve bu durumun bitkide oksidatif strese neden olduğunu gösteren farklı bitki türlerinde yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (Dixit ve ark. 2001, Schützendübel ve Polle 2002, Guo ve ark. 2004, Rai ve ark. 2004, Smeets ve ark. 2005, Shanker ve ark. 2005, Dazy ve ark. 2008, Diwan ve ark. 2010, Dominiquez

ve ark. 2010, Martins ve ark. 2011, Gallego ve ark. 2012, Li ve ark. 2012b). Bu çalışmalarda Cd'un reaktif oksijen radikalleri (ROS) meydana getirerek bitkilerde oksidatif stres oluşturduğu ve bu radikallerin öncelikli etki alanının hücre membranları olup (Gallego ve ark. 1996, Andrade ve ark. 2009) lipid peroksidasyonunu tetiklediği belirtilmektedir.

Serbest radikallerin (ROS) hücrede birikimi, lipitlerden, proteinlere, hatta DNA ve RNA ya kadar pek çok metabolik yapıya zarar verebilir. Bitkiler antioksidatif savunma sistemi ile bu zararın oluşumunu engellemektedir (Devi ve Prasad 1998 Lombardi ve Sebastiani 2005, Boojar ve Goodarzi 2007). Antioksidatif savunma sisteminde ilk basamakta yer alan süperoksit dismutaz (SOD), serbest radikalleri hidrojen peroksit ve oksijen moleküllerine dönüştürülerek etkisiz hale getirir. Çalışmamızda *V. olympicum* fidelerinin kök ve yaprak kısımlarında belirlenen SOD aktivitesi Cd konsantrasyonları ve uygulama süresindeki yükseliş ile ilişkili olarak artmıştır (Çizelge 4.1.4.1., Şekil 4.1.4.1.). Sharma ve ark. (2010) nın Cd toksitesine karşı tolerant olduğunu belirttikleri *Brassica juncea* T-59 varyetesi ile yaptığı çalışmada da benzer şekilde kök ve yapraklardaki SOD aktivitesi Cd stresine bağlı olarak artmıştır. Wang ve ark. (2010)' nın *Paulownia fortunei*' nin genç fideleri ile yaptığı çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Semane ve ark. (2007) tarafından *Arabidopsis thaliana*'da, Schickler ve Caspi (1999) tarafından *Alyssum* türlerinde, Ammar ve ark. (2008) tarafından domates bitkisinde de Cd uygulamasına bağlı olarak SOD aktivitesinin arttığı ifade edilmiştir.

ROS' ların oluşturduğu oksidatif strese karşı antioksidan enzimlerin biri ya da bir kaçını aynı anda aktif olabilir (Xu ve ark. 2010). Zira Wang ve ark. (2010) tarafından *Paulownia fortunei* türüne uygulanan kısa süreli Cd stresinde bitkinin savunma mekanizmalarının SOD/CAT döngüsü üzerinden etkili bir şekilde çalıştığı belirtilmiştir. CAT enzimi, SOD'un oluşturduğu H₂O₂'in su ve oksijene dönüştürülerek bertaraf edilmesinde görev almaktadır (Upadhyay ve Panda 2009). *V. olympicum* fidelerinde de SOD aktivitesindeki artışa paralel olarak uygulama süresi ve Cd konsantrasyonları arttıkça hem kök hem de yaprak kısımlarında CAT aktivitesi de artmıştır (Çizelge 4.1.4.3., Şekil 4.1.4.3.). Yüksek konsantrasyonlarda Cd' un SOD ve CAT aktivitesini arttırdığı *Hordeum vulgare* L. (Tiryakioğlu 2002), *Arachis hypogaea* L. (Dinakar ve ark. 2009), *Spartina densiflora* (Domínguez ve ark. 2010) gibi bitki türlerinde de gösterilmiştir. Bunun yanı sıra

literatürde Cd uygulamalarına bağlı olarak bitkide SOD aktivitesinin arttığı, CAT aktivitesinin azaldığı çalışmalar da mevcuttur (Fornazier ve ark. 2002, Sobkowiak ve ark.2004, Azpilicueta ve ark. 2007).

H₂O₂'in bertaraf edilmesinde yer alan bir diğer enzim de APX enzimidir ve mitokondri, kloroplast, sitosol ve peroksizom gibi H₂O₂ radikallerinin üretildiği organellerde etkin rol oynar (Dixit ve ark. 2001, Michalak 2006). Çalışmamızda 50, 100 ve 250 µM Cd konsantrasyonları 7 gün boyunca *V. olympicum*'da APX aktivitesini arttırmıştır (Çizelge 4.1.4.2., Şekil 4.1.4.2.). Cd stresine bağlı olarak bitkilerin verdiği antioksidatif yanıtlarda APX aktivitesinin arttığı farklı bitki türleri ile yapılan çalışmalarda da ifade edilmiştir (Shaw 1995, John ve ark. 2008). Hatta Smeets ve ark. (2005) Cd uygulamasına bağlı olarak *Phaseolus vulgaris*'de APX aktivitesinin arttığını ve Cd'un neden olduğu oksidatif streste askorbat-glutasyon döngüsünün önemli bir role sahip olduğunu belirtmiştir. Bunun yanı sıra *Helianthus annuus* gibi bazı bitkilerde Cd uygulamalarıyla birlikte APX aktivitesinin azaldığı ifade edilmektedir (Gallego ve ark. 1996). 7 gün boyunca 4 ve 40 µM Cd uygulaması yapılan bezelye bitkisinde (*Pisum sativum* L. cv. Azad) ise 4 µM Cd uygulamasının APX aktivitesinin arttığı, 40 µM Cd uygulamasının ise azalttığı belirlenmiştir (Dixit ve ark. 2001). Bu durum yüksek Cd konsantrasyonlarının APX enzimine yapısal olarak zarar vermesiyle ilişkilendirilebilir.

5.2. Krom (Cr)

Doğal koşullarda çevrede var olan krom bitkiler de toksik etki oluşturacak düzeyde değildir. Fakat madencilik gibi çeşitli faaliyetler sonucunda krom içeriğinin arttığı alanlarda zararlı etkilere sahip olabilir (Kabata-Pendias 2011, Kováčik ve ark. 2013). Özellikle Cr(VI) formunda kromun, düşük konsantrasyonlarda bile bitkilerde önemli hasarlara sebep olduğu belirtilmektedir (Shanker ve ark. 2005, Prado ve ark. 2010, Özdener ve ark. 2011, Gill ve ark. 2015). Ancak *Helianthus annuus* (Davies ve ark. 2002) ve *Allium cepa* (Liu ve ark. 1992) gibi bitki türlerinde Cr(III) formunda kromun büyümeyi azalttığı da ifade edilmektedir. Büyümede meydana gelen bu azalışın ana sebebi, mitotik indekste meydana gelen azalıştır ve bu durum Cr'un her iki formu için de geçerlidir (Singh ve ark. 2013). Çalışmamızda Cr₂(SO₄)₃ formunda kromun *V. olympicum* fidelerinin kök ve yaprak kısımlarına ait büyüme parametrelerini olumsuz etkilediği tespit edilmiş olup artan Cr konsantrasyonunun uygulama süresine bağlı olarak bitki

kısımlarının su içeriğini ve biyokütlesini azalttığı belirlenmiştir (Çizelge 4.2.1.1., Çizelge 4.2.1.2.). Aynı şekilde yapraklardaki klorofil (klorofil *a*, *b* ve toplam klorofil) içeriği de düşmüştür (Çizelge 4.2.1.3., Çizelge 4.2.1.4.). Bu durum *V. olympicum* fidelerinin biyokütlesinde meydana gelen azalışın, bitki su içeriğindeki azalma ve besin elementlerinin alınımının kısıtlanması ile de ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Shanker ve ark. (2005)'a göre krom besin elementlerinin alım yolları üzerinden bitki bünyesine alınarak özellikle Fe, S ve P ile rekabet etmektedir. Dolayısıyla krom varlığında oluşan Fe eksikliği fotosentez sürecinde aksaklıklara neden olurken, S eksikliği azot metabolizmasında yer alan enzimlere yapısal olarak önemli hasarlara yol açmaktadır. Calvin döngüsünde ve klorofil biyosentezinde yer alan enzimlerde meydana gelen yapısal bozulmalar ve elektron taşıma sisteminin inhibisyonu, Fe eksikliğine bağlı olarak fotosentez sürecinde görülen temel sorunlardır. Cr stresine bağlı olarak karbon fiksasyonunda yer alan RuBisCo enziminin aktivitesinin azaldığı dolayısıyla da fotosentez sürecinin olumsuz etkilendiği *Cyamopsis tetragonoloba*, *Pisum sativum* ve *Salvinia natans* türlerinde de ortaya konmuştur (Joshi ve ark. 2007, Dhir ve ark. 2009, Rodriguez-Serrano ve ark. 2006). Yüksek Cr konsantrasyonlarının klorofil içeriği ve fotosentez sürecini negatif yönde etkileyerek biyoküttele azalışa neden olduğu farklı bitki türlerinde de ortaya konmuştur (Monnet ve ark. 2001, Rai ve ark. 2004, Scoccianti ve ark. 2006, Dazy ve ark. 2008). Örneğin Rai ve ark. (2004) *Ocimum tenuiflorum* bitkisinde klorofil *a*, *b* ve total klorofilin sırasıyla % 69, 73 ve 70 oranında azaldığını ve bu durumun biyokütlerdeki azalış ile paralel olduğunu belirtmiştir.

Yüksek Cr konsantrasyonlarının bitki besin elementlerinden S'ün alınımını engellemesi sonucu bitkilerin özellikle amino asit biyosentezinde sorunlar ortaya çıkmaktadır (Vajpayee ve ark. 2000, Rai ve ark. 2004). Yüksek konsantrasyonlarda Cr'un bitkilerde S eksikliğine neden olduğu Schiavon ve ark. (2008, 2012) tarafından da belirtilmektedir. Benzer şekilde nitrat alınımının da Cr uygulamalarına bağlı olarak engellendiği Singh ve ark. (2013) tarafından yapılan derleme çalışmasında ifade edilmiştir. Azot metabolizmasının olumsuz etkilenmesinin nedeni sadece nitrat gibi bitki besin maddelerinin alınmaması değil aynı zamanda Cr'un bu süreçte yer alan enzimler üzerindeki engelleyici etkisidir (Gangwar ve Singh 2011). *V. olympicum* fidelerinde artan Cr konsantrasyonunun (50, 100 ve 200 μ M Cr) zamana bağlı olarak azot metabolizması enzimlerinin (NR ve GS) aktivitesini (Çizelge 4.2.2.1., Çizelge 4.2.2.2.) ve aynı zamanda

protein içeriğini azalttığı görülmektedir (Çizelge 4.2.2.3., Şekil 4.2.2.3.). Benzer sonuçlara 1-200 µM arasında değişen konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde Cr uygulaması yapılmış *Nelumbo nucifera* ve *Nymphaea alba* bitkilerinde de rastlanmış olup NR aktivitesinin önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir (Vajpayee ve ark. 1999, 2000). Panda ve Patra (2000) ise ≥ 2 µM Cr konsantrasyonlarının *Triticum aestivum*'un NR aktivitesinde azalışa neden olduğunu ifade etmiştir. NR aktivitesindeki değişimler azot metabolizmasının bir diğer enzimi olan GS için gerekli amonyum konsantrasyonlarının değişimine neden olur. GS, ATP ve NAD(P)H gibi enerji kaynakları ile amonyumu kullanarak GS/GOGAT döngüsü üzerinden amino asitleri meydana getirmektedir. Cr varlığında fotosentez sürecinde yaşanan sorunlar nedeniyle gerekli enerji kaynaklarının sağlanamaması GS aktivitesinin olumsuz etkilenmesine neden olur (Vajpayee ve ark. 2000). Cr varlığında NR ve GS aktivitesindeki düşüş dolaylı olarak protein sentezini de olumsuz etkilemektedir (Solanki ve Dhankhar 2011, Tripathi ve ark. 2012). Protein içeriğindeki azalış beraberinde bitki biyokütlesi üzerinde de negatif etkilere yol açmaktadır. Aynı zamanda Cr varlığında bitkide artan reaktif oksijen radikallerinin (ROS) amino asitlerin yan zincirlerinde oksidasyona neden olması protein içeriğindeki azalış ile birebir ilişkilendirilebilir. (Tiwari ve ark. 2009).

Cr'un bitkilerde oksidatif strese neden olduğu, *Pisum sativum* (Dixit ve ark. 2002), *Helianthus annuus* L. (Gallego ve ark. 2002), *Matricaria chamomilla* L. (Kováčik ve ark. 2013) gibi farklı bitki türlerinde yapılan çalışmalarla da desteklenmektedir. Cr stresine karşı oluşan bu radikallerin sadece reaktif oksijen türlerinin (ROS) olmayıp aynı zamanda reaktif nitrojen radikallerini (RNS) de içerdiği Kováčik ve ark. (2013) tarafından vurgulanmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin birikimi Cr konsantrasyonlarından bağımsız olup başta membran lipidleri olmak üzere pek çok yapıya zarar verirken, RNS'ler Cr konsantrasyonlarına bağlı olarak birikir ve Cr'un toksik etkilerinde düzenleyici rol oynar. Lipid peroksidasyonu, oksidatif stresin en belirgin göstergesi olup Cr'un hücre membranları üzerinde neden olduğu bu etki *Brassica juncea* (Pandey ve ark. 2005), *Sorghum bicolor* L. (Malmir 2011) gibi pek çok bitki türünde de gösterilmiştir. Çalışmamızda da *V. olympicum* fidelerinde lipid peroksidasyonu MDA içeriğiyle belirlenmiş olup, uygulanan Cr konsantrasyonları ve süredeki artışa bağlı olarak MDA içeriği artmıştır (Çizelge 4.2.3.3, Şekil 4.2.3.3.). Aynı zamanda hücre membran zararı ve iyon sızıntısı değerleri de Cr uygulamasına bağlı olarak artmıştır (Çizelge 4.2.3.1 ve

Çizelge 4.2.3.2.). Bu durum, Cr uygulamalarının *V. olympicum* fidelerinde ROS birikimini arttırarak oksidatif strese neden olduğunun en belirgin göstergesidir.

Reaktif oksijen türlerinin zararlı etkisinin bertaraf edilmesinde yer alan bir diğer mekanizma antioksidatif savunma sistemidir. Enzimatik antioksidatif savunma sisteminde yer alan SOD, CAT ve APX enzimlerinin aktivitesindeki değişimler bitkinin Cr stresine verdiği yanıtlar hakkında bilgi verir. *V. olympicum* fidelerinin kök ve yaprak kısımlarında Cr konsantrasyonları ve uygulama süresine bağlı olarak SOD aktivitesinin arttığını görmekteyiz (Çizelge 4.2.4.1., Şekil 4.2.4.1.). Bu durum *V. olympicum* fidelerinde Cr stresi ile başa çıkmada SOD'un bitkinin savunma sisteminin bir bileşeni olabileceğinin gösterir. Benzer bir sonuç Rai ve ark. (2004) tarafından *Ocimum tenuiflorum*'da gösterilmiştir. Literatürde çeşitli bitki türlerinde buna benzer sonuçlar ortaya konmuştur (Labra ve ark. 2006, Zhang ve ark. 2005, 2007). Diwan ve ark. (2010)'da *Brassica juncea* ve *Vigna radiata*'da 50, 100, 200 µM Cr uygulamalarının SOD aktivitesinde konsantrasyona bağlı bir artış meydana getirdiğini belirtmiştir. Fakat *Vigna radiata*'da meydana gelen artışın, oluşan serbest radikallerin tamamını yok edecek kadar yüksek olmadığı da vurgulanmıştır. Antioksidatif savunma sisteminde yer alan diğer iki enzim olan CAT ve APX ise H₂O₂'i su ve oksijene dönüştürerek ROS'ların bertaraf edilmesinde görev alır. Fakat bu iki enzimin hücredeki lokasyonu birbirinden farklı olup kloroplastlarda APX enzimi, sitosolde CAT enzimi aktiftir. Rai ve ark. (2004) tarafından *Ocimum tenuiflorum* ile yapılan çalışmada antioksidatif enzimlerden APX aktivitesinin azaldığı, CAT aktivitesinin ise arttığı belirtilmiştir. Bu nedenle *Ocimum tenuiflorum* da antioksidatif savunma sisteminin SOD/CAT yönünde etkili olduğu vurgulanmıştır. *V. olympicum* fidelerinde ise hem CAT hem de APX aktivitesinin uygulama süresi ve Cr konsantrasyonlarına bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.2.4.2., Çizelge 4.2.4.3.). SOD, CAT ve APX aktivitelerindeki artış, oksidatif strese neden olan radikallerin (ROS) bertaraf edilmesinde *V. olympicum* fidelerinin uygulanan Cr konsantrasyonlarına ve uygulama süresine karşı güçlü bir antioksidatif savunma sistemine sahip olduğu ve bozulmuş alanlarda gelişebilen bir tür olmasında bu antioksidatif savunma sisteminin önemli katkılar sağladığı söylenebilir.

5.3. Bakır (Cu)

Yaygın çevresel kirleticilerden olan krom ve kadmiyumun yanı sıra çalışmamızda *V. olympicum* fidelerinin bitki büyüme ve gelişimi için gerekli olan bitki besin elementlerinden bakır, nikel ve çinkonun artan konsantrasyonlarına verdiği yanıtlar da ortaya konmuştur. Cu uygulaması varlığında *V. olympicum* fidelerinin kök ve yaprak kısımlarındaki biyokütle ve su içeriğinde azalış meydana gelmiştir (Çizelge 4.3.1.1., Çizelge 4.3.1.2.). Benzer sonuçlar Monni ve ark. (2000)'nın *Calluna vulgaris* (L.) Hull., Chigbo ve ark. (2013)'nin *Brassica juncea* ile Chatterjee ve ark. (2006)'nin ise *Raphanus sativus* ile yaptıkları çalışmalarda da görülmektedir. Bu durum bitki besin elementlerinden biri olan Cu'nun yüksek konsantrasyonlarda toksik etkilere neden olduğunun bir göstergesidir ve bakırın çeşitli metabolik yollarda yer alan enzim ve proteinlere yapısal ve fonksiyonel olarak zarar vermesiyle yakından ilişkilidir (Teisseire ve Guy 2000).

Bitkilerdeki bakırın yarısından fazlasının plastosiyanin gibi fotosentetik aygıtlarda ve fotosentez sürecinde yer almasından dolayı (Hänsch ve Mendel 2009) Cu'nun toksik etkilere neden olduğu metabolik yolların başında fotosentez gelmektedir (Prasad 2004). Yruela (2005) ise Cu'nun fotosentetik elektron taşıma zincirine zarar verdiğini, bir protein kompleksi olan PS II'nin yapısını bozduğunu belirtmektedir. Bitkinin diğer metabolik yollar için gerekli enerji kaynaklarının fotosentez sürecinde üretilmemesi, bitkinin büyüme parametrelerinde gözlenen azalışı destekleyici niteliktedir (Devi ve Prasad 1998, Prasad ve ark. 2001, Chatterjee ve ark. 2006, Boojar ve Goodarzi 2007). Nitekim *V. olympicum* fidelerinde biyokütle ve su içeriğindeki azalışa ek olarak klorofil içeriği de uygulama süresi ve Cu konsantrasyonlarına bağlı olarak azalmıştır (Çizelge 4.3.1.3., Çizelge 4.3.1.4.). Özellikle de klorofil *b* içeriğinin uygulanan Cu konsantrasyonlarından daha fazla etkilendiği görülmektedir. Klorofil *b* ile ilgili benzer sonuçlara sucul bir bitki olan *Myriophyllum alterniflorum* DC. da rastlanmaktadır (Delmail ve ark. (2011). Nichols ve ark. (2000) tarafından da *Salvinia minima*'da yüksek Cu konsantrasyonlarının fotosentetik pigmentleri ve beraberinde biyokütleyi azalttığı ortaya konmuştur.

Aynı zamanda Fenton/Haber-Weiss reaksiyonları ve Fotosistem I'de elektron taşınımı gibi fotosentezde yer alan önemli metabolik süreçler, Cu ve Fe'in varlığında koordineli olarak gerçekleşir (Hänsch ve Mendel 2009). Cu toksitesine bağlı olarak Fe alımının

engellenmesi bu ilişkisinin bozulmasına neden olmaktadır. Cu'ın Fe, Mo, Mn gibi mikrobesein elementlerinin alınımını engellediği pek çok çalışmada belirtilmiştir (Chatterjee ve ark. 2006, Hänsch ve Mendel 2009). *V. olympicum* fidelerinde de Cu uygulamasına bağlı olarak Fe içeriğinin azaldığı Erdemir ve ark. (2014) tarafından gösterilmiştir.

Yüksek konsantrasyonlarda Cu'ın mikro besin elementlerinin alınımını engellemesi ile birlikte nitrat alınımını da engellediği belirtilmektedir. Kovacık ve ark.(2009) tarafından bakırın azot metabolizması üzerindeki etkisinin nitrat alınımı ve indirgenmesi sürecinde yaşandığı, bu durumun protein sentezini de engellediği belirtilmektedir. Cu stresine bağlı olarak nitrat alınımında meydana gelen azalış, NR aktivitesindeki değişimin temel kaynağıdır (Llorens ve ark. 2000, Xiong ve ark. 2006, Li ve ark. 2007). Bunun dışında, nitratın indirgenmesinde önemli rol oynayan NR enziminin içerdiği SH gruplarına reaktif Cu iyonlarının bağlanma eğiliminden dolayı da NR aktivitesinde azalış meydana gelebilir. Bu durum NR'ın yapısal olarak bozulmasına neden olarak geriye dönüşü olmayan sonuçları doğurur. Yüksek Cu konsantrasyonlarına bağlı olarak mikrobesein elementlerinden Mo'in yeterli düzeyde alınamaması sonucunda da NR enzimi yapısal olarak bozulabilir. Nitekim Mo, NR'ın yapısında kofaktör olarak bulunur ve yeterli düzeyde alınamaması NR aktivitesini düşürür. *V. olympicum* fidelerinde de NR aktivitesinin uygulanan Cu konsantrasyonlarına bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.3.2.1., Şekil 4.3.2.1.). Bu durum Cu uygulamasına bağlı olarak Mo eksikliğinden kaynaklanmış olabilir. Nitekim Erdemir ve ark. (2014) tarafından *V. olympicum* fidelerinde Cu uygulamasına bağlı olarak Mo içeriğinin azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca *V. olympicum* fidelerinin GS aktivitesinde de artan Cu konsantrasyonları ve uygulama süresine bağlı olarak azalış meydana gelmiştir (Çizelge 4.3.2.2., Şekil 4.3.2.2.). GS, azot özümlemesi sonucu oluşan amonyumu amino asitlerin oluşumunda kullanır ve bu basamakta fotosentetik ve mitokondriyal enerji kaynaklarına ihtiyaç duymaktadır. Cu'ın bu metabolik enerji kaynaklarının oluşumunda meydana getirdiği sorunlardan dolayı GS aktivitesinin azaldığı düşünülmektedir (Xiong ve ark. 2006, Li ve ark. 2007). Bu durum beraberinde protein sentezini de etkilemektedir. Nitekim *V. olympicum*'da NR ve GS aktivitelerindeki azalışa paralel olarak eriyebilir protein içeriğinin de azaldığı görülmektedir (Çizelge 4.3.2.3., Şekil 4.3.2.3). Başta nitratın sonrasında ise amonyumun fikse edilememesi amino asitlerin ve proteinlerin

oluşumunu engellemektedir. Protein içeriğindeki azalışın bir nedeni de yüksek konsantrasyonlarda Cu'ın SH grubuna sahip sistein gibi amino asitleri veya bu gibi amino asitleri içeren proteinleri yapısal olarak bozmasıdır. Nitekim reaktif Cu iyonları, SH gruplarına bağlanma eğilimi göstererek fitoşelat oluşumunu tetiklemektedir (Demirevska-Kepova ve ark. 2004).

Cu'ın çeşitli metabolik süreçlerde meydana getirdiği olumsuz etkiler, reaktif oksijen radikallerinin (ROS) oluşumuna neden olarak membran lipidleri üzerinde peroksidatif zincir reaksiyonunu başlatır (Fernandes ve Henriques 1991). Bu reaksiyon, malondialdehit (MDA) oluşumuyla sonlanır. Bu nedenle MDA içeriği, bitkide meydana gelen oksidatif stresin belirleyicisi niteliğindedir. Çalışmamızda da *V. olympicum* fidelerinde Cu uygulamalarının, konsantrasyon ve süredeki artışa paralel olarak MDA içeriğini arttırdığı gözlenmiştir (Çizelge 4.3.3.3. ve Şekil 4.3.3.3.). Bu durum Cu uygulamalarına bağlı olarak oksidatif stres oluşumunun bir göstergesidir. Thounaojam ve ark. (2012) da 10, 50, 100 µM Cu konsantrasyonlarının 5 gün boyunca *Oryza sativa* L. bitkisinde MDA içeriğini arttırdığını tespit etmiştir. Mazhoudi ve ark. (1997) ise *Lycopersicon esculentum*' da Cu uygulamasına bağlı olarak MDA içeriğinin arttığını göstermiştir. Buna benzer sonuçlar Wang ve ark. (2004) tarafından Cu hiperakümülatörü olan *Commelina communis* türünde, Saha ve ark. (2012) tarafından *Camellia sinensis* bitkisinde, Hartley-Whitaker ve ark. (2001) tarafından *Holcus lanatus*' da ve Xiong ve ark. (2008) tarafından *Kummerowia stipulacea* bitkisinde de elde edilmiştir. Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda Cu iyonlarının membranlardaki ATPaz enzimlerinin yapısını değiştirdiği ve hücre membranlarının stabilitesini bozduğu Prasad (2004) tarafından belirtilmiştir. Bizim sonuçlarımızda da *V. olympicum*'un kök ve yaprak kısımlarında hücre membran zararı ve iyon sızıntısı değerleri artmıştır (Çizelge 4.3.3.1 ve Çizelge 4.3.3.2.).

V. olympicum fidelerinde Cu uygulamalarına bağlı olarak antioksidatif savunma sistemi enzimlerinin aktivitesinde de uygulama süresine bağlı olarak artış gözlenmiştir. Bu durum meydana gelen oksidatif stres ile başa çıkabilecek bir mekanizmanın varlığını göstermektedir. Nitekim Cu, SOD gibi antioksidatif sistemde önemli rol oynayan enzimlerin kofaktörü olması (Cu/Zn SOD) nedeniyle yapısal bir öneme sahiptir. Brahim ve Mohamed (2011) tarafından *Atriplex halimus*' da Cu stresine bağlı olarak SOD

aktivitesinin arttığı vurgulanmıştır. SOD enziminin farklı organellerde MnSOD, Cu/ZnSOD gibi farklı izoformları bulunduğu için tüm hücreyi ve organellerini oksidatif zarardan korumaktadır (Alscher ve ark. 2002). Farklı Cu konsantrasyonlarının uygulama süresine bağlı olarak SOD aktivitesini arttırdığı *Camellia sinensis*'de (Saha ve ark. 2012), *Daucus carota* L.'da (Ke ve ark. 2007), *Holcus lanatus*'da (Hartley-Whitaker ve ark. 2001) ve bir Cu hiperakümülatörü olan *Commelina communis* (Wang ve ark. 2004) bitkisinde de tespit edilmiştir. Çalışmamızda da *V. olympicum* fidelerinin hem kök hem de yaprak kısımlarında Cu konsantrasyonları ve uygulama süresi arttıkça SOD aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.3.4.1).

SOD' un meydana getirdiği H₂O₂ radikallerinin bertaraf edilmesinde yer alan CAT ve APX enzimlerinin (Michalak 2006) aktivitesindeki değişimler bitki kısmına göre değişiklik gösterebilir. Nitekim *V. olympicum* fidelerinde elde edilen APX verileri incelendiğinde yaprak kısımlarında CAT aktivitesinin aksine APX aktivitesinde artış meydana gelmesi, askorbat-glutasyon döngüsünün bu aşamada etkin rol aldığını kanıtlamaktadır (Çizelge 4.3.4.2., Şekil 4.3.4.2.). APX enzimi, daha çok fotosentetik organellerde bulunur (Thounaojam ve ark. 2012). Bu durum yüksek Cu konsantrasyonlarının fotosentez süreci ve kloroplastlarda neden olduğu oksidatif stres ile de birebir ilişkilidir. Tewari ve ark. (2006) farklı Cu konsantrasyonlarına maruz bırakılan karadut bitkisinin antioksidatif savunma mekanizmasında da askorbat-glutasyon döngüsünün önemli rol oynadığını belirtmiştir. Benzer sonuçlar Drazkiewicz ve ark. (2003) tarafından *Arabidopsis thaliana*' da da elde edilmiştir. CAT aktivitesinde ise Cu uygulamalarına bağlı olarak *V. olympicum* fidelerinin kök kısımlarında daha yüksek değerler elde edilmiştir (Çizelge 4.3.4.3, Şekil 4.3.4.3.). Fakat 500 µM Cu konsantrasyonu hem kök hem de yapraklarda CAT aktivitesini azaltmış ama yine de kontrol örneklerinde belirlenen değer altına düşmemiştir. *Camellia sinensis* bitkisiyle yapılan çalışma bizim sonuçlarımızı destekler niteliktedir; Saha ve ark.(2012) 200 µM Cu konsantrasyonuna kadar CAT aktivitesinin arttığını, daha yüksek Cu konsantrasyonunda ise CAT aktivitesinin azaldığını belirtmiştir. *V. olympicum* fidelerinde en yüksek CAT aktivitesi 250 µM Cu uygulamasında tespit edilmiş olup daha yüksek Cu konsantrasyonları aktivitede azalmaya neden olmuştur. Bu durum yine de *V. olympicum*' da güçlü bir antioksidatif savunma sisteminin varlığını desteklemektedir.

5. 4. Nikel (Ni)

Nikel bitkiler için düşük konsantrasyonlarda gerekli olmasına rağmen (Atta-Aly 1999; Gerendás ve ark. 1999; Gajewska ve Sklodowska, 2009) yüksek konsantrasyonlarda başta azot metabolizması olmak üzere fotosentez, solunum bitki-su ilişkisi gibi temel süreçlerde olumsuz etkiye yol açar ve oksidatif strese neden olur (Seregin ve Kozhevnikova 2006). Nitekim 10 gün boyunca 50 ve 100 µM Ni uygulamaları kontrollü koşullarda yetiştirilen *V. olympicum* fidelerinin büyüme parametrelerinde (biyokütle, su ve klorofil içeriği) azalışa neden olmuştur (Çizelge 4.4.1.1., Çizelge 4.4.1.2., Çizelge 4.4.1.3. ve Çizelge 4.4.1.4.). Stanisavljevic ve ark. (2012) ise *Alyssum markgrafii*' nin büyüme parametrelerinin Ni konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak azaldığını göstermiştir. Aynı zamanda kuru ağırlıkta meydana gelen %50'ye varan azalışa rağmen bitkinin hayatta kaldığı vurgulanmıştır. Bu durum bitki metabolizmasının nikel ile mücadele ettiğinin bir göstergesi olarak düşünülebilir. Buna benzer sonuçlar Broadhurst ve ark. (2004) tarafından bir Ni hiperakümülatörü olan *Alyssum murale*'de elde edilmiş olup 5, 10, 20, 40 ve 80 mmol /kg Ni konsantrasyonlarının büyümeyi % 70 oranında azalttığı belirtilmiştir. *Hordeum vulgare* L.cv. *Minorimugi*'de ise 100 µM Ni konsantrasyonunun bitki büyümesi ve klorofil indeksinde benzer oranlarda azalışa neden olduğu belirtilmiştir (Rahman ve ark. 2005). Yüksek nikel konsantrasyonları aynı zamanda Mg, Mo, Mn, Fe gibi bitki besin elementlerinin alınımında sorunlar oluşturabilir (Asemaneh ve ark. 2007). Mg ve Fe gibi bitki besin elementlerinin alınımında meydana gelen aksaklıklar nikelin kloroplast yapısı ve klorofil içeriğini olumsuz etkilemesinin temel nedeni olarak düşünülebilir (Chen ve ark. 2009). Yüksek konsantrasyonlarda Ni'in klorofil içeriğinde ve fotosentez sürecinde azalışa neden olduğu pek çok çalışmada belirtilmiştir. Örneğin, Stanisavljevic ve ark. (2012) *Alyssum markgrafii*' da konsantrasyonlar arttıkça klorofil içeriğinin azaldığını tespit etmiştir ve özellikle klorofil *a*' nın Ni' e duyarlı olduğunu belirtmiştir. 5 gün boyunca 1, 10 ve 50 µM Ni konsantrasyonlarına maruz bırakılan *Elodea canadensis* bitkisinde de klorofil *a*' nın diğer pigmentlere göre Ni uygulamalarından iki kat daha fazla etkilendiği vurgulanmıştır (Maleva ve ark. 2009). Bizim çalışmamızda da *V. olympicum* fidelerinin klorofil *a* içeriğinin uygulanan Ni konsantrasyonlarından daha fazla etkilendiği görülmektedir (Çizelge 4.4.1.3. ve Şekil 4.4.1.3.).

Yüksek konsantrasyonlarda Ni aynı zamanda, hücre zarının geçirgenliğini etkileyerek bitkinin su ve nitrat alınımını da engellemektedir (Yusuf ve ark. 2011). Bu durum azot metabolizmasının olumsuz etkilenmesine neden olmaktadır (Gerendás ve ark. 1999, Tan ve ark. 2000). Nitrat, azot metabolizması enzimlerinden biri olan nitrat redüktaz (NR) enziminin substratıdır ve nitrat içeriğindeki azalış NR aktivitesini direkt olarak etkiler. Yüksek Ni konsantrasyonlarının bitkinin su ve nitrat içeriğinde azalışa neden olduğunu ve azot metabolizmasını olumsuz etkilediğini gösteren çalışmalar buğday, soya fasülyesi, şeker pancarı, bezelye, domates gibi çeşitli kültür bitkileri ile sınırlıdır (El-Shintinawy ve El-Ansary 2000, Tan ve ark. 2000, Kevresan ve ark. 2001, Gajewska ve Sklodowska 2008, 2009, Matraszek 2008). Ni uygulamasına bağlı olarak NR aktivitesinde meydana gelen azalışa; NR enziminin yapısında yer alan SH gruplarının Ni ile reaksiyona girerek değişikliğe uğraması da neden olmuş olabilir. Fakat Seregin ve Kozhevnikova (2006) nikelin NR'daki SH gruplarına olan eğiliminin düşük olduğunu belirtmektedir. NR enziminin yapısında Ni'in neden olabileceği bir diğer olumsuz etki, Mo içeriğinde meydana gelecek olan azalıştır. Zira, NR enziminin yapısında Mo bulunduğundan dolayı NR aktivitesi ve dolayısıyla bitkinin azot metabolizması da bundan olumsuz etkilenecektir (Kevresan ve ark. 2001). Gajewska ve Sklodowska (2009) tarafından da 7 gün boyunca uygulanan 50 ve 100 µM Ni konsantrasyonlarının *Triticum aestivum* L. (Buğday) bitkisinin NR aktivitesinde meydana getirdiği düşüş, Mo içeriğinin azalışıyla ilişkilendirilmiştir. Çalışmamızda incelenen *Verbascum olympicum* fidelerinin kök ve yaprak kısımlarında da Ni uygulamasına bağlı olarak NR aktivitesi azalmıştır (Çizelge 4.4.2.1. ve Şekil 4.4.2.1.). Bu durumun Mo içeriğindeki azalış ile orantılı olduğu Akpınar ve ark. (2015) tarafından ortaya konmuştur.

NR aktivitesindeki azalış, azot metabolizmasının devamında yer alan GS aktivitesi için gerekli amonyağın oluşumunu engellemektedir. Zira GS, amonyak ve ATP varlığında glutamin oluşumunu sağlayarak bitkinin azot beslenmesine katkı sağlamaktadır (Zheng-Xun ve ark. 2007). Ancak metabolik enerji kaynaklarının kullanıldığı GS/GOGAT döngüsüne yeterli düzeyde ATP, NAD(P)H sağlanamaması *V. olympicum* fidelerinin GS aktivitesinin düşmesi ile ilişkilendirilebilir. Bu durum fotosentez sürecinin olumsuz etkilenmesinden kaynaklanmaktadır. (Gajewska ve Sklodowska 2009). *V. olympicum* fidelerinde de Ni uygulamasına bağlı olarak GS aktivitesi ve protein içeriği azalmıştır (Çizelge 4.4.2.2. ve Çizelge 4.4.2.3.). Sonuç olarak, azot özümleme kapasitesi yüksek

olan *V. olympicum*'un azot metabolizması, uygulanan Ni konsantrasyonlarından olumsuz etkilenmiştir. Azot metabolizmasında yer alan enzimlerin aktivitesinde ya da yapısında meydana gelen sorunlar beraberinde fidelerin büyüme ve gelişimini sağlayacak olan amino asit ve proteinlerin oluşumunu da engellemiştir. Halbuki *V. olympicum* ise Uludağ'ın alpin bölgesinde bozulmuş alanlarda yayılış gösteren dominant tür olup *V. olympicum* topluluğunun bulunduğu toprak yüksek nitrifikasyon oranı ile karakterize edilmektedir (Güleryüz ve ark. 2008). Türün bu alana yerleşmesi etkili bir nitrat özümleme kapasitesine sahip olmasıyla mümkündür ki bu kapasite Güleryüz ve Arslan (1999) tarafından ortaya konmuştur. Bu nedenle doğal şartlarda yüksek nitrat özümleme kapasitesine sahip ve bozulmuş alanlarda dominant olan *V. olympicum*'un azot metabolizmasının Ni uygulamalarına verdiği yanıtlar türün dayanım mekanizmasını belirlemek adına önem taşımaktadır. Aynı zamanda Ni'in *V. olympicum* fidelerinde meydana getirdiği oksidatif stresin düzeyi ve bu stres ile başa çıkmasında enzimatik antioksidatif sistemin rolünün belirlenmesinin türün doğal ortamdaki davranışını anlamada katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

Çalışmamızda *V. olympicum* fidelerinde oksidatif stresin en temel göstergesi olan MDA içeriği, artan Ni konsantrasyonları ve uygulama süresine bağlı olarak artmıştır (Çizelge 4.4.3.3. ve Şekil 4.4.3.3.). Aynı zamanda *V. olympicum* fidelerinde Ni uygulamasına bağlı olarak meydana gelen membran bütünlüğünü ve iyon kaybını görmek adına belirlenen hücre membran zararı ve iyon sızıntısı değerleri de uygulama süresi ve konsantrasyonlara bağlı olarak artmıştır (Çizelge 4.4.3.1., Çizelge 4.4.3.2.). Bu durumun serbest radikallerin membran lipidlerine zarar vermesinin yanı sıra membranlarda yer alan enzimlerin SH gruplarına Ni gibi iki eşdeğerliğe sahip iyonların bağlanmasından kaynaklandığı düşünülebilir. Bu durumda K^+ , Ca^{+2} gibi iyonların membran dışına çıkışı söz konusudur. Yüksek konsantrasyonlarda nikelin lipid peroksidasyonuna neden olarak membran zararı oluşturduğu bazı çalışmalarda yer almaktadır (Liu ve ark. 2004, Gajewska ve Skladowska 2010, Gajewska ve ark. 2012). Örneğin; *Matricaria chamomilla* bitkisinde 3, 60 ve 120 μM Ni konsantrasyonlarında (Kováčik ve ark. 2009), *Nicotiana tabacum* L. (Tütün) bitkisinde 0,075 ve 0,75 mM Ni konsantrasyonlarında (Gratão ve ark. 2008) MDA içeriğinin konsantrasyonlardaki artışa paralel olarak arttığı belirtilmiştir.

Çalışmamızda *V. olympicum* fidelerinin kök ve yapraklarında antioksidatif savunma sistemine ait SOD, CAT ve APX enzimlerinin de arttığı görülmektedir (Çizelge 4.4.4.1., Çizelge 4.4.4.2. ve Çizelge 4.4.4.3.). Buna bağlı olarak *V. olympicum* fidelerinin uygulanan Ni konsantrasyonlarına karşı da güçlü bir antioksidatif enzim sisteminin olduğu söylenebilir. Ni stresinin SOD aktivitesinde meydana getirdiği artış hiperakümülatör bir tür olan *Alyssum maritimum* (Schickler ve Caspi 1999), *Zea mays* (Baccouch ve ark. 2001) ve *Cajanus cajan* (Rao ve Sresty 2000)'da elde edilen sonuçlarda da görülmektedir. Bir nikel hiperakümülatörü olan *Alyssum argenteum*' da ise 100 µM Ni konsantrasyonunun SOD aktivitesini azalttığı ifade edilmiştir (Schickler ve Caspi 1999). Benzer bir eğilim diğer bir hiperkümülatör tür olan *Alyssum bertolonii* da tespit edilmiş olup bu çalışmada 25 ppm Ni konsantrasyonunda SOD aktivitesinin azalttığı tespit edilmiştir (Boominathan ve Doran 2002). Bu durum oksidatif stres sonucu oluşan serbest radikallerin ya da metal iyonlarının SOD enzimini inaktif hale getirdiği yönünde açıklanmaktadır (Dietz ve ark. 1999, Dat ve ark. 2000, Stanisavljevic ve ark. 2012). *V. olympicum*' da elde edilen sonuçların bu yönde olmadığı görülmektedir.

Çalışmamızda aynı zamanda *V. olympicum* fidelerinin SOD ve APX aktivitesindeki artışın yaprak kısımlarında, CAT aktivitesindeki artışın ise kök kısımlarında daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4.4.2. ve Şekil 4.4.4.3.). Bu durum antioksidatif savunma sisteminin ilk basamağında yer alan SOD'un meydana getirdiği H₂O₂ radikallerinin bertaraf edilmesinde köklerde CAT'ın, yapraklarda ise APX' un etkili olduğu görüşünü desteklemektedir. Caverzan ve ark. (2012) APX enziminin kloroplastlardaki H₂O₂' in ortadan kaldırılmasında temel enzim olduğunu belirtmektedir. Siedlecka ve Krupa (2002) ise APX'un substrata olan eğiliminin CAT' dan daha fazla olduğunu belirtmektedir. Fakat literatürde Ni konsantrasyonlarındaki artışa paralel olarak yapraklarda CAT aktivitesinin daha yüksek olduğu sonuçlar da yer almaktadır (Gajewska ve Sklodowska 2007).

5. 5. Çinko (Zn)

Mikrobesin elementlerinden biri olan Zn, yüksek konsantrasyonlarda bitki türüne göre değişen toksik etkilere neden olmaktadır. Çalışmamızda da Zn uygulaması *V. olympicum* fidelerinin büyüme parametrelerinde değişikliğe neden olmuştur. Bu değişiklik, uygulamanın 1.gününde biyokütlede artış, diğer uygulama sürelerinde ise biyokütlede anlamlı bir azalış şeklindedir (Çizelge 4.5.1.1. ve Şekil 4.5.1.1.). Ayrıca uygulama süresi

ve Zn konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak klorofil ve su içeriği azalmıştır (Çizelge 4.5.1.2., Çizelge 4.5.1.3. ve Çizelge 4.5.1.4.). Bu durum yüksek Zn konsantrasyonlarının bitkide Fe eksikliğine yol açtığı, fotosentez sürecine ve kloroplastlara zarar vermesiyle ilişkili olabilir (Prasad ve ark. 1999, Tsonev ve Lidon 2005, Broadley ve ark. 2007, Cherif ve ark. 2010, Samreen ve ark. 2013). Çinkonun, fotosentetik aygıtlarda yer alan Mn, Mg ve Fe gibi elementler ile benzer iyon yüküne sahip olduğu için besin elementlerinin alınımında ve fotosentez sürecinde sorunlara neden olduğu düşünülebilir (Monnet ve ark. 2001). Zn'nin özellikle PSII'den elektron aktarımını engellediği bilinmektedir. Jin ve ark. (2008) tarafından *Sedum alfredii* üzerinde yapılan çalışmada da yüksek Zn konsantrasyonlarının kloroplast yapısına zarar verdiği belirtilmiştir. Cherif ve ark. (2010) ise *Lycopersicon esculentum*'da 10, 50, 100 ve 150 µM Zn konsantrasyonlarının klorofil içeriğini düşürdüğünü göstermiştir. Bu durum yüksek Zn konsantrasyonlarına bağlı olarak CO₂ fiksasyonunda meydana gelen sorunlarla da yakın ilişkilidir. Tsonev ve Lidon (2012) yüksek Zn konsantrasyonlarının fotosentez sürecindeki olumsuz etkisinin karbonik anhidraz (CA) enzimidaki değişiklikler ile ilişkili olabileceğini vurgulamaktadır. Nitekim, stomaların açılmasında Zn'nun düzenleyici rolü vardır ve CO₂ fiksasyonunda oluşabilecek sorunlar fotosenteze direk olarak yansımaktadır.

Protein, nükleik asit, DNA ve RNA sentezine katıldığı bilinen (Hänsch ve Mendel 2009) çinko, yüksek konsantrasyonlarda azot metabolizması üzerinde ciddi zararlara neden olabilir. Literatürde genellikle Zn eksikliğinde bitkilerde meydana gelen değişikliklere yönelik çalışmalar mevcuttur. Yüksek Zn konsantrasyonlarının özellikle azot metabolizması üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar az sayıda olup kültür bitkileriyle sınırlıdır (Smirnoff ve Stewart 1987, Gadallah 2000, Lea ve ark. 2007). Çalışmamızda yüksek konsantrasyonlarda Zn uygulamalarının, uygulama süresi ve Zn konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak *V. olympicum* fidelerinin yaprak kısımlarında belirlenen NR aktivitesini olumsuz etkilediği gözlenmiştir (Çizelge 4.5.2.1. ve Şekil 4.5.2.1.). *V. olympicum* fidelerinin köklerde belirlenen NR aktivitesinde ise yapraklardaki gibi Zn konsantrasyonuna ve uygulama süresine bağlı olarak bir azalış gözlenmemiştir. Bunun nedeni olarak, 24 saat gibi kısa süreli Zn uygulamalarında nitrat formunda azot alınımının azaldığı, bunun yerine amonyum formunda azot özümlemesinin gerçekleştiği düşünülebilir. Yüksek konsantrasyonlarda Zn uygulamasına bağlı olarak su içeriğinde meydana gelen azalış, beraberinde sitosolik nitrat içeriğini de etkilemesi nedeniyle yaprak

kısımlarında NR aktivitesi düşmüş olabilir (Çizelge 4.5.2.1.). Benzer bir durum Gadallah (2000) tarafından soya fasülyesi ile yapılan bir çalışmada da elde edilmiştir. Ayrıca yüksek Zn konsantrasyonlarının NR'ın SH gruplarına bağlanma eğiliminden dolayı da NR enzimi yapısal olarak zarara uğramış olabilir.

Çalışmamızda *V.olympicum* fidelerinin yapraklarında NR aktivitesindeki sonuçlara paralel olarak GS aktivitesinin de azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.5.2.2.). Yüksek Zn konsantrasyonlarından dolayı fotosentez sürecinde yeterli metabolik enerji kaynağının üretilmemesi GS aktivitesinde azalışa neden olmaktadır. Cherif ve ark. (2010)'na göre yüksek konsantrasyonlarda Zn, stomaların açılıp kapanma mekanizmasını olumsuz etkileyerek CO₂ alınımını engeller ve fotosentez sürecinde elektron alıcı olarak rol alan NADP⁺'nin sınırlı düzeyde oluşumuna neden olur. Böylece GS aktivasyonu için gerekli enerji kaynağı sağlanmamış olacaktır. GS aktivitesinde meydana gelen azalış da beraberinde protein içeriğinin azalmasına neden olmaktadır. Protein içeriğindeki bu azalış, yüksek Zn konsantrasyonlarında proteaz gibi hidrolitik enzimlerin aktivitesinde meydana gelen artıştan kaynaklanıyor olabilir (Andrade ve ark. 2009). Çalışmamızda *V.olympicum* fidelerinin protein içeriğinde, 200 µM Zn konsantrasyonuna kadar protein içeriğinin arttığı, 500 µM Zn konsantrasyonunda ise uygulama süresine bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.5.2.3.). 500 µM gibi yüksek Zn konsantrasyonları Fenton/Haber-Weiss reaksiyonları ve ETS üzerinden reaktif oksijen radikalleri meydana getirerek proteinlerde agregasyon, protein-protein ya da protein-lipid çapraz bağlarının oluşması gibi yapısal bozulmalara neden olmuş olabilir (Davies ve ark. 1987).

Zn uygulamasına bağlı olarak bitkilerde oksidatif stres olduğu ve bitkilerde hücre membran bütünlüğünün bozulduğu pek çok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Çakmak 2000, Madhava Rao ve Sresty 2000, López-Millán ve ark. 2005, Tsonev ve Lidon 2012). Yüksek konsantrasyonlarda Zn uygulamasının hücre membran bütünlüğünü bozduğu Andrade ve ark. (2009) tarafından *Canavalia ensiformis* türünde tespit edilmiştir. Buna benzer yanıtlar Chaoui ve ark. (1997) tarafından *Phaseolus vulgaris* türünde de belirlenmiştir. Çalışmamızda da *V.olympicum* fidelerinde Zn uygulamalarına bağlı olarak MDA içeriğinin arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.5.3.3.). Ayrıca hücre membran zararı ve iyon sızıntısı değerleri de Zn konsantrasyonları ve uygulama süresine bağlı olarak artmıştır (Çizelge 4.5.3.1. ve Çizelge 4.5.3.2.).

Zn uygulamasına bağı olarak *V.olympicum* fidelerinin antioksidatif enzim aktivitesinde elde ettiğimiz sonuçlarda ise, fidelerin hem kök hem yaprak kısımlarında belirlenen SOD aktivitesinin 200 µM Zn uygulamasına kadar arttığı, 500 µM Zn uygulamasında ise azaldığı görülmektedir (Şekil 4.5.4.1.). Bu durum *V. olympicum* fidelerinin 200 µM Zn konsantrasyonlarına dayanabilen güçlü bir savunma sistemine sahip olduğunu fakat 500 µM Zn uygulamasının antioksidatif savunma sistemini inhibe ettiğini göstermektedir. Çünkü SOD aktivitesindeki azalış, enzimin yapısal olarak bozulduğunun bir göstergesidir. SOD'un bitkilerde en fazla bulunan izoformu Cu/ZnSOD'dur. Bu nedenle Zn konsantrasyonlarında meydana gelecek artış ya da azalış, bitkinin SOD aktivitesi üzerinde direkt olarak etkilidir (Çakmak 2000). Prasad ve ark. (1999) tarafından *Brassica juncea* da, Luo ve ark. (2010) tarafından *Jatropha curcas* da Zn uygulamasına bağı olarak SOD aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. *V. olympicum* fidelerinin CAT ve APX aktivitelerinde elde edilen sonuçlar da SOD aktivitesine benzerdir. Her iki enzim aktivitesi de 500 µM Zn konsantrasyonunda uygulama süresine bağı olarak azalmıştır (Çizelge 4.5.4.2. ve Çizelge 4.5.4.3.). Luo ve ark. (2010) *Jatropha curcas* fideleri ile yaptığı çalışmada 0,25, 0,5, 1, 2 ve 3 mM Zn konsantrasyonlarının etkisini incelemiş olup CAT aktivitesinde 2 mM Zn konsantrasyonuna kadar artış olduğunu belirtmiştir. Buna benzer çalışmalar Prasad ve ark. (1999), McGeer ve ark. (2000) tarafından da ifade edilmiştir.

Elde ettiğimiz bulgulara göre yetiştirme ortamında Cd, Cr, Cu, Ni ve Zn konsantrasyonlarının artışı *V. olympicum*'un azot metabolizması ve antioksidatif savunma sisteminde değişimlere yol açmaktadır. Araştırılan metallerin yetiştirme ortamındaki artışı çoğunlukla türün kök ve yapraklarındaki NR ve GS aktivitelerini düşürerek azot metabolizmasını olumsuz yönde etkilemektedir. Ağır metal uygulamaları azot metabolizması enzimlerinin aktivitesini bir dereceye kadar düşürmesine rağmen SOD, CAT ve APX aktivitesini arttırarak antioksidatif savunma mekanizmasını uyarılmaktadır. Antioksidatif sistemde gözlenen bu değişimler türün ağır metallerle başa çıkabilme yeteneğinin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda türün fitoremediasyon potansiyelinin ortaya konması adına metal bağlayıcı ligand komplekslerinin araştırılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Adriano, D.C.(Ed.), 2001.** Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Biavailability and Risks of Metals. Springer-Verlag, New York, pp: 264-314.
- Ahmed, A., Hasnain, A., Akhtar, S., Mahmood, S., 2010.** Antioxidant enzymes as biomarkers for copper tolerance in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Afr. Journal Biotechnol.*, 9:5441-5444.
- Akpınar, A., Arslan, H., Güleriyüz, G., Kırmızı, S., Erdemir, Ü.S., Gücer, S., 2015.** Ni-induced Changes in Nitrate Assimilation and Antioxidant Metabolism of *Verbascum olympicum* Boiss: Could the Plant be Useful for Phytoremediation or/and Restoration Purposes? *International Journal of Phytoremediation*, 17(6): 546-555.
- Akpınar, A., Arslan, H., Güleriyüz, G., Kırmızı, S., 2016.** Antioxidative defense mechanism of the ruderal *Verbascum olympicum* Boiss. against copper (Cu)-induced stress. *Open Life Science*, 11:10-20.
- Aksoy, A., Leblebici, Z., Prasad, M., 2015.** Metal-accumulating plants from serpentine habitats of Kızıldağ, Konya Province, Turkey. *Australian Journal of Botany*, 63(3-4) DOI: 10.1071/BT14354
- Ali, H., Khan, E., Sajad, M.A., 2013.** Phytoremediation of heavy metals: Concepts and applications. *Chemosphere*, 91: 869-881.
- Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S., 2002.** Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1331-1341.
- Ammar, W.B., Nouairi, I., Zarrouk, M., Ghorbel, M.H., Jemal, F., 2008.** Antioxidative response to cadmium in roots and leaves of tomato plants. *Biologia Plantarum*, 52 (4): 727-731.
- Andrade, E.R., Piccoli, J.C.E., Cruz, I.B.M., Rocha, J.B.T., Andrade, V.V.R., González, P., Bauermann, L.F., Barrio1, J.P., 2009.** Effect Of Black Grape Juice Intake On Liver Lipoperoxidation And Body Weight Loss In Whole Body X-Irradiated Rats. *Journal of Medical Chemical, Biological and Radiological Defense*, 7: 12-24.
- Ardıç, M., Sekmen, A.H., Türkan, I., Tokur, S., Ozdemir, F., 2009.** The Effects of Boron Toxicity on Root Antioxidant Systems of Two Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Cultivars. *Plant Soil*, 314: 99-108.
- Arnon, D.I., 1949.** Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoxidase in beta vulgaris. *Plant Physiology* 24: 1-15.
- Arslan, H., Güleriyüz, G., 2005.** A Study on Nitrate Reductase Activity (NRA) of Geophytes from Mediternean Environment. *Flora*, 200: 434-443.

Arslan, H., Güleriyüz, G., Leblebici, Z., Kırmızı, S., Aksoy, A., 2009. *Verbascum bombyciferum* Boiss. (Scrophulariaceae) as Possible Bio-indicator for The Assessment of Heavy Metals in The Environment of Bursa, Turkey. *Environental Monitoring and Assesment.*, 163(1-4):105-113.

Arslan, H., Güleriyüz, G., Akpınar, A., Kırmızı, S., Seven Erdemir, Ü., Güçer, Ş., 2014. Responses of Ruderal *Verbascum olympicum* Boiss. (Scrophulariaceae) Growing under Cadmium Stress. *Clean – Soil, Air, Water*, 42(6):824–835.

Asemaneh, T., Ghaderian, S.M., Baker, A.J.M., 2007. Responses to Mg/Ca balance in an Iranian serpentine endemic plant, *Cleomeheratensis* (Capparaceae) and a related non-serpentine species, *C. foliolosa*. *Plant and Soil* 293: 49 – 59.

Astolfi, S., Zuchi, S., Passera, C., 2004. Role of sulphur availability on cadmium-induced changes of nitrogen and sulphur metabolism in maize (*Zea mays* L.) leaves. *Journal of Plant Physiology*, 161:795–802.

Atta-Aly, M.A., 1999. Effect of nickel addition on the yield and quality of parsley leaves. *Sci. Hortic.*, 82: 9–24

Azevedo, R.A., Lea, P.J., 2005. Toxic metals in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17: 53-64.

Azevedo, R.A., Gratão, P. L., Monteiro, C.C., Carvalho, R.F., 2012. What is new in the research on cadmium-induced stress in plants? *Food and Energy Security*, 1(2):133–140.

Azmat, R., Khan, N., 2011. Nitrogen metabolism as a Bio Indicator of Cu Stress in *Vigna radiata*. *Pak. J. Bot.*, 43(1): 515-520.

Azpilicueta, C.E., Benavides, M.P., Tomaro, M.L., Gallego, S.M., 2007. Mechanism of CATA3 induction by cadmium in sunflower leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 589-595.

Baccouch, S., Chaoui, A., El Ferjani, E., 2001. Nickel toxicity induces oxidative damage in *Zea mays* roots. *J. Plant Nutr.* 24: 1085-1097

Baker, A.J.M., 1981. Accumulators and Excluders - Strategies in The Response of Plants to Heavy Metals. *Journal of Plant Nutrition*, 3: 643-654.

Balestrasse, K.B., Gallego, S.M., Tomaro, M.L., 2006. Oxidation of the enzymes involved in nitrogen assimilation plays an important role in the cadmium-induced toxicity in soybean plants. *Plant Soil*, 284:187–194.

Bao, T., Sun, T., Sun, L., 2011. Effect of cadmium hyperaccumulation on antioxidative defense and proline accumulation of *Solanum nigrum* L. *African Journal of Biotechnology*, 10(37):7198-7206.

- Barceló, J., Poschenrieder, C., 1990.** Plant water relations as affected by heavy metal stress: A review. *Journal of Plant Nutrition*, 13: 1-37.
- Barconi, D., Bernardini, G., Santucci, A., 2011.** Linking protein oxidation to environmental pollutants: redox proteome approaches. *Journal of Proteomics*, 74(11): 2324–2337.
- Barrameda-Medina, Y., Montesinos-Pereira, D., Romero, L., Ruiz, J.M., Blasco, B., 2016.** Comparative study of the toxic effect of Zn in *Lactuca sativa* and Brassica oleracea plants: I. Growth, distribution and accumulation of Zn and metabolism of carboxylates. *Environmental and Experimental Botany*, 107: 98-104.
- Baryla, A., Carrier, P., Franck, F., Coulomb, C., Sahut, C., Havaux, M., 2001.** Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth. *Planta*, 212: 696–709.
- Beevers, L., Hageman, R.H., 1983.** Uptake and Reduction of Nitrate: Bacteria and Higher Plants. In: Läuchli A., Bielecki R. L. (Eds.), *Inorganic Plant Nutrition*. Springer, Berlin, pp. 351-375.
- Benavides, F., Benach, J., Diez-Roux, A., Roman, C., 2000.** How do types of employment relate to health indicators? Findings from the second European survey on working conditions. *J. Epidemiol. Community Health*, 54: 494–501. doi: 10.1136/jech.54.7.494
- Benavides, M.P., Gallego, S.M., Tomaro, M.L., 2005.** Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17: 21–34.
- Beuchamp, C., Fridovich, I., 1971.** Superoxide dismutase; improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Anal. Biochem.*, 44: 276-287.
- Bhargava, A., Carmona, F.F., Bhargava, M., Srivastava, S., 2012.** Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. *Journal of Environmental Management*, 105: 103-120.
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V., 2003.** Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress a Review. *Annals of Botany*, 91:179-194.
- Bradford, M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Brahim, L., Mohamed, M., 2011.** Effects of copper stress on antioxidative enzymes, chlorophyll and protein content in *Atriplex halimus*. *African Journal of Biotechnology*, 10(50): 10143-10148.
- Broadhurst, C.L., Chaney, J., Angle, J.S., Erbe, E.F., Mangel, T.K., 2004.** Nickel localization and response to increasing Ni soil levels in leaves of the nickel hyperaccumulator *Alyssum murale*. *Plant Soil*, 265: 225–242.

Broadley, M.R., White, P.J., Hammond, J.P., Zelko, I., Lux, A., 2007. Zinc in plants. *New Phytologist*, 173: 677–702

Broadley, M., Brown, P.I.C., Rengel, Z., Zhao, F., 2012. Function of nutrients: micronutrients. In: Marschner, P. (Ed.), *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. Elsevier, Amsterdam.

Brooks, R.R., Lee, J., Reeves, R.D., Jaffre, T., 1997. Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. *Journal of Geochemical Exploration*, 7: 49-57.

Boojar, M.M.A., Goodarzi, F., 2007. The copper tolerance strategies and the role of antioxidative enzymes in three plant species grown on copper mine. *Chemosphere*, 67(11):2138-47.

Boominathan, R., Doran, P.M., 2002. Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertolonii*. *New Phytologist*, 156: 205–215.

Cailliatte, R., Schikora, A., Briat, J.F., Mari, S., Curie, C. 2010. High-affinity manganese uptake by the metal transporter NRAMP1 is essential for *Arabidopsis* growth in low manganese conditions. *Plant Cell*, 22: 904-917.

Cardosa, P.F., Gratão, P.L., Gomes-Junior, R.A., Azevedo, R.A., 2005. Response of *Crotalaria juncea* to nickel exposure. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17(2): 267-272.

Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S.B., Ribeiro, C.W., Lazzarotto, F., Margis-Pinheiro, M., 2012. Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology*, 35: 1011-1019.

Chaffei, C., Pageau, K., Suzuki, A., Gouia, H., Ghorbel, M.H., Masclaux-Daubresse, C., 2004. Cadmium Toxicity Induced Changes in Nitrogen Management in *Lycopersicon esculentum* Leading to a Metabolic Safeguard Through an Amino Acid Storage Strategy. *Plant Cell Physiol.*, 45(11): 1681–1693.

Chatterjee, C., Dube, B.K., Sinha, P., Srivastava, P., 2004. Detrimental effects of lead phytotoxicity on growth, yield, and metabolism of rice. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 35: 255–265.

Chatterjee, C., Sinha, P., Dube, B.K., Rajeev, G., 2006. Excess copper-induced oxidative damages and changes in radish physiology. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 37: 2069-2076.

Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M.H., Ferjani, E.E., 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science*, 127: 139-147.

Chaoui, A., El Ferjani, E., 2004. Impact of Cadmium and Copper Excess on Cell Wall Peroxidases in Pea Stems. *Pakistan Journal of Biological Science*, 7(6): 902-904.

Chaudhry, T.M., Hayes, W.J., Khan, A.G., Khoo, C.S., 1998. Phytoremediation – Focusing on accumulator plants that remediate metal-contaminated soils. *Aust. Journal of Ecotoxicology*, 41: 37-51.

Chen, J., Shiyab, S., Han, F.X., Monts, D.L., Waggoner, A.W., Su, Z.Y., 2009. Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Pteris vittata* and *Nephrolepis exaltata*. *Ecotoxicology* 18: 110–121.

Cherif, J., Derbel, N., Nakkach, M., von Bergmann, H., Jernal, F., Lakhdar, Z.B., 2010. Analysis of in vivo chlorophyll fluorescence spectra to monitor physiological state of tomato plants growing under zinc stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 101(3): 332-341.

Chigbo, C., Batty, L., Bartlett, R., 2013. Phytoremediation potential of *Brassica juncea* in Cu-pyrene co-contaminated soil: comparing freshly spiked soil with aged soil. *Journal of Environ. Manage.*, 129: 18-24.

Choudhary, M., Jetley, U.K., Khan, M.A., Zutshi, S., Tasneem, F., 2007. Effect of Heavy Metal Stress on Proline, Malondialdehyde and Superoxide Dismutase Activity in *Cyanobacterium Spirulina Platensis-S5*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66: 204-209.

Clemens, S., 2001. Molecular mechanisms of plant metal homeostasis and tolerance. *Planta*, 212: 475–486.

Çakmak, I., Marschner, H., 1992. Magnesium Deficiency and High Light Intensity Enhance Activities of Superoxide Dismutase, Ascorbate Peroxidase and Glutathione Reductase in Bean Leaves. *Plant Physiology*, 98: 1222-1227.

Çakmak, I., 2000. Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytol.*, 146: 185-205.

DalCorso, G., Fasani, E., Furini, A., 2013. Recent advances in the analysis of metal hyperaccumulation and hypertolerance in plants using proteomics. *Frontiers in Plant Science*, 4: 280-287.

DalCorso, G., Manara, A., Piasentin, S., Furini, A., 2014. Nutrient metal elements in plants. *Metallomics*, 6(10): 1770-1788.

Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé D., Van Breusegem, F., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57: 779–795.

Davies, K.J.A., Delsignore, M.E., Lin, S.W., 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J. Biol. Chem.*, 262: 9902-9907.

Davies, F.T., Puryear, J.D., Newton, R.J., Egilla, J.N., Saraiva Grossi, J.A., 2002. Mycorrhizal fungi increase Chromium uptake by *H. annuus* plants: influence on tissue mineral concentration, growth, gas exchange. *J Plant Nutr.*, 25(11): 2389–2407.

Davis, P.H., 1978. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, vol.6 Edinburg: Edinburg University Press.

Dazy, M., Béraud, E., Cotelle, S., Meux, E., Masfaraud, J.-F., Féraud, J.-F., 2008. Antioxidant enzyme activities as affected by trivalent and hexavalent chromium species in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere* 73:281–290

de Souza Costa, E.T., Guimarães Guilherme, L.R., Chaves de Melo É.E., Teixeira Ribeiro, B., dos Santos B. Inácio, E., da Costa Severiano, E., Faquin, V., Hale, B.A., 2012. Assessing the Tolerance of Castor Bean to Cd and Pb for Phytoremediation Purposes. *Biol. Trace Elem. Res.*, 145: 93-100.

Delmail, D., Labrousse, P., Hourdin, P., 2011. Differential responses of *Myriophyllum alterniflorum* DC (Haloragaceae) organs to copper: physiological and developmental approaches. *Hydrobiologia* 664:95–105.

Demidchik, V., Straltsova, D., Medvedev, S.S., Pozhvanov, G.A., Sokolik, A., Yurin, V., 2014. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K⁺ - permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. *Journal of Experimental Botany*, 65(5): 1259-1270.

Demirevska-Kepova, K., Simova-Stoilova, L., Stoyanova, Z., Hölzer, R., Feller, U., 2004. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. *Environ. Exp. Bot.* 52: 253-266.

Demirezen Yilmaz, D., Uruç Parlak, K., 2011. Modelling the influence of salinity and water deficiency on growth and biomass of *Groenlandia densa* (Potamogetonaceae). *Fresenius Environmental Bulletin*, 20: 1667-1672.

Devi, S.R., Prasad, M.N.V., 1998. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: Response of antioxidant enzymes and antioxidants. *Plant Science*, 138 (2): 157-165.

Devi, S.R., Prasad, M.N.V., 1999. Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants. In: Prasad MNV, Hagemeyer J, eds. Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems. Berlin: Springer- Verlag, pp: 99–116.

Devi, S.R., Prasad, M.N.V., 2005. Antioxidant Capacity of *Brassica juncea* Plants Exposed to Elevated Levels of Copper. *Russian Journal of Plant Physiology* 52(2): 205-208.

Dhir, B., Sharmila, P., Pardha Saradhi, P., Nasim, S.A., 2009. Physiological and antioxidant responses of *Salvinia natans* exposed to chromium-rich wastewater. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 72: 1790–1797.

Dietz, K.-J., Baier, M., Krämer, U., 1999. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: Prasad MNV, Hagemeyer J, eds. Heavy metal stress in plants. Berlin, Germany: Springer, 73–97.

- Domínguez, D.M., Garc'ia, F.C., Raya, A.C., Santiago, R.T., 2010.** Cadmium-induced oxidative stress and the response of the antioxidative defense system in *Spartina densiflora*. *Physiologia Plantarum* 139: 289–302.
- Dubey, R.S., Pessarakli, M., 2002.** Physiological mechanisms of nitrogen absorption and assimilation in plants under stressful conditions. In *Handbook of Plant and Crop Physiology* (M. Pessarakli, ed.) 2nd Edition, Marcel Dekker, Inc., New York, pp: 637-655.
- Dinakar, N., Nagajyothi, P.C., Suresh, S., Damodharam, T., Suresh, C., 2009.** Cadmium induced changes on proline, antioxidant enzymes, nitrate and nitrite reductases in *Arachis hypogaea* L. *J. Environ. Biol.* 30(2): 289-294.
- Diwan, H., Khan, I., Ahmad, A., Iqbal, M., 2010.** Induction of phytochelatins and antioxidant defence system in *Brassica juncea* and *Vigna radiata* in response to chromium treatments. *Plant Growth Regulation*, 61(1): 97-107.
- Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R., 2001.** Differential oxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L cv. Azad). *J. Exp. Bot.* 52:1101-1109.
- Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R., 2002.** Chromium Ions Inactivate Electron Transport and Enhance Superoxide Generation in vivo in Pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad) Root Mitochondria. *Plant Cell and Environmental*, 25: 687-690.
- Drazkiewicz, M., Skorzynska-Polit, E., Krupa, Z., 2003.** Response of ascorbate-gluthathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (L.). *Plant Science*, 164:195-202.
- Ellenberg, H., 1988.** *Vegetation Ecology of Central Europe*. Cambridge Univ. Pres. 4th. Ed. Cambridge.
- El-Shintinawy, F., El-Ansary, A., 2000.** Differential Effect of Cd²⁺ and Ni²⁺ on Amino Acid Metabolism in Soybean Seedlings, *Biol. Plant*, 43: 79–84.
- El-Shora, H.E., Ali, A.S., 2011.** Changes in Activities of Nitrogen Metabolism Enzymes in Cadmium Stressed Marrow Seedlings. *Asian Journal of Plant Sciences*, 10(2): 117-124.
- Erdemir, U., Arslan, H., Güleriyüz, G., Güçer, Ş., 2014.** Responses of *Verbascum olympicum* BOISS. To excess manganese. 14th International Conference on Environmental Science and Technology, at Rhodes, Greece
- Farnden, K.J.F., Robertson, J.G., 1980.** Methods for Studying Enzymes Involved in Metabolism Related to Nitrogenase. In: Bergensen, F. J. ed. *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. John Wiley & Sons Ltd., pp: 265-314.
- Farnese, F.S., Menezes-Silva, P.E., Gusman, G.S., Oliveira, J.A., 2016.** When Bad Guys Become Good Ones: The Key Role of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in the Plant Responses to Abiotic Stress. *Front Plant Science*, 7:471-486.

Feigl, G., Kolbert, Z., Lehotai, N., Molnár, A., Ördög, A., Bordé, A., Laskay, G., Erdei, L., 2016. Different zinc sensitivity of *Brassica* organs is accompanied by distinct responses in protein nitration level and pattern. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 125:141-152.

Fernandes, J. C., Henriques, F. S., 1991. Biochemical, physiological and structural effects of excess copper in plants. *The Bot. Rev.* 21: 246-273.

Fernández, J., Zacchini, M., Fleck, I., 2012. Photosynthetic and growth responses of *Populus* clones Eridano and I-214 submitted to elevated Zn concentrations. *Journal of Geochemical Exploration*, 123:77-86.

Fornazier, R.F., Ferreira, R.R., Vitória, A.P., Molina, S.M.G., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2002. Effects of Cadmium on Antioxidant Enzyme Activities in Sugar Cane. *Biologia Plantarum*, 45(1): 91-97.

Fulekar, M., Singh, A., Bhaduri, A.M., 2009. Genetic engineering strategies for enhancing phytoremediation of heavy metals. *African Journal Biotechnology*, 8: 529-535.

Frink, C.R., Waggoner, P.E., Ausubel, J.H., 1999. Nitrogen fertilizer: retrospect and prospect. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(4): 1175-1180.

Gadallah, M.A.A., 2000. Effects of indole-3-acetic acid and zinc on the growth, osmotic potential and soluble carbon and nitrogen components of soybean plants growing under water deficit. *Journal of Arid Environment*., 44: 451-467.

Gajewska, E., Sklodowska, M., 2007. Effect of nickel on ROS content and antioxidative enzyme activities in wheat leaves. *Biometals*, 20(1): 27-36.

Gajewska, E., Sklodowska, M., 2008. Differential biochemical responses of wheat shoots and roots to nickel stress: antioxidative reactions and proline accumulation. *Plant Growth Regul.*, 54:179–188.

Gajewska, E., Sklodowska, M., 2009. Nickel-induced changes in nitrogen metabolism in wheat shoots. *Journal of Plant Physiology*, 166:1034-1044.

Gajewska, E., Wielanek, M., Bergier, K., Sklodowska, M., 2009. Nickel-induced depression of nitrogen assimilation in wheat roots. *Acta Physiol. Plant.*, 31:1291–1300. DOI 10.1007/s11738-009-0370-8

Gajewska, E., Sklodowska, M., 2010. Differential effect of equal copper, cadmium and nickel concentration on biochemical reactions in wheat seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73: 996–1003.

Gajewska, E., Bernat, P., Dlugonski, J., Sklodowska, M., 2010. Effect of Nickel on Membrane Integrity, Lipid Peroxidation and Fatty Acid Composition in Wheat Seedlings. *J. Agronomy and Crop Science*, 198: 286-294.

Gallego, S.M., Benavides, M.P., Tomaro, M.L., 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science*, 121(2): 151-159.

Gallego, S., Benavides, M., Tomaro, M., 2002. Involvement of an antioxidant defense system in the adaptive response to heavy metal ions in *Helianthus annuus* L. cells. *Plant Growth Regul.*, 36: 267-273.

Gallego, S.M., Pena L.B., Barcia, R.A., Azpilicueta, C.E., Lannone, M.F., Maria, F., 2012. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. *Environ. Exp. Botany*, 83: 33–46.

Gangwar, S., Singh, V.P., Srivastava, P.K., Maurya, J.N., 2011. Modification of chromium (VI) phytotoxicity by exogenous gibberellic acid application in *Pisum sativum* (L.) seedlings. *Acta Physiol Plant*, 33: 1385–1397

Garbisu, C., Alkorta, I., 2003. Basic concepts on heavy metal soil bioremediation. *Eur. J. Min. Proc. & Environ. Protect.*, 3: 58–66.

Gasecka, M., Mleczek, M., Siwulski, M., Niedzielski, P., 2015. Phenolic composition and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* enriched with selenium and zinc. *European Food Research and Technology*, DOI: 10.1007/s00217-015-2580-1

Gebauer, G., Melzer, A., Rehder, H., 1984. Nitrate Content and Nitrate Reductase Activity in *Rumex obtusifolius* L. I. Differences in Organs and Diurnal Changes. *Oecologia*, 63:136–142.

Gebauer, G., Rehder, H., Wollenweber, B., 1988. Nitrate, Nitrate Reduction and Organic Nitrogen in Plants from Different Ecological and Taxonomic Groups of Central Europe. *Oecologia*, 75; 371-385.

Gerendás, J., Polacco, J.C., Freyermuth, S.K., Sattelmacher, B., 1999. Significance of nickel for plant growth and metabolism. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 162: 241–256.

Ghanati, F., Ishka, M.R., 2006. Improvement of Antioxidant System and Decrease of Lignin by Nickel Treatment in Tea Plant. *Journal of Plant Nutrition*, 29 (9): 1649-1661.

Gill, R.A., Ali, B., Islam, F., Farooq, M.A., Gill, M.B., Mwamba, T.M., Zhou, W., 2015. Physiological and molecular analyses of black and yellow seeded Brassica napus regulated by 5-aminolivulinic acid under chromium stress, *Plant Physiology and Biochemistry*, 94:130-143.

Glińska, S., Gapińska, M., Michlewska, S., Skiba, E., Kubicki, J., 2016. Analysis of *Triticum aestivum* seedling response to the excess of zinc. *Protoplasma* 253: 367-377.

González, R.C., González-Chávez, M.C.A., 2006. Metal accumulation in wild plants surrounding mining wastes. *Environmental Pollution.*, 144: 84–92.

Gouia, H., Ghorbal, M.H., Meyer, C., 2000. Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 629–638.

Göhre, V., Paszkowski, U., 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta*, 223: 1115-1122.

Gratão, P.L., Pompeu, G.B., Capaldi, F.R., Vitorello, V.A., Leaand, P.J., Azevedo, R.A., 2008. Antioxidant response of *Nicotianatabacum* cv. Bright Yellow 2 cells to cadmium and nickel stress. *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 94:73-83.

Greipsson, S., 2011. Phytoremediation. *Nature Education Knowledge*, 3(10): 7.

Guo, T., Zhang, G., Zhou, M., Wu, F., Chen, J., 2004. Effects of aluminum and cadmium toxicity on growth and antioxidant. *Plant and Soil*, 258: 241–248.

Gupta, D.K., Nicoloso, F.T., Schetinger, M.R.C., Rossato, L.V., Pereirab, L.B., Castroa, G.Y., Srivastavac, S., Tripathi, R.D., 2009. Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown *Zea mays* seedlings under moderate lead stress. *Journal of Hazardous Materials*, 172: 479–484.

Güleryüz, G., Arslan, H., 1999. Nitrate Reductase Activity in *Verbascum* L. (Scrophulariaceae) Species from The Eastern Mediterranean in Dependence on Altitude. *Turkish Journal of Botany*, 23: 89-96.

Güleryüz, G., Arslan, H., 2001. A Study on Biomass Production of Three Endemic *Verbascum* L. Species (Scrophulariaceae) from East Mediterranean. *Perspectives in Environmental Sciences*, 3: 1-6.

Güleryüz, G., Arslan, H., Izgi, B., Gucer, S., 2006. Element content (Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn) of the ruderal plant *Verbascum olympicum* Boiss. from East Mediterranean. *Z Naturforsch C*, 61(5–6): 357–362.

Güleryüz, G., Titrek, E., Arslan, H., 2008. Nitrogen Mineralization in the Ruderal Sub-alpine Communities in Mount Uludağ, Turkey. *European Journal of Soil Biology*, 44: 408-418.

Güleryüz, G., Seven Erdemir, Ü., Arslan, H., Akpınar, A., Çiçek, A., Güçer, Ş., 2015. Variation in trace element mobility and nitrogen metabolism of *Verbascum olympicum* Boiss. under copper stress. *Chemistry and Ecology*, 31(6): 494-509.

Hageman, R.H., Flesher, D., 1960. Nitrate Reductase Activity in Corn Seedlings as Affected by Light and Nitrate Content of Nutrient Media. *Plant Physiology*, 35(5): 700-708.

- Hageman, R.H., Hucklesby, D.P., 1971.** Nitrate reductase. *Methods Enzymol.*, 23: 497-503.
- Hall, J.L., 2002.** Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1-11.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1984.** Oxygen Toxicity, Oxigen Radicals, Transition Metals and Disease. *Biochemical Journal.*, 219: 1-14.
- Hamutoğlu, R., Dinçsoy, A.B., Cansaran-Duman, D., Aras, S., 2012.** Biyosorpsiyon, adsorpsiyon ve fitoremediasyon yöntemleri ve uygulamaları. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69(4): 235-253.
- 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 and Environment*, 24: 713-722.
- Hasan, S.A., Fariduddin, Q., Ali, B., Hayat, S., Ahmad, A., 2009.** Cadmium: Toxicity and tolerance in plants. *J. Environ. Biol.* 30(2): 165-174.
- Hänsch, R., Mendel, R.R., 2009.** Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology* 12: 259–266
- Heath, R.L., Packer, L., 1968.** Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation, *Arch. Biochem. Biophys.*, 125: 189-198.
- Hirsch, R.E., Sussman, M.R., 1999.** Improving nutrient capture from soil by the genetic manipulation of crop plants. *Trends Biotechnol.*, 17: 356–361.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I. 1950.** The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*, 347:1-32.
- Hossain, M.A., Piyatida, P., Teixeira da Silva, J.A., Fujita, M., 2012.** Molecular Mechanism of HeavyMetal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species andMethylglyoxal and in Heavy Metal Chelation. *Journal of Botany*, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/872875>, sf. 37.
- Högberg, P., Granström, A., Johansson, T., Lundmark-Thelin, A., Nasholm, T., 1986.** Plant Nitrate Reductase Activity as an Indicator of Availability of Nitrate in Forest Soils. *Can. J. For. Res.*, 16; 1165-1169.
- Israr, M., Jewell, A., Kumar, D., Sahi, S.V., 2011.** Interactive effects of lead, copper, nickel and zinc on growth, metal uptake and antioxidative metabolism of *Sesbania drummondii*. *Journal of Hazardous Materials*, 186:1520–1526.
- Işeri, O., Aksoy Körpe, D., Yurtcu, E., Haberal, M., 2011.** Copper-induced oxidative damage, antioxidant response and genotoxicity in *Lycopersicum esculentum* Mill. and *Cucumis sativus* L. *Plant Cell Reports*, 30(9):1713-21.

Ivanov, Y.V., Kartashov, A.V., Ivanova, A.I., Savochkin, Y.V., Kuznetsov, V.V., 2016. Effects of zinc on Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings grown in hydroculture. *Plant Physiology and Biochemistry* 102: 1-9.

Jabeen, R., Ahmad, A., Iqbal, M., 2009. Phytoremediation of heavy metals: physiological and molecular mechanisms. *Botanical Review*, 75: 339-364.

Janicka-Russak, M., Kaba1a, K., Burzyn'ski, M., K1obus, G., 2012. Response of plasma membrane H⁺-ATPase to heavy metal stress in *Cucumis sativus* roots. *Journal of Experimental Botany* 59: 3721–3728.

Jaworski, E.K., 1971. Nitrate Reductase Assay in Intact Plant Tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 43: 1274-1279.

John, R., Ahmad, P., Gadgil, K., Sharma, S., 2008. Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in *Lemna polyrrhiza* L. *Plant Soil Environ.*, 54(6): 262–270.

Joshi, P.N., Ramaswamy, N.K., Iyer, R.K., 2007. Partial protection of photosynthetic apparatus from UV-B-induced damage by UV-A radiation. *Environ Exp Bot.*, 59: 166–172

Kabata-Pendias, A., 2011. Trace elements in soils and plants. 4th edition. CRC Press, Boca Raton, 505 pp.

Kachout, S.S., Mansoura, A.B., Leclerc, J.C., Mechergui, R., Rejeb, M.N., Ouerghi, Z., 2010a. Effects of heavy metals on antioxidant activities of: *Atriplex hortensis* and *A. rosea*, *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 9(3): 444-457.

Kachout, S.S., Mansoura, A.B., Mechergui, R., Leclerc, J.C., Rejeb, M.N., Ouerghi, Z., 2010b. Accumulation of Cu, Pb, Ni and Zn in the halophyte plant *Atriplex* grown on polluted soil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(2): 336–342.

Karuppanapandian, T., Manoharan, K., 2008. Uptake and Translocation of Tri- and Hexa-Valent Chromium and Their Effects on Black Gram (*Vigna mungo* L. Hepper cv. Co4) Roots. *Journal of Plant Biology*, 51(3): 192-201.

Ke, W., Xiong, Z., Chen, S., Chen, J., 2007. Effects of copper and mineral nutrition on growth, copper accumulation and mineral element uptake in two *Rumex japonicus* populations from a copper mine and an uncontaminated field sites, *Environmental and Experimental Botany*, 59: 59-67.

Kevresan, S., Krstic, B., Popovic, M., Kovacev, L., Peyevic, S., Kandrak, J., Malencici, K., 1998. Biochemical changes in sugar beet lines in dependence of soil moisture. *Biol. Plant.*, 40: 245-250.

Kevresan, S., Petrovic, N., Popovic, M., Kandrak, J., 2001. Nitrogen and protein metabolism in young pea plants as affected by different concentrations of nickel, cadmium, lead, and molybdenum. *J. Plant Nutr.*, 24:1633–1644.

- Khan, M.S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., Wani, P.A., 2010.** Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi-current perspective. *Arch. Agro and Soil Science*, 56: 73-98.
- Khellaf, N., Zerdaoui, M., 2010.** Growth response of the duckweed *Lemna gibba* L. to copper and nickel phytoaccumulation. *Ecotoxicology* 19:1363–1368.
- Kim, M.Y., Seguin, P., Ahn, J.K., Kim, J.J., Chun, S.C., Kim, E.H., Seo, S.H., Kang, E.Y., Kim, S.L., Park, Y.J., Ro, H.M., Chung, I.M., 2008.** Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *Journal of Agriculture Food Chem.*, 56: 7265– 7270.
- Kováčik, J., Klejdus, B., Kadukova, J., Bačkor, M., 2009a.** Physiology of *Matricaria chamomilla* exposed to nickel excess. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 603-609.
- Kováčik, J., Klejdus, B., Hedbavny, J., Bačkor, M., 2009b.** Tolerance of *Silene vulgaris* to copper: Population-related comparison of selected physiological parameters, *Environmental Toxicology*, 25(6): 581-592.
- Kováčik, J.B., Babula, P., Klejdus, B., Hedbavny, J., 2013.** Chromium uptake and consequences for metabolism and oxidative stress in chamomile plants. *J. Agric. Food Chem.*, 61: 7864-7873.
- Kumar, A., Prasad, M.N.V., Sytar, O., 2012.** Lead toxicity, defense strategies and associated indicative biomarkers in *Talinum triangulare* grown hydroponically. *Chemosphere*, 89: 1056–1165.
- Kumar, D., Kumar Tripathi, D., Kumar Chauhan, D., 2014.** Phytoremediation Potential and Nutrient Status of *Barringtonia acutangula* Gaerth. Tree Seedlings Grown Under Different Chromium (CrVI) Treatments. *Biological Trace Element Research.*, 157(2): 164-174.
- Kupper, H., Lombi, E., Zhao, F.J., Wieshammer, G., ve McGrath, S.P., 2001.** Cellular Compartmentation of Nickel in the Hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*. *J. Exp. Bot.*, 52: 2291–3000.
- Labra, M., Gianazza, E., Waitt, R., Eberini, I., Sozzi, A., Regondi, S., Grassi, F., Agradi, E., 2006.** *Zea mays* L. protein changes in response to potassium dichromate treatments. *Chemosphere*, 62: 1234–1244
- Lamb, D.T., Ming, H., Megharaj, M., Naidu, R., 2010.** Relative Tolerance of a Range of Australian Native Plant Species and Lettuce to Copper, Zinc, Cadmium, and Lead. *Arch Environ Contam Toxicol.* 59: 424–432.
- Landberg, T., Greger, M., 2002.** Differences in oxidative stress in heavy metal resistant and sensitive clones of *Salix viminalis*. *Journal of Plant Physiology*; 159, 69-75.
- Larson, R.A., 1988.** The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27: 969-978.

- Lasat, M.M., 2000.** Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. *Journal for Hazardous Substance Research*, 2:5-25.
- Lea, P.J., Sodek, L., Parry, M.A.J., Shewry, P.R., Halford, N.G., 2007.** Asparagine in plants. *Annals of Applied Biology*, 150: 1-26.
- Lee, J.A., Stewart, G.R., 1978.** Ecological Aspects of Nitrogen Metabolism. *Advances in Botanical Research*, 6: 1-43.
- Lefebvre, C., Vernet, P., 1990.** Microevolutionary processes on contaminated deposits. In Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects. Edited by A. Jonathan Shaw. CRC Press, Boca Raton, Fla. pp: 285–299.
- Lester, C., Moller, N., Hammerum, A., 2004.** Conjugal Transfer of Aminoglycoside and Macrolide Resistance between *Enterococcus faecium* Isolates in The Intestine of Streptomycin-Treated Mice. *Feems Microbiol. Lett*, 235:385-391.
- Li, M., Xiong, Z., Dai, L., Huang, Y., 2007.** Effects of copper on nitrogen assimilation in copper-tolerant and non-tolerant populations of *Elsholtzia haichowensis* S., *Water Air Soil Pollution*, 184:323-333.
- Li, X., Ma, H., Jia, P., Wang, J., Jia, L., Zhang, T., Yang, Y., Chen, H., Wei, X., 2012a.** Responses of seedling growth and antioxidant activity to excess iron and copper in *Triticum aestivum* L. *Ecotoxicology Environmental Safety* 86: 47-53.
- Li, X., Zhao, M., Guo, L., Huang, L., 2012b.** Effect of cadmium on photosynthetic pigments, lipid peroxidation, antioxidants and artemisinin in hydroponically grown *Artemisia annua*. *Journal of Environmental Sciences* 24: 1511-1518.
- Liu, D., Jiang, W., Li, M., 1992.** Effects of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa* . *Hereditas*, 117: 23-29.
- Liu, H., Ramnarayanan, R., Logan, B.E., 2004.** Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell. *Environmental Science & Technology*, 38(7): 2281–2285.
- Liu, D.H., Wang, M., Zou, J.H., Jiang, W.S., 2006.** Uptake and accumulation of cadmium and some nutrient ions by roots and shoots of maize (*Zea mays* L.). *Pakistan Journal of Botany* 38: 701-709.
- Liu, D., Zou, J., Wang, M., Jiang, W., 2008.** Hexavalent chromium uptake and its effects on mineral uptake, antioxidant defence system and photosynthesis in *Amaranthus viridis* L. *Bioresource Technology*, 99(7): 2628–2636.
- Liu, N., Lin, Z., Mo, H., 2012.** Metal (Pb, Cd, and Cu)-induced reactive oxygen species accumulations in aerial root cells of the Chinese banyan (*Ficus microcarpa*). *Ecotoxicology*, 21: 2004–2011.

Lodhi, M.A.K., Ruess, R.W., 1988. Variation in Soil Nitrifiers and Leaf Nitrate Reductase Activity of Selected Tree Species in a Forest Community. *Soil Biology and Biochemistry*, 20: 939-943.

Lombardi, LL., Sebastiani, L., 2005. Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. *Plant Science*, 168: 797-802.

López-Millán, A.F., Ellis, D.R., Grusak, M.A., 2005. Effect of zinc and manganese supply on the activities of superoxide dismutase and carbonic anhydrase in *Medicago truncatula* wild type and raz mutant plants. *Plant Science*, 168: 1015- 1022.

Llorens, N., Arola, L., Bladé, C., Mas, A., 2000. Effects of copper exposure upon nitrogen metabolism in tissue cultured *Vitis vinifera*. *Plant Science*, 160: 159-163.

Lu, Y., Li, X., He, M., Zhao, X., Liu, Y., Cui, Y., Pan, Y., Tan, H., 2010. Seedlings growth and antioxidative enzymes activities in leaves under heavy metal stress differ between two desert plants: a perennial (*Peganum harmala*) and an annual (*Halogeton glomeratus*) grass, *Acta Physiol. Plant*, 32: 583-590.

Luo, Z.-B., He, X.-J., Chen, L., Tang, L., Gao, S., Chen, F., 2010. Effects of Zinc on Growth and Antioxidant Responses in *Jatropha curcas* Seedlings. *International Journal of Agriculture & Biology*, 12: 119-124.

Madhava Rao, K.V., Sresty, T.V.S., 2000. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Science*, 157: 113–128

Maestri, E., Pirondini, A., Visioli, G., Marmioli, N., 2013. Trade-off between genetic variation and ecological adaptation of metallicolous and non-metallicolous *Noccaea* and *Thlaspi* species. *Environmental and Experimental Botany*, 96: 1-10.

Maheshwari, R., Dubey, R.S., 2009. Nickel-induced oxidative stress and the role of antioxidant defence in rice seedlings. *Plant Growth Regulation*, 59(1): 37–49.

Malec, P., Waloszek, K.A., Prasad, M.N.V., Strzalka, K., 2008. Zinc reversal of Cd-induced energy transfer changes in photosystem II of *Ceratophyllum demersum* L. as observed by whole-leaf 77K fluorescence. *Plant Stress*, 2: 121–126.

Malec, P., Maleva, M.G., Prasad, M.N.V., Strzalka, K., 2009. Identification and characterization of Cd-induced peptides in *Egeria densa* (water weed): putative role in Cd detoxification. *Aquat Toxicol.*, 95: 213–221.

Maleva, M.G., Nekrasova, G.F., Malec, P., Prasad, M.N.V, Strzalka, K., 2009. Ecophysiological tolerance of *Elodea canadensis* to nickel exposure. *Chemosphere*, 77: 392-398.

Malmir, H.A., 2011. Comparison of antioxidant enzyme activities in leaves stems and roots of *Sorghum* (*Sorghum bicolor* L.) exposed to Chromium (VI). *African Journal of Plant Science*, 5(8): 436-444.

Marichali, A., Dallali, S., Ouerghemmi, S., Sebei, H., Casabianca, H., Hosni, K., 2016. Responses of *Nigella sativa* L. to Zinc Excess: Focus on Germination, Growth, Yield and Yield Components, Lipid and Terpene Metabolism, and Total Phenolics and Antioxidant Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64: 1664-1675.

Marques, A.P.G.C., Rangel, A.O.S.S., Castro, P.M.L., 2009. Remediation of Heavy Metal Contaminated Soils: Phytoremediation as a Potentially Promising Clean-Up Technology. *J.Critical Reviews in Environmental Science and Technology* , 39: 622-654.

Marquez, A.J., Betti, M., Garcia-Calderon, M., Estivill, G., Credali, A., Pajuelo, P., Orea, A., Clemente, M.T., Pajuelo, E., Galvan, F., 2005. Nitrate and Ammonium Assimilatory Enzymes. *Lotus japonicus Handbook*. pp: 315-328.

Márquez-García, B., Horemans, N., Cuypers, A., Guisez, Y., Córdoba, F., 2011. Antioxidants in *Erica andevalensis*: a comparative study between wild plants and cadmium-exposed plants under controlled conditions. *Plant Physiol Biochem* 49:110–115.

Marques, T.C.L.L. de S.M., Soares, A.M., 2011. Antioxidant system of ginseng under stress by cadmium. *Sci. Agric.*, 68(4): 482-488.

Martins, L.L., Mourato, M.P., Cardoso, A.I., Pinto, A.P., Mota, A.M., Gonçalves, L., Varennes, A., 2011. Oxidative stress induced by cadmium in *Nicotiana tabacum* L.: effects on growth parameters, oxidative damage and antioxidant responses in different plant parts. *Acta Physiol Plant*, 33: 1375-1383.

Marschner, H., 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants, San Diego, CA 2nd edn. London: Academic Press. pp: 197-219.

Marschner, P., 2012. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants Third Edition, Academic Press, Elsevier Ltd. pp. 651.

Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., and Suzuki, A., 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: Challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann. Bot.* 105:1141–1157.

Masood, A., Shah, N.A., Zeeshan, M., Abraham, G., 2006. Differential response of antioxidant enzymes to salinity stress in two varieties of *Azolla*, *Environmental Exp. Botany*, 58: 216-222.

Matraszek, R., 2008. Nitrate reductase activity of two leafy vegetables as affected by nickel and different nitrogen forms. *Acta Physiol Plant* 30:361–370

Mazhoudi, S., Chaoui, A., Ghorbal, M.H., Ferjani, E.E., 1997. Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Science*, 127: 129–137.

McGeer, J.C., Szebedinszky, C., McDonald, D.G., Wood, C.M., 2000. Effect of Chronic Sublethal Exposure to Waterborne Cu, Cd or Zn in Rainbow Trout 2: Tissue Specific Metal Accumulation. *Aquatic Toxicology*, 50: 245-256

- McGrath, S.P., Zhao, F.J., Lombi, E., 2002.** Phytoremediation of metals, metalloids and radionuclides. *Advances in Agronomy*, 75: 1-56.
- Melo Azevedo, L.C., Ferracciú Alleoni, L.R., Carvalho, G., Azevedo, R.A., 2011.** Cadmium- and barium-toxicity effects on growth and antioxidant capacity of soybean (*Glycine max* L.) plants, grown in two soil types with different physicochemical properties. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174(5):847–859.
- Memon, A.R., Schröder, P., 2009.** Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 16(2): 162-175.
- Michalak, A., 2006.** Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. *Polish J. of Environ. Stud.*, 15(4): 523-530
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Govindarajan, R., Kuriakose, S.V., Prasad, M.N.V., 2006.** Phytochelatin Synthesis and Response of Antioxidants During Cadmium Stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44: 25-37.
- Mishra, P., Dubey, R.S., 2011.** Nickel and Al-excess inhibit nitrate reductase but upregulate activities of aminating glutamate dehydrogenase and aminotransferases in growing rice seedlings. *Plant Growth Regul.*, 64:251–261
- Mittler, R., 2002.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, 7: 405-410.
- Mohan, B.S., Hosetti, B.B., 2006.** Phytotoxicity of cadmium on the physiological dynamics of *Salvinia natans* L. grown in macrophyte ponds. *Journal of Environmental Biology*, 27(4):701-704.
- Mohanty, M., Kumar Patra, H., 2013.** Effect of Ionic and chelate assisted hexavalent chromium on mung bean seedlings (*Vigna radiata* L. wilczek. Var k-851) during seedling growth. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 9(2): 232-241.
- Møller, I.M., Jensen, P.E., Hansson, A., 2007.** Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 58: 459–481.
- Monnet, F., Vaillant, N., Vernay, P., Coudret, A., Sallanon, H., Hitmi, A., 2001.** Relationship between PSII activity, CO₂ fixation, and Zn Mn and Mg contents of *Lolium perenne* under zinc stress. *J Plant Physiol.*, 158:1137–1144.
- Monni, M. Salemaa, S., White, C., Tuittila, E., Huopalaainen, M., 2000.** Copper resistance of *Calluna vulgaris* originating from the pollution gradient of a Cu-Ni smelter, in southwest Finland. *Environmental Pollution* 109:211-219.
- Morina, F., Jovanović, Lj, Kukavica, B., Veljović-Jovanović, S., 2008.** Peroxidase, phenolics and antioxidative capacity of Common Mullein (*Verbascum thapsus* L.) grown in zinc excess. *Arch. Biol. Sci.* 60: 687-695.

- Morina, F., Jovanović, L., Prokić, L., Veljović-Jovanović, S., 2016.** Physiological basis of differential zinc and copper tolerance of *Verbascum* populations from metal-contaminated and uncontaminated areas. *Environmental Science Pollution Res.* 23: 10005-10020.
- Moschou, P.N., Wu, J., Cona, A., Tavladoraki, P., Angelini, R., Roubelakis-Angelakis, K.A., 2012.** The polyamines and their catabolic products are significant players in the turnover of nitrogenous molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, 63(14): 5003-5015.
- Nada, E., Ferjani, B.A, Ali, R., Bechir, B.R., Imed, M., Makki, B., 2007.** Cadmium-induced growth inhibition and alteration of biochemical parameters in almond seedlings grown in solution culture. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29: 57-62.
- Nadgórska-Socha, A., Kafel, A., Kandziora-Ciupa, M., Gospodarek, J., Zawisza-Raszka, A., 2013.** Accumulation of heavy metals and antioxidant responses in *Vicia faba* plants grown on monometallic contaminated soil. *Environ. Science Pollut. Res.*, 20:1124–1134.
- Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., Sreekanth, T.V.M., 2010.** Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ Chem. Lett.* 8: 199–216, DOI 10.1007/s10311-010-0297-8.
- Navari-Izzo, F., 1998.** Thylakoid-bound and stromal antioxidative enzymes in wheat treated with excess copper. *Physiologia Plantarum*, 104 (4): 630–638.
- Navari-Izzo, F., Quartacci, M.F., 2001.** Phytoremediation of metals: tolerance mechanisms against oxidative stress. *Minerva Biotechnologica*, 13(2): 73.
- Nedjimi, B., Daoud, Y., 2009.** Effects of Calcium Chloride on Growth, Membrane Permeability and Root Hydraulic Conductivity in Two Atriplex Species Grown at High (Sodium Chloride) Salinity. *Journal of Plant Nutrition*, 32(11): 1818-1830. doi:10.1080/01904160903242342.
- Nichols, P.B., Couch, J.D., Al-Hamdani, S.H., 2000.** Selected physiological responses of *Salvinia minima* to different chromium concentrations. *Aquat. Bot.*, 1439:1-8.
- Obermeier, M., Schröder, C.A., Helmreich, B., Schröder, P., 2015.** The enzymatic and antioxidative stress response of *Lemna minor* to copper and a chloroacetamide herbicide. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(23): 18495-18507.
- Olson, M.O., Falkengren-Grerup, U., 2003.** Partitioning of Nitrate Uptake Between Trees and Understory in Oak Forests. *For. Ecol. Manage.*, 179: 311-320.
- Özdener, Y., Kutbay, H.G., 2011.** Physiological and biochemical responses of the leaves of *Verbascum wiedemannianum* (Boiss) to Cadmium. *Pak. J. Bot.* 43(3): 1521-1525.

Pál, M., Horváth, E., Janda, T., Páldi, E., Szalai, G., 2006. Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 169: 239–246.

Palmer, C.M., Guerinot, M.L., 2009. Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nature Chemical Biol.*, 5(5):333-40.

Pan, X., Chen, G., Shi, C., Chai, M., Liu, J., Cheng, S., Shi, F., 2016. Effects of Zn Stress on Growth, Zn Accumulation, Translocation, and Subcellular Distribution of *Spartina alterniflora* Loisel. *CLEAN-Soil, Air, Water* 44: 579-585.

Panda, S.K., Patra, H.K., 2000. Does Cr III produces oxidative damage excised wheat leaves. *J. Plant Biol.*, 27(2):105-110

Panda, S.K., Choudhury, S., 2005. Changes in nitrate reductase activity and oxidative stress response in the moss *Polytrichum commune* subjected to chromium, copper and zinc phytotoxicity. *Braz. J. Plant Physiology*, 17(2): 191-197.

Pandey, V., Dixit, V., Shyam, R., 2005. Antioxidative responses in relation to growth of mustard (*Brassica juncea* cv. Pusa Jaikisan) plants exposed to hexavalent chromium. *Chemosphere*, 61: 40-47.

Panković, D., Plesnicar, M., Maksimovic, I., Kastori, R., 2000. Effects of Nitrogen Nutrition on Photosynthesis in Cd-treated Sunflower Plants. *Annals of Botany* 86(4): 841-847.

Poschenrieder, C., Gunsé, B., Barceló, J., 1989. Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance, and abscisic acid content in expanding bean leaves. *Plant Physiol.*, 90: 1365-1371.

Prasad, M.N.V., 1995. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environ. Expt. Bot.*, 35: 525-545.

Prasad, K.V.S.K., Pardha Saradhi, P., Sharmila, P., 1999. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth and zinc toxicity in *Brassica juncea*. *Env Exp Botany*, 42:1–10

Prasad, M.N.V., Greger, M., Landberg, T., 2001. *Acacia nilotica* L. bark removes toxic elements from solution: corroboration from toxicity bioassay using *Salix viminalis* L. in hydroponic system. *Int. Journal of Phytoremediation*, 3: 289-300.

Prasad, M.N.V., 2004. Heavy Metal Stress in Plants, From Biomolecules to Ecosystems, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Prado, C., Rodríguez-Montelongo, L., González, J. A., Pagano, E.A., Hilal, M., Prado, F.E., 2010. Uptake of chromium by *Salvinia minima*: Effect on plant growth, leaf respiration and carbohydrate metabolism. *Journal of Hazardous Materials*, 177(1-3): 546-553.

Quig, D., 1998. Cysteine metabolism and metal toxicity. *Altern. Med. Rev.*, 3: 262–270.

Rahman, H., Sabreen, S., Alam, S., Kawai, S., 2005. Effects of Nickel on Growth and Composition of Metal Micronutrients in Barley Plants Grown in Nutrient Solution. *Journal of Plant Nutrition*, 28: 393–404.

Rajkumar, M., Prasad, M.N.V., Swaminathan, S., Freitas, H., 2013. Climate change driven plant–metal–microbe interactions. *Environ. Int.*, 53: 74–86.

Rai, V., Vajpayee, P., Singh, S.N., Mehrotra, S., 2004. Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. *Plant Science* 167:1159–1169.

Raskin, I., Smith, R.D., Salt, D.E., 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology*, 8: 221-226.

Rastgoo, L., Alemzadeh, A., 2011. Biochemical responses of Gouan (*Aeluropus litoralis*) to heavy metals stress. *Australian Journal of Crop Science* 5(4):375-383.

Rauser, W.E., 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochem. Biophys.*, 31: 19–48.

Razinger, J., Dermastia, M., Drinovec, L., Dolenc Koce, J., 2007. Antioxidative responses of Duckweed (*Lemna minor* L.) to short-term copper exposure. *Environmental Science and Pollution Research* 14(3):194-201.

Rehder, H., Gökçeoğlu, M., Gebauer, G., Güteryüz, G., 1994. Die Vegetation des Uludağ-Gebirges (Anatolien). *Phytocoenologia*, 24: 167-192.

Remon, E., Bouchardon, J.-L., Faure, O., 2007. Multi-tolerance to heavy metals in *Plantago arenaria* Waldst. & Kit.: Adaptive versus constitutive characters. *Chemosphere* 69: 41–47.

Reeves, R.D., 1992. The hyperaccumulation of nickel by serpentine plants. In: Baker, A.J.M., Proctor, J., Reeves, R.D., eds. *The Vegetation of ultramafic (Serpentine) Soils*. Andover, UK: Intercept Ltd., 253-277.

Reeves, R.D., Baker, A.J.M., 2000. Metal-accumulating plants. In: Raskin, I., Ensley, B.D., (Eds) *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. Wiley, New York, pp 193-229.

Rodriguez Martin, J.A., De Arana, C., Ramos-Miras, J.J., Gill, C., Boluda, R., 2015. Impact of 70 years urban growth associated with heavy metal pollution. *Environmental Pollution*, 196: 156-163.

Rodriguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., Zabalza, A., Corpas, F.J., Gomez, M., Del Rio, L.A., Sandalio, L.M., 2006. Cadmium Effect on Oxidative Metabolism of Pea (*Pisum sativum* L.) Roots: Imaging of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide Accumulation *in vivo*. *Plant Cell Environ.*, 29: 1532–1544.

- Saha, D., Mandal, S., Saha, A., 2012.** Copper induced oxidative stress in tea (*Camellia sinensis*) leaves. *J. Environ. Biol.* 33(5): 861-866.
- Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gomez, M., Romero-Puertas, M.C., del Río, L.A., 2001.** Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Botany*, 52: 2115-2126.
- Santos, E.S., Abreu, M.M., Nabais, C., Saraiva, J.A. 2009.** Trace elements and activity of antioxidative enzymes in *Cistus ladanifer* L. growing on an abandoned mine area. *Ecotoxicology*, 18: 860–868.
- Sas-Nowosielska, A., Galimska-Stypa, R., Kucharski, R., Zielonka, U., Małkowski, E., Gray, L., 2008.** Remediation aspect of microbial changes of plant rhizosphere in mercury contaminated soil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 137(1–3): 101–109.
- Schiavon, M., Pilon-smits, E.A.H., Wirtz, M., Hell, R., Malagoli, M., 2008.** Interactions between chromium and sulfur metabolism in *Brassica juncea*. *J. Environ. Qual.* 37: 1536–1545.
- Schiavon, M., Pittarello, M., Pilon-smits, E.A.H., Wirtz, M., Hell, R., Malagoli, M., 2012.** Selenate and molybdate alter sulfate transport and assimilation in *Brassica juncea* L. Czern. Implications for phytoremediation. *Environmental and Experimental Botany*, 75:41–51.
- Schicker, H., Caspi, H., 1999.** Response of Antioxidative Enzymes to Nickel and Cadmium Stres in Hyperaccumulator Plants of The Genus *Alyssum*. *Physiol Plant*, 105: 39-44.
- Schützendubel, A., Polle, A., 2002.** Plant responses to abiotic stresses: Heavy-metal induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal Experimental Botany*, 53:1351–1365.
- Scoccianti, V., Crinelli, R., Tirillini, B., Mancinelli, V., Speranza, A., 2006.** Uptake and toxicity of Cr (III) in celery seedlings. *Chemosphere*, 64 (10): 1695-1703
- Semane B., Cuypers, A., Smeets, K., Van Belleghem, F., Horemans, N., Schat, H., Vangronsveld, J., 2007.** Cadmium responses in *Arabidopsis thaliana*: glutathione metabolism and antioxidative defence system. *Physiologia Plantarum* 129: 519–528.
- Seregin, I.V., Kozhevnikova, A.D., 2006.** Physiological Role of Nickel and Its Toxic Effects on Higher Plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(2): 257–277.
- Seth, C.S., Misra, V., Singh, R.R., Zolla, L., 2011.** EDTA-enhanced lead phytoremediation in sunflower (*Helianthus annuus* L.) hydroponic culture. *Plant and Soil*, 347: 231-242.
- Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S., 2005.** Chromium toxicity in plants. *Environ Int.*, 31: 739–753.

Sharma, P., Dubey, R.S., 2005. Lead toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.*, 17:35–52.

Sharma, P., Dubey, R.S., 2006. Cadmium Uptake and its Toxicity in Higher Plants. In *Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants* (Eds. Khan N.A. and Samiullah), Narosa Publishing House (India), pp.63-86.

Sharma, S.S., Dietz, K.J., 2006. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*, 57(4): 711-726.

Sharma, S.S., Dietz, K.J., 2009. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Science*, 14: 43-50.

Sharma, A., Sainger, M., Dwivedi, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Singh, R.P., 2010. Genotypic Variation in *Brassica juncea* (L.) Czern. Cultivars in Growth, Nitrate Assimilation, Antioxidant Responses and Phytoremediation Potential During Cadmium Stress. *Journal of Environmental Biology*, 31(5): 773-780.

Shaw, B.P., 1995. Effect of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedling of *Phaseolus aureus*. *Biology of Plants*, 37: 587–596.

Shaw, B.P., Rout, N.P., 1998. Age dependent responses of *Phaseolus aureus* Roxb. to inorganic salts of mercury and cadmium. *Acta Physiol. Plant.*, 20: 85–90.

Shaw, B.P., Sahu, S.K., Mishra, R.K., 2004. Heavy Metal Induced Oxidative Damage in Terrestrial Plants. *Heavy Metal Stress in Plants*, Book of M.N.V. Prasad. pp: 84-119.

Sheoran, V., Sheoran, A.S., Poonia, P., 2011. Role of hyperaccumulators in phytoextraction of metals from contaminated mining sites: a review. *Crit. Rev. Environ. Science Technology*, 41: 168-214.

Shibli, R.A., Kushad, M., Yousef, G.G., Lila, M.A., 2007. Physiological and biochemical responses of tomato microshoots to induced salinity stress with associated ethylene accumulation. *Plant Growth Regul.*, 51:159-169.

Shu, W.S., Ye, Z.H., Lan, C.Y., Zhang, Z.Q., Wong, M.H., 2002. Lead, zinc and copper accumulation and tolerance in populations of *Paspalum distichum* and *Cynodon dactylon*. *Environ Pollut* 120:445–453.

Siedlecka, A., Krupa, Z., 2002. Functions of enzymes in heavy metal treated plants. In: *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants* (Prasad M.N.V., Kazimierz S., eds.). Kluwer, The Netherlands. pp:314–3177.

Singh, R.P., Tripathi, R.D., Sinha, S.K., Maheshwari, R., Srivastava, H.S., 1997. Response of higher plants to lead contaminated environment. *Chemosphere*, 34: 2467–2493.

Singh, A., Prasad, S.H., 2011. Reduction of heavy metal load in food chain: technology assessment. *Rev. Environ. Sci. Biotechnology*, 10: 199-214.

Singh, R., Gautam, N., Mishra, A., Gupta, R., 2011. Heavy metals and living systems: An overview. *Indian Journal of Pharmacology*, 43:246-253.

Singh, H.P., Mahajan, P., Kaur, S., Batish, D.R., Kohli, R.K., 2013. Chromium toxicity and tolerance in plants. *Environ. Chem. Lett.* 11: 229-254.

Singh, S., Prasad, M.S., 2015. IAA alleviates Cd toxicity on growth, photosynthesis and oxidative damages in eggplant seedlings. *Plant Growth Regulation*, 77(1): 87-98

Sivritepe, N., Kumral, N., Erturk, U., Yerlikaya, C., Kumral, A., 2009. Responses of grapevines to two-spotted spider mite mediated biotic stress. *Journal of Biological Sciences*, 9: 311–318.

Smeets, K., Cuypers, A., Lambrechts, A., Semane, B., Hoet, P., van Laere, A., Vangronsveld, J., 2005. Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiol. Biochem.*, 43: 437–444.

Smirnoff, N., Stewart, G.R., 1987. Glutamine synthetase and ammonium assimilation in roots of Zinc-tolerant and non-tolerant clones of *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv. and *anthoxanthum odoratum*. *New Phytol.*, 107: 659-670.

Smith, A.M., Coupland, G., Dolan, L., Harberd, N., Jones, J., Martin, C., Sablowski, R., Amey, A., 2010. *Plant Biology*. Garland Science, Taylor&Francis Group, LLC.

Srivastava, S., Mishra, S., Tripathi, R.D., Dwivedi, S., Gupta, D.K., 2006. Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatins in *Hydrilla verticillata* (L. f.) Royle. *Aquatic Toxicology*, 8: 405–415.

Sobkowiak, R., Rymer, K., Rucińska, R., Deckert, J., 2004. Cadmium-induced changes in antioxidant enzymes in suspension culture of soybean cells. *Acta Biochim Polon.*, 51: 219–222.

Solanki, R., Dhankhar, R., 2011. Biochemical changes and adaptive strategies of plants under heavy metal stress. *Biologia*, 66(2):195–204.

Solomonson, L.P., Barber, M.J., 1990. Assimilatory Nitrate Reductase: Functional Properties and Regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 4: 225-253.

Somashekaraiah, B.V., Padmaja, K., Prasad, A.R.K., 1992. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiologia Plantarum*, 85: 85–89.

Soudek, P., Petrová, Š., Vaněk, T., 2011. Heavy metal uptake and stress responses of hydroponically cultivated garlic (*Allium sativum* L.). *Environmental and Experimental Botany* 74: 289-295.

Sun, S.-Q., Wang, G.-X., He, M., Cao, T., 2010. Effects of Pb and Ni stress on oxidative stress parameters in three moss species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(6):1630–1635.

Sutter, K., Jung, K., Krauss, G.-J. 2002. Effects of heavy metals on the nitrogen metabolism of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. *Environ. Sci & Pollut. Res.* 9: 417-421.

Stanisavljević, N., Savić, J., Jovanović, Z., Miljuš-Djukic, J., Radović, S., Vinterhalter, D., Vinterhalter, B., 2012. Antioxidative-related enzyme activity in *Alyssum markgrafii* shoot cultures as affected by nickel level. *Acta Physiol Plant*, 34: 1997–2006.

Swaileh, K.M., Hussein, R.M., Abu-Elhaj, S., 2004. Assessment of heavy metal contamination in roadside surface soil and vegetation from the West bank. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 47: 23-30.

Sytar, O., Kumar, A., Latowski, D., Kuczynska, P., Strzalka, K., Prasad, M.N.V., 2013. Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35: 985–999.

Tan, X.W., Ikeda, H., Oda, M., 2000. Effects of nickel concentration in the nutrient solution on the nitrogen assimilation and growth of tomato seedlings in hydroponic culture supplied with urea or nitrate as the sole nitrogen source. *Scientia Horticulturae* 84: 265-273

Teisseire, H., Guy, V., 2000. Copper-induced Changes in Antioxidant Enzymes Activities in Fronds of Duckweed (*Lemna minor*). *Plant Science* 153: 65–72.

Tewari, R.K., Kumar, P., Sharma, P.N., 2006. Antioxidant responses to enhanced generation of superoxide anion radical and hydrogen peroxide in the copper-stressed mulberry plants. *Planta*, 223:1145–1153. doi: 10.1007/s00425-005-0160-5.

Thakur, S., Singh, L., Wahid, Z.A., Siddiqui, M.F., Atnaw, S.M., Din, M.F.M., 2016. Plant-driven removal of heavy metals from soil: uptake, translocation, tolerance mechanism, challenges and future perspectives. *Environmental Monit. Assess.*, 188-206.

Thounaojam, T.C., Panda, P., Mazumdar, P., Kumar, D., Sharma, G.D., Sahoo, L., Panda, S.K., 2012. Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice. *Plant Physiol. Bioch.* 53: 33-39.

Tiryakioglu, M. 2002. Effect of cadmium on growth and antioxidant enzymes in two barley cultivars. Master's Dissertation Submitted to the Graduate School of Engineering and Natural Sciences to Sabancı University.

Tiwari, K.K., Dwivedi, S., Singh, N.K., Rai, U.N., Tripathi, R.D., 2009. Chromium (VI) induced phytotoxicity and oxidative stress in pea (*Pisum sativum* L.): Biochemical changes and translocation of essential nutrients. *Journal of Environmental Biology*, 30(3): 389-394.

Tripathi, B.N., Gaur, J.P., 2004. Relationship between copper- and zinc-induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus* sp. *Planta Medica*, 219: 397-404.

Tripathi, D.K., Singh, V.P., Kumar, D., Chauhan, D.K., 2012. Impact of exogenous silicon addition on chromium uptake, growth, mineral elements, oxidative stress, antioxidant capacity, and leaf and root structures in rice seedlings exposed to hexavalent chromium. *Acta Physiol Plant*, 34: 279–289.

Tsonev, T., Lidon, F.C., 2005. Effect of Zn pollution on plant growth and photosynthesis, *Biologia Vegetal e Agro-Industrial*, 2:223-234.

Tsonev, T., Lidon, F.J.C., 2012. Zinc in plants—an overview. *Emirates J Food Agric.*, 24:322–333.

Upadhyay, R.K., Panda, S.K., 2009. Copper-induced growth inhibition, oxidative stress and ultrastructural alterations in freshly grown water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). *C. R. Biologies*, 332: 623-632.

Wahid, A., Ghani, A., Ali, I., Ashraf, M.Y., 2007. Mineral Toxicity Stress. *J. Agronomy & Crop Science*, 193:357-365.

Wan, G., Najeeb, U., Jilani, G., Naeem, M.S., Zhou, W., 2011. Calcium invigorates the cadmium-stressed *Brassica napus* L. plants by strengthening their photosynthetic system. *Environ. Science Pollut. Res.*, 18: 1478–1486.

Wang, H., Shan, X.-q., Wen, B., Zhang, S., Wang, Z.-j., 2004. Responses of antioxidative Enzymes to Accumulation of Copper in a Copper Hyperaccumulator of *Commoelina communis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 47: 185–192.

Wang, L., Zhou, Q., Ding, L., Sun, Y., 2008. Effect of cadmium toxicity on nitrogen metabolism in leaves of *Solanum nigrum* L. as a newly found cadmium hyperaccumulator. *Journal of Hazardous Materials*, 154: 818-825.

Wang, H., Feng, T., Peng, X., Yan, M., Tang, X., 2009. Up-regulation of chloroplastic antioxidant capacity is involved in alleviation of nickel toxicity of *Zea mays* L. by exogenous salicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 1354-1362.

Wang, J., Li, W., Zhang, C., Ke, S., 2010. Physiological Responses and Detoxification Mechanisms to Pb, Zn, Cu and Cd in Young Seedling of *Paulownia fortunei*. *Journal of Environmental Sciences*, 22(12); 1916-1922.

Wang, T.Z., Chen, L., Zhao, M.G., Tian, Q.Y., Zhang, W.H., 2011. Identification of drought-responsive microRNAs and their targets in *Medicago truncatula* by genome-wide high-throughput sequencing and degradome analysis. *BMC Genomics* 12: 367-372.

Whitaker, J., Ainsworth, G.C., Meharg, A.A. 2001. Copper-and arsenate induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L. clones with different sensitivity. *Plant Cell Environ.* 24: 713-722.

Witham, F.H., Blaydes, B.F., Devlin, R.M. 1971. Experiments in plant physiology, Van Nostrand Reinhold, New York, USA, 1971, pp:167-200

Wuana, R.A., Okieimen, F.F., 2011. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. ISRN Ecol: 402647. DOI: 10.5402/2011/402647, pp:20.

Xia, H.P., 2004. Ecological rehabilitation and phytoremediation with four grasses in oil shale mined land. *Chemosphere*, 54: 345–353.

Xiong, Z.-T., Zhao, F., Li, M.-J., 2006. Lead Toxicity in *Brassica pekinensis* Rupr.:Effect on Nitrate Assimilation and Growth. *Environmental Toxicology*, 21: 147–153.

Xiong, Z.-T., Wang, T., Liu, K., Zhang, Z.-Z., Gan, J.-H., Huang, Y., Li, M.-J. 2008. Differential invertase activity and root growth between Cu-tolerant and non-tolerant populations in *Kummerowia stipulacea* under Cu stress and nutrient deficiency. *Environmental and Experimental Botany*, 62: 17–27.

Xu, J., Wang, W., Yin, H., Liu, X., Sun, H., Mi, Q., 2010. Exogenous nitric oxide improves antioxidative capacity and reduces auxin degradation in roots of *Medicago truncatula* seedlings under cadmium stress. *Plant and Soil*, 321-326.

Xu, X., Shi, G., Ding, C., Xu, Y., Zhao, J., Yang, H., Pan, Q., 2011. Regulation of Exogenous Spermidine on the reactive oxygen species level and polyamine metabolism in *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb under Copper Stress. *Plant Growth Regulations* 63: 251–258.

Vajpayee, P., Sharma, S.C., Rai, U.N., Tripathi, R.D., Yunus, M., 1999. Bioaccumulation of chromium and toxicity to photosynthetic pigments, nitrate reductase activity and protein content of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *Chemosphere* 39:2159-2169.

Vajpayee, P., Tripathi, R.D., Rai, U.N., Ali, M.B., Sinha, S.N., 2000. Chromium (VI) accumulation reduced chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content of *Nymphaea alba* L. *Chemosphere*, 41:1075-1082.

Vajpayee, P., Rai, U.N., Ali, M.B., Tripathi, R.D., Yadav, V., Sinha, S., Singh, S.N., 2002. Chromium-induced physiologic changes in *Vallisneria spiralis* L. and its role in phytoremediation of tannery effluent. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 67: 246–256.

Vaculík, M., Landberg, T., Greger, M., Luxová, M., Stoláriková, M., Lux, A., 2012. Silicon modifies root anatomy, and uptake and subcellular distribution of cadmium in young maize plants. *Annals of Botany*, 110(2): 433-443.

Van Aken, B., 2009. Transgenic plants for enhanced phytoremediation of toxic explosives. *Current Opin Biotechnology*, 20: 231-236.

Van Assche, F., Clijsters, H., 1986. Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentrations of zinc: effects on electron transport and photophosphorylation. *Physiologia Plantarum*, 66(4): 717-721.

Van Assche, F., Clijsters, H., 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.*, 13: 195–206.

Van der Ent, A., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Pollard, A.J., Schat, H., 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloids trace elements: Facts and fiction. *Plant and Soil*, 362(1): 319-334.

Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H., 2009. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist*, 181 (4): 759-776.

Verkleji, J.A.C., Schat, H., 1990. Mechanisms of metal tolerance in higher plants. In Shaw, A.J., (Ed.), Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects, (CRC Press, Boca Raton, FL), pp. 179-193.

Viégas, R.A., Silveira, J.A.G., 1999. Ammonia assimilation and proline accumulation in young cashew plants during long-term exposure to NaCl-salinity. *Braz. Journal of Plant Physiology*, 11: 153–159.

Yang, X., Baliger, V.C., Martens, D.C., Clark, R.B., 1996. Cadmium effects on influx and transport of mineral nutrients in plant species. *Journal Plant Nutr.*, 19: 643–656.

Yang, X., Feng, Y., He, Z., Stoffella, P.J., 2005. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18(4): 339-353.

Ye, Z.H., Wong, J.W.C., Wong, M.H., 2000. Vegetation response to lime and manure compost amendments on acid lead/zinc mine tailings: A greenhouse study. *Restoration Ecology* 8: 289-295.

Ye, Z.H., Baker, A.J.M., Wong, M.H., Willis, A.J., 1997. Zinc, lead and cadmium tolerance, uptake and accumulation by the common Reed, *Phragmites australis* (Cav.) Trin.ex Steudel. *Annals of Botany* 80:363-370.

Yilmaz, D.D., Parlak, K.U., 2011. Changes in proline accumulation and antioxidative enzyme activities in *Groenlandia densa* under cadmium stress. *Ecol. Indicators*, 11: 417-423.

Yruela, I., 2005. Copper in plants. *Braz. J. Plant Physiol.*, 17: 145–156.

Yusuf, M., Fariduddin, Q., Hayat, S., Ahmad, A., 2011. Nickel: An Overview of Uptake, Essentiality and Toxicity in Plants. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 86: 1–17.

Yusuf, M., Fariduddin, Q., Varshney, P., Ahmad, A., 2012. Salicylic acid minimizes nickel and/or salinity-induced toxicity in Indian mustard (*Brassica juncea*) through an improved antioxidant system. *Environ. Sci. Pollution Res.*, 19: 8–18.

Zeidler, M., 2005. Heavy Metals in Two Herb Species (river Morava, Czech Republic). *Polish Journal of Ecology*, 53: 185-195.

Zhang, X-H., Luo, Y.P., Huang, H.T., Liu, J., Chen, J., 2005. Electroplating factory heavy metal pollution in soil and characteristics of plant accumulation. *J. Guilin Univ. Technol.*, 25: 289-292.

Zhang, X-H., Liu, J., Huang, H.T., Chen, J., Zhu, Y-N., Wang, D.-Q., 2007. Chromium accumulation by the hyperaccumulator plant *Leersia hexandra* Swartz. *Chemosphere*, 67: 1138-1143.

Zhao, S., Liu, Q., Qi, Y., Duo, L., 2010. Responses of root growth and protective enzymes to copper stress in turfgrass, *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 52(2):7-11.

Zheng-Xun, J., Chun-Rong, Q., Jing, Y., Hai-Ying, L., Zhong-Ze, P., 2007. Changes in Activities of Glutamine Synthetase During Grain Filling and Their Relation to Rice Quality. *Rice Science*, 14(3): 211-216.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ayşegül AKPINAR
Doğum Yeri ve Tarihi : Bursa - 10.05.1982
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Çelebi Mehmet Lisesi 2000

Lisans : Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü 2000

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : Uludağ Üniversitesi Teknoloji Transfer Ofisi

A.Ş. 2014 – Halen

İletişim (e-posta) : agulugur@gmail.com

Yayınları :

1. Arslan, H., Güteryüz, G., Akpınar, A., Kırmızı, S., Erdemir, Ü. S., Güçer, Ş., 2013. **Responses of ruderal *Verbascum olympicum* Boiss. (Scrophulariaceae) growing under cadmium (Cd) stress.** Clean-Soil, Air, Water, doi: [10.1002/clen.201300219] (Sci.Exp.)
2. Akpınar, A., Arslan, H., Güteryüz, G., Kırmızı, S., Erdemir, Ü.S., Gücer, S., 2015. **Ni-induced Changes in Nitrate Assimilation and Antioxidant Metabolism of *Verbascum olympicum* Boiss: Could the Plant be Useful for Phytoremediation or/and Restoration Purposes?** *International Journal of Phytoremediation*, 17(6): 546-555.
3. Akpınar, A., Arslan, H., Güteryüz, G., Kırmızı, S., 2016. **Antioxidative defense mechanism of the ruderal *Verbascum olympicum* Boiss. against copper (Cu)-induced stress.** *Open Life Science*, 11:10-20.
4. Güteryüz, G., Seven Erdemir, Ü., Arslan, H., Akpınar, A., Çiçek, A., Güçer, Ş., 2015. **Variation in trace element mobility and nitrogen metabolism of *Verbascum olympicum* Boiss. under copper stress.** *Chemistry and Ecology*, 31(6): 494-509.