



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**BAKIR (Cu) UYGULANMIŞ MISIR (*Zea mays* L.)  
FİDELERİNDEKİ ANTiOKSİDAN AKTİVİTELERİN  
FİZYOLOJİK VE ANATOMİK YÖNDEN İNCELENMESİ**

**Fadime ERYILMAZ  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Botanik Programı**

**Danışman  
Prof.Dr. Semahat YENTÜR**

**Aralık, 2007**

**İSTANBUL**



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**BAKIR (Cu) UYGULANMIŞ MISIR (*Zea mays* L.)  
FİDELERİNDEKİ ANTiOKSİDAN AKTİVİTELERİN  
FİZYOLOJİK VE ANATOMİK YÖNDEN İNCELENMESİ**

**Fadime Eryılmaz  
Biyoloji Bölümü  
Botanik Programı**

**Danışman  
Prof.Dr. Semahat YENTÜR**

**Aralık, 2007**

**İSTANBUL**

Bu çalışma 03/12/2007 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Botanik / Bitki Fizyolojisi programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof.Dr. Semahat YENTÜR (Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Prof.Dr. Muammer ÜNAL  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Prof.Dr. Orhan KÜÇÜKER  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Prof.Dr. Memduh SERİN  
Marmara Üniversitesi  
Fen Edebiyat Fakültesi

Prof.Dr. Sabri SÜMER  
Marmara Üniversitesi  
Fen Edebiyat Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin T-730/13092005 numaralı projesi ile desteklenmiştir.



## ÖNSÖZ

Lisans, yüksek lisans ve doktora öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Prof.Dr. Semahat YENTÜR'e en içten dileklerle teşekkür ederim.

Bilgi birikimi ve laboratuvar deneyimlerini benimle paylaşan çok değerli hocalarım Prof.Dr. Muammer ÜNAL'a, Prof.Dr. Orhan KÜÇÜKER'e, Doç.Dr. Gül CEVAHİR ÖZ'e, Doç.Dr. Gülriz BAYÇU'ya, Yard.Doç.Dr. Ergül ÇETİN'e, Yard.Doç.Dr. Mine SARSAĞ'a, Yard.Doç.Dr. Serap ÇAĞ'a ve yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmamın uygulama kısmını destekleyen İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği ve İstanbul Üniversitesi İleri Analizler Laboratuvarı'nın tüm çalışanlarına teşekkürü borç bilirim.

Elektron mikroskopu analizlerindeki yardımlarından ötürü İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan arkadaşlarım biyolog Fadime AKTAR'a, yüksek lisans öğrencisi Ebru KARABULUT'a ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı'nda doktora yapan tıp doktoru Leyla BAHAR'a içtenlikle teşekkür ederim.

Bakır ölçümü ve enzim aktivitelerinin tayinindeki tavsiye ve yardımlarından ötürü Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak çalışan doktora öğrencisi Çiğdem İLERİ ile İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Sinirbilim Anabilim Dalı'ndan çok değerli hocamlarım Doç.Dr. Makbule AYDIN'a, Dr. Elif ÖZKÖK'e ve doktora öğrencisi olan arkadaşım Emine BİLGE'ye içtenlikle teşekkür ederim.

Yüksek lisans ve doktora tez çalışmalarım ve ayrıca diğer araştırmalarım için gerekli olan tohum ihtiyacımı en kısa sürede ve hiçbir ücret talep etmeden karşılayan Bursa MAY Tohumculuk A.Ş.'nin tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Bitki resimlerinin düzenlenmesinde ve şekillerin çizilmesinde yardım eden İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğrencisi ve amatör fotoğrafçı Enes ÖZDİL ile Marmara Üniversitesi Bilişim Merkezi'nde çalışan kardeşim bilgisayar programcısı Metin ERYILMAZ'a içtenlikle teşekkür ederim.

Bütün öğrenim hayatım boyunca her türlü desteklerini esirgemeyen ve bana uygun bir çalışma ortamı sağlayan aileme en içten dileklerle teşekkür ederim.

Aralık, 2007

Fadime ERYILMAZ

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ .....	xi
SEMBOL LİSTESİ .....	xiii
ÖZET .....	xv
SUMMARY.....	xvii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL KISIMLAR.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. BİTKİLERDE AĞIR METAL TOKSİSİTESİ.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. BİTKİLERDE BAKIR STRESİ.....</b>	<b>6</b>
2.2.1. Bakırın Kimyasal ve Biyolojik Özellikleri.....	7
2.2.2. Bitkilerde Aşırı Bakıra Karşı Geliştirilen Çeşitli Savunma Stratejileri.....	8
2.2.3. Bakırın Bitkilerdeki Fizyolojik ve Anatomik Etkileri.....	10
<b>2.3. BİTKİLERDE OKSİDAN STRES VE SERBEST OKSİJEN TÜRLERİ.....</b>	<b>14</b>
2.3.1. Superoksit Radikali ( $O_2^-$ ).....	16
2.3.2. Hidrojen Peroksit ( $H_2O_2$ ).....	17
2.3.3. Hidroksil Radikali ( $OH^\cdot$ ).....	19
2.3.4. Singlet Oksijen ( $O_2^1$ ).....	20
<b>2.4. BİTKİLERDE LİPİT PEROKSİDASYONU.....</b>	<b>21</b>
2.4.1. Lipit Peroksidasyonu Başlama Evresi.....	21
2.4.2. Lipit Peroksidasyonu İlerleme Evresi.....	22
2.4.3. Lipit Peroksidasyonu Yıkım Evresi ve Oluşan Çeşitli Organik Radikaller.....	22
2.4.3.1. Organik Peroksit Radikali ( $RCOO^\cdot$ ).....	22
2.4.3.2. Peroksil Radikali ( $ROO^\cdot$ ).....	22
2.4.3.3. Alkoksil Radikali ( $RO^\cdot$ ).....	22
2.4.4. Lipit Peroksidasyonu Sonlanma Evresi.....	22

<b>2.5. BİTKİLERDE ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ.....</b>	<b>28</b>
<b>2.5.1. Superoksit Dismutaz (SOD).....</b>	<b>29</b>
<b>2.5.2. Katalaz (CAT).....</b>	<b>30</b>
<b>2.5.3. Peroksidaz (POD).....</b>	<b>30</b>
2.5.3.1. Askorbat Peroksidaz (APX).....	30
2.5.3.2. Guaiakol Peroksidaz (GuPX).....	31
2.5.3.3. Glutatyon Peroksidaz (GPX).....	32
<b>2.5.4. Glutatyon Redüktaz (GR).....</b>	<b>32</b>
<b>2.5.5. Fenilalanin Amonyak Liyaz (PAL).....</b>	<b>33</b>
<b>2.5.6. Askorbat (C Vitamini).....</b>	<b>33</b>
<b>2.5.7. Glutatyon (GSH).....</b>	<b>35</b>
<b>2.5.8. α-Tokoferol (E Vitamini).....</b>	<b>37</b>
<b>2.5.9. Karotinoidler (β-Karotin, A Vitamini).....</b>	<b>39</b>
<b>2.5.10. Fenolik Bileşikler (Flavonoidler, Antosiyaninler).....</b>	<b>41</b>
<b>2.6. ANTOSİYANİNLERİN BAKIR STRESİNDEKİ ANTIOKSİDAN ROLLERİ....</b>	<b>44</b>
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM .....</b>	<b>51</b>
<b>3.1. BİTKİ MATERYALİ VE ÖZELLİKLERİ.....</b>	<b>51</b>
3.1.1. Mısır Bitkisinin Genel Özellikleri.....	51
<b>3.2. FİDELERİN YETİŞTİRİLMESİ.....</b>	<b>53</b>
<b>3.3. BİTKİLERE BAKIR UYGULANMASI.....</b>	<b>53</b>
<b>3.4. BAKIR ANALİZİ.....</b>	<b>55</b>
<b>3.5. ÇİMLENME YÜZDESİNİN ÖLÇÜLMESİ.....</b>	<b>55</b>
<b>3.6. KÖK VE GÖVDE UZUNLUĞUNUN ÖLÇÜLMESİ.....</b>	<b>55</b>
<b>3.7. TAZE VE KURU AĞIRLIK MİKTARININ ÖLÇÜLMESİ.....</b>	<b>56</b>
<b>3.8. ORANSAL SU İÇERİĞİNİN ÖLÇÜLMESİ.....</b>	<b>56</b>
<b>3.9. MEMBRAN PERMEABİLİTESİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN ÖLÇÜLMESİ....</b>	<b>56</b>
<b>3.10. PROLİN MİKTARININ ÖLÇÜLMESİ.....</b>	<b>56</b>
<b>3.11. HİDROJEN PEROKSİT (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) MİKTARININ ÖLÇÜLMESİ.....</b>	<b>57</b>
<b>3.12. LİPİT PEROKSİDASYONUNUN ÖLÇÜLMESİ.....</b>	<b>57</b>
<b>3.13. ASKORBAT İÇERİĞİNİN ÖLÇÜLMESİ.....</b>	<b>58</b>
<b>3.14. GLUTATYON İÇERİĞİNİN ÖLÇÜLMESİ.....</b>	<b>58</b>
<b>3.15. KLOROFİL VE KAROTİNOİD İÇERİĞİNİN ÖLÇÜLMESİ.....</b>	<b>59</b>
<b>3.16. ANTOSİYANİN İÇERİĞİNİN ÖLÇÜLMESİ.....</b>	<b>59</b>
<b>3.17. TOTAL FENOLİK BİLEŞİKLERİN İÇERİĞİNİN ÖLÇÜLMESİ.....</b>	<b>60</b>
<b>3.18. FENİLALANİN AMONYAK LİYAZ (PAL) ENZİMİNİN TAYİNİ.....</b>	<b>60</b>
<b>3.19. ANTIOKSİDAN ENZİMLERİN EKSTRAKSİYONU.....</b>	<b>61</b>

3.20. TOTAL ÇÖZÜNEBİLİR PROTEİN MİKTARININ TAYİNİ.....	61
3.21. ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİNİN ÖLÇÜMÜ.....	61
3.21.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzimi (E.C. 1.15.1.1) Aktivitesinin Ölçümü.....	61
3.21.2. Katalaz (CAT) Enzimi (E.C. 1.11.1.6) Aktivitesinin Ölçümü.....	62
3.21.3. Askorbat Peroksidaz (APX) Enzimi (E.C. 1.11.1.11) Aktivitesinin Ölçümü...62	
3.21.4. Guaiakol Peroksidaz (GuPX) Enzimi (E.C. 1.11.1.7) Aktivitesinin Ölçümü...62	
3.21.5. Glutasyon Redüktaz (GR) Enzimi (E.C. 1.6.4.2) Aktivitesinin Ölçümü.....62	
3.22. ANATOMİK ANALİZLER.....	63
3.22.1. Işık Mikroskopu Analizleri.....	63
3.22.2. Elektron Mikroskopu Analizleri.....	63
3.23. İSTATİSTİKSEL HESAPLAMALAR.....	63
4. BULGULAR.....	64
4.1. BAKIRIN MISIR FİDELERİNDEKİ GENEL FİZYOLOJİK ETKİLERİ.....	64
4.2. BAKIR İÇERİĞİ.....	67
4.3. ÇİMLENME YÜZDESİ.....	68
4.4. KÖK VE GÖVDE UZUNLUĞU.....	70
4.5. TAZE VE KURU AĞIRLIK MİKTARI.....	72
4.6. ORANSAL SU İÇERİĞİ.....	74
4.7. MEMBRAN PERMEABİLİTESİNDE MEYDANA GELEN DEĞİŞİMLER.....	75
4.8. PROLİN İÇERİĞİ.....	76
4.9. TOTAL ÇÖZÜNEBİLİR PROTEİN İÇERİĞİ.....	77
4.10. HİDROJEN PEROKSİT İÇERİĞİ.....	79
4.11. MALONDİALDEHİT İÇERİĞİ.....	80
4.12. ASKORBAT İÇERİĞİ.....	81
4.13. GLUTATYON İÇERİĞİ.....	83
4.14. KLOROFİL VE KAROTİNOİD İÇERİĞİ.....	85
4.15. ANTOSİYANİN İÇERİĞİ.....	87
4.16. TOTAL FENOLİK BİLEŞİKLERİN İÇERİĞİ.....	89
4.17. FENİLALANİN AMONYAK LİYAZ (PAL) ENZİMİ AKTİVİTESİ.....	92
4.18. SUPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) ENZİMİ AKTİVİTESİ.....	93
4.19. KATALAZ (CAT) ENZİMİ AKTİVİTESİ.....	95
4.20. ASKORBAT PEROKSİDAZ (APX) ENZİMİ AKTİVİTESİ.....	96
4.21. GUAIAKOL PEROKSİDAZ (GUPX) ENZİMİ AKTİVİTESİ.....	97
4.22. GLUTATYON REDÜKTAZ (GR) ENZİMİ AKTİVİTESİ.....	99
4.23. MORFOLOJİK VE ANATOMİK BULGULAR.....	101

4.23.1. Morfolojik Bulgular.....	101
4.23.2. Anatomik Bulgular (Işık Mikroskopu Analizleri).....	105
4.23.3. Anatomik Bulgular (Elektron Mikroskopu Analizleri).....	109
5. TARTIşMA VE SONUÇ.....	122
KAYNAKLAR .....	169
ÖZGEÇMİş .....	201

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 2.1</b>	: Bitkilerde ağır metallere karşı geliştirilen çeşitli savunma stratejileri.....	9
<b>Şekil 2.2</b>	: Bitkilerde serbest oksijen radikallerinin (ROS) çeşitli metabolik kaynakları.....	14
<b>Şekil 2.3</b>	: Serbest oksijen radikalleri (ROS) ile antioksidanların moleküler yapısı ve aralarındaki elektron alışverişi.....	15
<b>Şekil 2.4</b>	: Aktif oksijen türlerinin oluşumu ve yıkımı.....	18
<b>Şekil 2.5</b>	: Lipit peroksidasyonunun başlama, ilerleme ve yıkım evreleri.....	23
<b>Şekil 2.6</b>	: Lipit peroksidasyonunun sonlanma evresi.....	24
<b>Şekil 2.7</b>	: Lipit peroksidasyonu sonucunda hücre membranı bileşenlerinin oksidasyonu ve çeşitli kısımların çapraz bağlanmaları ile meydana gelen değişimler.....	25
<b>Şekil 2.8</b>	: Çevresel stres etmenleri ve hücrel savunma sistemlerinin uyarılması.....	27
<b>Şekil 2.9</b>	: Bitki hücrelerinde antioksidan savunma sistemleri.....	27
<b>Şekil 2.10</b>	: Reaktif oksijen türlerinin (ROS) abiyotik ve biyotik stres koşullarında çeşitli hücre kısımlarındaki antioksidan genleri aktivasyonu.....	28
<b>Şekil 2.11</b>	: Superoksit dismutaz (SOD) izoenzimlerinin hücrelerde bulunduğu kısımlar ve bunların antioksidan genler tarafından uyarılması.....	29
<b>Şekil 2.12</b>	: Halliwell-Asada yolu (Askorbat-Glutasyon Döngüsü).....	34
<b>Şekil 2.13</b>	: Hidroksil radikalının (OH <sup>•</sup> ) başlattığı lipit peroksidasyonunun engellenmesinde $\alpha$ -tokoferol, askorbat ve glutasyon bileşiklerinin rolleri.....	36
<b>Şekil 2.14</b>	: Aktif oksijen türlerinin (ROS); kloroplastların stroma ve membran kısımlarındaki askorbat-glutasyon döngüsü, $\alpha$ -tokoferol ve ilgili antioksidan enzimler aracılığı ile temizlenme mekanizması.....	38
<b>Şekil 2.15</b>	: Kloroplastlardaki elektron transpotu sırasında oluşan serbest oksijen türleri ve çeşitli antioksidan savunma sistemleri.....	39
<b>Şekil 2.16</b>	: Fotosentez olayında klorofilin eksitasyonu ile oluşan singlet oksijenin ( $O_2^1$ ), $\beta$ -karotin tarafından indirgenmesi.....	40
<b>Şekil 2.17</b>	: Klorofilin eksitasyonu ve oksidan metabolizma sonucunda oluşan serbest oksijen türlerinin ve lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonlarının önlenmesinde karotenoidlerin rolleri.....	40
<b>Şekil 2.18</b>	: Bitkilerde $H_2O_2$ 'in detoksifikasyonunda vakuoldeki peroksidaz/fenolikler/askorbat sistemi ile sitosol ve kloroplastlardaki askorbat-glutasyon döngüsünün birlikte çalışma mekanizmaları.....	43

<b>Şekil 2.19</b>	: (a) Fenilpropanoid biyosentez yolu ile sentezlenen çeşitli flavonoid bileşikleri (antosiyantinler, flavonoller, flavanlar, filobafenler, proantosiyanidinler, kahverengi maddeler) (b) Antosiyantin ve flavonollerin genel yapısı.....	45
<b>Şekil 2.20</b>	: Antosiyantinlerin biyosentezi.....	46
<b>Şekil 2.21</b>	: (a) Antosiyantinlerin genel yapısı (b) Antosiyantinlerin ve flavonollerin antioksidan etkinliklerinde ve ağır metallerin kelatlanmasında rol alan çeşitli kısımları ile yan grupları.....	49
<b>Şekil 3.1</b>	: Mısır bitkisinin genel görünümü ve başlıca kısımları.....	52
<b>Şekil 4.1</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO <sub>4</sub> çözeltileri uygulanmış (a) karanlıkta, (b) ışıktta yetiştirilmiş 4 günlük mısır fideleri ile (c) karanlıktan alınarak gelişimini ışıktta sürdürmüş 7 günlük mısır fidelerinde meydana gelen çeşitli değişimler.....	65
<b>Şekil 4.2</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO <sub>4</sub> çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarında meydana gelen çeşitli değişimler.....	66
<b>Şekil 4.3</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO <sub>4</sub> uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki bakır içerikleri.....	68
<b>Şekil 4.4</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO <sub>4</sub> çözeltileri uygulanan mısır tohumlarının çimlenme yüzdeleri.....	69
<b>Şekil 4.5</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO <sub>4</sub> çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök ve gövde uzunlukları.....	71
<b>Şekil 4.6</b>	: Kontrol ve 250 µM CuSO <sub>4</sub> çözeltisi uygulanmış 15 günlük mısır fidelerinin kök, gövde ve yapraklarının genel görünümüleri.....	71
<b>Şekil 4.7</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO <sub>4</sub> uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarının taze (a) ve kuru (b) ağırlık miktarları.....	73
<b>Şekil 4.8</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO <sub>4</sub> çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin yapraklarındaki oransal su içeriği.....	74
<b>Şekil 4.9</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO <sub>4</sub> çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök ve yapraklarındaki elektrolit sızma yüzdesi.....	76
<b>Şekil 4.10</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO <sub>4</sub> çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök ve yapraklarındaki prolin içeriği.....	77
<b>Şekil 4.11</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO <sub>4</sub> çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki total protein içeriği.....	78
<b>Şekil 4.12</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO <sub>4</sub> çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) içeriği.....	79
<b>Şekil 4.13</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO <sub>4</sub> çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki malondialdehit (MDA) içeriği.....	80

<b>Şekil 4.14</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO <sub>4</sub> çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki (a) redüklenmiş askorbat (AsA), (b) dehidroaskorbat (DHA) ve (c) total askorbat (AsA+DHA) içeriği.....	82
<b>Şekil 4.15</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO <sub>4</sub> çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki (a) redüklenmiş glutatyon (GSH), (b) oksitlenmiş glutatyon (GSSG) ve (c) total glutatyon (GSH+GSSG) içeriği.....	84
<b>Şekil 4.16</b>	: (a) Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO <sub>4</sub> çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin yapraklarındaki klorofil a, klorofil b ve total klorofil içeriği; (b) total karotinoid içeriği.....	86
<b>Şekil 4.17</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO <sub>4</sub> çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin (a) kök, (b) yaprak kını, (c) ilk yapraklarındaki antosiyanin içeriği.....	88
<b>Şekil 4.18</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO <sub>4</sub> uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin (a) kök, (b) yaprak kını ve (c) ilk yapraklarındaki total fenolik bileşiklerin içeriği.....	90
<b>Şekil 4.19</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO <sub>4</sub> uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, yaprak kını ve ilk yapraklarındaki fenilalanin amonyak liyaz (PAL) aktiviteleri.....	93
<b>Şekil 4.20</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO <sub>4</sub> uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki superoksit dismutaz (SOD) enzimi aktivitesi.....	94
<b>Şekil 4.21</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO <sub>4</sub> uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki katalaz (CAT) enzimi aktivitesi.....	95
<b>Şekil 4.22</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO <sub>4</sub> uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki askorbat peroksidaz (APX) enzimi aktivitesi.....	97
<b>Şekil 4.23</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO <sub>4</sub> çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki guaiakol peroksidaz (GuPX) aktivitesi.....	99
<b>Şekil 4.24</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO <sub>4</sub> çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki glutatyon redüktaz (GR) aktiviteleri.....	100
<b>Şekil 4.25</b>	: Kontrol çözeltisinde yetiştirilen (a) erken gelişim evresindeki 4 günlük mısır fidesinin, (b) ileri gelişim evresindeki 15 günlük mısır fidesinin genel görünüşleri.....	101
<b>Şekil 4.26</b>	: Aşırı bakır uygulamalarına maruz kalmış 4 günlük mısır bitkisinin kök uçlarında meydana gelen kahverengi oluşumlar....	102
<b>Şekil 4.27</b>	: Aşırı bakır uygulamalarına maruz bırakılmış 7 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarında meydana gelen bazı değişimler.....	102
<b>Şekil 4.28</b>	: 500, 1000 ve 1500 µM CuSO <sub>4</sub> konsantrasyonlarındaki aşırı bakır uygulamalarına maruz bırakılan 7 günlük mısır fidelerinin genel görünüşleri.....	103



<b>Şekil 4.29</b>	: 500, 1000 ve 1500 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$ konsantrasyonlarındaki aşırı bakır uygulamalarına maruz bırakılan 15 günlük mısır fidelerinin genel görünüşleri.....	103
<b>Şekil 4.30</b>	: 50, 100, 250, 500, 1000 ve 1500 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$ konsantrasyonlarındaki bakır uygulamalarına maruz bırakılan 15 günlük mısır fidelerinin köklerinin genel görünüşü.....	104
<b>Şekil 4.31</b>	: Aşırı bakır uygulanmış 7 günlük mısır fidelerinin köklerinden alınan enine kesitlerde yan kök gelişimi ve epidermal kök tüylerinin görünüşü.....	105
<b>Şekil 4.32</b>	: Aşırı bakır uygulanmış 15 günlük mısır fidelerinin köklerinden alınan enine kesitlerde (a) korteks tabakasındaki parenkimatik hücrelerde meydana gelen bozulmalar, (b) korteks parenkiması, iletim sistemi ve öz tabakası hücrelerindeki kahverengi madde birikimi.....	106
<b>Şekil 4.33</b>	: Kontrol (K) ve bakır uygulanmış (+Cu) 4 günlük (a), (b); 7 günlük (c) ve 15 günlük (d) mısır fidelerinin kök, mezokotil, koleoptil, yaprak kını ve ilk yapraklarındaki antosiyanin birikiminin genel görünüşü.....	107
<b>Şekil 4.34</b>	: Kontrol (K) ve bakır uygulanmış (+Cu) 7 günlük mısır fidelerinin kök (a), (b); mezokotil (c), (d); yaprak kını (e), (f) ve ilk yapraklarındaki (g), (h) antosiyanin birikimi.....	108
<b>Şekil 4.35</b>	: 50 $\mu\text{M}$ (düşük miktarda) bakıra maruz bırakılmış 15 günlük mısır bitkisinin köklerinden alınan enine kesitlerin TEM mikrofotografı.....	109
<b>Şekil 4.36</b>	: 50 $\mu\text{M}$ bakıra maruz bırakılmış 7 günlük mısır bitkisinin mezokotilinden alınan enine kesitlerin TEM mikrofotografı... ..	110
<b>Şekil 4.37</b>	: 50 $\mu\text{M}$ bakıra maruz bırakılmış 7 ve 15 günlük mısır bitkisinin kök ve mezokotilinden alınan enine kesitlerin TEM mikrofotografı.....	111
<b>Şekil 4.38</b>	: 50 $\mu\text{M}$ bakıra maruz bırakılmış 7 ve 15 günlük mısır bitkisinin kök ve mezokotilinden alınan enine kesitlerde hücre çeperinin TEM mikrofotografı.....	112
<b>Şekil 4.39</b>	: 50 $\mu\text{M}$ bakıra maruz bırakılmış 15 günlük mısır bitkisinin kök ve mezokotilinden alınan enine kesitlerde hücre çeperi ve diğer kısımların ayrıntılı görünüşleri.....	113
<b>Şekil 4.40</b>	: 50 $\mu\text{M}$ bakıra maruz bırakılmış 15 günlük mısır bitkisinin kök ve mezokotilinden alınan enine kesitlerde hücre çeperi ve diğer kısımların ayrıntılı görünüşleri.....	114
<b>Şekil 4.41</b>	: Aşırı (1500 $\mu\text{M}$ ) bakıra maruz bırakılmış 7 ve 15 günlük mısır bitkisinin kök ve mezokotilinden alınan enine kesitlerin TEM mikrofotografı.....	115
<b>Şekil 4.42</b>	: Aşırı bakıra maruz bırakılmış 15 günlük mısır bitkisinin gövdesinden alınan enine kesitlerin TEM mikrofotografı.....	116
<b>Şekil 4.43</b>	: Aşırı bakıra maruz bırakılmış 15 günlük mısır bitkisinin gövdesinden alınan enine kesitlerde hücre çeperi ve diğer kısımların ayrıntılı görünüşleri.....	117
<b>Şekil 4.44</b>	: Aşırı bakıra maruz bırakılmış 15 günlük mısır bitkisinin gövdesinden alınan enine kesitlerde hücrelerdeki bazı yapısal değişimlerin görünüşü.....	118

<b>Şekil 4.45</b>	: 50 $\mu\text{M}$ bakıra maruz bırakılmış 15 günlük mısır bitkisinin yapraklarından alınan enine kesitlerin TEM mikrograflarında kloroplastların görünümü.....	119
<b>Şekil 4.46</b>	: Aşırı bakıra (1500 $\mu\text{M}$ ) maruz bırakılmış 15 günlük mısır bitkisinin yapraklarından alınan enine kesitlerin TEM mikrograflarında hücre ve kloroplastların görünümü.....	120
<b>Şekil 4.47</b>	: Aşırı bakıra maruz bırakılmış 15 günlük mısır bitkisinin yapraklarından alınan enine kesitlerin TEM mikrograflarında hücre ve kloroplastlarda meydana gelen bazı değişimler.....	121

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 2.1</b>	: Bitkilerde bakırın dağılımı ve işlevleri.....	13
<b>Tablo 2.2</b>	: Başlıca reaktif oksijen türleri (ROS).....	15
<b>Tablo 2.3</b>	: Başlıca antioksidan maddeler ve işlevleri.....	26
<b>Tablo 3.1</b>	: Hoagland çözeltisi: Tabloda görülen mineral tuzların distile su ile hazırlanan stok çözeltilerinden aşağıda belirtilen miktarlarda alınarak son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.....	53
<b>Tablo 3.2</b>	: Bakır konsantrasyon serileri.....	53
<b>Tablo 4.1</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$ çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki bakır içerikleri.....	66
<b>Tablo 4.2</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$ çözeltileri uygulanan mısır tohumlarının çimlenme yüzdeleri.....	67
<b>Tablo 4.3</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$ çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök ve gövde uzunlukları..	69
<b>Tablo 4.4</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$ çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarının taze ve kuru ağırlıkları.....	71
<b>Tablo 4.5</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$ çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin yapraklarındaki oransal su içeriği.....	73
<b>Tablo 4.6</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$ çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök ve yapraklarındaki elektrolit sızma yüzdesi.....	74
<b>Tablo 4.7</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$ çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök ve yapraklarındaki prolin içeriği.....	75
<b>Tablo 4.8</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$ çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki total protein içeriği.....	77
<b>Tablo 4.9</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$ çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) içeriği.....	78
<b>Tablo 4.10</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$ çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki malondialdehit (MDA) içeriği.....	79
<b>Tablo 4.11</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$ çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki redüklenmiş askorbat (AsA), dehidroaskorbat (DHA) ve total askorbat (AsA+DHA) içeriği.....	80

<b>Tablo 4.12</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$ çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin yapraklarındaki redüklenmiş glutatyon (GSH), oksitlenmiş glutatyon (GSSG) ve total glutatyon (GSH+GSSG) içeriği.....	82
<b>Tablo 4.13</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$ uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin yapraklarındaki klorofil a, klorofil b, total klorofil ve total karotinoid içeriği.....	84
<b>Tablo 4.14</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$ çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, yaprak kını ve ilk yapraklarındaki antosiyanin içeriği.....	86
<b>Tablo 4.15</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$ uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, yaprak kını ve ilk yapraklarındaki total fenolik bileşiklerin içeriği.....	89
<b>Tablo 4.16</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$ uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, yaprak kını ve ilk yapraklarındaki fenilalanin amonyak liyaz (PAL) aktivitesi.....	91
<b>Tablo 4.17</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$ uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki superoksit dismutaz (SOD) aktivitesi.....	92
<b>Tablo 4.18</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$ uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki katalaz (CAT) enzimi aktivitesi.....	94
<b>Tablo 4.19</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$ uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki askorbat peroksidaz (APX) enzimi aktivitesi.....	95
<b>Tablo 4.20</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$ çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki guaiakol peroksidaz (GuPX) aktivitesi.....	97
<b>Tablo 4.21</b>	: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$ çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki glutatyon redüktaz (GR) aktiviteleri.....	98

## SEMBOL LİSTESİ

<b>AA, AsA, Asc</b>	: askorbat
<b>AO</b>	: askorbat oksidaz
<b>APX</b>	: askorbat peroksidaz
<b>Asc<sup>•-</sup></b>	: askorbat radikali
<b>BSA</b>	: bovin serum albumin
<b>Car-OOH</b>	: karotinoid
<b>Car-OO<sup>•</sup></b>	: karotinoid radikali
<b>CAT</b>	: katalaz
<b>CBB</b>	: Coomassie Brilliant Blue
<b>Chl a</b>	: klorofil a
<b>Chl a<sup>•</sup></b>	: oksitlenmiş klorofil a molekülü
<b>CHS</b>	: kalkon sentaz
<b>cm</b>	: santimetre
<b>Cu</b>	: bakır
<b>CuSO<sub>4</sub></b>	: bakır sülfat
<b>da</b>	: dekar
<b>dak.</b>	: dakika
<b>DHA</b>	: dehidroaskorbat
<b>DHAR</b>	: dehidroaskorbat redüktaz
<b>DTNB</b>	: 5,5' ditio-bis-(2-nitro benzoik asit)
<b>DTT</b>	: ditiotretitol
<b>EDTA</b>	: etilen diamin tetra asetik asit
<b>Fe</b>	: demir
<b>FlavOH</b>	: flavonoid bileşiği
<b>FlavO<sup>•</sup></b>	: flavonoid radikali
<b>g</b>	: gram
<b>GPX</b>	: glutasyon peroksidaz
<b>GR</b>	: glutasyon redüktaz
<b>GSH</b>	: redüklenmiş glutasyon
<b>GSSG</b>	: oksitlenmiş glutasyon (glutasyon disülfid)
<b>GST</b>	: glutasyon transferaz
<b>GuPX</b>	: guaiakol peroksidaz
<b>ha</b>	: hektar
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: hidrojen peroksit
<b>HO<sub>2</sub><sup>•</sup></b>	: perhidroksil radikali
<b>K.A.</b>	: kuru ağırlık
<b>l</b>	: litre
<b>L<sup>•</sup></b>	: lipit radikali
<b>LA</b>	: lakkaz
<b>LH</b>	: yağ asidi
<b>LOO<sup>•</sup></b>	: lipit peroksil radikali
<b>LOOH</b>	: lipit peroksit
<b>M</b>	: molar
<b>MDA</b>	: malondialdehit
<b>MDA<sup>•</sup></b>	: monodehidroksiaskorbat (askorbat radikali)
<b>MDA<sup>•-</sup></b>	: monodehidroksiaskorbik asit radikali

<b>MD(H)AR</b>	: monodehidroksiaskorbat redüktaz
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: magnezyum klorür
<b>mg</b>	: miligram
<b>ml</b>	: mililitre
<b>mm</b>	: milimetre
<b>mM</b>	: milimolar
<b>MTs</b>	: metalotiyoninler
<b>µg</b>	: mikrogram
<b>µl</b>	: mikro litre
<b>µmol</b>	: mikromol
<b>µM</b>	: mikro molar
<b>NBT</b>	: nitro blue tetrazolium
<b>nmol</b>	: nanomol
<b>O<sub>2</sub></b>	: moleküler oksijen
<b>O<sub>2</sub><sup>·-</sup></b>	: süperoksit radikali
<b>O<sub>2</sub><sup>1</sup></b>	: singlet oksijen
<b>-OH</b>	: hidroksil grubu
<b>OH<sup>·</sup></b>	: hidroksil radikalleri
<b>PAL</b>	: fenilalanin amonyak liyaz
<b>PCs</b>	: fitokelatinler
<b>PhOH</b>	: fenolik bileşik
<b>PhO<sup>·</sup></b>	: fenoksil radikali
<b>PMSF</b>	: fenil metil sulfonil florid
<b>POD</b>	: peroksidaz
<b>POX</b>	: peroksidaz
<b>PPO</b>	: polifenol oksidaz
<b>PUFA</b>	: çoklu doymamış yağ asidi
<b>PVP</b>	: polivinil prolidon
<b>PVPP</b>	: polivinil poliprolidon
<b>RH</b>	: alkiler
<b>R<sup>·</sup></b>	: alkil radikali
<b>RO<sup>·</sup></b>	: alkoksil radikali
<b>RCOO<sup>·</sup></b>	: organik peroksit radikali
<b>RO<sub>2</sub><sup>·</sup></b>	: peroksil radikali
<b>ROS</b>	: reaktif oksijen türleri
<b>-SH</b>	: sülfidril grubu
<b>SOD</b>	: superoksit dismutaz
<b>T.A.</b>	: taze ağırlık
<b>TBA</b>	: tiyobarbitürik asit
<b>TCA</b>	: trikloroasetik asit
<b>α-tocOH</b>	: α-tokoferol
<b>α-tocO<sup>·</sup></b>	: tokoferoksil radikali
<b>TR.A.</b>	: turgorlu ağırlık
<b>Zn</b>	: çinko

## ÖZET

### BAKIR (Cu) UYGULANMIŞ MISIR (*Zea mays* L.) FİDELERİNDEKİ ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİN FİZYOLOJİK ve ANATOMİK YÖNDEN İNCELENMESİ

Bakır (Cu), bitkilerin normal büyüme ve gelişmesi için gerekli olan bir mikroelementtir, ancak yüksek konsantrasyonlarda, bitki hücrelerinin fizyolojik, biyokimyasal ve yapısal işlevlerindeki potansiyel inhibe edici etkilerine bağlı olarak başlıca bir toksik bileşik olarak da kabul edilmektedir. Bu çalışmada, mısır (*Zea mays* L., cv., Rx770) bitkisinin farklı kısımlarındaki bakır birikimi ve bunun antioksidan yanıtlar ile morfolojik anatomik değişimlere olan çeşitli etkileri incelenmiştir. Tohumlar kontrolde ve artan Cu konsantrasyonu (50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) çözeltilerinde 25 °C da hem karanlık hem de ışıktaki çimlendirilmiştir. 50 ve 100  $\mu\text{M}$  Cu uygulamalarının tohum çimlenmesi üzerinde önemli etkilere sahip olmazken; 250  $\mu\text{M}$  ve daha yüksek konsantrasyonların çimlenme oranlarında indirgenmeye neden olduğu kaydedilmiştir. Diğer deneyler perlit içeren plastik kaplarda 25 °C sıcaklık, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyotta yetiştirilen fidelerde sürdürülmüştür. Bu kontrollü çevresel koşullar altında büyütülen 8 günlük fidelerden iyi gelişmiş olanları seçilerek hidroponik kültüre aktarılmış ve 7 gün boyunca aynı Cu serilerine maruz bırakılmıştır. Üçüncü yaprağın açılma evresinde, 15 günlük bitkiler, hasat edilerek fizyolojik ve anatomik analizleri yapılmıştır. Besi çözeltilisindeki artan Cu konsantrasyonları ile birlikte mısır fidelerinin köklerinde olduğu gibi gövde ve yapraklarında artan düzeylerde Cu içeriği saptanmıştır. Ancak, Cu iyonlarının köklerde gövde ve yapraklardan daha fazla birikim gösterdiği ve önemli bazı metabolik işlevleri engelleyerek bitkilerin büyüme ve gelişmesini yavaşlattığı belirlenmiştir. Kök ve gövde uzunluğu, taze ve kuru ağırlık, total çözünebilir protein miktarı ile oransal su içeriği azalırken; lipit peroksidasyonu ile iyon sızmasına yol açan membran permeabilitesinin arttığı gösterilmiştir. Toksik Cu konsantrasyonlarında; gerilemiş fide büyümesi, yapraklarda klorosis, nekrosis ve senesens ile köklerde kırmızı-kahverengi renk oluşumları gibi gözle görülür belirtiler gözlemlenmiştir. Cu toksisitesine karşı hücrelerin osmotik uyumunu sağlamak üzere prolin gibi koruyucu organik bileşiklerin birikiminin indüklendiği de tayin edilmiştir. Mısırın yapraklarında Cu'a bağlı olarak klorofil yıkımının teşvik edildiği; karotenoidlerin ise düşük Cu konsantrasyonlarında bir miktar arttığı fakat toksik Cu düzeylerinde azaldığı tespit edilmiştir. Bunun aksine, fidelerin herbir kısmındaki antosiyanin, total fenolik içerikleri ve fenilalanin amonyak liyaz (PAL) aktivitelerinde belirgin yükselişler kaydedilmiştir. Bu çalışmada esas olarak, antosiyanin, total fenolikler ve bunların biyosentezinde yer alan ilgili PAL enziminin antioksidan ve katlayıcı özellikleri tartışılmış ve sonuçlardan elde edilen veriler; bu fenolik bileşik ve enzimlerin artışının aşırı bakırın indüklediği hücresel zararlara karşı koruyucu yanıt olduğu açıkça ortaya konularak, bunların mısır bitkisindeki Cu'ın detoksifikasyonunda önemli roller aldıkları ileri sürülmüştür.

Bitkiler Cu'nun teşvik ettiği oksidan strese karşı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemlerini düzenleyerek yanıt vermektedir. Cu'ya bağlı fitotoksitenin oksidan stresten kaynaklandığını gösterir şekilde, bakırın toksik dozlarına maruz bırakılmış fidelerin yüksek düzeylerde reaktif oksijen türlerini (ROS) ürettiği ve ilgili antioksidan bileşik ve enzimlerinin aktivitelerinin değiştiği ortaya konmuştur. Bu koşullar altında, kontrol ile karşılaştırıldığında, kök ve gövdelerde yapraklara göre daha belirgin olmak üzere, redüklenmiş askorbat (AsA) ve total askorbat (AsA+DHA) azalırken; dehidroaskorbat (DHA) içeriğinde bir miktar artış belirlenmiştir. Benzer şekilde, Cu uygulamaları boyunca, bütün bitki kısımlarında düşük düzeylerde redüklenmiş glutatyon (GSH) ve total glutatyon (GSH+GSSG) saptanırken; okside olmuş glutatyon (GSSG) ilerleyen bir yükselme göstermiştir. Toksik Cu konsantrasyonlarının oksidan strese neden olduğu, mısır fidelerinin kök, gövde ve yapraklarındaki artan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve malondialdehit (MDA) oluşumları ile kanıtlandığı gibi; yüksek derecede teşvik edilmiş guaiakol peroksidaz (GuPX) aktivitesi ile artan düzeylerdeki MDA ve  $H_2O_2$  arasında da paralel bir ilişki olduğu gözlemlenmiştir. Diğer yandan, mısır fidelerinin bütün kısımlarındaki katalaz (CAT) ve askorbat peroksidaz (APX) aktivitelerinin azaldığı ve artan MDA ve  $H_2O_2$  birikimlerine eşlik etmediği tespit edilmiştir. Bu yanıtlara ek olarak, superoksit dismutaz (SOD) aktivitesi kök ve gövdede etkili bir şekilde artarken; bunun tersine, yapraklarda indirgenmiştir. Glutatyon redüktaz (GR) aktivitesi ise özellikle kök ve yapraklarda azalırken; gövdede bir miktar yükselmiştir. Deneylemlerden elde edilen sonuçlar, bu kültür bitkisinde, aşırı bakır toksisitesi altında SOD, CAT ve APX yetersiz hale geldiğinde, GuPX aktivitesinin ROS'in temizlenmesinde anahtar rol oynadığını göstermektedir.

Morfolojik ve anatomik düzeyde ise, 50  $\mu$ M Cu uygulaması hücrelerde önemli yapısal değişimler ortaya koymazken; 1500  $\mu$ M Cu'ya kadar olan toksik konsantrasyonlarda, membranların zarar görmesi, plazma membranının hücre çeperinden ayrılması, hücrelerde vakuolleşme, Cu iyonlarının ve fenolik bileşiklerin vasküler sistemin ya da korteks parenkiması hücrelerinin vakuol ve hücre çeperlerinde artan miktarlardaki birikimi ile birlikte mısır fidelerinin kök organelleri ve yaprak kloroplastlarında belirgin bozulmalar gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra, transmisyon elektron mikroskopu (TEM) analizleri toksik Cu konsantrasyonlarına maruz kalmış mısır bitkisinde köklerin, gövde ve yapraklardan daha çok hasara uğradığını ve hücre çeperlerinde diğer kısımlara göre çok daha fazla Cu yerleşimi olduğunu doğrulamaktadır. Bitkilerde, hücre çeperi ve vakuolün metal toleransında rol oynadığı bilinmektedir ve bu kısımlardaki Cu birikimi fenolik asitlerle işbirliği içinde birlikte yer alarak, esas olarak mısır bitkisinin hücrelerindeki aşırı Cu'nun detoksifikasyon mekanizması şeklinde açıklanabilmektedir. Bu çalışmaya dayanarak, mısır bitkisinin yüksek düzeylerde Cu biriktirebildiği ve Cu'ya bağlı oksidan strese karşı etkili bir antioksidan savunma sistemi kullanarak direnç gösterebildiği sonucuna varılabilir.

Sonuç olarak, bu araştırmanın amacı artan konsantrasyonlarda bakıra maruz bırakılmış bitkilerdeki antioksidan yanıtların daha iyi anlaşılmasına katkı sağlamaktır. Bunun için, mısır fidelerinin çeşitli kısımlarındaki bakır birikimi toksisitesi, oksidan stres ve antioksidan metabolizmanın değişik yanıtları üzerinde durularak incelenmiştir. Dolayısıyla, bu çalışma mısırın bakıra oldukça dayanıklı olduğunu ve bakır stresinin zararlarını hafifletmek üzere antioksidan aktivitelerini teşvik ettiğini göstermekte ve böylece bu bitkinin fitoremediyasyon çalışmaları için kullanılabilmesi önerilmektedir.



## SUMMARY

### PHYSIOLOGICAL AND ANATOMICAL INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITIES IN COPPER (Cu) TREATED MAIZE (*Zea mays* L.) SEEDLINGS

Copper (Cu) is an essential microelement for the normal growth and development of plants, however, at high concentrations, it is also regarded as a major toxicant to plant cells due to its potential inhibitory effects against many physiological, biochemical and structural processes. In the current study, accumulation of copper and its various effects on antioxidative responses and morpho-anatomical changes were investigated in different parts of maize (*Zea mays* L., cv., Rx770) plants. Seeds were germinated in control and in increasing concentrations of Cu (50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) solutions at 25 °C in both dark and light. It was recorded that 50 and 100  $\mu\text{M}$  Cu treatments had no marked effect on seed germination while 250  $\mu\text{M}$  and higher concentrations caused reduction of germination rates. The other experiments were conducted in seedlings that were grown in plastic pots containing perlite, at 25 °C temperature and 16 h light 8 h dark photoperiod. The well developed 8 days old seedlings that were grown under these controlled environmental conditions were selected, transferred to hydroponic culture and subjected to the same Cu series, for 7 days. At the stage of third leaf opening, 15 days old plants, were harvested and their physiological and anatomical analysis were done. High levels Cu contents were determined in roots as well as in shoots and leaves of maize seedlings with increasing Cu concentrations in the nutrient solution. However, Cu ions were found accumulated higher in roots than shoots or leaves and retarded the growth and development of plants by interfering with certain important metabolic processes. It was presented that root and shoot elongation, fresh and dry weight, total soluble protein and relative water contents were decreased, whereas lipid peroxidation and membrane permeability of cells leading to the leakage of ions were increased. Visible symptoms such as stunted seedling growth; chlorosis, necrosis and senescence in leaves and red-brownish discoloration in roots were detected at toxic Cu concentrations. Induced accumulation of protective organic solutes, such as proline was also determined providing osmotic adjustment of cells against Cu toxicity. Cu-induced chlorophyll degradation was observed in the leaves of maize while, carotenoids were slightly increased at lower Cu concentrations but decreased at toxic Cu levels. In contrast, significant enhancement of anthocyanin, total phenolic contents and phenylalanine ammonia lyase (PAL) activities were recorded in all parts of the seedlings. Mainly, antioxidative and chelating properties of anthocyanin, total phenolics and their biosynthesis-related PAL enzyme was discussed in this study and data obtained from the results suggested that the increase in these phenolic compounds and enzymes clearly reflected the protective response to cellular damage induced by excess copper and they might play important roles in detoxification of Cu in maize.

Plants responded to Cu-induced oxidative stress by modulating their enzymatic and non-enzymatic antioxidative systems. Seedlings exposed to toxic doses of copper produced high levels of reactive oxygen species and the activities of related antioxidant compounds and enzymes were altered, indicating that Cu-induced phytotoxicity is mediated by oxidative stress. Under these conditions, decrease in reduced ascorbate (AsA) and total ascorbate (AsA+DHA), while slightly increase in dehydroascorbate (DHA) contents, more pronounced in roots and stems than in leaves, was observed, as compared to controls. Similarly, decreased levels of reduced glutathione (GSH) and total glutathione (GSH+GSSG) was detected in all parts of seedlings, while oxidized glutathione (GSSG) showed a progressive increase during the time Cu treatments. Toxic concentrations of Cu caused oxidative stress as evidenced by the increased hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and malondialdehyde (MDA) formations in the roots, shoots and leaves of maize seedlings. A parallel relation was observed between the drastically enhanced activity of guaiacol peroxidase (GuPX) and increased levels of MDA and  $H_2O_2$ . On the other hand, catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) activities were not correlated with enhanced accumulations of MDA and  $H_2O_2$  contents, in contrast, increased production of MDA and  $H_2O_2$  was accompanied with decreased activities of CAT and APX, in all parts of the maize seedlings. In addition to these responses, the activities of superoxide dismutase (SOD) increased pronouncedly in roots and shoots, in contrast, decreased in leaves. Glutathione reductase (GR) activities in roots and leaves decreased notably in roots and leaves, while increased slightly in shoots. The results obtained from the experiments suggest that GuPX activity appears to play a key role in scavenging reactive oxygen species in this cultivar, when SOD, CAT and APX become inadequate under excess copper toxicity.

At morphological and anatomical level, 50  $\mu M$  Cu treatment did not exhibit significant structural changes in cells, however, at toxic concentrations up to 1500  $\mu M$  Cu, pronounced damage was observed in the root organelles and leaf chloroplasts of maize seedlings, with disruption of membranes, withdrawal of plasma membrane from cell walls, cell vacuolation, increasing compartmentation of Cu ions and phenolic substances in vacuoles and cell walls of vascular system or cortical parenchyma cells; indicating that the structural alternation and metal accumulation in the cells was dependent on the concentration of the metal. Furthermore, transmission electron microscope (TEM) analysis confirmed that roots exhibited more injuries than shoots and leaves and much more Cu localized in cell walls of maize roots than the other parts when the maize plant was exposed to toxic Cu levels. In plants, cell wall and vacuole were said to be play a role in metal tolerance and copper localization in these parts associated with co-existence of phenolic acids, could mainly account for the detoxification mechanism of Cu in maize cells. Based on the present study, it can be concluded that maize plant is able to accumulate high concentrations of Cu and can resist Cu-induced oxidative stress using an effective antioxidative defence system.

Conclusively, purpose of the present study was to contribute to a better understanding of the antioxidative responses of plants subjected to increasing concentrations of copper. Therefore, the toxicity of copper accumulation on various parts of maize seedlings was investigated, focusing on the different display of oxidative stress and antioxidative metabolism. Consequently, this study demonstrated that maize is quite tolerant to copper and stimulates antioxidant activities in order to mitigate copper-stress damage and thus, it can be recommended for being used in phytoremediation studies.

## 1. GİRİŞ

Ağır metal kirliliği, bitki verimini kısıtlayan ve insan sağlığını olumsuz etkileyen önemli çevresel sorunlardan birisidir. Endüstriyel etkinlikler, motorlu taşıtların egsoz gazları, maden yatakları ve işletmeleri, volkanik faaliyetler, tarımda gübreleme ve ilaçlama gibi pek çok etken ağır metal kirliliğinin nedenleri arasında yer almaktadır. Bunlardan bir tanesi olan bakır (Cu) özellikle pestisitler ve gübrelerden tarımsal alanlara geçmektedir. Bakır gibi ağır metallerin normal konsantrasyonları bitkilerin büyüme ve gelişmesinde önemli rol oynayan bazı protein ve enzimlerin yapısı için gerekli kofaktör olarak görev almaktadır. Bitki büyümesinde ve çeşitli biyokimyasal işlevlerde yer almasına rağmen yüksek konsantrasyonlardaki bakır güçlü fitotoksik etkiler gösteren bir elementtir ve bitki dokularında aşırı biriktiği zaman çimlenmenin gerilemesi; azot ve protein metabolizmasının olumsuz etkilenmesi; klorofilin yıkımına bağlı olarak fotosentetik fonksiyonların yavaşlaması; solunumun inhibe olması gibi canlılıkla ilgili çeşitli fizyolojik işlevlerin değişmesine sebep olmaktadır.

Bakır birçok serbest oksijen türünün oluşumu için de etkili bir katalizördür. Özellikle Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları sonucu oluşan peroksi ve alkoksi radikallerinin artan konsantrasyonları da hücrelerde oksidan strese yol açmaktadır. Bakır toksisitesinin organizmadaki primer etki alanı hücre membranlarıdır. Bu metal iyonları proteinlerdeki sülfidril gruplarına bağlanarak ve lipit peroksidasyonunu teşvik ederek hücrelerin yapı ve işlevlerinin zarar görmesine neden olmaktadır. Serbest oksijen radikallerinin bu zararlı etkileri enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlarla yok edilebilmektedir. Superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), guaiakol peroksidaz (GuPX), glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimler ile askorbik asit, glutatyon,  $\alpha$ -tokoferol ve antosiyanin gibi antioksidan bileşikler bu reaktif oksijen türlerinin hücresel düzeyini kontrol etmekte anahtar rol oynamaktadır. Antosiyaninler; flavonoidler alt grubuna dahil olan fenolik bileşiklerdendir. Yüksek bitkilerin çeşitli kısımlarının özellikle kırmızı, mor ve mavi renklerinden sorumlu olan bu pigmentler; kök, gövde, yaprak, çiçek ve meyve gibi bütün bitki organlarında bulunabilmektedir.

Gözcü renkleriyle böceklerin çekimlenmesini sağlayarak tozlaşma olayı ve tohumların dağılımında önemli ekolojik rolleri olan antosiyaninler, son yıllarda özellikle çevresel stres koşullarına karşı bitkilerin korunumundaki rolleri, antioksidan özellikleri ve antikanser potansiyelleri ile de araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Üzerinde çalışıldıkça yeni özellikleri keşfedilen antosiyaninlerin bilinen antioksidanlardan birisi olan askorbattan (C vitamini) birçok kez daha aktif olduğu da belirtilmektedir.

Bu araştırmada; önemli bir tarım bitkisi olan mısırın bakır stresine karşı geliştirdiği antioksidan yanıtlar fizyolojik ve anatomik yönden incelenmiştir. Böylece mısırın bakıra toleranslı bir bitki olup olmadığının yanı sıra antioksidan özellikleri, pigment içeriği ve anatomik yapısındaki değişimler tespit edilmeye çalışılmıştır. Bunlardan özellikle antosiyaninlerin bakır uygulamaları sonucu bitkinin neresinde ve ne kadar birikim gösterdiği saptanarak bu bileşiklerin antioksidan etkilerinin yanı sıra bakır iyonunu kelatlama özelliği üzerinde durulmuştur. Buradan elde edilen verilerin günümüzde antosiyanin pigmentinin üzerinde çalışılan birçok özelliğine (antioksidan, antikanser, vb.) farklı bir bakış açısı getirmesi ve böylece ileriki çalışmalara bir temel teşkil etmesi ümit edilmektedir. Daha genel ve uzun vadede ise bu araştırmadan elde edilen sonuçların, ülkemizin ağır metal kirliliği gösteren bölgelerindeki tarımsal alanlarının temizlenmesi ile ilgili mevcut bilgilere yeni yaklaşımlar sağlaması ve yapılacak diğer çalışmalara katkıda bulunması hedeflenmiştir. Ülkemizde ve dünyada büyük miktarlarda üretimi yapılan önemli bir tarım bitkisi olan mısır, bakır stresine karşı oluşan fizyolojik, biyokimyasal ve anatomik değişimlerin en iyi gözlenebileceği bir bitki materyali olarak düşünülmüştür. Mısırdaki çeşitli stres koşulları altında dokuya özgü antosiyanin sentezini teşvik eden genlerin varlığı da bu bitkinin seçilmesinde etken olmuştur. Bakır uygulamaları sonucu mısır bitkisinin çimlenme ve büyümesinde görülen çeşitli değişimlerin yanı sıra; protein, prolin, klorofil ve antosiyanin içerikleri; antioksidan bileşikler (askorbat, glutatyon) ile antosiyanin biyosentezinde rol alan fenilalanin amonyak liyaz (PAL) enziminin ve SOD, CAT, APX, GuPX, GR gibi bazı antioksidan enzimlerin miktar ve aktiviteleri ile lipit peroksidasyonu sonucu membran yapısında görülen değişimler incelenmiştir. Çeşitli bitki kısımlarından alınan enine kesitlerin ışık mikroskopu ve elektron mikroskopu analizlerinde ise bakırın antosiyanin ve diğer fenolik bileşikler üzerindeki etkileri saptanmaya çalışılarak bunun morfolojik, anatomik ve antioksidan özellikleri nasıl etkilediği araştırılmıştır.

## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1. BİTKİLERDE AĞIR METAL TOKSİSİTESİ

Günümüzde ağır metallerin yol açtığı çevre kirliliği tüm dünyanın dikkatini çeken bir konu olmuştur (Agrawal ve Agrawal, 1999; Prasad, 2004; Lerche ve Glaesser, 2006). Son yıllarda nüfustaki hızlı artış, enerji ve besin yetersizliği, düzensiz kentleşme, insanların aşırı tüketim isteği ve baş döndürücü bir hızla gelişen teknolojik ilerlemeler çevre kirliliği sorununun önemini iyice hissettirir hale getirmiştir (Hill, 1997; Ware, 2000). Çevresel kirlenmeyi ortamlarına göre hava, su ve toprak kirliliği olmak üzere üç grup altında incelemek mümkündür (Nriagu ve Pacyna, 1988). Hava kirliliğinin başlıca kaynakları endüstrileşme, aşırı kentleşme ve motorlu taşıtlardır (Bell ve Treshow, 2002; Skelly, 2003; Lerche ve Glaesser, 2006). Su kirliliği; evsel ve endüstriyel atıkların arıtılmaksızın su ortamına boşaltılmaları, tarımda üretimi artırma ve koruma amacıyla kullanılan gübre ve ilaçların sucul ortama taşınmaları sonucunda meydana gelmektedir (Farmer, 1997). Toprak kirliliğinin başlıca kaynaklarını ise endüstriyel atıklar, tarımsal ilaçlar, tarım alanlarının hatalı sulanması, erozyon, hatalı gübreleme ve kentsel atıklar oluşturmaktadır (Ross, 1994; Hayat ve diğ., 2005). Çevre kirliliğine neden olan kirleticiler arasında şüphesiz ki ağır metaller önemli bir yer teşkil etmektedir (Hill, 1997; Agrawal ve Agrawal, 1999; Ware, 2000) ve bunların çevrede yaygın bir şekilde birikmesi; başta bitki, hayvan ve insanlar olmak üzere hemen her çeşit organizma üzerinde boyutları giderek artan bir tehlike arz etmektedir (Bell ve Treshow, 2002; Skelly, 2003; Hayat ve diğ., 2005; Lerche ve Glaesser, 2006; Ahsan ve diğ., 2007).

Ağır metaller; bakır, kobalt, civa, kurşun, kadmiyum, demir, nikel, çinko, alüminyum gibi fizyolojik açıdan tehlikeli özellikleri bulunan ve aşırı miktarları çevre kirliliğine sebep olan element ya da bileşikler olarak tanımlanabilir (Ross, 1994; Hill, 1997; Agrawal ve Agrawal, 1999; Kıran ve Munzuroğlu, 2004). Ağır metaller kayaçların ve dolayısıyla toprakların doğal bileşenleridir ve topraklar bileşimlerine bağlı olarak farklı oranlarda ve formlarda ağır metal içerirler (Ware, 2000; Lerche ve Glaesser, 2006).

Ağır metallerin çevredeki jeolojik nedenlerle oluşan doğal dağılım deseni son yıllarda antropojen (insan kaynaklı) etki ile önemli ölçüde değişmeye başlamıştır (Lerche ve Glaesser, 2006). Topraklardaki ağır metal kirliliği, endüstrinin ve madencilik etkinliklerinin gelişmesiyle, atık suyla yapılan sulamaların ve arıtma çamuru uygulamalarının yaygınlaşmasıyla küresel bir problem halini almaktadır (Farmer, 1997; Hill, 1997; Ware, 2000; Hayat ve diğ., 2005). Bu nedenle toprakta meydana gelen ağır metal kirliliği yalnız verim ve ürün kalitesi üzerinde değil aynı zamanda atmosferik ve sucul çevre kalitesi hatta besin zinciri yoluyla insan ve hayvan sağlığı üzerinde de çok önemli etkiler yaratmaktadır (Hill, 1997; Ware, 2000; Lerche ve Glaesser, 2006). Organizmalarda birikmek ve gıda zinciri döngüsünde yer almakla uzun süreli sorunlara neden olan ağır metaller, ekosistemlerde yüksek konsantrasyonları ile zararlarını yıllarca sürdürebilmektedir (Hill, 1997; Ware, 2000). Ağır metallerin çevreyi kirleten etmenlerin başında gelmesi ve bu kirliliğin tehlikeli boyutlara ulaşması çalışmaları bu yöne kaydırmış ve çok sayıda araştırmaya konu olmuştur (Zenk, 1996; Hill, 1997; Agrawal ve Agrawal, 1999; Ware, 2000; Kıran ve Munzuroğlu, 2004).

Toprak, su ve havada değişik oranlarda bulunabilen ağır metallerden bazıları bitkiler için gerekli mikro besinler olmasına rağmen, belirli konsantrasyonlardan sonra toksik etkilere sahiptir ve çevre kirliliğine yol açmaktadır (Ross, 1994; Hill, 1997; Ware, 2000; Hayat ve diğ., 2005). Yüksek konsantrasyonlardaki ağır metaller bitki büyümesini önemli derecede inhibe etmekte (Ouzounidou ve diğ., 1995; Mocquot ve diğ., 1996; Chen ve diğ., 2000; Munzuroğlu ve Geçgil, 2002), bitkilerin fizyolojik özelliklerine ve metabolizmasına ciddi bir şekilde zarar vermekte (Munzuroğlu ve Geçgil, 2002; Lin ve diğ., 2003; Ahsan ve diğ., 2007) ve tarımsal üretimi belirgin bir şekilde sınırlandırmaktadır (Mocquot ve diğ., 1996; Pandit ve Prasannakumar, 1999).

Bitkilerde ölüme sebep olmaksızın metabolik aktiviteyi önemli derecede inhibe eden ağır metal konsantrasyonları için 'toksik konsantrasyon' deyimini kullanılmaktadır (Ross, 1994; Zenk, 1996). Bitkilerin çevrelerine adaptasyon yetenekleri toksik maddelere karşı olan toleransları ile ilişkilidir ve ağır metal konsantrasyonlarına maruz kalan bitkiler stresten korunmak amacıyla çeşitli mekanizmalar oluşturarak onları etkisiz hale getirmeye çalışmaktadır (Verkleij ve Schat, 1990; Zenk, 1996, Küpper ve diğ., 1999; Shao ve diğ., 2005; Kvesitadze, 2006; Marchiol ve diğ., 2007; Tanyolaç ve diğ., 2007).

Ağır metal kirliliğinin olduğu yerlerde bazı bitkiler buna karşı hızlı bir şekilde tolerans geliştirebilmekte iken bazıları oldukça duyarlı olup herhangi bir savunma sistemine sahip değildir (Baker ve Walker, 1990; Verkleij ve Schat, 1990). Ağır metallere dirençli bitki türleri iyonları aldıktan sonra onları belli kısımlarında tutmakta (immobilize etmekte), bu yolla metalleri kendi kökleri ve gövdelerinde yoğunlaştırmaktadırlar (Reeves ve Baker, 2000; Lin ve diğ., 2003; Liu ve diğ., 2004). Bitkinin yapısında biriktirilen bu toksik metaller, bunun doğal bir sonucu olarak besin zinciri yoluyla insan sağlığını tehdit eder hale gelmektedir (Uriu-Adams ve Keen, 2005). Diğer yandan metale dirençli bu türlerin çok kirli alanlarda metalin ortamdan kaldırılması (fitoremediyasyon) amacıyla kullanıldığı da bilinmektedir (Mulligan ve diğ., 2001; Kocaer ve Başkaya, 2003; Peer ve diğ., 2005; Calzoni ve diğ., 2007).

Günümüzde yüksek etkinlik ve düşük maliyetlere sahip olan biyolojik iyileştirme (remediyasyon) stratejileri ile ilgili çalışmalar metalle kirlenmiş alanların arıtımında cazip bir alternatif olmaktadır (Salt ve diğ., 1995; Kvesitadze, 2006; Komárek ve diğ., 2007; Gupta ve Sinha, 2007). Dolayısıyla topraktaki ağır metal kirliliği ile ilgili çalışmalar ağır metallerin kaynakları ve davranışları, halk sağlığı ve çevre üzerindeki etkileri, kirlenmiş bölgelerin araştırılması ve analizlenmesi, remediyasyon yöntemi ve risk değerlendirilmesi ile remediyasyon teknikleri üzerinde yoğunlaşmıştır (Kocaer ve Başkaya, 2003; Peer ve diğ., 2005; Eapen ve diğ., 2007; Marchiol ve diğ., 2007). Bilim adamları bu araştırmaları sırasında, ağır metallerin çevreye yayıldığı çeşitli kaynakları; havada, suda ve toprakta hangi oranda bulduklarını; bitkiler, hayvanlar ve insanlarda ne gibi zararlara neden olduklarını ve toksik etkilere sahip oldukları konsantrasyonları anlamaya çalışmışlardır (Lefebvre ve Vernet, 1990; Ware, 2000; Lerche ve Glaesser, 2006). Bu konuda yapılacak diğer araştırmalar sonucunda ağır metal direncinin moleküler temellerinin daha iyi bilinmesiyle, tarım bitkilerinin ağır metallere dayanıklı çeşitlerinin (varyetelerinin) seçilmesi mümkün olabilecektir.

Bu tez çalışmasında ağır metallerden bir tanesi olan bakırın (Cu) mısır fidelerindeki antioksidan aktiviteleri nasıl etkilediği fizyolojik ve anatomik yönden incelenmiş ve deney materyali olarak seçilen mısırın diğer biyolojik özelliklerinin yanı sıra yüksek konsantrasyonlardaki bakıra karşı oldukça dirençli bir kültür bitkisi olduğu ve fitoremediyasyon çalışmaları için uygun nitelikler taşıdığı saptanmıştır.

## 2.2. BİTKİLERDE BAKIR STRESİ

Bitkiler yaşamları süresince birçok stres etmenine maruz kalmaktadır. Doğadaki çeşitli biyotik (yaralanma, patojen hücumu, enfeksiyon, diğer organizmalarla yarışma, vb.) ve abiyotik (kuraklık, tuzluluk, radyasyon, yüksek sıcaklık, ağır metal toksisitesi, vb.) stres koşulları ekonomik önemi olan tahıllar dahil olmak üzere tüm bitkilerin normal fizyolojik işlevlerinde değişikliklere yol açabilmekte (Mckersie ve Leshem, 1994; Kabata-Pendias, 1995; Benbelkacem, 1996), stresin şiddeti ve süresi uzadığında ise bitkilerde önemli derecede zarar meydana gelebilmektedir (Otte, 2001; Schützendübel ve Polle, 2002; Reddy ve diğ., 2003; Shao ve diğ., 2005).

Çevresel ve biyolojik etmenlerin ayrı ayrı ya da birlikte canlının fizyolojik olaylarında belirgin değişimler meydana getirmesi olarak tanımlanan stres; bitkilerin fizyolojisini etkilemekte (Benbelkacem, 1996; Otte, 2001), biyosentetik kapasitelerini azaltmakta (Schützendübel ve Polle, 2002; Reddy ve diğ., 2003), genetik potansiyellerini değiştirmekte (Shao ve diğ., 2005), verimliliklerini kısıtlayarak büyük oranlarda ürün kayıpları meydana getirmekte (He ve diğ., 2005) ve normal fonksiyonlarını değiştirerek bitkinin ölümüne yol açabilecek zararlara neden olabilmektedir (Schützendübel ve Polle, 2002; Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005; Shao ve diğ., 2005). Stres etmenlerinin oluşturduğu zarar bitkinin çevreye yönelik adaptasyon derecesine bağlı olarak değişmekle beraber (Shao ve diğ., 2005; Mittler, 2006) bir metabolizma bozukluğu sonucunda meydana geldiğinden bitkinin büyümesi ve veriminde önemli azalmalara neden olabilmektedir (Ouzounidou ve diğ., 1995; Benbelkacem, 1996; Schützendübel ve Polle, 2002; Shao ve diğ., 2005; Tanyolaç ve diğ., 2007). Elde edilen bu bilgilerin ışığında; bitki gelişimini, dolayısıyla da besin zinciri yolu ile hayvan ve insan sağlığını olumsuz yönde etkileyen ağır metal toksisitesinin bitki metabolizmasına etkilerinin incelenmesinin giderek artan bir öneme sahip olduğu açıkça görülmektedir.

Bu tez çalışmasında mısır fidelerine çeşitli konsantrasyonlarda uygulanan bakır (Cu), sahip olduğu kimyasal ve biyolojik özellikleri ile bitkilerdeki ağır metal stresinin başlıca kaynaklarından (Yruela, 2005) ve bitkilerde önemli fizyolojik, biyokimyasal ve anatomik değişimlere neden olmaktadır (Ouzounidou ve diğ., 1995; Wisniewski ve Dickinson, 2003; Xiong ve diğ., 2006; Zhang ve diğ., 2007; Tanyolaç ve diğ., 2007).



### 2.2.1. Bakırın Kimyasal ve Biyolojik Özellikleri

Atmosfer koşullarında metalik gri tonda bulunmayan iki metalden birisi olan kırmızımsı renkteki bakır, M.Ö. 5000 yılından beri tanınmaktadır ve adını ilk bulunduğu yer olan Kıbrıs'ın Latincesinden (aes cyprum = Kıbrıs cevheri, cyprum ve daha sonra cuprum) almıştır. Atomik numarası 29, moleküler ağırlığı  $63.546 \text{ g.mol}^{-1}$  olan bakır, periyodik tablonun IB serisinde yer alan bir geçiş (transisyon) elementidir. Doğal ortamda kayalarda, toprakta, suda ve havada bulunmaktadır. Toprakta en fazla Cu (I) ve Cu (II) olmak üzere iki formu bulunan bakırın kirlenmemiş topraklardaki konsantrasyonu yaklaşık  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  M düzeyindedir (Nriagu ve Pacyna, 1988; Kabata-Pendias, 1995). Bakırın topraktan alınıp bitki ve diğer canlılar tarafından kullanılabilirliği, yüksek bağlanma afinitesi gösterdiği etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), sitrik asit ve fenolik asitler gibi organik ligantlara bağlanarak çözünürlüğünü arttırmasına bağlıdır (Hunter ve Welkie, 1977; Cotton ve Wilkinson, 1988; Gekeler ve diğ., 1988; Di Palma ve Mecozzi, 2007; Ke ve diğ., 2007).

Bakırın biyolojik fonksiyonları ise bir geçiş elementi olmasıyla ilişkilidir. Geçiş elementleri oluşturdukları bileşiklerin çoğunda yarı dolu *d* orbitallerine sahiptir ve bu durum onların değerlik değişim mekanizmalarıyla elektron transferi yapabilmelerini sağlamaktadır (Cotton ve Wilkinson, 1988). Bu özelliklerinden ötürü geçiş elementleri birden fazla değerliğe sahiptir ( $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+3}$ ). Bakırın canlılar üzerindeki etkileri, elementin kimyasal formuna ve canlının büyüklüğüne göre değişmektedir (Lamb ve Tollefson, 1973; Beinert, 1991). Bakır küçük ve basit yapıları için zehir özelliği gösterirken (Lamb ve Tollefson, 1973); büyük ve daha gelişmiş canlılar için temel yapı bileşeni olarak görev yapmaktadır (Beinert, 1991). Bu nedenle bakır ve bileşikleri fungusit, biyosit, antibakteriyel madde ve böcek zehiri olarak tarım zararlılarına ve yumuşakçalara karşı yaygın olarak kullanılmaktadır (Lee ve Johnston, 2007).

Bitkiler için ise gerekli bir iz element olan bakır, pek çok metabolik yoldaki protein ve enzimin yapısal ve katalitik bileşeni olarak belirli konsantrasyonlarda büyüme ve gelişmeyi teşvik etmekte (Eyüboğlu ve diğ., 1998; Munzuroğlu ve Geçgil, 2002; Yruela, 2005; Pilon ve diğ., 2006) ancak yüksek konsantrasyonlarda güçlü fitotoksik etkiler göstermektedir (Lombardi ve Sebastiani, 2005; Ahsan ve diğ., 2007).

### 2.2.2. Bitkilerde Aşırı Bakıra Karşı Geliştirilen Çeşitli Savunma Stratejileri

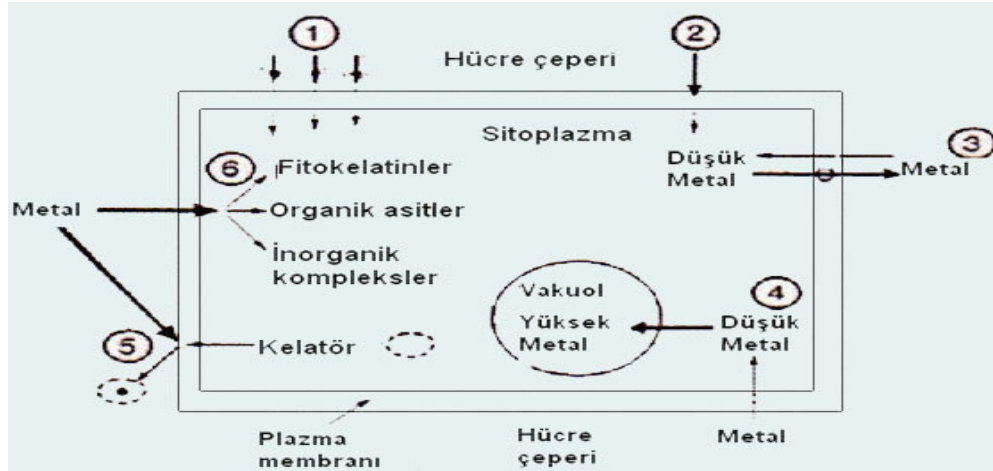
Bitkiler bakırı topraktan kökleri aracılığıyla doğrudan alırlar (Baker ve Walker, 1990; Tani ve Barrington, 2005; Yruela, 2005). Topraktan bakırın alınması; topraktaki bakır miktarına ve bitkinin kök-toprak ilişkisine bağlı olarak köklerin metal iyonları ile etkileşimi, metal iyonlarının kitle akımı ve difüzyonla köklerden içeriye alınması ve metal iyonlarının köklerden gövdeye translokasyonu şeklinde gerçekleşmektedir (Tani ve Barrington, 2005; Sahi ve diğ., 2007; Ke ve diğ., 2007). Bakırın topraktan alınma hızı bitkinin transpirasyonu ve köklerden alınan su miktarıyla doğru orantılıdır (Nellessen ve Fletcher, 1993; Lidon ve Henriques, 1993a; Tani ve Barrington, 2005).

Yüksek bitkilerde bakırın hücreye girişi ve gövde dokularındaki translokasyonu,  $Cu^{+2}$  şeklindeki iyonların köklerdeki katyon değişim bölgelerinden membran transport proteinlerine bağlanmasıyla (Lidon ve Henriques, 1993a; Lidon ve Henriques, 1994; Dučić ve Polle, 2005) ve hücre içinde  $Cu^{+}$ 'a redüklenerek suda çözünür proteinler olan metalloşaperonlara transfer olmasıyla gerçekleşmektedir (Nellessen ve Fletcher, 1993). Bakırın bitkilerde ksilem özsuyunda, serbest metal iyonu şeklinden ziyade kompleks anyonik formlarda, transpirasyon akımına bağlı olarak taşındığı belirlenmiş (Loneragan, 1981); yaşlı yapraklardan genç yapraklara taşınma kabiliyeti iyi olmadığından eksiklik belirtilerinin öncelikle genç yapraklarda görüldüğü saptanmıştır (Xiong ve diğ., 2006).

Bitkiler uzun süre kurşun, krom, alüminyum, kadmiyum ya da bakır gibi mobil metallere maruz kaldığında genellikle kök büyümesindeki azalma sürgün büyümesinden daha fazla olmakta ve kök gövde oranı azalmaktadır (Ouzounidou ve diğ., 1995; Mocquot ve diğ., 1996; Munzuroğlu ve Geçgil, 2002; An ve diğ., 2004). Bununla birlikte metal alımı ve kök büyümesinin engellenmesi, bitki türlerine ve büyüme koşullarına göre değişmektedir (An ve diğ., 2004). Bakırın topraktan alınma yüzdesi ve bitkideki metal konsantrasyonu çevresel, fizyolojik ve biyokimyasal faktörlere dayanmakta (Song ve diğ., 2004); toprak özellikleri ve pH, ağır metallerin bitkiler üzerindeki toksik etkilerinin oluşmasında önemli rol oynamaktadır (Gupta ve diğ., 1996). Bakırın çözünür protein ve amino asitlere bağlanma kapasitesinin ise bitkinin türüne, fiziksel değişimlere ve metallerin bitkideki birikimi gibi özelliklerine bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir (Himmelblau ve Amasino, 2000; Sharma ve Dietz, 2006).

Bitkiler metal konsantrasyonu artışına karşı çeşitli savunma stratejileri geliştirmiştir (Şekil 2.1) ve aşırı bakır alınımı çeşitli fizyolojik mekanizmalarla engellenmektedir (Verkleij ve Schat, 1990; Ouzounidou ve diğ., 1994; Zenk, 1996; Boojar ve Goodarzi, 2007). Köklerden metal iyonlarının içeri alınmasının engellenmesi ya da kısıtlanması bunlardan birisidir (Ke ve diğ., 2007) ancak buna rağmen bazı bitkiler topraktan belirli miktarlarda bakırı almakta ve çeşitli dokularında depolayabilmektedir (Küpper ve diğ., 1999; Lou ve diğ., 2004; Johansson ve diğ., 2005; Ke ve diğ., 2007) (Şekil 2.1).

Kökler topraktaki bakırla ilk temas eden yapılar olduklarından genellikle gövdeden daha fazla metal içermekte (Paivöke, 1983; Nishizono, 1987; Tukendorf, 1987; Lin ve diğ., 2003) ve bakır iyonları kök dokularında tutularak gövde boyunca ilerlemeleri çeşitli yollarla engellenmeye çalışılmaktadır (Nishizono, 1987; Lin ve diğ., 2003; Panou-Filotheou ve Bosabalidis, 2004). Bundan dolayı kökler ağır metalleri depolama ve inaktive etme yerleri olarak görev yapmaktadır (Tukendorf, 1987; Lin ve diğ., 2003; Panou-Filotheou ve Bosabalidis, 2004; Lou ve diğ., 2004). Ağır metallerin fitokelatinlere (PCs) bağlanması (Leopold ve diğ., 1999; Cobbett, 2000; Srivastava ve diğ., 2006) ve toksik metal iyonlarının bazı organ, doku ya da organellerde birikim göstererek diğer kısımlardan ayrı tutulması ise bu stratejilerden diğer birkaç tanesidir (Reeves ve Baker, 2000; McGrath ve diğ., 2001; Sahi ve diğ., 2007) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Bitkilerde ağır metallerle karşı geliştirilen çeşitli savunma stratejileri (1) Metalin hücre çeperine bağlanması (2) Plazma membranından metallerin geçişinin sınırlandırılması (3) Metalin aktif transportla dışarı atılması (4) Fazla metalin vakuolde birikimi (5) Metallerin hücre çeperi ile plazma membranı arasındaki bölgede kelatlanması (6) Metallerin sitoplazmada kelatlanması (Tomsett ve Thurman'dan (1988) modifiye edilmiştir)

Metallerin, metallotiyoninler (MTs) gibi proteinler ile kelatlanması ilk olarak gelişen yanıtlardan birisidir (Steffens, 1990; Morelli ve Scarano, 2004; Ogra ve diğ., 2006). Doğal kelatlayıcı bileşikler olan amino asitler ve türevleri, sitrik asit, malik asit gibi organik asitler ile fenolikler ve fitokelatinlerin metallerin kelatlanmasında ve toksisitelerinin azaltılmasında önemli rolleri olduğu bilinmektedir (Howe ve Merchant, 1992; Le Faucheur ve diğ., 2006; Di Palma ve Mecozzi, 2007). Toksik metal iyonlarının bitkilerin bazı kısımlarında özel olarak yerleşim gösterdikleri (Küpper ve diğ., 1999; Liu ve Kottke, 2004) ve hücre içi düzeyde özellikle merkezi vakuolde depo edildikleri de belirlenmiştir (Lidon ve Henriques, 1998; Sahi ve diğ., 2007). Kök dokularında ağır metallerin özellikle hücre çeperlerinde ya da hücre içerisinde vakuolde birikim gösterdiği de saptanmıştır (Nishizono, 1987; Lidon ve Henriques, 1998; Lin ve diğ., 2003; Liu ve Kottke, 2004; Panou-Filothou ve Bosabalidis, 2004) (Şekil 2.1).

### **2.2.3. Bakırın Bitkilerdeki Fizyolojik ve Anatomik Etkileri**

Biyolojik sistemlerde yapısal bir bileşen ve bazı katalitik enzimlerin kofaktörü olarak görev yapan bakır, bitki büyümesinde ve çeşitli biyokimyasal işlevlerde önemli rol oynamasına rağmen yüksek konsantrasyonlarda güçlü fitotoksik etkiler gösteren bir elementtir (Phalson, 1989; Dreosti, 1991; Devi ve Prasad, 1998; Chen ve diğ., 2000; Erdei ve diğ., 2002). Normal büyüme ve gelişme için gerekli olan bakırın konsantrasyonu bitkinin türüne, gelişim evresine ve bitkinin kullandığı azot kaynağına göre değişim göstermektedir (Xiong ve diğ., 2006; Ahsan ve diğ., 2007).

Bakır, bitki dokularında aşırı biriktiği zaman çimlenmenin (Munzuroğlu ve Geçgil, 2002; Ahsan ve diğ., 2007) ve kök, gövde büyümesinin gerilemesi (Kıran ve Munzuroğlu, 2004; Johansson ve diğ., 2005; Ke ve diğ., 2007), azot ve protein metabolizmasının olumsuz etkilenmesi (Cuypers ve diğ., 2005; Xiong ve diğ., 2006), klorofilin yıkımına bağlı olarak fotosentetik fonksiyonların yavaşlaması (Mocquot ve diğ., 1996; Frankart ve diğ., 2002), solunumun inhibe olması (Lombardi ve Sebastiani, 2005), transpirasyonun yavaşlaması (Perales-Vela ve diğ., 2007), serbest prolin birikiminin artması (Alia ve Saradhi, 1991; Bačkor ve diğ., 2004), membran bütünlüğünün ortadan kalkması (Morelli ve Scarano, 2004; Sgherri ve diğ., 2007) ve hormonal dengenin bozulması (Hunter ve Welkie, 1977) gibi canlılıkla ilgili çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal işlevlerin değişmesine sebep olmaktadır.

Bakır, indirgenme yükseltgenme (redoks) olaylarında aktif bir geçiş elementi olarak birçok reaktif oksijen türünün (reactive oxygen species = ROS) oluşumu için de etkili bir katalizördür (Aust ve diğ., 1985; Maksymiec, 1997; Chen ve diğ., 2000; Guo ve diğ., 2007). Zararlı serbest radikallerin üretimini katalize eden en önemli ağır metallere birisi olan bakır (Palma ve diğ., 1987; Mazhoudi ve diğ., 1997) bir geçiş elementi olması nedeniyle bitkilerde oksidan strese sebep olan etmenlerin başında yer almaktadır (Aust ve diğ., 1985, Elstner ve diğ., 1988; Dat ve diğ., 2000; Azevedo ve diğ., 2007). Aşırı bakır uygulamaları bu toksik oksijen türlerinin miktarında artışa yol açarak hücrelerin yapı ve işlevlerinde ciddi zararlar meydana getirebilmekte (Pompella, 1997; Demirevska-Kepova ve diğ., 2004; Sgherri ve diğ., 2007), büyümenin gerilemesinden organizmanın ölümüne kadar varabilen pek çok değişime neden olabilmektedir (Chen ve diğ., 2000; Gechev ve diğ., 2006; Azevedo ve diğ., 2007).

Oksidan stresin derecesine bağlı olarak bakırın protein yapısının bozulmasına ve enzim aktivitesinin inhibisyonuna yol açarak (Van Assche ve Clijsters, 1990; Demirevska-Kepova, 2004), protein fonksiyonu ve enzim aktivitesinde değişikliklere neden olduğu (Cuypers ve diğ., 2005; Tanyolaç ve diğ., 2007) (Tablo 2.1) kaydedilmiştir. Bakırın birçok enzimin aktivitesini teşvik ettiği ya da baskıladığı (Srivastava ve diğ., 2006) ve ayrıca proteinlerdeki sülfidril (-SH) gruplarına bağlanarak hücre yapısında bozulmalar (Tukendorf, 1987) ve kromozom lezyonları meydana getirdiği de (Palma ve diğ., 2002; Ahsan ve diğ., 2007; Zhang ve diğ., 2007) saptanmıştır.

Bakır iyonları hücre ve organellerin membran yapısında da önemli değişimlere neden olmakta, lipidlerin oksidasyonuna neden olarak membran yapısı ve özelliklerini değiştirmektedir (De Filippis, 1979; Palma ve diğ., 1987; De Vos ve diğ., 1989; Barylva ve diğ., 2000) (Tablo 2.1). Köklerden ya da metal stresine maruz kalan diğer hücre kısımlarından dışarıya metal iyonu sızmasının membranın permeabilitesindeki değişimlerden kaynaklandığı (Ouzounidou ve diğ., 1995; Pandit ve Prasannakumar, 1999; Berglund ve diğ., 2002) belirlenmiştir. Benzer şekilde aşırı miktardaki bakırın membran lipidlerinin peroksidasyonuna bağlı yıkımına (Dhindza ve diğ., 1981; Berglund ve diğ., 2002) ve toplam pigment içeriğinde azalmalara (Chettri ve diğ., 1998; Tanyolaç ve diğ., 2007) yol açarak yapraklarda klorosise neden olduğu (Mocquot ve diğ., 1996; Kupper ve diğ., 1996; Perales-Vela ve diğ., 2007) gözlemlenmiştir.

Bakırın, fotosentez ve elektron transportunun primer reaksiyonlarında toksik etkilere sahip olduğu (Baszynski ve diğ., 1988; Chettri ve diğ., 1998; Frankart ve diğ., 2002) (Tablo 2.1), klorofildeki magnezyum ( $Mg^{+2}$ ) iyonunun yerini alarak fotosentezin inhibisyonuna ve klorofil yıkımına neden olduğu (Clijsters ve Van Assche, 1985; Vinit-Dunand ve diğ., 2002) böylece klorofilin yapı ve işlevlerine zarar verdiği de (Baszynski, 1988; Garnczarska ve Ratajczak, 2000; Perales-Vela ve diğ., 2007) bildirilmiştir. Bakır toksisitesinin demir eksikliği (Vinit-Dunand ve diğ., 2002), lipit peroksidasyonundan kaynaklanan klorosis (Gallego ve diğ., 1996; Chettri ve diğ., 1998), sekonder kök ve kök tüylerinin sayısı ve uzunluklarında azalma gibi belirtileri vardır (Ouzounidou ve diğ., 1995; Wisniewski ve Dickinson, 2003; Sgherri ve diğ., 2007).

Hücresele düzeyde transkripsiyon sinyalinin iletiminde (Guo ve diğ., 2007; Ke ve diğ., 2007), protein sentezinin düzenlenmesinde (Howe ve Merchant, 1992; Weckx ve Clijsters, 1996; Ahsan ve diğ., 2007), oksidatif fosforilasyonda (Wohlrab ve Jacobs, 1967) ve demir dağılımının (mobilizasyonunun) sağlanmasında (Di Palma ve Mecozzi, 2007) önemli rolleri olan bakır; sitokrom oksidaz gibi metalloenzimlerin de aktif merkezinde yer almaktadır (Maksymiec, 1997; Pilon ve diğ., 2006) (Tablo 2.1). Bitkilerde bakır içeren enzimlerden bazıları superoksit dismutaz (SOD), askorbat oksidaz (AO), polifenol oksidaz (PPO) ve lakkaz (LA) gibi oksidoredüktazlardır (Messerschmidt, 1997) (Tablo 2.1). Bakır içeren enzimatik olmayan bileşikler ise; bazı amino asitler, kısa peptitler ve diğer bazı metabolitlerdir (Steffens, 1990; Howe ve Merchant, 1992; Rauser, 1999; Morelli ve Scarano, 2004; Le Faucheur ve diğ., 2006; Sharma ve Dietz, 2006; Srivastava ve diğ., 2006).

Bakırın hücre çeperinin kimyasal yapısı ve sentezi üzerinde de belirgin etkilere sahip olduğu (Panou-Filothou ve Bosabalidis, 2004; Ali ve diğ., 2006), özellikle köklerdeki primer hücre çeperi ve orta lamellere bağlanma eğilimi gösterdiği (Nishizono, 1987; Tukendorf, 1987; Ali ve diğ., 2006) bilinmektedir (Tablo 2.1). Yüksek bitkilerde bakır eksikliği hücre çeperindeki lignifikasyonun bozulmasına yol açarak genç yaprakların bükülüp kıvrılması, gövdenin eğilmesi, zayıf ve ince sürgünlerin oluşması gibi tipik morfolojik ve anatomik değişimlere neden olmaktadır (Chen ve diğ., 2002; Jouili ve El Ferjani, 2003; Chaoui ve El Ferjani, 2005; Ali ve diğ., 2006).

Bütün bu veriler, bitkilerin normal büyüme ve gelişmesi için gerekli bir mikroelement olan bakırın, aşırı miktarlarda oksidan strese neden olarak hücrelerin büyüme ve gelişme periyotlarını bozduğunu ve onları genetik potansiyellerinden alıkoyarak önemli miktarda ürün kaybına yol açtığını göstermektedir.

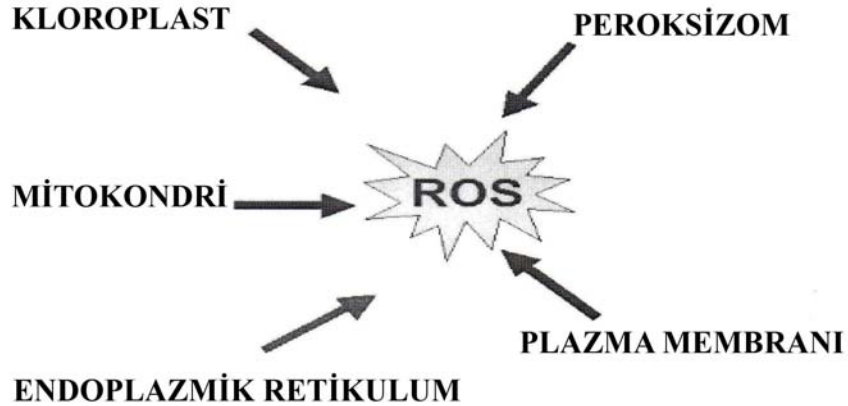
Tablo 2.1: Bitkilerde bakırın dağılımı ve işlevleri

Adı	Bulunduğu Yer	İşlevi
Plastosiyenin	Kloroplastlar	Elektron transferi
Superoksit dismutaz (Cu-Zn SOD)	Mitokondri, Glioksizomlar, Kloroplast	Superoksit radikalının detoksifikasyonu Lipit peroksidasyonu
Sitokrom oksidaz	Mitokondri	Elektron transport zincirinin terminal oksidasyonu
Askorbat oksidaz	Hücre çeperi	Askorbik asitin oksidasyonu / redüksiyonu Hücre büyümesi ve bitki savunması
Diamin oksidaz	Epidermis ve ksilem dokusunun apoplazması	Poliamin yıkımı Lignifikasyon-Suberizasyon
Fenol oksidaz	Hücre çeperi Kloroplastlar	Lignin ve alkaloid biyosentezi Plastosiyenin

Bakırın mikroelement olarak bitkilerdeki işlevleri ve dağılımı çok çalışılmış bir konu olmasına rağmen bakır konsantrasyonu ve antioksidan aktivite arasındaki ilişki henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Bu çalışmanın amacı bakırın toksik etkileri ile bitkilerin savunma mekanizmasında yer alan antioksidan enzim aktivitelerindeki değişimler arasındaki ilişkileri incelemektir.

### 2.3. BİTKİLERDE OKSİDAN STRES VE SERBEST OKSİJEN TÜRLERİ

Atmosferde en bol bulunan elementlerden birisi olan oksijen, aerobik canlılar için vazgeçilmez bir element olup; hidrojen, karbon, azot ve kükürt ile birlikte organik moleküllerin temel yapısal atomlarını oluşturmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1984; Sies, 1991; Lane, 2003). Bunun yanında, aerobik canlıların enerji metabolizmasındaki rolü nedeniyle, oksijen hayati bir öneme sahiptir. Oksijenin canlılardaki toksik etkilerinin ‘oksijen radikalleri’ olarak adlandırılan ve oksijenin vücuttaki metabolizması sırasında oluşan reaktif türlerden kaynaklandığı bilinmektedir (Smirnoff, 2005) (Şekil 2.2). Biyokimyasal tepkimeler daima atomların dış orbitallerindeki elektronlar seviyesinde gerçekleşmektedir. Serbest radikal, atomik ya da moleküler yapılarda eşleşmemiş bir veya daha fazla tek elektron taşıyan moleküllere verilen isimdir (Foote, 1995). Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere ‘oksidan moleküller’ ya da ‘reaktif oksijen türleri’ (ROS) de denmektedir. Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve eksojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşan bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanırlar (Elstner, 1982; Baskin ve Salem, 1997).

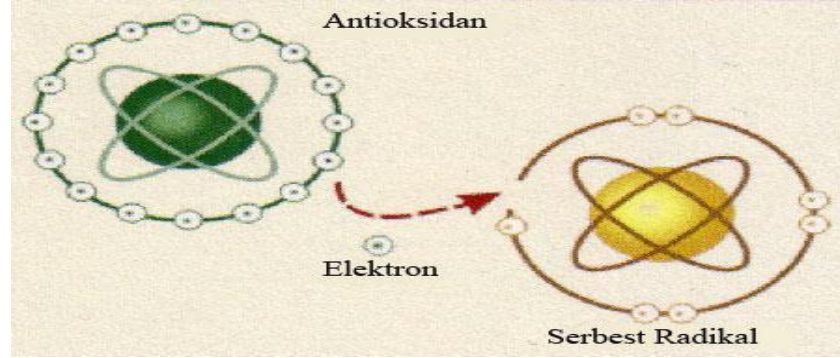


Şekil 2.2: Bitkilerde serbest oksijen radikallerinin (ROS) çeşitli metabolik kaynakları

Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması söz konusu kimyasal bileşiğin reaktivitesini olağanüstü arttırdığı için, serbest radikaller tepkime etkinliği çok yüksek olan aktif oksijen türleridir (Mittler, 2002; Mercan, 2004; Mittler, 2006) (Şekil 2.3).



Oksijen bulunan bir ortamda serbest radikaller; çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenlerle kovalent bağların homolitik kırılması, normal bir molekülün elektron kaybetmesi ve normal bir moleküle elektron transferi olmak üzere başlıca 3 temel mekanizma ile oluşurlar (Mittler, 2002; Halliwell, 2006; Mittler, 2006) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Serbest oksijen radikalleri (ROS) ile antioksidanların moleküler yapısı ve aralarındaki elektron alışverişi

Oksijen radikallerinin fazla yapımının neden olduğu etkilerin toplamı 'oksidan stres' diye adlandırılır (Akkuş, 1995; Foote, 1995; Van Montague ve Inze, 2002; Halliwell, 2006; Mittler, 2006). Oksidan stres ayrıca antioksidan savunma sistemi ile serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik olarak da tanımlanabilmektedir (Mittler, 2002).

Tablo 2.2: Başlıca reaktif oksijen türleri (ROS)

Radikaller	Radikal olmayanlar
Superoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ )	Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )
Hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ )	Lipit hidroperoksit (LOOH)
Peroksil radikali ( $RO_2^{\cdot}$ )	Hipoklorik asit (HOCl)
Alkoksil radikali ( $RO^{\cdot}$ )	Ozon ( $O_3$ )
Hidroperoksil radikali ( $HO_2^{\cdot}$ )	Singlet oksijen ( $O_2^1$ )
Peroksinitrit radikali (ONOO)	

Canlılarda oluşabilen serbest oksijen bileşiklerinin sayısı yüzlerce farklı tür şeklinde ifade edilebilirse de, bunların arasında süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikalleri ( $OH^{\cdot}$ ) ile singlet oksijenin ( $O_2^1$ ) özel yerleri vardır (Roberfroid, 1995; Alscher ve diğ., 1997; Colton, 1999; Halliwell, 2006) (Tablo 2.2) (Şekil 2.4).

### 2.3.1. Superoksit Radikali ( $O_2^{\cdot-}$ )

Moleküler oksijen ( $O_2$ ) bir elektron alarak kararsız bir yapı olan superoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ) radikaline dönüşmektedir (Şekil 2.4).



Hücrel metabolik etkinlikler sonucunda üretilen superoksit radikalının oluşumu pek çok abiyotik ve biyotik stres faktörleri altında indüklenmektedir (Bowler ve diğ., 1992; Baskin ve Salem, 1997). Anyonik yapıdaki bu radikaller, taşıdıkları yükten dolayı hücre ve organellerin membranlarından geçemezler ve dolayısıyla etkilerini genellikle üretildikleri yerde gösterirler. Superoksit bileşikleri; fosfolipitlerin varlığı nedeniyle asidik yapıdaki membran yüzeylerinin hidrofobik ortamlarında daha uzun ömürlüdür ve çözünürlükleri daha fazladır (Afanas'ev, 1989; Fridovich, 1983; 1993). Düşük pH'da aktivitesi artan superoksit anyonu buradan kolayca bir proton alarak kendisinden daha kuvvetli bir oksidan olan perhidroksil radikalini ( $HO_2^{\cdot}$ ) oluşturmaktadır (Fridovich, 1983). Superoksite göre çok daha reaktif olan bu radikal, membranlarda lipit peroksidasyonunu başlatabilmekte ve bazı antioksidan bileşikleri oksitleyebilmektedir (Asada, 1984; Fridovich, 1993; Akkuş, 1995; Alscher ve diğ., 1997; Asada, 2006).

Güçlü oksitleyici bileşikler olan superoksit radikalleri ayrıca ağır metalleri indirgeyerek bağlı bulunduğu proteinlerden salınımına neden olmakta, kofaktörlerin oksidasyon düzeylerini bozmakta ve bazı metal iyonlarının katıldığı hidroksil radikali yapım tepkimelerini (Fenton ve Haber-Weiss) hızlandırmaktadır (Aust ve diğ., 1985; Bowler ve diğ., 1992; Roberfroid, 1995; Baccouch ve diğ., 1998; Barylva ve diğ., 2000).

Superoksit; hem  $H_2O_2$ 'in öncülü hem de metalleri indirgeyici bir tür olarak proteinlere bağlı metallerin indirgenip serbest kalmasına neden olabildiğinden, biyolojik koşullarda superoksit oluşumunun arttığı ortamda  $\cdot OH$  üretimi kaçınılmazdır (Del Maestro, 1979; Afanas'ev, 1989; Burkitt ve Gilbert, 1990). Yüklü bir molekül olan superoksit anyonu; biyolojik membranlardan geçememekte (Colton, 1999; Berglund ve diğ., 2002), dolayısıyla bu radikaller üretildikleri hücre kısmında etkisiz hale getirilmek üzere superoksit dismutaz (SOD) enziminin yüksek katalitik aktiviteleri ile daha az zararlı olan  $H_2O_2$ 'e dönüştürülerek hücrelerde birikimine izin verilmemektedir (Lidon ve Henriques, 1993b; Van Montague ve Inze, 2002; Halliwell, 2006).

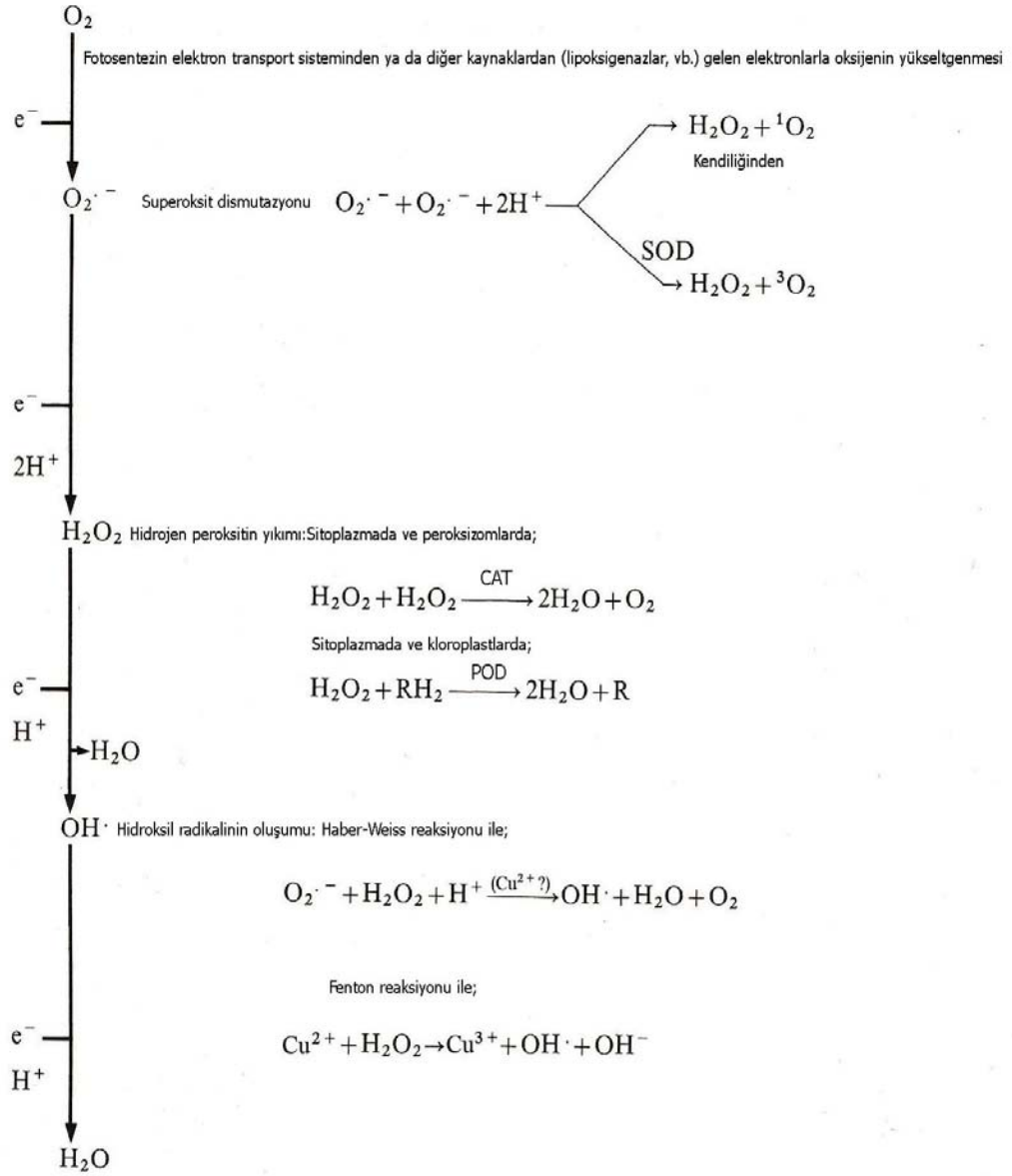
### 2.3.2. Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımayan hidrojen peroksit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; reaktif bir tür değildir (Çakmak ve diğ., 1993) ancak 'reaktif oksijen türleri' ya da 'serbest oksijen türleri' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi serbest radikal olmayan türler için de ortak olarak kullanılan bir terimdir (Blokina ve diğ., 2003; Halliwell, 2006). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, superoksit (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) radikaline bir elektronun eklenmesi (superoksit dismutasyonu) ya da O<sub>2</sub>'in doğrudan indirgenmesiyle oluşmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1999; Hegedus ve diğ., 2001; Mittler, 2002; 2006; Halliwell, 2006). Dismutasyon kendiliğinden ya da superoksit dismutaz (SOD) enzimi aracılığıyla katalize edilmektedir (Şekil 2.4).



Oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, superoksitin aksine membranlardan kolaylıkla geçebilmektedir (Dat ve diğ., 2000). Reaktif oksijen türleri içerisinde diğerlerine göre daha uzun ömürlü olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; üretildiği yerden uzak kısımlara difüzyon yoluyla dağılmakta ve çeşitli organellerin membran yapılarına girerek sinyal molekülü olarak da rol alabilmektedir (Klapheck ve diğ., 1990; Dat ve diğ., 2000; Liochev ve Fridovich, 2007).

Aktif oksijen türleri arasında diğerlerine göre nispeten daha düşük toksisiteye sahip olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni; özellikle bakır ve demir gibi geçiş metallerinin varlığında, hidroksil radikalının (OH<sup>•</sup>) öncülü olarak davranmasıdır (Aust ve diğ., 1985; Halliwell, 2006). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, özellikle proteinlerde bulunan bakır ya da demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki aktif metal formlarını oluşturmaktadır (Sigel ve Sigel, 1999). Çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olan bu metaller; Fenton ya da Haber-Weiss reaksiyonları ile biyolojik sistemlerde en toksik ve en reaktif radikaller olarak bilinen OH<sup>•</sup> bileşiklerini üreterek (Elstner, 1982; Baskin ve Salem, 1997; Kehrer, 2000) (Şekil 2.4), hücre membranlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimelerini başlatabilmektedir (Sigel ve Sigel, 1999; Li ve diğ., 2006).



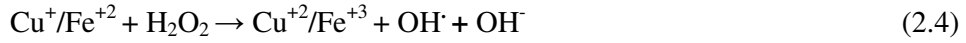
Şekil 2.4: Aktif oksijen türlerinin oluşumu ve yıkımı (Fedtke, 1982; Salin, 1988)

Bitki hücrelerinde oksidan zararın önlenmesi için  $H_2O_2$ 'in temizlenmesi büyük önem taşımaktadır ve oksitleyici özellikleri nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan  $H_2O_2$ 'in derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir (Smirnoff, 2005; Mittler, 2006).  $H_2O_2$ 'in yıkımı bitkilerde öncelikle askorbat-glutasyon döngüsü (Şekil 2.11) ile (Hausladen ve Alscher, 1993), hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri tarafından gerçekleştirilmektedir (Chance ve Maehly, 1955; Fang ve Kao, 2000; Hegedus ve diğ., 2001; Blokhina ve diğ., 2003; Lepeduš ve diğ., 2004).

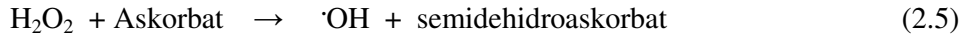
### 2.3.3. Hidroksil Radikali (OH<sup>·</sup>)

Biyolojik sistemlerde üretilen hidroksil radikalının (OH<sup>·</sup>) önemli bir kısmı canlılarda hidrojen peroksitin eksik indirgenmesi ile gerçekleşmektedir (Sigel ve Sigel, 1999). Bu tür indirgenme Fe ve Cu gibi geçiş elementlerinin varlığında Fenton reaksiyonu ile katalizlenmektedir (Burkitt ve Gilbert, 1990; Kehrer, 2000) (Şekil 2.4).

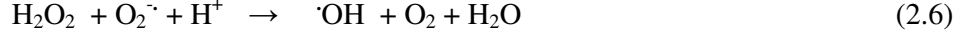
Fenton reaksiyonu sonucunda oksitlenen metal iyonları olan Cu<sup>+2</sup> / Fe<sup>+3</sup>; askorbik asit ya da superoksit (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) gibi indirgeyici bileşiklerin de bulunduğu ortamlarda yeniden redüklenmekte (Haber-Weiss reaksiyonu) ve böylece H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den OH<sup>·</sup> yapımı döngüsel bir biçimde sürekli duruma gelerek tekrarlanmaktadır.



Fe, Cu



Fe, Cu



Haber-Weiss reaksiyonu olarak adlandırılan bu tepkime ile oluşan OH<sup>·</sup> miktarı; hücrede üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişimi ve serbest metal iyonlarının varlığına bağlıdır (Burkitt ve Gilbert, 1990; Kehrer, 2000). Biyolojik sistemlerde bilinen en reaktif tür olan OH<sup>·</sup>, su dahil ortamda rastladığı her biyomolekülle etkileşime girebilmektedir (Sigel ve Sigel, 1999). Bütün hücresel yapılar OH<sup>·</sup>'in bir hedefi ise de özellikle protein, lipit ve nukleik asitler gibi elektronca zengin bileşikler tercihli hedeflerdir (Pryor, 1982; Genestra, 2007) ve bu kısımlarda başlatılan radikal tepkimelerinde binlerce farklı ara ürün oluşabilmektedir (Genestra, 2007). Proteinlerin serbest radikallerce oksidasyonu yapı değişimlerine yol açabilmekte ve hücreleri proteolitik yıkıma götürebilmektedir (Stadtman ve Oliver, 1991). OH<sup>·</sup> radikalının sebep olduğu biyolojik zararlardan en iyi tanımlanmış olanı, lipit peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur (Girrotti, 1985; Maillard ve diğ., 2007). Lipitlerin peroksidasyonu; membranın yapısını, bütünlüğünü ve seçici geçirgenliğini bozarak hücre ölümüne kadar varabilen olaylara neden olabilmektedir (De Vos ve diğ., 1989; Çakmak ve diğ., 1991; 1993). OH<sup>·</sup>'in nukleik asitler ile tepkimeleri sonucunda ise baz modifikasyonları, baz delesyonları ve zincir

kırılmaları gerçekleşebilmektedir (Getoff, 2007; Lin ve diğ., 2007). DNA yapısında meydana gelen ileri derecedeki bozukluklar onarılamadığından serbest radikaller; mutasyon, yaşlanma ve hatta hücre ölümüne yol açabilmektedir (Valko ve diğ., 2006). OH<sup>-</sup> yapımını katalizlemelerindeki etkileri nedeniyle, canlılarda metal iyonları serbest radikallerin zararlarından birinci derecede sorumludurlar (Del Maestro, 1979) ve bu etkiye sahip olmadıkları formda (proteine bağlı) tutulmaları gerekmektedir (Tukendorf, 1987; Steffens, 1990; Leopold ve diğ., 1999; Rauser, 1999; Cobbett, 2000). Birçok canlı organizmada bu görev transferrin, ferritin ve ürik asit gibi bileşiklerce yapılırken, bitkilerde metalotiyoninler, glutatyon, fitokelatinler ve fenolik bileşikler toksik metal iyonlarını bağlı formda tutarak zararlı etkilerini azaltmakta ya da ortadan kaldırmaktadır (Meister, 1981; Cobbett, 2000; Le Faucheur ve diğ., 2006).

#### 2.3.4. Singlet Oksijen (O<sub>2</sub><sup>1</sup>)

Yapısında eşleşmemiş elektronu bulunmaması nedeniyle serbest radikal olmadığı halde yüksek enerjili elektronlarının varlığı ile reaktif oksijen türleri arasında yer alan singlet oksijen (O<sub>2</sub><sup>1</sup>), serbest radikal zincir reaksiyonlarının başlamasına neden olması açısından önem taşımaktadır (Shih ve Hu, 1999; Das ve Das, 2000). Oksijenin enerjetik olarak uyarılan bu formunda reaktivite çok yüksektir (Colton, 1999; Das ve Das, 2000). Pigmentlerin flavin içeren nukleotidlerinin oksijenli ortamda ışığı absorblamasıyla moleküler oksijenin (O<sub>2</sub><sup>1</sup>) elektronlarından birinin dışarıdan aldığı enerji sonucunda kendi dönüş yönünün tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi ile oluşan bu bileşikler (Nobel, 1974), aynı zamanda hidroperoksitlerin geçiş metallerinin varlığındaki yıkım tepkimelerinde (Aust ve diğ., 1985) ve superoksit radikalinin kendiliğinden dismutasyonu sırasında da (Nobel, 1974; Quintanilha, 1988; Baskin ve Salem, 1997; Van Montague ve Inze, 2002) (Şekil 2.4) üretilebilmektedir.

Aldığı enerjiyi çevreye yayarak yeniden oksijene dönüşebilen O<sub>2</sub><sup>1</sup>; diğer moleküllerle etkileşime girdiğinde ise sahip olduğu bu enerjiyi diğer moleküllere transfer ederek çeşitli kovalent tepkimelere girmektedir (Foote, 1995; Lane, 2003). Özellikle doymamış yağ asitlerindeki karbon-karbon çift bağları ile doğrudan etkileşime girerek peroksil radikallerinin oluşumuna neden olan O<sub>2</sub><sup>1</sup>; OH<sup>-</sup> bileşiği kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilmektedir (Nobel, 1974; Girotti, 1985; Smirnoff ve Cumbes, 1989; Hodges ve diğ., 1999; Shih ve Hu, 1999; Das ve Das, 2000; Apel, 2004).

## 2.4. BİTKİLERDE LİPİT PEROKSİDASYONU

Hücrelerin metabolik aktiviteleri ve çeşitli çevresel stres etmenleri sonucunda oluşan serbest oksijen türleri (ROS); yağ asitleri başta olmak üzere karbonhidrat, protein ve nükleik asitler gibi çeşitli moleküllerden bir proton çıkararak karbon merkezli organik alkil radikallerinin ( $R^{\cdot}$ ), ( $RCOO^{\cdot}$ ), ( $RO_2^{\cdot}$ ) ve ( $RO^{\cdot}$ ) oluşmasına ve lipit peroksidasyonu zincir tepkimelerinin başlamasına neden olarak yapısal ve fizyolojik bazı değişimlere yol açmaktadır (Blokina ve diğ., 2003; Halliwell, 2006; Mittler, 2006).

Karbon merkezli bu radikaller hızlı bir şekilde oksijen ile reaksiyona girerek çeşitli alkil radikallerini oluşturmaktadır. Bunlardan özellikle peroksil radikali ( $ROO^{\cdot}$ ), lipit peroksidasyonunu başlatan radikal olup çok uzun ömürlüdür (Çakmak ve Horst, 1991). Hücre membranı ve hücre içi bileşenler (mitokondri, kloroplast, endoplazmik retikulum, vs.), özellikle membran fosfolipitlerindeki doymamış yağ asitlerinin varlığı nedeniyle oksidan saldırılara duyarlıdır (Pompella, 1997; Ishikawa ve Wagatsuma, 1998).

Biyomoleküllerin serbest oksijen türlerince bu şekilde oksidasyonu sonucunda hücre yapı ve işlevlerinde çeşitli bozukluklar meydana gelirken aynı zamanda lipit radikalleri ( $L^{\cdot}$ ) ve lipit peroksitler ( $LOOH$ ) de oluşmaktadır (Yan ve diğ., 1996; Yamamoto ve diğ., 1997) ve bu toksik ürünler yeni bir tepkimeyi başlatabilmektedir (Zhang ve diğ., 2007).

“Serbest Radikal Otooksidasyonu” olarak isimlendirilen bu tip tepkimelerin en iyi bilineni ‘lipit peroksidasyonu’ olarak adlandırılan çoklu doymamış (poliansatüre) yağ asitlerinin (PUFA) zincirleme radikal reaksiyonudur ve bunun başlatılması için bir tetikleyici (başlatıcı) etmen gereklidir. Sözü edilen bu etmenin çoğunlukla  $OH^{\cdot}$  radikali olduğu kabul edilmektedir (Girotti, 1985; Halliwell ve Gutteridge, 1984; 1998; 1999). Lipit peroksidasyonu; başlama, ilerleme, yıkım ve sonlanma olmak üzere dört aşamada oluşmaktadır (Şekil 2.5, Şekil 2.6).

### 2.4.1. Lipit Peroksidasyonu Başlama Evresi

$OH^{\cdot}$  radikalinin, yağ asitinin (LH) metilen kısmından bir hidrojen atomunu ( $H^+$ ) koparmasıyla bir lipit radikali ( $L^{\cdot}$ ) meydana gelmektedir (Şekil 2.5).



### 2.4.2. Lipit Peroksidasyonu İlerleme Evresi

Zincirleme reaksiyon oluşan lipit radikaline (L<sup>·</sup>), O<sub>2</sub> ilavesi ile devam etmekte ve sonuçta lipit peroksil radikali (LOO<sup>·</sup>) ile lipit peroksit (LOOH) oluşmaktadır (Şekil 2.5).



### 2.4.3. Lipit Peroksidasyonu Yıkım Evresi ve Oluşan Çeşitli Organik Radikaller

Tek elektron üzerinden yeniden yapılanma lipitin parçalanması ile sonuçlanarak çeşitli organik alkil radikalleri meydana gelmektedir (Şekil 2.5).

#### 2.4.3.1. Organik Peroksit Radikali (RCOO<sup>·</sup>)

Organik peroksit radikalleri, lipitlerin yıkımında ortaya çıkan toksik ürünlerden biridir.

#### 2.4.3.2. Peroksil Radikali (ROO<sup>·</sup>)

Peroksil radikali, yeni bir lipit peroksidasyonunu tetikleyerek zincirleme tepkimelerin başlamasına neden olan oldukça toksik özelliklere sahip bir lipitlerin yıkım ürünüdür.

#### 2.4.3.3. Alkoksil Radikali (RO<sup>·</sup>)

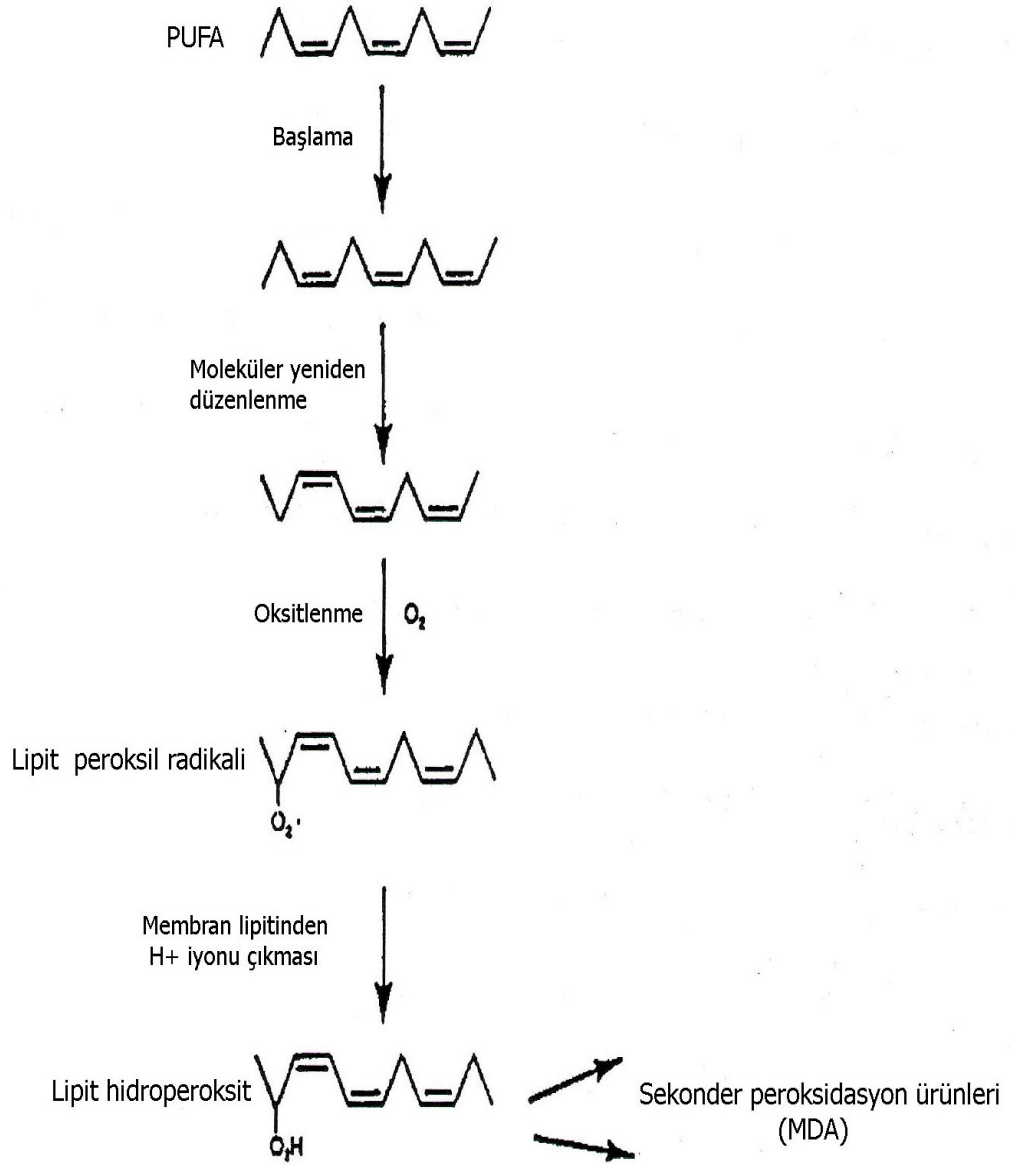
Alkoksil radikalleri, peroksil radikalinden bir oksijen atomunun çıkması sonucunda oluşmaktadır. Lipit peroksidasyonu sonucunda ayrıca jasmonik asitler, alkoller, etan, etilen ve aldehitler gibi çeşitli sekonder ara ürünler oluşmaktadır. Bunlardan özellikle malondialdehit (MDA), çeşitli mutajenik ve genotoksik etkileri ile en zehirli ürünlerden birisidir (Heath ve Packer, 1968; Girotti, 1985)

### 2.4.4. Lipit Peroksidasyonu Sonlanma Evresi

Zincir reaksiyonu, askorbat (C vitamini) ve α-tokoferol (E vitamini) gibi antioksidanlar tarafından sonlandırılabilir (Şekil 2.6).

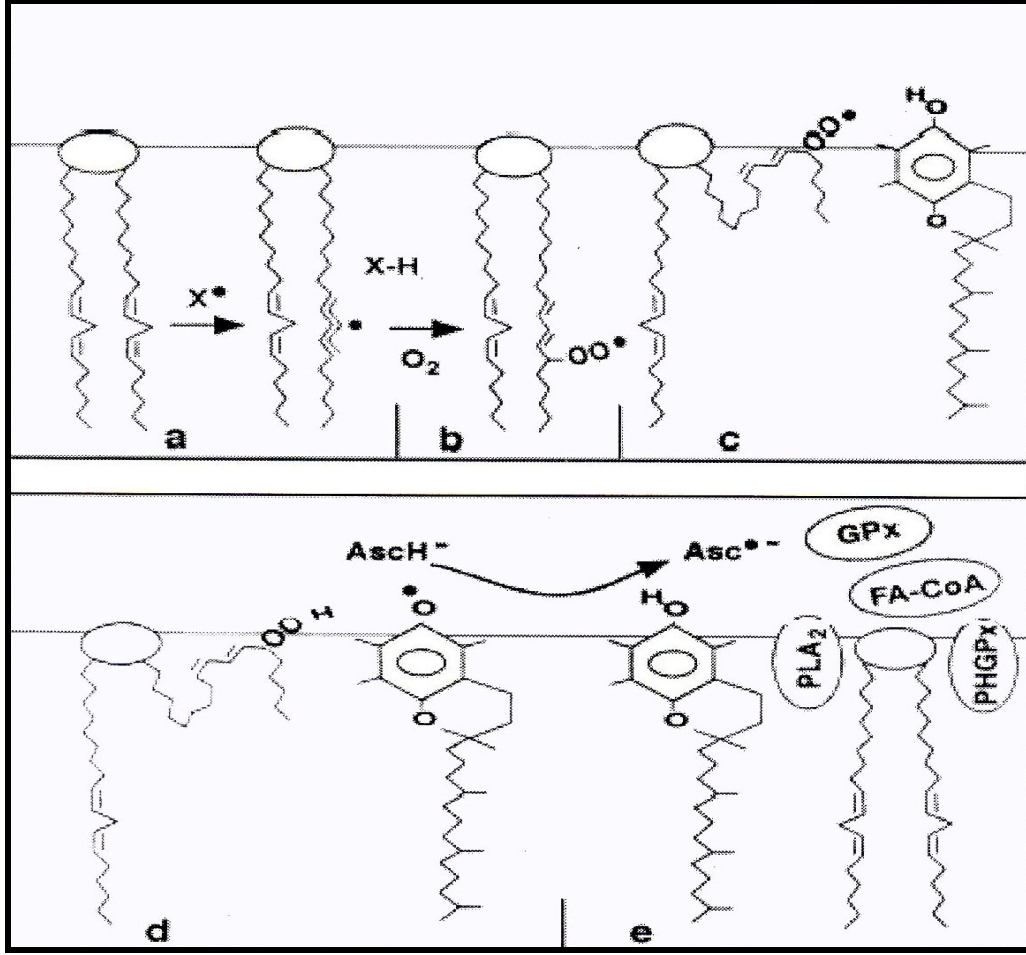






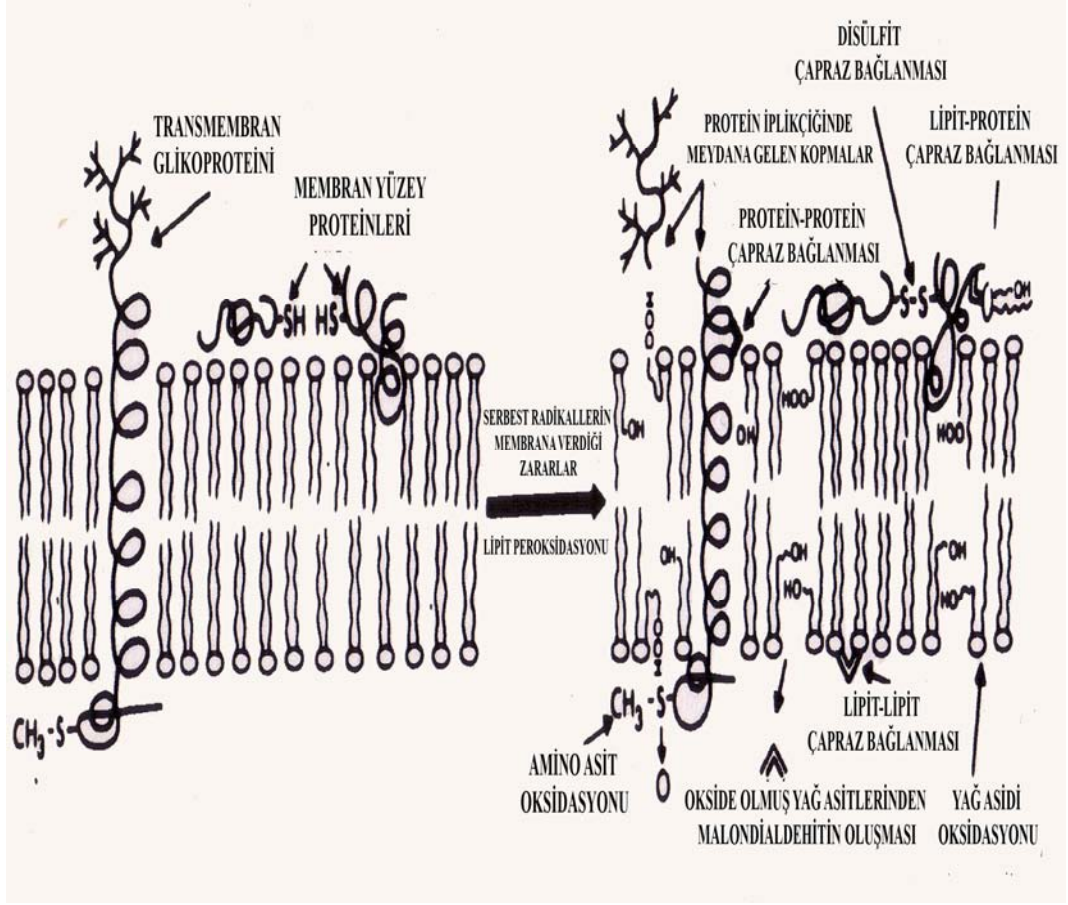
Şekil 2.5: Lipit peroksidasyonunun başlama, ilerleme ve yıkım evreleri (Halliwell ve Gutteridge'den, 1999)

Lipit peroksidasyonu kendisini tetikleyerek yeniden lipit radikalleri ve peroksitleri oluşturabilmektedir. Hidroperoksitlerin ve sekonder peroksidasyon ürünlerinin konsantrasyonları arttıkça (Şekil 2.5); membranların akışkanlıkları azalmakta, hücre dışındaki çeşitli iyon ve maddelerin hücre içine geçişi kolaylaşarak sonuçta hücrenin yapısında ve işlevlerinde çeşitli bozukluklar ortaya çıkmaktadır (Kindl, 1993; Kwon ve diğ., 2003; Li ve diğ., 2006) (Şekil 2.6, Şekil 2.7).



Şekil 2.6: Lipit peroksidasyonunun sonlanma evresi: (a)  $X^{\bullet}$  radikali lipit peroksidasyonunu başlatmakta, (b) Membran oksitlenerek peroksil radikali ( $ROO^{\bullet}$ ) oluşmakta, (c) Peroksil radikali  $\alpha$ -tokoferolün de yer aldığı membranın lipofilik kısmına bağlanmakta (d) Peroksil radikali  $\alpha$ -tokoferol tarafından redüklenerek hidroperoksite ( $ROOH$ ) dönüşürken; tokoferoksil radikali meydana gelmekte (e) Tokoferoksil radikali askorbat ( $AscH^{\bullet}$ ) ile indirgenirken meydana gelen askorbat radikali ( $Asc^{\bullet-}$ ) ilgili enzimlerce askorbata dönüştürülmektedir (Buettner'den, 1993).

Lipit peroksidasyonu; çok tehlikeli bir zincir reaksiyonu olarak doğrudan membran yapısına, dolaylı olarak da reaktif aldehytlar üretmek suretiyle diğer hücre bileşenlerine zarar vermektedir (Luna ve diğ., 1994) (Şekil 2.7). Peroksidasyonla oluşan ve mutajenik, genotoksik, karsinojenik etkileri ortaya çıkarılan malondialdehit (MDA); membran kısımlarının çapraz bağlanmasına ve polimerizasyonuna yol açmaktadır (Mercan, 2004, Li ve diğ., 2006). Bu durum, membranın yapısında deformasyona neden olarak iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi önemli hücresel özelliklerin değişimine neden olmaktadır (Luna ve diğ., 1994; Smirnoff, 2005; Li ve diğ., 2006; Zhang ve diğ., 2007) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7: Lipit peroksidasyonu sonucunda hücre membranı bileşenlerinin oksidasyonu ve çeşitli kısımların çapraz bağlanmaları ile meydana gelen değişimler (Halliwell ve Gutteridge, 1999)

Sonuçta, membranların bu şekildeki oksidatif yıkımı; dokularda ciddi bozuklukların ortaya çıkmasına sebep olmakta hatta stresin derecesine bağlı olarak yaşlanma ve hücre ölümü gibi olaylar meydana gelmektedir (Girotti, 1985; Lin ve diğ., 1988; Stadtman, 1992; Berglund ve diğ., 2002; Li ve diğ., 2006; Ahsan ve diğ., 2007) (Şekil 2.7).

Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan bileşikler, serbest oksijen türlerinin teşvik ettiği oksidasyona bağlı hücre ve doku zararlarının önlenmesinde büyük önem taşımaktadır (Dalton ve diğ., 1986; Baccouch ve diğ., 1998; Rice-Evans, 2001; Mittler, 2006; Srivastava ve diğ., 2006; Azevedo ve diğ., 2007) (Tablo 2.3, Şekil 2.8).

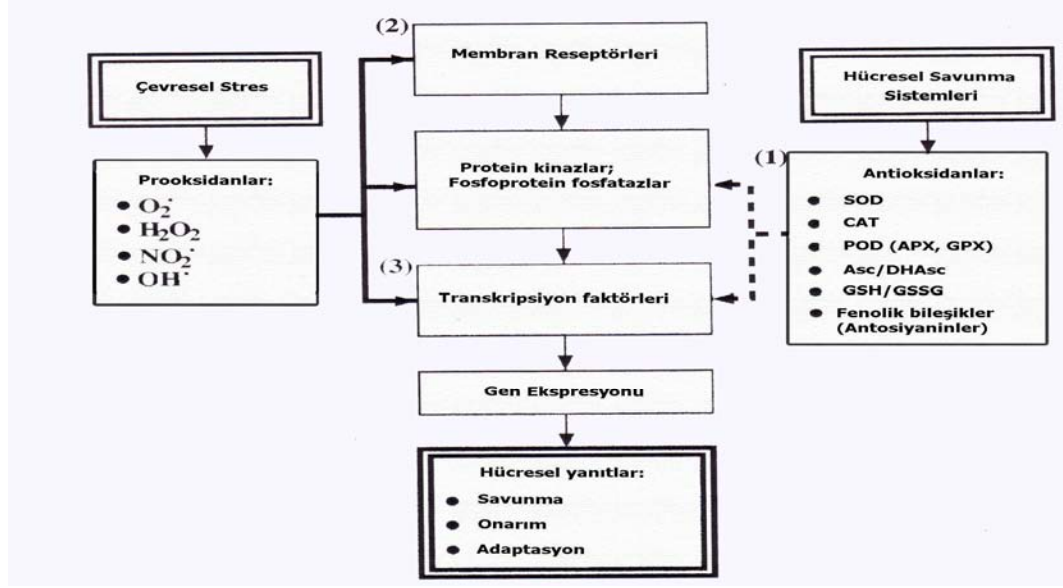
Tablo 2.3: Başlıca antioksidan maddeler ve işlevleri

Antioksidanlar	İşlevleri
<b>Enzimatik antioksidanlar</b>	
Superoksit dizmutaz	Superoksitin hidrojen peroksite dönüştürülmesi
Katalaz	Hidrojen peroksitin suya yıkımı
Glutasyon peroksidaz	Hidrojen peroksitin indirgenerek detoksifiye edilmesi
Askorbat peroksidaz	Hidrojen peroksitin indirgenerek detoksifiye edilmesi
<b>Enzimatik olmayan antioksidanlar</b>	
Ürik asit	Bakır ve demirin bağlanması
Glutasyon	Okside olmuş E vitamininin redüklenmesi (rejenerasyonu)
Transferrin, ferritin	Okside olmuş reaktif formdaki bakır ve demirin bağlanması
<b>Besin değeri olan antioksidanlar</b>	
$\alpha$ -Tokoferol (E vitamini)	Membranlardaki radikallerin temizlenerek etkisizleştirilmesi
Karotinoidler ( $\beta$ -karoten, A vitamini)	Membranlardaki radikallerin etkisizleştirilmesi
Askorbik asit (C vitamini)	E vitamininin, glutasyonun ve flavonoidlerin rejenerasyonu
Flavonoidler (Antosiyaninler, vs.)	Radikallerin temizlenmesi ve metal iyonlarının kelatlanması

Bu tablo Barry Halliwell ve John M.C. Gutteridge'den (1999) modifiye edilmiştir.

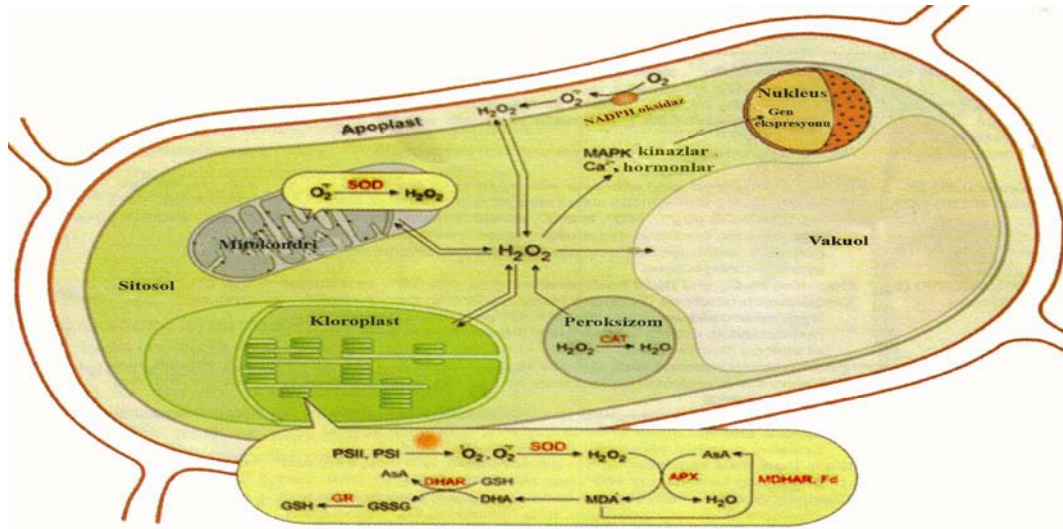
Reaktif oksijen türlerinin (ROS) belirtilen toksik etkilerinin yanı sıra; biyolojik işlevlerin düzenlenmesi ve kontrolünde olumlu rolleri olduğu da bilinmektedir (Mittler, 2002; Gapper ve Dolan, 2006; Halliwell, 2006; Mittler, 2006). Bunlardan birisi olan  $H_2O_2$ 'in; bir sinyal molekülü olarak görev yaptığı ve bitkilerde özellikle lignifikasyon ve suberinizasyonu teşvik ederek hücre çeperinin yapısının şekillenmesinde, mekanik desteğin sağlanmasında ve böylece hücrelerin infeksiyon ve yaralanmalara karşı korunmasında yer aldığı saptanmıştır (De Vos ve Schat, 1991; Chen ve diğ., 2000; Apel, 2004; Shao ve diğ., 2005; Gechev ve diğ., 2006).

Belirli miktarlardaki ROS'in; çimlenme (Bailly, 2004), büyüme (Hunter ve Welkie, 1977, Mocquot ve diğ., 1996; Gapper ve Dolan, 2006; Perales-Vela ve diğ., 2007), gravitropizma (Elstner ve diğ., 1988), stomanın açılıp kapanması (Mittler, 2002; 2006), programlanmış hücre ölümü (Hernandez-Jimenez ve diğ., 2002; Kwon ve diğ., 2003; Gechev ve diğ., 2006), yaralanma ve patojenlere karşı yanıtların oluşumu (Dixon ve Paiva, 1995; Mittler, 2006) gibi büyüme, gelişme ve savunma gibi çeşitli biyolojik olaylarda aktif rol aldığı da kaydedilmiştir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8: Çevresel stres etmenleri ve hücrel savunma sistemlerinin uyarılması (1), (2) ve (3)'te belirtilen kısımlar stres etmenleri sonucunda oluşan serbest oksijen türleri (prooksidanlar) tarafından aktive edilerek hücrelerin savunma, onarım ve adaptasyon genlerinin ekspresyonunu teşvik etmektedir (Hoshi ve Heinemann'dan, 2001)

Bitkilerdeki antioksidan savunma sistemi oldukça karmaşıktır ve aktif oksijen türlerinin detoksifikasyon mekanizmaları enzimatik aktivasyon (superoksit dizmutaz, katalaz, askorbat peroksidaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz) ve enzimatik olmayan (askorbat, glutatyon, tokoferol, karotinoid ve flavonoid, fenolik bileşikler ve antosiyaninler gibi) antioksidanlardan ibarettir (Hernandez-Jimenez ve diğ., 2002; Mittler, 2002; Kwon ve diğ., 2003; Mittler, 2006) (Tablo 2.3), (Şekil 2.8), (Şekil 2.9).

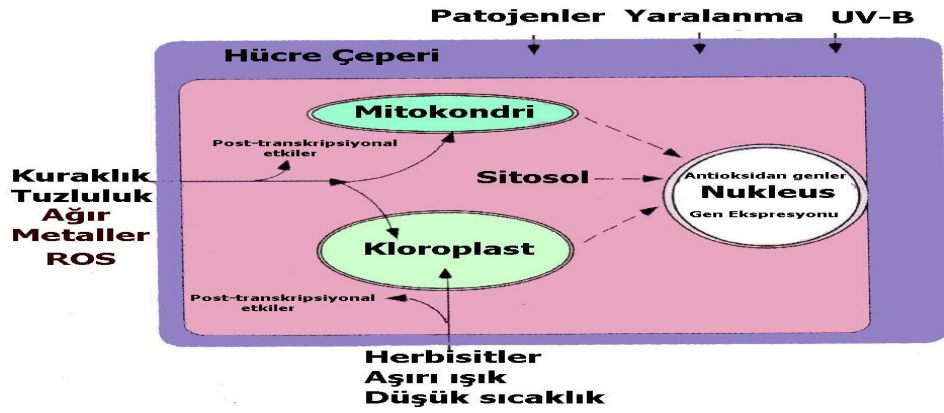


Şekil 2.9: Bitki hücrelerinde antioksidan savunma sistemleri (Gechev ve diğ., 2006)



## 2.5. BİTKİLERDE ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Bitkilerde metabolik aktiviteler sonucunda oluşan serbest oksijen türlerinin (ROS) üretimi; ağır metaller de dahil olmak üzere çeşitli çevresel stres etmenlerince teşvik edilmektedir (Aust ve diğ., 1985; Beinert, 1991; Akkuş, 1995) (Şekil 2.8, Şekil 2.9). Hücrelerde aşırı miktarda biriken ROS; güçlü oksidan etkileri ile biyolojik makromoleküller ve membranlara saldırarak işlevlerini bozan özelliklere sahiptir (Roberfroid, 1995; Colton, 1999; Dat ve diğ., 2000; Blokhina ve diğ., 2003; Ahsan ve diğ., 2007). Abiyotik ve biyotik stres koşullarında etkinliği artan ROS, antioksidan genlerin ekspresyonunu aktive ederek hücresel savunma sistemini uyarmaktadır (Dixon ve Paiva, 1995; Grene, 2002; Mittler, 2006) (Şekil 2.8, Şekil 2.9, Şekil 2.10).

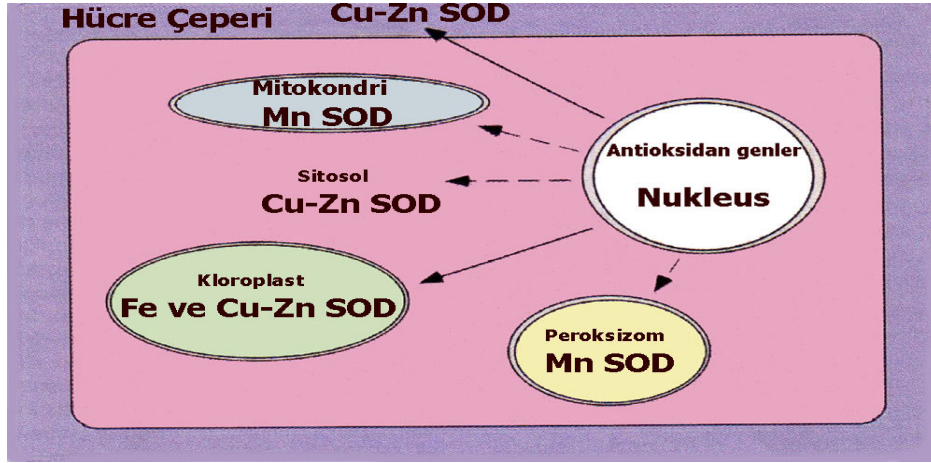


Şekil 2.10: Reaktif oksijen türlerinin (ROS) abiyotik ve biyotik stres koşullarında çeşitli hücre kısımlarındaki antioksidan genleri aktivasyonu (Grene'den, 2002).

Normal koşullar altında hücreler reaktif oksijen türlerini sahip oldukları antioksidan sistem tarafından etkin bir şekilde uzaklaştırabilmektedir. Ancak, ağır metal (bakır) toksisitesi gibi çeşitli çevresel stres koşullarında, ROS üretimi antioksidan sistemin kapasitesini aşmakta ve protein oksidasyonu, lipit peroksidasyonu ile nukleik asit baz modifikasyonları gibi sitotoksik değişimlere neden olmaktadır (De Vos ve diğ., 1989). Bitkiler serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerinden korunmak için; superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat, guaiakol ve glutatyon peroksidaz (APX, GuPX, GPX), glutatyon redüktaz (GR), fenilalanin amonyak liyaz (PAL) gibi enzimler ile düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlardan (askorbat, glutatyon,  $\alpha$ -tokoferol, karotinoidler, flavonoidler, fenolik bileşikler ve antosiyaninler) oluşan gelişmiş bir antioksidan sisteme sahiptirler (Grene, 2002; Halliwell, 2006) (Tablo 2.3) (Şekil 2.8).

### 2.5.1. Superoksit Dismutaz (SOD)

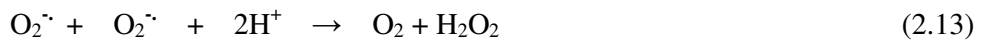
Superoksit dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1) enzimi, Mc Cord ve Fridovich tarafından 1968'de keşfedilmiştir. Superoksit dismutazın aktif metal iyonu merkezine, amino asit yapısına, alt ünitelerinin sayısına, kofaktörlerine ve diğer özelliklerine bağlı olarak farklı izoenzimleri bulunmaktadır. Bunlardan Mn-SOD mitokondri ve peroksizomlarda; Cu-Zn SOD sitosolde, kloroplastlarda ve hücre çeperi ile membran arasındaki (ekstrasellüler) alanlarda; Fe-SOD ise kloroplastlarda yerleşim göstermektedir (Liochev ve Fridovich, 2007). Ayrıca bazı bakterilerde de Fe-SOD olduğu saptanmıştır (Giannopolitis ve Ries; 1977; Afanas'ev, 1989) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11: Superoksit dismutaz (SOD) izoenzimlerinin hücrelerde bulunduğu kısımlar ve bunların antioksidan genler tarafından uyarılması (Grene'den, 2002).

Aerobik canlılarda katalitik aktivitesi çok yüksek bir metalloenzim olan SOD, superoksit radikalinin ( $O_2^{\cdot -}$ ), serbest oksijen ( $O_2$ ) ve daha az reaktif bir bileşik olan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) dismutasyonunu katalizlemektedir (Mc Cord ve Fridovich, 1968; 1969; Beauchamp ve Fridovich, 1971; Halliwell ve Gutteridge, 1998; 1999).

SOD



Bu reaksiyon oksidan strese karşı ilk savunma olarak da adlandırılabilir, çünkü, superoksit zincirleme radikal tepkimelerinin güçlü bir başlatıcısıdır. Bu sistem aracılığıyla hücrel  $O_2^{\cdot -}$  düzeyleri kontrol altında tutulmaktadır (Afanas'ev, 1989).

### 2.5.2. Katalaz (CAT)

Katalaz (CAT) (EC 1.11.1.6) enzimi, Summer ve Dounce tarafından 1937'de kristalize halde saflaştırılmıştır. Bu enzim, her biri yapısında  $Fe^{+3}$  bulunduran 4 tane hem grubundan oluşmuş bir hemoproteindir. Özellikle peroksizomlarda yer alan katalaz, hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizlemektedir.

CAT



Katalaz enzimi hücrelerin metabolik etkinlikleri sonucunda oluşan ve çevresel stres koşullarında miktarı artan  $H_2O_2$  bileşiklerini tamamen su ve moleküler oksijene indirgeyerek enzimatik detoksifikasyonda çok önemli rol almaktadır (Beers ve Sizer, 1952; Dhindsa ve diğ., 1981; Scandalios, 1994; Willekens ve diğ., 1997).

### 2.5.3. Peroksidaz (POD)

Peroksidazlar (POD) (EC 1.11.1.7), aktif merkezlerinde demir ya da selenosistein içeren 4 alt birimden oluşan tetramerik yapıda izoenzimlerdir. Hidrojen peroksit ve büyük moleküllu lipit hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludurlar (Chimi ve diğ., 1991; Chen ve diğ., 2002). Peroksidazların bitkilerde lignifikasyon, oksin katabolizması, patojenlere ve çeşitli çevresel stres koşullarına karşı savunma gibi çeşitli metabolik ve antioksidan rolleri vardır (Miller ve Schreier, 1985; Bunkelmann ve Trelease, 1996; Laloue ve diğ., 1997; Morales ve Barcelo, 1997; Bishop, 2002; Dehon ve diğ., 2002; Erdei ve diğ., 2002). Bitkilerde peroksidazlar; kloroplast, sitosol ya da peroksizomlarda yerleşim gösteren ve elektron vericisi olarak tercihen askorbat kullanan askorbat peroksidaz (APX) ile sitosol ya da vakuolde yer alan ve elektron vericisi olarak glutatyon (GPX) ya da guaiakol ve diğer fenolik bileşiklerini kullanan guaiakol peroksidaz (GuPX) izoenzimleri olmak üzere başlıca üç gruba ayrılmaktadır.

#### 2.5.3.1. Askorbat Peroksidaz (APX)

Bu gruptaki peroksidaz izoenzimleri (APX) (EC 1.11.1.11), özellikle kloroplastlarda (Asada, 1984), sitosolde (Asada, 2006) ve peroksizomlarda (Yamaguchi ve diğ., 1995) yerleşim göstermekte ve organellerde oluşan  $H_2O_2$ 'i temizleyici işlevleri bulunmaktadır (Klapheck ve diğ., 1990; Mehlhorn ve diğ., 1996; Noctor ve Foyer, 1998).



Hücre çeperi ve plazma membranı arasında (apoplastik alanda) yer alan APX enzimleri, lignin biyosentezinde ve bunların sekonder hücre çeperlerinde birikiminde rol alırken (Sato ve diğ., 1993; Morales ve Barcelo, 1997; Yamasaki ve diğ., 1997; Yamasaki ve Grace, 1998); apoplazma ve vakuolde bulunan peroksidazların her ikisi de bitkilerin yaralanma ve infeksiyon durumlarında suberin ve kahverengi maddelerin oluşumunu teşvik ederek (Dixon ve Paiva, 1995; Lavid ve diğ., 2001; Takahama, 2004) ayrıca çeşitli stres koşullarında aktivitelerini arttırarak (Gara ve diğ., 2000; Otte, 2001; Schützendübel ve Polle, 2002) bitkiyi koruyucu özellikleri bulunmaktadır.

#### 2.5.3.2. Guaiakol Peroksidaz (GuPX)

Bu gruptaki peroksidaz izoenzimleri (GuPX) (EC 1.11.1.7), vakuolde oluşan ya da hücrenin diğer kısımlarından difüzyonla vakuole taşınan  $H_2O_2$ 'in yıkımında görev almaktadır (Morales ve Barcelo, 1997; Lepeduš ve diğ., 2004). Fenolik bileşikleri elektron vericisi olarak tercih eden guaiakol peroksidaz izoenzimlerinin çok daha çeşitli işlevleri bulunmaktadır (Yamasaki ve diğ., 1997; Takahama ve Oniki, 1992; 2000; Takahama, 2004). Yamasaki ve Grace (1998), vakuolün önemli miktarlarda fenolik bileşik, GuPX ve askorbat içerdiğine ve bunların çeşitli stres koşullarında bitki hücrelerinin diğer kısımlarında oluşan  $H_2O_2$ 'i yok etmek üzere bir çeşit detoksifikasyon mekanizması olarak iş gördüklerine dikkat çekmektedir.

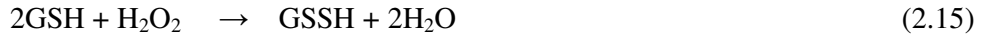
Takahama ve Oniki (1992) tarafından ileri sürülen askorbat-fenolik bileşik-peroksidaz sistemi hipotezine göre ise; vakuol ve tonoplastlarda oluşan ya da hücrenin diğer kısımlarından difüzyonla vakuole taşınan  $H_2O_2$ 'in indirgenmesi, burada bulunan fenolik bileşiklerin elektron vericisi olarak kullanıldığı peroksidazlar tarafından katalizlenmekte ve bu işlem sonunda okside olan fenoliklerin (fenoksil radikallerinin) redüksiyonları başka bir antioksidan bileşik olan askorbat tarafından gerçekleşmektedir. Oksitlenen askorbat ise Halliwell-Asada metabolik yolundaki (Şekil 2.10) çeşitli enzimler aracılığı ile tekrar eski haline dönüştürülmektedir (Noctor ve Foyer, 1998). Toksik ürünler olan fenoksil radikallerinin, bitkilerin çeşitli çevresel stres koşullarına karşı dayanıklılığında önemli bir teşvik etmeni olarak görev yaptığı da ileri sürülmektedir (Takahama ve Oniki, 1992; Sakihama ve diğ., 2002; Takahama, 2004). Peroksidazların ağır metallerle ilişkileri ile ilgili çok az bilgi mevcuttur. Bitkilerde ağır metaller de dahil olmak üzere pek çok atık ve toksik bileşiğin hücre içinde birikim gösterdiği kısımlar olan vakuoller;

aynı zamanda antosiyaninler, flavonoidler ve hidroksisinnamik asit esterleri gibi çeşitli fenolik bileşikler ile organik asitlerin depo edildiği organellerdir (Hutzler ve diğ., 1998). Vakuollerin içeriğinde bulunan ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in GuPX enzimi ile yıkımı sırasında oksitlenen fenolik bileşiklerin, ağır metal iyonları ile etkileşime girerek daha kararlı (stabilize) oldukları ve yarı ömürlerinin arttığı ileri sürülmektedir (Takahama, 2004). Meydana gelen bu fenoksil radikallerinin oldukça toksik etkilere sahip oldukları, canlı hücrelerde serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlattıkları (Synge, 1975; Stochs ve Bagchi, 1995; Sakihama ve diğ., 2000; 2002; Son ve Lewis, 2002), örneğin; kök hücre çeperlerindeki ağır metal toksisitesinin bu şekilde ortaya çıktığı kaydedilmiştir (Pourcel ve diğ., 2007).

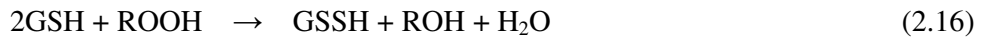
#### 2.5.3.3. Glutasyon Peroksidaz (GPX)

Bu gruptaki peroksidaz izoenzimleri (GPX) (EC 1.11.1.7), elektron kaynağı ya da substrat olarak tercihen glutasyonu kullanarak; sitosolde ya da hücrenin diğer kısımlarında oluşan hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve diğer lipit peroksitlerin (ROOH) yıkımı sırasında redüklenmiş glutasyonun (GSH), okside olmuş glutatyona (GSSG) dönüşümünü katalizlemektedir. GPX, bu işlem sırasında glutasyonu (GSH) glutasyon disülfide (GSSH) yükseltgerken; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i de suya dönüştürerek detoksifiye etmekte ve böylece membran lipidlerini oksidan strese karşı korumaktadır (Rennenberg, 1982).

GPX



GPX



Organizmaların glutasyon depoları sınırlı olduğu için oluşan bu okside formun (GSSH), ileride kullanılmak üzere tekrar redükte forma (GSH) dönüştürülmesi gerekmektedir.

#### 2.5.4. Glutasyon Redüktaz (GR)

Glutasyon redüktaz enzimi (GR) (EC 1.6.4.2), NADPH varlığında glutasyon disülfiti (GSSG) tekrar redükte glutatyona (GSH) çevirmektedir (Foyer ve Halliwell, 1976).

GR



### 2.5.5. Fenilalanin Amonyak Liyaz (PAL)

Fenilalanin amonyak liyaz (PAL; EC 4.3.1.5), fenilpropanoid metabolik yolunda yer alan kilit enzimlerden en önemlisidir ve fenolik bileşiklerin hücrelerdeki yapısal ve savunmaya bağlı işlevlerinden sorumludur (Dixon ve Paiva, 1995; El Shora, 2002). PAL enzimi, L-fenilalanin amino asidinin deaminasyonu ile trans-sinamik asidin oluşumunu katalize etmektedir. Çeşitli çevresel stres koşullarında PAL aktivitesinin artması bu enzimin bitkilerin savunma mekanizmasındaki önemini ortaya koymaktadır (Santiago ve diğ., 2000). Abiyotik ve biyotik çevresel stres etmenlerinde peroksidaz ve fenilalanin amonyak liyaz enzimlerinin aktivitelerindeki artış da bitkilerdeki savunma sisteminin önemli göstergelerinden biri olarak kabul edilmektedir (Dixon ve Paiva, 1995; Santiago ve diğ., 2000; El Shora, 2002; Mittler, 2002).

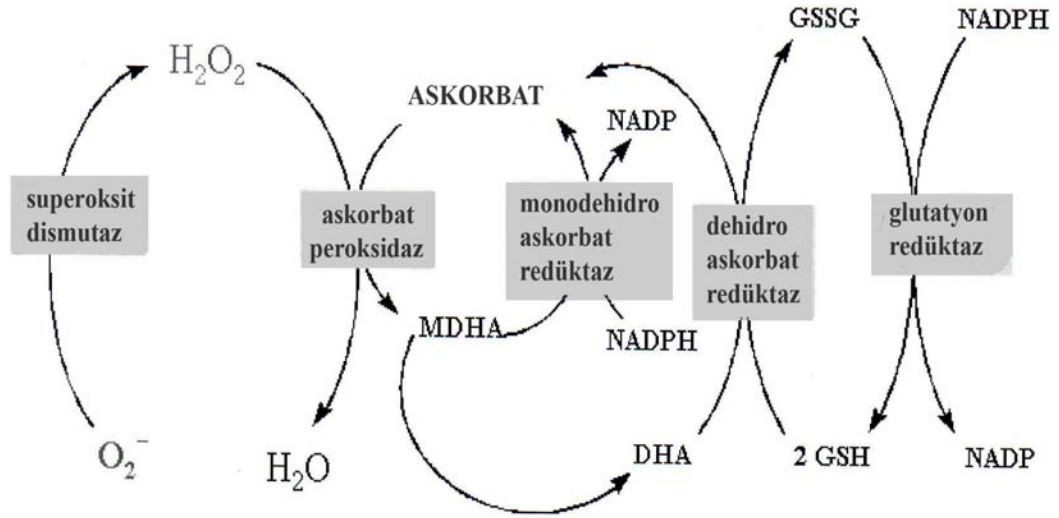
Bitkilerde ağır metal stresine karşı antioksidan savunma bu şekilde enzimatik mekanizma ile sağlanmakta ve oluşan serbest oksijen türlerinin zararlı etkileri azaltılmaktadır. Hücrelerdeki enzimatik olmayan belli başlı antioksidan etkinlikler ise; askorbat, glutatyon,  $\alpha$ -tokoferol ile karotinoid ve flavonoidler (fenolik bileşikler, antosiyaninler) gibi belli başlı antioksidan bileşiklerce metal iyonlarının serbest radikal tepkimelerine girmelerinin önlenmesi ile gerçekleşmektedir (Mittler, 2006).

### 2.5.6. Askorbat (C Vitamini)

Askorbik asit; sulu ortamlarda serbest radikallerle tepkimeye girebilme yeteneğinde olan suda çözünür bir vitamin ve güçlü bir antioksidandır. Askorbat, hücrelerdeki  $H_2O_2$ 'i yok etmek üzere askorbat peroksidaz (APX) enzimine elektron vericisi olarak bitki antioksidan sisteminin önemli bir bileşimidir (Burkitt ve Gilbert, 1990; Klapheck ve diğ., 1990; Çakmak ve Horst, 1991; Bunkelmann ve Trelease, 1996; Mehlhorn ve diğ., 1996; Laloue ve diğ., 1997; Asada, 2006).

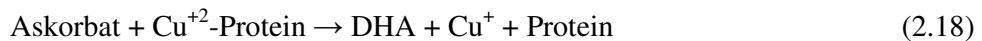
Güçlü bir indirgeyici ajan olan askorbat; superoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksit radikali ( $\cdot OH$ ) ve singlet oksijen ( $^1O_2$ ) ile kolayca reaksiyona girerek bunları temizleme ve ortamdan uzaklaştırma özelliklerine sahiptir (Bodannes ve Chan, 1979; Olmos ve diğ., 1997; Sarma ve diğ., 1997; Noctor ve Foyer, 1998; Gara ve diğ., 2000).

Askorbat; ROS üzerinde doğrudan etkili olabildiği gibi okside olmuş glutatyon (GSSG), tokoferoksil ya da fenoksil radikallerinin, Halliwell Asada (askorbat-glutatyon) döngüsü ile redüklenmesinde yer alarak dolaylı yoldan da antioksidan özellikler göstermektedir (Noctor ve Foyer, 1998). Bu sırada kendisi de dehidroaskorbata (DHA) okside olan askorbatın tekrar redüklenmesi için glutatyon (GSH) devreye girmekte ve böylece hücrelerdeki serbest oksijen radikalleri ile okside olmuş antioksidan bileşikler, askorbat-glutatyon döngüsü ile yeniden indirgenerek antioksidan savunmada işlev görmektedir. (Nakano ve Asada, 1981; Mehlhorn ve diğ., 1996) (Şekil 2.12, Şekil 2.13).



Şekil 2.12: Halliwell-Asada yolu (Askorbat-Glutatyon Döngüsü) AsA, askorbat; APX, askorbat peroksidaz; MDHA, monodehidroaskorbat; MDHAR, monodehidroksiaskorbat redüktaz; DHA, dehidroaskorbat; DHAR, dehidroaskorbat redüktaz; GSH, redüklenmiş glutatyon; GSSG, oksitlenmiş glutatyon; GR, glutatyon redüktaz (Çakmak, 1994; Alscher ve diğ., 1997; May ve diğ., 1998a; Noctor ve Foyer, 1998; Asada, 2006; Halliwell, 2006)

Askorbik asit; ayrıca  $\text{Cu}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$  iyonlarını  $\text{Cu}^{+}/\text{Fe}^{+2}$  ye indirgeyen ve proteinlere bağlı durumda bulunan demir ya da bakırın serbest hale geçmesini sağlayan, süperoksit dışındaki tek hücreli bir ajan olması nedeniyle; antioksidan özelliklerinin yanında prooksidan etkilere de sahiptir. Böylece, askorbat bileşikleri metal iyonları ile tepkimeye girdiklerinde prooksidanlara dönüşebilmekte ve bu şekilde hücrelerdeki bakır ya da demiri Fenton reaksiyonuna uygun hale getirerek (Kehrer, 2000), serbest radikal zincir reaksiyonlarının oluşumunu teşvik etmektedir (Caillet ve diğ., 2007).



### 2.5.7. Glutasyon (GSH)

Glutasyon (GSH), serbest radikalleri indirgeyici özelliklere sahip önemli bir antioksidan bileşimidir. Glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden meydana gelmiş bir tripeptid olan GSH'a; antioksidan özelliğini sistein amino asidinde bulunan reaktif tiyol grubu kazandırmaktadır. GSH'ın, hücrelerin oksidan strese karşı korunmasında ve özellikle  $\text{OH}^-$  ve  $\text{O}_2^{\cdot 1}$  gibi serbest oksijen türlerinin temizlenmesinde (Foyer ve Halliwell, 1976; Meister, 1981; Rennenberg ve Lamoureux, 1990; Hausladen ve Alscher, 1993; Noctor ve Foyer, 1998; Morelli ve Scarano, 2004) önemli rolleri vardır.

Güçlü bir antioksidan bileşiği olan GSH; aynı zamanda birçok enzimin prostetik grubudur ve yapısında bulunan tiyollerin ROS ile kurdukları bağlar ile doğrudan ya da antioksidan enzimlerin kofaktörü ya da koenzimi olarak dolaylı yollardan detoksifikasyon tepkimelerinde yer almaktadır (Rennenberg, 1982; Rennenberg ve Lamoureux, 1990; Hausladen ve Alscher, 1993; Morelli ve Scarano, 2004).

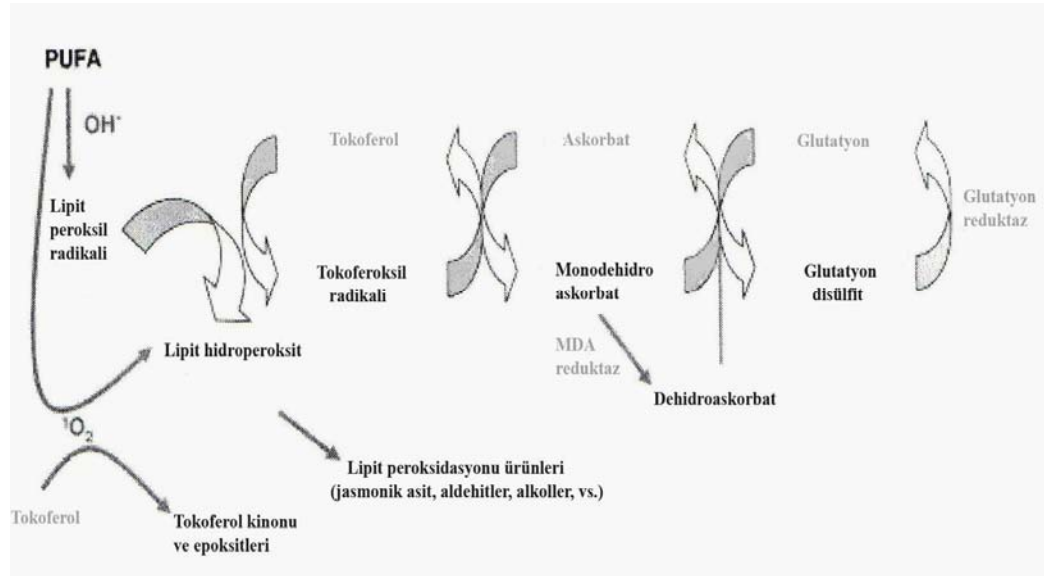
Askorbat-glutasyon döngüsünde bulunan enzimlerden glutasyon redüktazın (GR) koenzimi olan GSH; oksitlenmiş askorbatın tekrar indirgenmesinde (Noctor ve Foyer, 1998) ve böylece lipid peroksidasyonunun önlenmesinde (Rennenberg, 1982) görev yaparak önemli antioksidan özellikler göstermektedir (Hausladen ve Alscher, 1993; Morelli ve Scarano, 2004) (Şekil 2.12, Şekil 2.13) (Denklem 2.17).

GSH, bazı moleküllerin hücre içi taşınmasında aracılık ederek de birçok toksik bileşiğin detoksifikasyonunda rol oynamaktadır. Bunlardan en önemlisi olan fitokelatinler (PCs), enzimatik olarak GSH'dan sentez edilen ve  $\gamma$ -glutamil-sistein ünitelerinden meydana gelen kısa peptitlerdir. PCs, bakır da dahil olmak üzere toksik metal iyonlarıyla kompleks yapılar oluşturarak, ağır metallerin vakuole taşınmasını ve böylece hücrenin diğer kısımlarından ayrılmasını sağlayan bileşiklerdir (Chen ve Goldsbrough, 1994).

Bir fitokelatin öncülü olan GSH; demir ve bakırın bağlı formda kalmasını ve proteinlerdeki -SH gruplarının indirgenmiş halde tutulmasını sağlayarak biyomoleküllerin oksidasyonunu önlemekte (Rennenberg ve Lamoureux, 1990) ve protein ve enzimlerin inaktivasyonunu engellemektedir (Hausladen ve Alscher, 1993).

Etkili bir indirgenme yükseltgenme (redoks) tamponu olan glutasyon; hücre içerisinde redüklenmiş formda (GSH) bulunmaktadır ve endojen olarak üretilen peroksitleri, glutasyon peroksidaz (GPX) enzimi aracılığıyla indirgemektedir (Denklem 2.15, 2.16).

Okside olmuş glutasyonun (GSSH) hücrede birikimi ve GSH/GSSH oranı organizmalardaki oksidan stresin önemli bir ölçütüdür (Noctor ve Foyer, 1998). Okside glutasyonun konsantrasyonunun aşırı derecede artışı birçok enzime zarar vermekte; proteinlerdeki sülfidril grupları ile etkileşime girerek protein-glutasyon disülfidril yapılarını meydana getirmektedir (Hausladen ve Alscher, 1993).



Şekil 2.13: Hidroksil radikalinin (OH<sup>·</sup>) başlattığı lipit peroksidasyonunun engellenmesinde  $\alpha$ -tokoferol, askorbat ve glutasyon bileşiklerinin rolleri (May ve diğ., 1998a)

Glutasyonun etkin olarak hücreleri koruyabilmesi için büyük bir kısmının redükte halde tutulması gerekmektedir ve NADPH'a bağlı olan bu tepkimeyi glutasyon redüktaz (GR) enzimi katalizlemektedir (Foyer ve Halliwell, 1976; Morelli ve Scarano, 2004) (Denklem 2.17) (Şekil 2.13, Şekil 2.14).

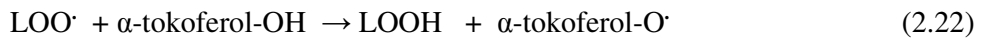
SOD, APX ve CAT aktiviteleri arasındaki denge; hücrelerdeki  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$ 'i belli düzeylerde tutmak ve ayrıca metal iyonlarına bağlı olarak Haber-Weiss tepkimeleri sonucunda üretilen aşırı derecede toksik  $\cdot OH$  oluşumunu önlemek üzere büyük önem taşımaktadır (Rennenberg, 1982; Rennenberg ve Lamoureux, 1990; Mittler, 2006).

GSH; GPX ve GR gibi pek çok enzimin çalışmasında olduğu kadar,  $OH\cdot$  radikali ile singlet oksijenin temizlenmesi, hidrojen peroksit ve lipit peroksitlerin detoksifikasyonu ile askorbat ve  $\alpha$ -tokoferolün tekrar aktif formlarına dönüşümünde de rol alan (Rennenberg ve Lamoureux, 1990) (Şekil 2.13, 2.14) çok işlevli bir antioksidan bileşiği olarak oksidan stresin zararlarının önlenmesinde büyük önem taşımaktadır.

### 2.5.8. $\alpha$ -Tokoferol (E Vitamini)

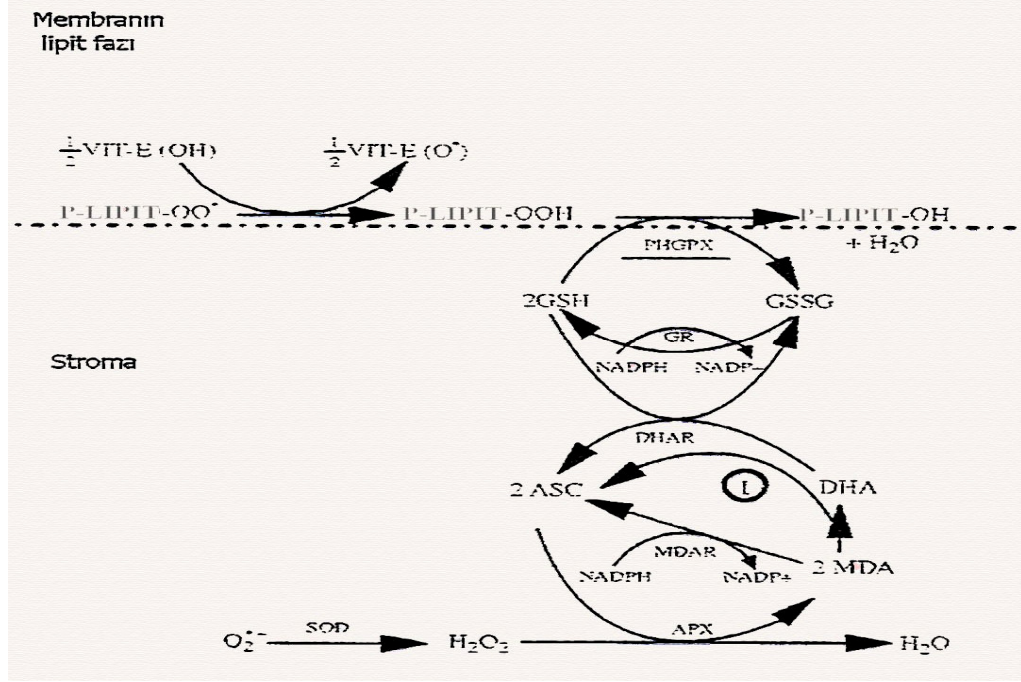
E vitamini tokoferol yapısında olup  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve  $\delta$  şeklindeki dört tipin karışımıdır. En aktif formu olan  $\alpha$ -tokoferol, doğal dağılımı en geniş ve biyolojik aktivitesi en fazla olanıdır. Yağda çözünür bir vitamin ve güçlü bir antioksidan olan  $\alpha$ -tokoferol, yapısında bulunan fenolik hidroksil gruplu aromatik halka vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturmakta ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanmaktadır. Özellikle membranlara bağlı antioksidan bileşik olarak hücrenin ve diğer hücrel bileşenlerin membranlarında ve lipoproteinlerde bulunmaktadır (Munné-Bosch, 2007).

Membranlardaki oksijen radikallerinin ana temizleyicisi olan  $\alpha$ -tokoferoller, lipit peroksil radikallerini yıkarak lipit peroksidasyonun zincir reaksiyonlarını sonlandırdığı için zincir kırıcı bir antioksidan olarak da bilinmektedir (Halliwell, 2006) (Şekil 2.12).  $\alpha$ -tokoferollerin yapılarında, membranların hidrofobik kısmına kolayca hidrojen iyonu verebilen  $-OH$  grubu bağlıdır ve bu şekilde lipit peroksidasyonu sırasında oluşan peroksil ve alkoksil radikalleri yağ asidi yerine  $\alpha$ -tokoferolle birleşerek reaksiyon zinciri kırılmış olmaktadır (Mittler, 2002, Halliwell, 2006; Munné-Bosch, 2007).

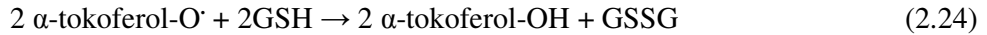
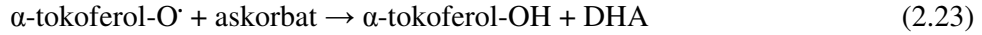


Böylece,  $\alpha$ -tokoferol yeni bir radikal olan  $\alpha$ -tokoferol- $O\cdot$ 'e dönüştürülmüş olur. Oluşan tokoferoksil radikali stabildir, başka bir yağ asidiyle birleşebilme aktivitesi düşüktür ve dolayısıyla kendi kendine yeni bir lipit peroksidasyonunu başlatmak için yeterince etkin değildir.  $\alpha$ -tokoferol ile askorbatın döngüsel bir şekilde birlikte iş gördükleri ve

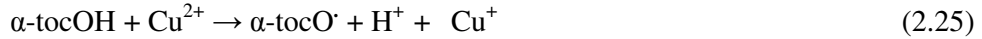
tokoferoksil radikalinin askorbik asit ya da glutatyon aracılığıyla tekrar indirgendiği bilinmektedir (Mittler, 2002, Halliwell, 2006) (Şekil 2.12, Şekil 2.13). Sonuçta lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonu durdurulmakta ve oluşan bu tokoferoksil radikali membran yüzeyindeki askorbat (ASC) ya da glutatyonla (GSH) tepkimeye girerek tekrar  $\alpha$ -tokoferole dönüşmektedir (Noctor ve Foyer, 1998) (Şekil 2.14).



Şekil 2.14: Aktif oksijen türlerinin (ROS); kloroplastların stroma ve membran kısımlarındaki askorbat-glutatyon döngüsü,  $\alpha$ -tokoferol ve ilgili antioksidan enzimler aracılığı ile temizlenme mekanizması. (1) Monodihidroksiaskorbatın (MDA) enzimatik olmayan yolla (kendiliğinden) askorbat (ASC) ve dehidroksiaskorbata (DHA) dönüşmesi (Mullineaux ve diğ., 2000)



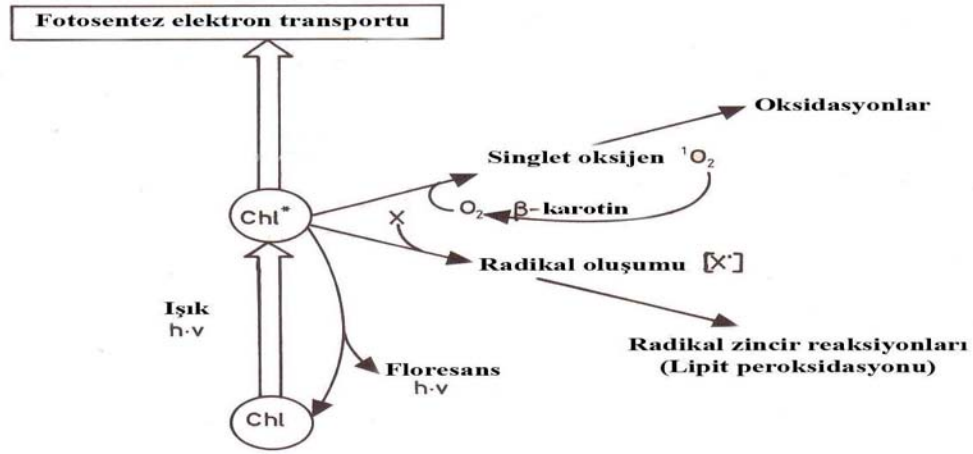
İki değerlik elektrona sahip olan  $\text{Cu}^{2+}$  gibi bazı metaller linoleik ve linolenik asitin oksidasyonunu katalize etmektedir. Metal iyonlarının ve  $\alpha$ -tokoferolün lipid peroksidasyonundaki rolleri aşağıdaki gibidir.



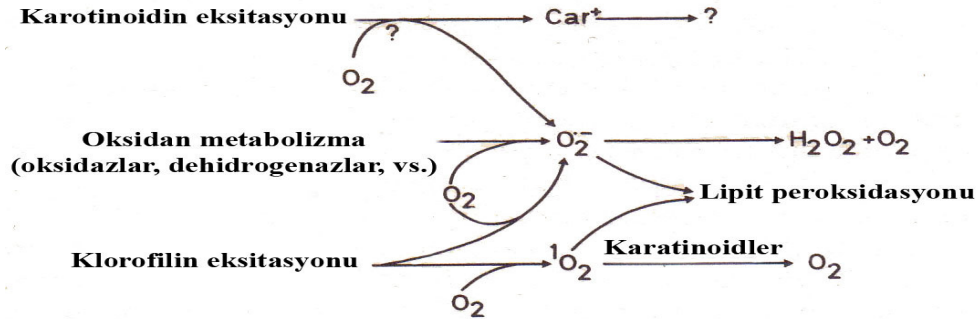




A vitamininin öncül maddesi de olan  $\beta$ -karotin, son derece güçlü bir singlet oksijen ( $O_2^1$ ) temizleyicisi olup ayrıca hidroksil, peroksil ve alkoksil radikalleri ile de doğrudan tepkimeye girerek lipid peroksidasyonu zincirini kırıcı özelliklere sahiptir (Young ve Britton, 1993; Hirayama ve ve diğ., 1994; Edge ve diğ., 1997) (Şekil 2.16, Şekil 2.17).



Şekil 2.16: Fotosentez olayında klorofilin eksitasyonu ile oluşan singlet oksijenin ( $O_2^1$ ),  $\beta$ -karotin tarafından indirgenmesi (Fedtke'den, 1982)



Şekil 2.17: Klorofilin eksitasyonu ve oksidan metabolizma sonucunda oluşan serbest oksijen türlerinin ve lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonlarının önlenmesinde karotinoidlerin rolleri (Fedtke'den, 1982)

Antioksidan etkileri genellikle yapılarındaki konjuge çift bağlardan kaynaklanan karotinoidler; peroksil, hidroksil ve superoksit radikalleri ile singlet oksijenin uzaklaştırılmasında ve lipidlerin peroksidatif yıkımdan korunmasında rol almaktadır (Young ve Britton, 1993; Hirayama ve ve diğ., 1994; Edge ve diğ., 1997) (Şekil 2.17).

### 2.5.10. Fenolik bileşikler (Flavonoidler, Antosiyaninler)

Bitkiler yaşamlarını sürdürebilmek; büyüme, gelişme ve diğer metabolik olaylarını düzenleyebilmek ayrıca çevresel stres etmenlerinden korunabilmek üzere çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir (Mckersie ve Leshem, 1994; Dixon-Paiva, 1995; Chalker-Scott, 1999; Mittler 2002; 2006). Bunun için sentezledikleri kimyasal bileşikler 'sekonder metabolitler' olarak adlandırılmaktadır. Geçmişte sekonder metabolitler yalnızca bitki hücrelerinin artık ürünleri olarak kabul edilmekte iken, günümüzde bu bileşiklerin büyüme ve gelişme, üreme, sinyal iletimi, savunma gibi fizyolojik olaylarda çok önemli rolleri olduğu kanıtlanmıştır (Winkel-Shirley, 2001, 2002; Williams ve diğ., 2004; Winkel-Shirley, 2006). İnsanlar yüzlerce yıldan beri bunları ilaç, tatlandırıcı, renklendirici gibi amaçlarla da kullanmaktadır (Harborne ve Williams, 2000). Basit fenoller, fenilpropanoidler, flavonoidler, taninler ve ligninler bitkilerde bulunan bazı önemli sekonder bileşiklerdir (Hradzina, 1982; Iwashina, 2000; Winkel-Shirley, 2001; Williams ve diğ., 2004; Winkel-Shirley, 2006).

Bitkilerde sekonder metabolitler, primer metabolizmanın karbonhidrat, protein ve lipid yıkım ürünlerinden sentez edilmektedir (Harborne ve Williams, 2000). Hidrofilik olanlar genellikle vakuolde depo edilirken lipofilik olanlar reçine kanalı, latisifer, trikoma ve kutikulada birikim gösterebilmektedir (Harborne ve Williams, 2000). Polifenoller içerdikleri 8000'den fazla sayıda fenolik bileşik ile sekonder bitki metabolizmasının en geniş dağılım gösteren yapılarıdır. Doğal polifenoller; fenolik asitler, fenilpropanoidler ve flavonoidler gibi basit moleküller ile lignin ve taninler gibi yüksek derecede polimerize olmuş bileşiklere kadar çeşitlilik göstermektedir (Hradzina, 1982; Harborne ve Williams, 2000). Flavonoidler bunların içinde flavonol, flavanol ve antosiyanidinleri de içeren en geniş gruptur (Schwinn ve Davies, 2004).

Fenilpropanoid ya da şikimat biyosentez yolu sonunda sentezlenen (Şekil 2.18) ve bir ya da daha fazla sayıda hidroksil, metil, glikozil grupları taşıyan aromatik bileşikler olarak tanımlanan fenoliklerin (Soobrattee ve diğ., 2005); halka şeklindeki temel yapılarında meydana gelen oksidasyon, hidroksilasyon, glikosilasyon ve metilasyon gibi modifikasyonlar bu moleküllerin çok çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahip olmalarını sağlamaktadır (Loomis ve Battaile, 1966; Spencer ve diğ., 2003; Williams ve diğ., 2004; Es Safi ve diğ., 2007; Pourcel ve diğ., 2007; Prakash ve diğ., 2007).

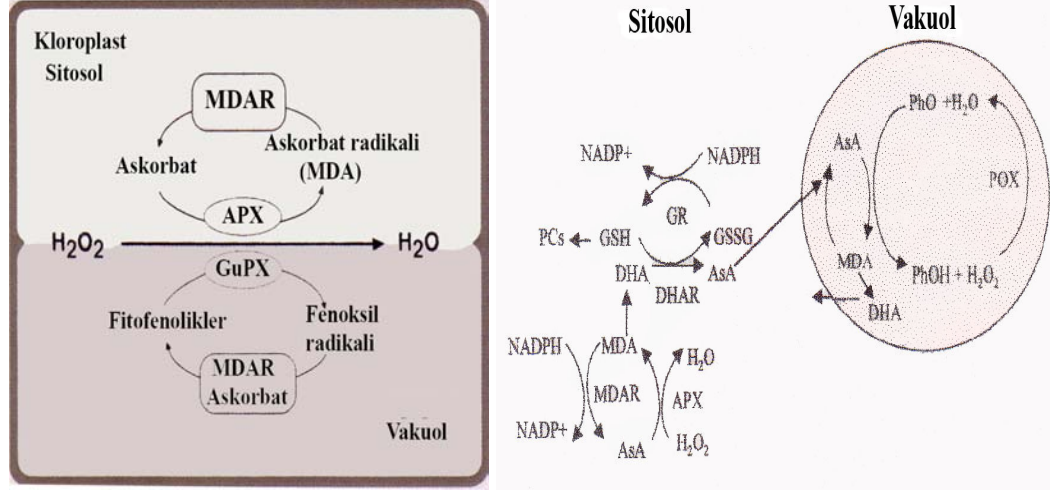
Fenolikler; serbest radikal temizleyici ve antioksidan kapasiteleri (Chimi ve diğ., 1991; Ferreira ve diğ., 2007), metal iyonu kelatlayıcı özellikleri (Lavid ve diğ., 2001; Son ve Lewis, 2002; Esparza ve diğ., 2004, 2005; Maillard ve diğ., 2007), gen ekspresyonunu düzenleyici etkileri (Mol ve diğ., 1998) ve hücre sinyal iletimindeki rolleri (Mol ve diğ., 1996; Williams ve diğ., 2004) ile pek çok biyolojik ve tıbbi nitelikler taşımaktadır.

Fenolik bileşiklerin antioksidan ve metal kelatlayıcı aktiviteleri; molekülün halka şeklindeki yapısına ve bu yapıdaki ortama H<sup>+</sup> iyonu ve elektron veren fonksiyonel grupların (-OH) sayısına bağlı olarak, bunların indirgenme yükseltgenme (redoks) etkinliklerine dayanmaktadır (Rice-Evans, 1995; Bors ve diğ., 2001). Serbest 3-OH gruplarının varlığı, sayısı ve bunların birbirine göre yerleşimleri fenoliklerin antioksidan aktivitesinde önemli rollere sahiptir (Es Safi ve diğ., 2007; Pourcel ve diğ., 2007). Ayrıca, aromatik yapıda bulunan konjuge çift bağlar moleküllerdeki elektronların yer değişimini (delokalizasyonunu) sağlayarak fenoksil radikallerinin stabilizasyonuna neden olmaktadır (Rice-Evans, 1995; Rice-Evans ve diğ., 1996; Sakihama ve diğ., 2000, Bors ve diğ., 2001; Rice-Evans, 2001; Sakihama ve diğ., 2002).

Polifenolik bileşikler; serbest radikal zincirlerini sonlandıran ve redoks aktif metal iyonlarını kelatlayarak lipit peroksidasyonunu önleyen bileşiklerdir (Rice-Evans, 1995). Bazı araştırmacılar flavonoidlerin taşıdıkları yapısal ve elektrokimyasal bu özellikleri ile lipit peroksidasyonunu baskıladığını (Tsuda ve diğ., 1996; Da Silva ve diğ., 1998; Hodges ve diğ., 1999), lipit oksidasyonunu indirgeyerek membran yapısını koruyan antioksidan etkinlikler taşıdığını (Rice-Evans ve diğ., 1996; Yamamoto ve diğ., 1999; Rice-Evans, 2001; Brown ve Kelly, 2007) ileri sürmektedir.



Fitofenolikler, oksidan metabolizma sonucunda oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i yok etmek üzere guaiakol peroksidazlara (GuPX) elektron vererek antioksidan bileşikler olarak rol almaktadır. Bu işlem sonucunda meydana gelen fenoksil radikalleri ise (PhO<sup>•</sup>) askorbat bileşiği tarafından indirgenmektedir (Nakano ve Asada, 1981; Takahama ve Oniki, 1997; Noctor ve Foyer, 1998; Zancani ve Nagy, 2000; Asada, 2006) (Şekil 2.18).

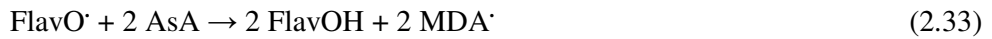


Şekil 2.18: Bitkilerde  $H_2O_2$ 'in detoksifikasyonunda vakuoldeki peroksidaz /fenolikler /askorbat sistemi ile sitosol ve kloroplastlardaki askorbat-glutasyon döngüsünün birlikte çalışma mekanizmaları (Takahama ve Oniki, 1997; Zancani ve Nagy, 2000; Sakihama ve diğ., 2002; Sgherri ve diğ., 2007) POX, peroksidazlar; PhOH, fenolik bileşikler; PhO $\cdot$ , fenoksil radikalleri; AsA, askorbat; APX, askorbat peroksidaz; GuPX, guaiakol peroksidaz; MDA, monodehidroaskorbat; MDAR, monodehidroaskorbat redüktaz; DHA, dehidroaskorbat; DHAR, dehidroaskorbat redüktaz; GSH, redüklenmiş glutasyon; GSSG, oksitlenmiş glutasyon; GR, glutasyon redüktaz; PCs, fitokelatinler

Yamasaki ve diğ. (1997), bitki hücrelerinin özellikle vakuollerinde gerçekleşen flavonoid-GPX tepkimesinin,  $H_2O_2$  temizleyici özelliğinin yanı sıra bitki hücrelerinin detoksifikasyonunda da önemli rolleri olduğunu belirtmektedir.



Meydana gelen flavonoid radikali (FlavO $\cdot$ ) askorbik asitle tepkimeye girerek monodehidroksiaskorbik asit radikali (MDA $\cdot$ ) oluşmaktadır.



MDA $\cdot$  ise kendiliğinden AsA (askorbat) ve dehidroksiaskorbata (DHA) dönüşürken; oluşan DHA, Halliwell-Asada (askorbat glutasyon) döngüsünde yer alan enzimlerden birisi olan dehidroksiaskorbat redüktaz (DHAR) enzimi ile tekrar AsA'ya indirgenmektedir (Foyer ve Halliwell, 1976; Nakano ve Asada, 1981; Alscher ve diğ., 1997; Takahama ve Oniki, 1997; Noctor ve Foyer, 1998; Noctor ve Foyer, 1998, Zancani ve Nagy, 2000; Halliwell, 2006) (Şekil 2.12, Şekil 2.13, Şekil 2.18).

Güçlü antioksidan bileşikler olarak da tanımlanan fenoliklerin; bitkilerde enfeksiyon, yaralanma, herbivorlar, ultraviyole radyasyonu, aşırı ışık şiddeti gibi çeşitli stres koşullarında aktivitelerinin artarak birikimlerinin teşvik edildiği hakkında pek çok çalışma olmasına rağmen (Mckersie ve Leshem, 1994; Dixon ve Paiva, 1995; Mittler, 2002; Winkel-Shirley, 2002, 2006), ağır metal stresindeki rolleri ile ilgili bilgiler oldukça sınırlıdır (Krupa ve diğ., 1996; Ferreira ve diğ., 2007; Sgherri ve diğ., 2007).

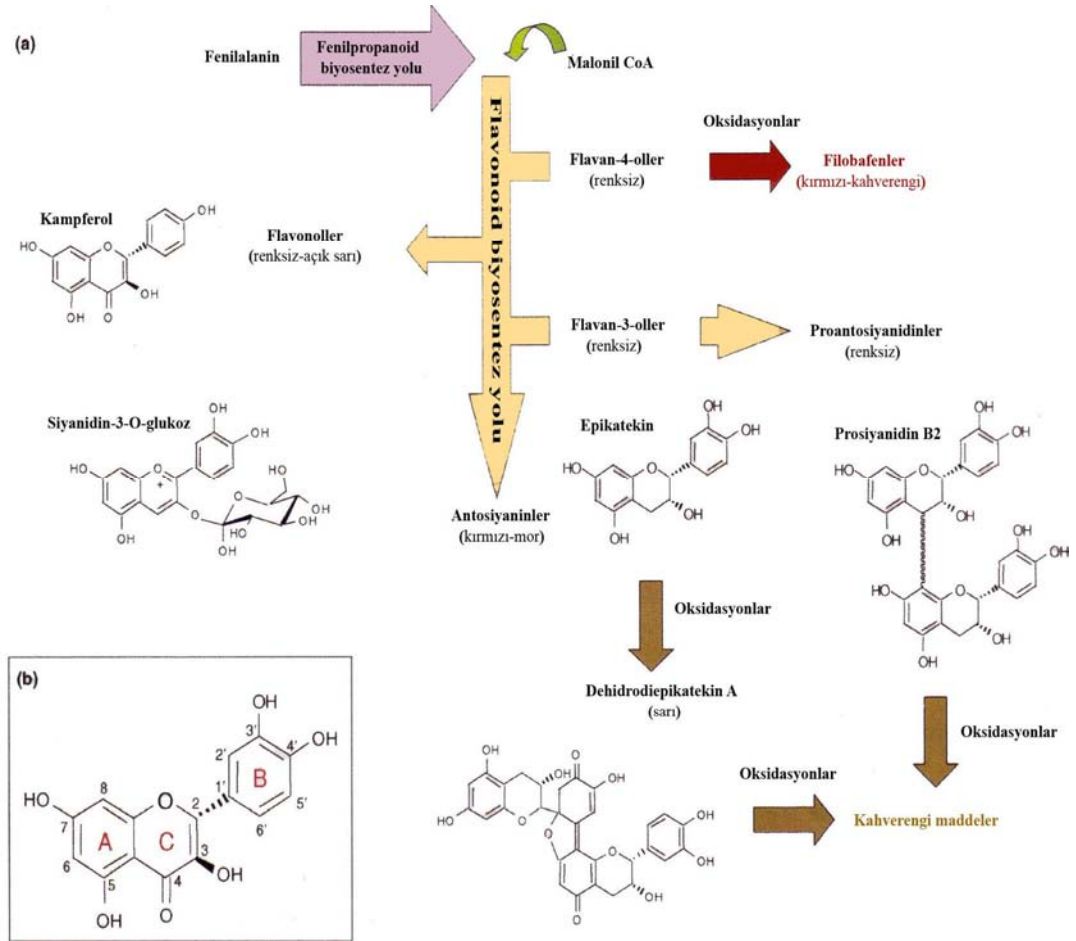
Ağır metallerin kimyasal yönden diğer abiyotik etmenlerden daha iyi tanımlanmış bir stres faktörü olarak fenilpropanoidlerin biyosentezini aktive ettiğine dair son yıllarda çeşitli araştırmalar yapılmış (Krupa ve diğ., 1996; Grace ve Logan, 2000; Santiago ve diğ., 2000; Ito ve diğ., 2005; Ferreira ve diğ., 2007), ancak bu konu henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır.

Bu tez çalışmasında antioksidan fenolik bileşiklerden birisi olan antosiyaninlerin bakır stresindeki antioksidan rolleri, çeşitli konsantrasyonlarda  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  uygulanan 15 günlük mısır fidelerinin kök, gövde ve yapraklarında fizyolojik ve anatomik yönden uygun metotlar kullanılarak incelenmiştir.

## **2.6. ANTOSİYANİNLERİN BAKIR STRESİNDEKİ ANTIOKSİDAN ROLLERİ**

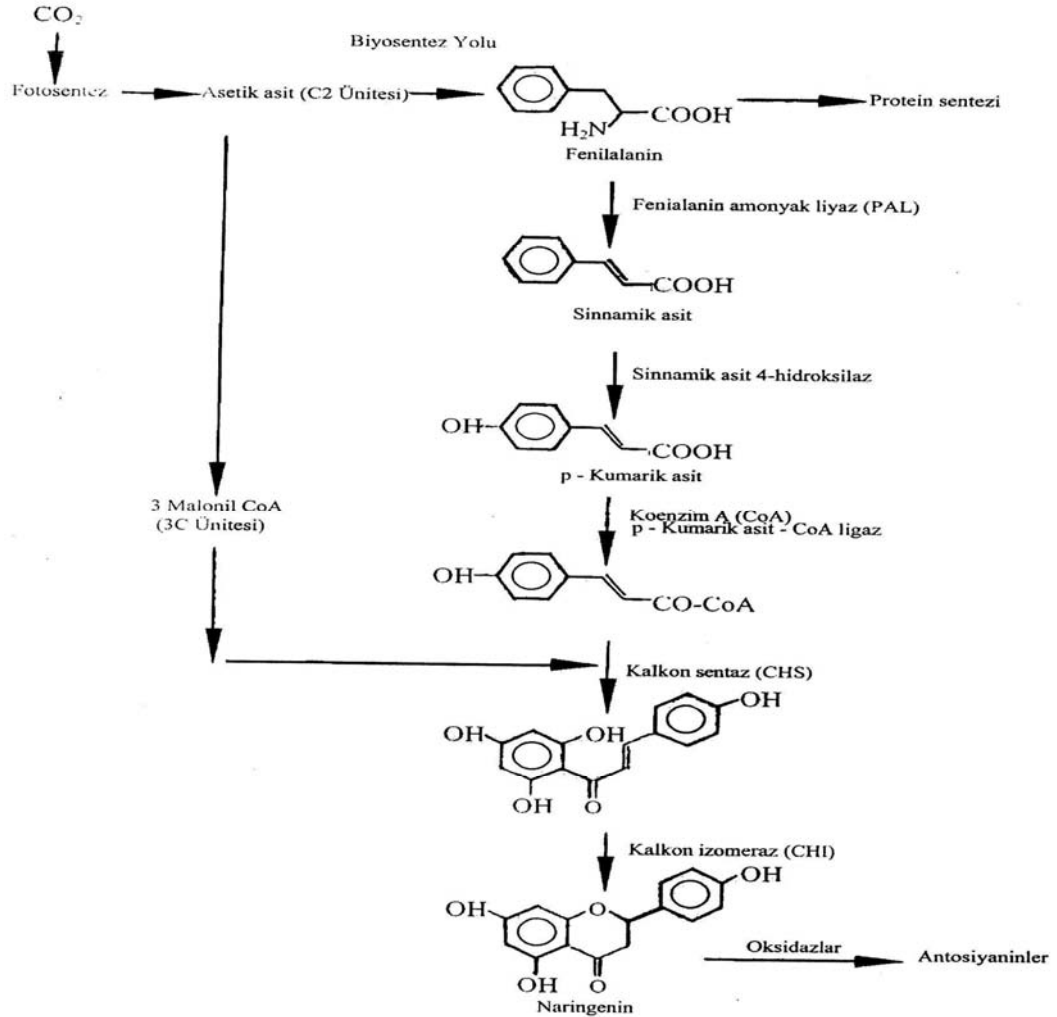
Antosiyaninler; sekonder bitki metabolitlerinden flavonoidler alt grubuna dahil olan fenolik bileşiklerdendir (Hradzina, 1982; Iwashina, 2000). Yüksek bitkilerin çeşitli kısımlarının özellikle kırmızı, mor ve mavi renklerinden sorumlu olan bu pigmentler; kök, gövde, yaprak, çiçek, meyve ve tohum gibi bütün bitki organlarında bulunabilmektedir (Mol ve diğ., 1998; Sullivan, 1998). Bir ya da birkaç şeker grubunun antosiyanidin (aglikon) denilen moleküle bağlanmasından meydana gelen antosiyaninler A ve B diye adlandırılan çift bağ taşıyan iki karbon halkası ve ortada oksijen bulunan bir merkezi halka yapısındadır (Şekil 2.19.b, Şekil 2.21.a, Şekil 2.21.b). Çiçek ve meyvelerin renklerinin bu pigmentler aracılığı ile sahip olduğu zengin çeşitlilik; B halkasına bağlanan şekerler, aromatik asitler, hidroksil ve metoksil gruplarının (R) sayısı ile diğer antosiyanin molekülleri ya da başka pigment ve iyonlarla oluşturdukları kompleks yapılar (ko-pigmentler) gibi küçük etkileşimleri içermektedir (Yamasaki, 1997; Mol ve diğ., 1998) (Şekil 2.19.b, Şekil 2.21.a, Şekil 2.21.b).

Bitki hücrelerinin sitoplazmasında flavonoid biyosentez yolu sonunda sentezlenen antosiyaninler (Şekil 2.19.a, Şekil 2.20), aktif transportla vakuole taşınarak burada ergastik depo maddesi olarak yerleşim gösteren glikozidik yapılardır (Hradzina, 1982; Stintzing ve diğ., 2002; Schwinn ve Davies, 2004). Glutasyon-S-transferazlar (GST), bu bileşiklerin tanınmasında ve vakuole taşınmasında rol almaktadır (Marrs ve diğ., 1995). Bunlar suda çözünür bileşiklerdir ve bitkilerde epidermis hücrelerinin vakuolünde çözülmüş halde bulunurlar (Iwashina, 2000). Vakuoldeki ya da bir çözeltideki antosiyaninin rengi ve kararlılığı büyük ölçüde onun asiditesine dayanmaktadır. Ortamın asit olduğu durumlarda kırmızı, nötr iken mor, bazik koşullarda ise mavi renk alan antosiyaninlerin (Mol ve diğ., 1998; Grotewold, 2006), flavilyum katyonu şeklindeki yapısı asidik koşullarda genellikle stabildir ancak nötr ve alkali ortamlarda bozulmaktadır (Hradzina, 1982; Mol ve diğ., 1998; Sullivan, 1998; Iwashina, 2000).



Şekil 2.19: (a) Fenilpropanoid biyosentez yolu ile sentezlenen çeşitli flavonoid bileşikleri (antosiyaninler, flavonoller, flavanlar, filobafenler, proantosiyanidinler, kahverengi maddeler) (b) Antosiyanin ve flavonollerin genel yapısı (Williams ve diğ., 2004; Pourcel ve diğ., 2007)

Antosiyaninler; fotosentez sonucu oluşan asetik asit (2 karbonlu) ünitesi ile başlayan iki farklı metabolik yol üzerinden sentezlenirler (Winkel-Shirley, 2001, 2002, 2006). Birincisi asetik asitten fenilalanin amino asidi öncülünün oluşumuna kadar olan şikimik asit yolu diğeri ise malonil CoA (3 karbonlu) ünitesini veren asetik asit yoludur. Antosiyaninlerin biyosentezinde başlıca fenilalanin amonyak liyaz (PAL) ve kalkon sentaz (CHS) enzimleri iş görmektedir. Fenil alanin amino asidi PAL enzimi aracılığıyla sinnamik asitlere; sinnamik asitler ise ilgili enzimler üzerinden p-kumarik asit CoA'ya dönüşmektedir. Fenilpropanoid yolu diye de adlandırılan bu biyosentez yolu CHS enzimi aracılığıyla malonil CoA ile biraraya gelerek CHI (kalkon izomeraz) enziminin etkinliğiyle naringenin bileşiğine izomerize olmaktadır. Naringenin ise oksitlenerek antosiyaninleri meydana getirmektedir (Sullivan, 1998) (Şekil 2.20).



Şekil 2.20: Antosiyaninlerin biyosentezi (Sullivan'dan, 1998)

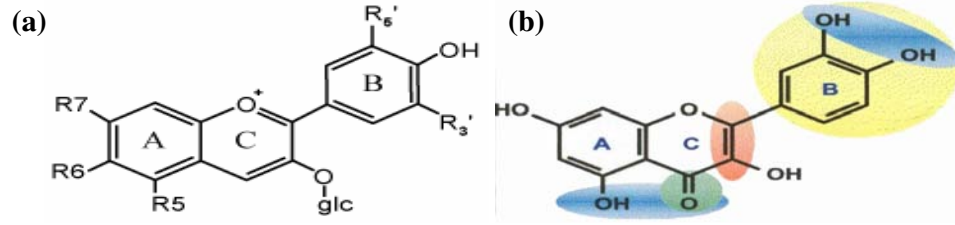


Antosiyaninler; çiçek, meyve ve tohum gibi generatif organların bu pigmentler aracılığı ile sahip oldukları gözalcı renkleriyle böcek ve kuş gibi polinatörlerin çekimlenmesini sağlayarak tozlaşma olayı ve tohumların dağılımında önemli ekolojik rollere sahiptir (Harborne ve Williams, 2000; Williams ve diğ., 2004). Bu pigmentlerin vegetatif organlardaki sentezi ve dağılımı ise daima üzerinde tartışılan bir konu olmuştur (Chalker-Scott, 1999; Steyn ve diğ., 2002). Antosiyaninlerin kök, gövde, yaprak gibi vegetatif dokulardaki birikimi; çeşitli stres etmenlerinin bir göstergesi olarak ifade edilmekte (Winkel-Shirley, 2006) ve bir sinyal iletimi şeklinde genetiksel düzenleyici genlerin ekspresyonunu teşvik ederek (Mol ve diğ., 1996; Winkel-Shirley, 2002), bitkinin gelişimsel ve çevresel etkenlere yanıtı ile ilgili olan yapısal genlerini kontrol ettiği (Mol ve diğ., 1996) ileri sürülmektedir. Örneğin; mısır bitkisinde antosiyanin biyosentezinin dokuya özgü olduğu ve alevron tabakasındaki en az 10 genin antosiyanin biyosentezinde rol aldığı belirtilmiştir (Reddy ve diğ., 2003). Sahip oldukları bu özellikleri ile antosiyaninlerin; kuraklık, sıcaklık, ışık, tuzluluk ve su stresi ile herbisitler, patojen mikroorganizmalar, herbivorlar gibi çeşitli abiyotik ve biyotik çevresel stres koşullarında bitkileri korudukları bilinmektedir (Coley ve Kusar, 1996; Chalker-Scott, 1999; Steyn ve diğ., 2002; Winkel-Shirley, 2002, Winkel-Shirley, 2006).

İlk gelişim evrelerindeki genç yaprakların ve sürgün uçlarının ayrıca sonbaharda senesense uğrayan bazı bitkilerin yapraklarının sahip oldukları kırmızı rengin ise fotooksidan zararlara karşı sentezlenen antosiyanin pigmentlerinden kaynaklandığı kaydedilmiştir (Gould ve diğ., 2000, 2002; Neill ve Gould, 2003). Bu araştırmacılara göre antosiyaninler; fotoinhibisyon ve ultraviyole radyasyonuna karşı çeşitli bitki kısımlarının korunmasını sağlamak üzere klorofil molekülleri tarafından yakalanan ışığın şiddeti ve dalga boyu gibi kantitatif ve kalitatif özelliklerini modifiye ederek moleküllerin uyarılma (eksitasyon) basıncını indirgemekte ve böylece başta klorofiller olmak üzere yaşamsal önem taşıyan biyomoleküllerin oksidan stresten zarar görmesini engelleyen koruyucu antioksidan özellikler taşımaktadır (Gould ve diğ., 2000, 2002; Steyn ve diğ., 2002; Neill ve Gould, 2003). Çevresel stres koşullarına karşı bitkilerin korunumunda rolü olan antosiyaninler, antioksidan özellikleri ve antikanser potansiyelleri ile de araştırmacıların ilgisini çekmektedir (Rice-Evans, 1995; Gasiorowski ve diğ., 1997; Jovanovic ve diğ., 1997; Rice-Evans ve diğ., 1997; Rice-Evans; 2001; Kähkönen ve Heinonen, 2003; Kim ve diğ., 2003; Soobratte ve diğ., 2005).

Ekolojik ve fizyolojik rollerinin yanı sıra aktif oksijen türlerinin (ROS) ortamdaki uzaklaştırılıp temizlenmesi ve böylece hücrelerin zarar görmesinin önlenmesi gibi antioksidan özellikleri (Yamasaki, 1997; Yamasaki ve diğ., 1997) ile de dikkat çeken antosiyaninlerin, bitkilerdeki bazı spesifik direnç etkileşimleri ile ilişkili oldukları da gözlemlenmiştir (Klaper ve diğ., 1996, Steyn ve diğ., 2002). Antosiyaninlerin antioksidan aktivitelerinin; antosiyanidin yapısının glikosilasyonu ve hidroksilasyonunu ile teşvik edildiği (Wang ve diğ., 1997) ve hücrelerdeki aktif oksijen ya da hidroperoksit radikallerini uzaklaştırmak üzere bu toksik bileşiklerle etkileşime girdiklerinde yapılarında kırılmaların meydana geldiği saptanmıştır (Rice-Evans, 1995), bu tepkime sonucunda oluşan ürünlerin ise radikalleri yok ederek antioksidan aktivite gösterdiği özel bazı yöntemlerle tespit edilmiştir (Pourcel ve diğ., 2007). Son yıllarda antosiyaninlerin metal stresi de dahil olmak üzere çeşitli çevresel stres etmenlerine yanıt olarak sentezlendiğine dair çeşitli yayınlar mevcuttur (Chalker-Scott, 1999; Hale ve diğ., 2001; Kähkönen ve Heinonen, 2003; Kim ve diğ., 2003) ancak bakır uygulamaları sonucunda antosiyaninlerin birikimi ile ilgili bilgiler oldukça kısıtlı olup bu pigmentlerin ağır metal stresindeki rollerini kanıtlamakta yetersiz kalmaktadır.

Çeşitli abiyotik ve biyotik stres koşullarına karşı bitkileri koruyucu rolleri olan (Chalker-Scott, 1999; Treutter, 2006; Winkel-Shirley, 2006) ve son yıllarda antioksidan etkileri üzerinde de (Wang ve diğ., 1997; Pourcel ve diğ., 2007) çeşitli çalışmaların yapıldığı antosiyaninlerin demir ve bakır gibi bazı ağır metalleri kelatlama özellikleri hakkında oldukça sınırlı sayıda kaynağa rastlanmıştır (Krupa ve diğ., 1996; Santiago ve diğ., 2000; Ito ve diğ., 2005; Ferreira ve diğ., 2007). Buna göre antosiyaninler bir metal-antosiyanin kompleksi oluşturarak hücrelerdeki diğer önemli antioksidan bileşiklerden birisi olan askorbik asitin oksitlenmesine engel olmaktadır (Sarma ve diğ., 1997; Sarma ve Sharma, 1997). Yapılan bazı araştırmalarda, antosiyaninlerin yapısal özelliklerinden dolayı (A ve B halkasındaki -OH grupları) bazı metaller ile kompleks oluşturabildiği (Şekil 2.21.b) ve böylece hücrenin protein, membran, DNA gibi önemli bileşenlerini oksidatif toksisiteye karşı korudukları ileri sürülmektedir (Rice-Evans, 1995; Rice-Evans ve diğ., 1996; Wang ve diğ., 1997; Soobrattee ve diğ., 2005; Treutter, 2006; Pourcel ve diğ., 2007). Bakır gibi ağır metallerin antosiyaninler tarafından bağlanarak (kelatlanarak) toksisitesinin azaltılması ya da yok edilmesi oldukça ilgi çekici bir konudur ve bu olayın mekanizması henüz tam olarak açığa kavuşmuş değildir.



Şekil 2.21: (a) Antosiyaninlerin genel yapısı (b) Antosiyaninlerin ve flavonollerin antioksidan etkinliklerinde ve ağır metallerin kelatlanmasında rol alan çeşitli kısımları ile yan grupları (renkli olarak gösterilmiştir) (Sullivan, 1998; Spencer ve diğ., 2003; Williams ve diğ., 2004)

Antosiyaninlerin diğ er bir önemli antioksidan özelliğ i demir ve bakır gibi geçiş metal iyonları ile çeşitli bağlar kurup karmaşık (kompleks) yapılar oluşturarak, bu metal iyonlarının serbest radikal üretimini engellemektir (Rice-Evans, 1995). Yüksek derecede indükleyici etkiye sahip olan antosiyaninlerin antioksidan mekanizmaları; ortama hidrojen ve elektron verme, metalleri kelatlama ve proteinlere bağlanma şeklinde işlemektedir (Rice-Evans, 1995) ve yapısal özellikleri ile halkaya bağlanan yan grupların sayısı ve yerleşimi (Şekil 2.21.b) bu bileşiklerin antioksidan gücünü ortaya koymaktadır. Örneğin; antosiyanin ve taninlerin *orto*-pozisyonunda yer alan 3'-OH-4'-OH gruplarının,  $\text{Cu}^{+2}$  ve  $\text{Zn}^{+2}$  iyonları ile güçlü bağlar kurdukları (Esparza ve diğ., 2005) ve bir bakır-fenolik asit kompleksi oluşturarak metal iyonu kelatlayıcısı olarak rol aldıkları çeşitli ileri analiz yöntemleri ile saptanmıştır (Esparza ve diğ., 2005; Maillard ve diğ., 2007). Antosiyaninlerin; bakır iyonlarını kelatlayarak  $\text{Cu}^{+2}$  dan hızla  $\text{Cu}^{+}$  ya indirgedikleri ve böylece lipid peroksidasyonunu inhibe ettikleri de ileri sürülmektedir (Tsuda ve diğ., 1996; Ito ve diğ., 2004; Adhikari ve diğ., 2005; Brown ve Kelly, 2007).

*In vitro* deneylerde fenoksil radikallerinin canlı organizmalar için prooksidan etkilere sahip oldukları ve bu prooksidan bileşiklerin de metallerin redüklenmesi ve kelatlanmasında çeşitli aktivitelere sahip oldukları belirlenmiştir (Grace ve Logan, 2000). Bazı bitkilerde birikim gösteren metallerin, fenoliklerin sitotoksik özelliklerini tamamlayıcı etki göstererek herbivor ve patojenlere karşı savunmada rol aldıkları da belirtilmektedir (Coley ve Kusar, 1996; Sakihama ve diğ., 2000, 2002). Fenoksil radikallerinin metal iyonları tarafından spin stabilizasyonları sonucunda Alzheimer ve Parkinson hastalıklarına da zemin hazırladıkları, bu hastalıkların aynı zamanda hücre ve dokularda anormal metal birikiminden kaynaklandığı belirtilmektedir (Spencer ve diğ., 2003; Williams ve diğ., 2004; Soobrattee ve diğ., 2005; Uriu-Adams ve Keen, 2005).

Bu tez çalışmasının amacı, ülkemizde ve dünyada büyük miktarlarda üretimi yapılan önemli bir tarım bitkisi olan mısırın, bakır stresine karşı geliştirdiği antioksidan yanıtları fizyolojik ve anatomik yönden incelemektir. Bunun için, kontrol, 50, 100, 250, 500, 1000 ve 1500  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  uygulanan mısır tohumlarının çimlenmesi, fidelerin büyümesi ve gelişmesi; klorofil, karotinoid, antosiyanin pigmentleri ile prolin ve protein içeriği; çeşitli antioksidan bileşiklerin (askorbat, glutatyon) miktarı; antosiyanin biyosentezinde rol alan fenilalanin amonyak liyaz (PAL) enziminin yanı sıra superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), guaiakol peroksidaz (GuPX), glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimlerin aktiviteleri ile lipit peroksidasyonu sonucu membran yapısında görülen değişimler uygun metotlar kullanılarak tayin edilmiştir. Çeşitli bitki kısımlarından alınan anatomik kesitlerde ise bakırın neden olduğu bazı yapısal değişimler ile fenolik bileşiklerin hücrelerdeki birikim yerleri saptanmaya çalışılmıştır.

Ağır metal toksisitesinin bitkilerde yol açtığı fizyolojik, biyokimyasal, morfolojik ve anatomik değişimler ile sekonder metabolitler ve bunların antioksidan özelliklerinin incelendiği bu tez çalışmasında, mısır bitkisinin hangi konsantrasyonlarda bakıra dirençli olduğu tespit edilmiş ve elde edilen sonuçların fitoremediyasyon çalışmaları için de faydalı olması amaçlanmıştır. Bakıra dirençli olduğu saptanan mısır bitkisinin; ülkemizin ağır metal kirliliği gösteren bölgelerindeki tarımsal alanların kullanımı konusundaki mevcut bilgilere yeni yaklaşımlar sağlaması ve yapılacak diğer çalışmalara katkıda bulunması hedeflenmiştir.

Mısırdaki özellikle stres koşulları altında dokuya özgü antosiyanin sentezini teşvik eden genlerin varlığı, bu bitkinin deney materyali olarak seçilmesinde önemli bir etken olmuştur. Üzerinde çalışıldıkça yeni özellikleri keşfedilen antosiyaninlerin; çeşitli metal iyonlarını kelatlayarak bitkilerin ağır metal direncinin sağlanmasında önemli görevleri olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, bakır uygulamaları sonucunda antosiyaninlerin bitkinin neresinde ve ne kadar birikim gösterdiği saptanarak bu bileşiklerin antioksidan işlevlerinin yanı sıra ağır metalleri kelatlama özellikleri üzerinde durulmuştur. Böylece, günümüzde flavonoid bileşiklerinin üzerinde çalışılan çeşitli etkinliklerine farklı bir bakış açısı getirilmesi ve buradan elde edilen verilerin ileride yapılacak olan çalışmalara bir temel teşkil ederek literatürdeki bu açığın kapatılması ümit edilmektedir.

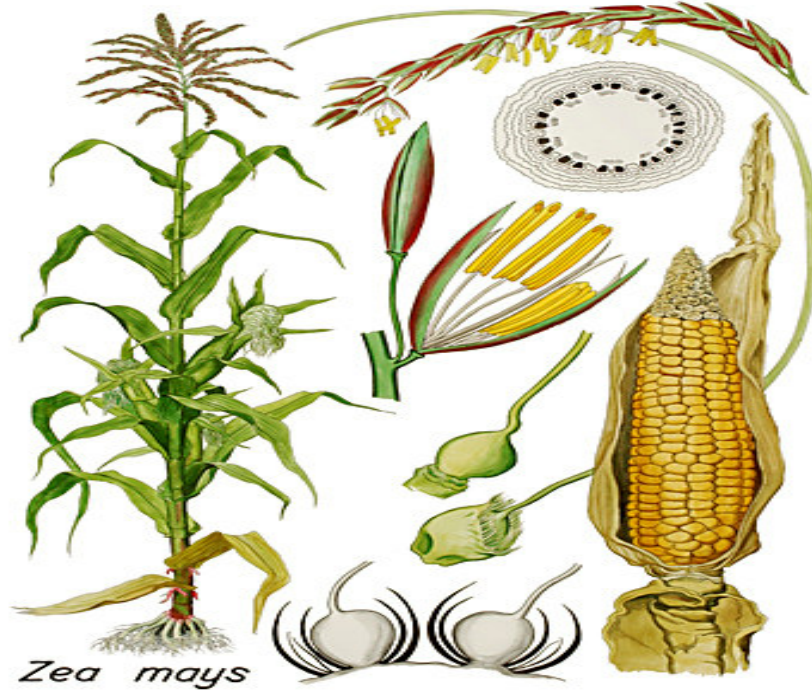
### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1. BİTKİ MATERYALİ VE ÖZELLİKLERİ

Bu tez çalışmasında Bursa MAY Tohumculuktan temin edilen mısır (*Zea mays* L.) bitkisine ait RX770 varyetesi kullanıldı. Bakır uygulamaları sonucunda meydana gelen fizyolojik ve anatomik değişimlerin kolayca izlenebilmesi ve ayrıca dokuya özgü antosiyanin biyosentezinin görülmesi nedeniyle (Reddy ve diğ., 2003) mısır bitkisi deney materyali olarak seçildi.

##### 3.1.1. Mısır Bitkisinin Genel Özellikleri

İnsanoğlunun kültüre aldığı en eski tarla bitkilerinden biri olan Mısır (*Zea mays* L.), dünyada yaygın olarak yetiştirilen Poaceae (Gramineae) familyasından önemli bir tahıl bitkisidir. Ilıman ve tropik bölgelerde tarımı yapılan bir bitki olan mısırın kökeni ve gen merkezi Amerika kıtası olarak kabul edilmektedir. Hindistan ve Mısır üzerinden ülkemize getirildiğinden, dilimizde bu bitkiye mısır adı verildiği sanılmaktadır. Monokotillerden, bir yıllık, dayanıklı tahıl ve kültür bitkisi olan mısırın radikuladan gelişen ana kök ve çok sayıdaki yan köklerden oluşan iyi gelişmiş, kalın ve bol saçaklı, ağsı yapıda bir kök sistemi vardır. Bu şekilde toprakta derinlere kadar inebilen mısırın gövdeden gelişen ve ‘ayak kök’ ismi verilen adventif kökleri ise toprağa daha sıkı bir şekilde tutunmasını sağlamaktadır. Mısır bitkisinin 2-3 m boya ve 4 cm çapa ulaşabilen gövdesi dik ve boğumludur. Gövde üzerinde almaşık dizili uzun yaprakları şerit biçiminde, paralel damarlı ve uçları sivridir. Aynı bitki üzerinde ayrı kesimlerde yer alan çiçeklerden erkek olanları, gövdenin ucunda başaklar halinde; dişi olanları ise yaprak koltuklarında koçanlar halinde görülür. Dişi çiçeklerin olgunlaşmasıyla meydana gelen mısır tohumları, tek ve kalın bir sap olan koçan üzerinde düzgün sıralar halinde dizilmiş iri taneler şeklindedir. Dişi çiçeklerin olgunlaşp tane biçimine gelmeden önce koçanın ucunda oluşturdukları 10-30 cm. uzunluktaki ipliksi uzantılardan meydana gelen ve adına mısır püskülü denilen yapı ise stigmalarıdır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Mısır bitkisinin genel görünümü ve başlıca kısımları (Thomé'den, 1885)

Tahıl bitkileri içerisinde buğday ve arpadan sonra en geniş ekim alanı ve üretime sahip olan mısır, (585 bin ha ekim alanı, 2.5 milyon ton üretim ve 425 kg/da tane verimi), Türkiye tarımında önemli bir yere sahiptir ve özellikle Marmara ve Karadeniz Bölgeleri'nde yaygın olarak yetiştirilmektedir (Süzer, 2004). Günümüzde çok sayıda kullanım alanı olan ve önemi giderek artan mısır, yüksek verim alınabilen bir tarla bitkisi olarak diğerlerinden farklılık göstermektedir. Mısır sahip olduğu zengin besin maddeleri nedeniyle hem insan, hem de hayvan beslenmesi bakımından çok değerli ve kullanım çeşitliliği olan bir üründür. Gerek dünyada ve gerekse Türkiye'de bitkisel kökenli proteinlerin yeterli ve ekonomik üretimi için büyük önem taşıyan mısırın tanesinden elde edilen nişasta, glukoz ve mısırözü yağı da ekonomide hammadde olarak kullanılmaktadır (Süzer, 2004). Mısır tarımı için en uygun toprak tipi; su tutma ve besin maddesi depolama kapasitesi iyi olan, kolay işlenir, iyi drenaj ve havalanma özelliği dolayısıyla milli-killi topraklardır (Süzer, 2004). Mısır, fenolik asitler, fitoöstrojenler ve flavonoidler açısından da zengin bir bitkidir (Zielinski ve Koslowska, 2000).

### 3.2. FİDELERİN YETİŞTİRİLMESİ

Mısır tohumları akar musluk suyu altında iyice yıkanıp, 24 saat distile suda ıslatıldıktan sonra %20 sodyum hipoklorit çözeltisinde 15 dakika bekletildi ve tekrar distile su ile iyice yıkanarak yüzey sterilizasyonu yapıldı. Eşit büyüklükte seçilen tohumlar 14 cm çapındaki petri kaplarında çift kat filtre kağıdı üzerine ekildi ve düzenli aralıklarla eşit miktarda (5 ml) su ve bakır çözeltileri ile sulandı. Petriler iki gruba ayrılarak bir kısmı  $25\pm 2$  °C etüvde tutulurken; bir kısmı da 6000 luks ışık şiddeti altında,  $25\pm 2$  °C sıcaklık ve 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyotta çalışan büyüme odasında çimlenmeye terkedildi. Petrilerdeki tohumlar her gün gözlemlenerek ve çimlenme yüzdeleri kaydedildi. Yaklaşık 4. günden itibaren çimlenmelerini tamamlayan fidelerin karanlık ve ışıktaki morfolojik özellikleri incelenerek bakır uygulamalarından ne şekilde etkilendikleri saptandı. Mısır bitkisinin karanlık ve aydınlıkta yetişmesine göre bazı morfolojik değişimler gösterdiği belirlendi. Karanlıkta çimlendirilen fidelerde kök ve gövde arasındaki geçiş yeri olarak kabul edilen ve ‘mezokotil’ diye isimlendirilen bölge iyi gelişim gösterirken; ışıktaki çimlendirilen tohumlarda bu kısmın oldukça gerilemiş olduğu fark edildi.

Deneyin çimlenme kısmı bu şekilde yapılırken; diğer fizyolojik değişimleri incelemek üzere bitkiler hidroponik kültürde yetiştirildi. Bunun için belirtilen şekilde yüzey sterilizasyonu tohumlar perlit içeren plastik kaplara ekildi ve düzenli olarak distile su ile sulandı. 8. günden itibaren (2 yapraklı evrede) fideler perlitten dikkatli bir şekilde çıkarılıp kökleri iyice temizlendikten sonra hazırlanan bakır serilerine transfer edildi. 7 gün boyunca bakır serilerine maruz bırakılan fideler 15 günlük iken (3 yapraklı evrede) kök ve gövde uzunlukları tespit edildikten sonra çeşitli fizyolojik ve anatomik analizleri yapılmak üzere hasat edildi.

### 3.3. BİTKİLERE BAKIR UYGULANMASI

Kontrol olarak  $\frac{1}{4}$  oranında seyreltilen Hoagland çözeltisinin (Hoagland ve Arnon, 1950) kullanıldığı deneylerde, bakır uygulamaları için ise  $\frac{1}{4}$  Hoagland çözeltisi içerisinde çözüldürülerek hazırlanan 50, 100, 250, 500, 1000 ve 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  konsantrasyonlarındaki seriler kullanıldı. Bitkiler kontrol ve bakır çözeltilerini içeren 500 ml’lik kahverengi şişelerde yetiştirildi.

Tablo 3.1: Hoagland çözeltisi: Tabloda görülen mineral tuzların distile su ile hazırlanan stok çözeltilerinden aşağıda belirtilen miktarlarda alınarak son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı

Mineral tuzlar	Konsantrasyon (M)	1 litre için alınacak miktar (ml)
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1	5
KNO <sub>3</sub>	1	5
MgSO <sub>4</sub>	1	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	1
FeEDTA <sup>(*)</sup>	0.1	1
Mikro elementler	Bakınız <sup>(**)</sup>	1

<sup>(\*)</sup> FeEDTA (etilen diammin tetra asetik asitin Fe kompleksi) stok çözeltide 5 mg/ml Fe içerecek şekilde hazırlandı.

<sup>(\*\*)</sup> Mikro elementleri içeren stok çözeltinin 1 litresinde bulunan mineral tuzlarının miktarları: 2.86 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.81 g MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 1.1 g ZnCl<sub>2</sub>, 0.05 g CuCl<sub>2</sub>, 0.025 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.

Kontrol için seçilen Hoagland çözeltisi bitkilerde bakırın etkilerinin daha kolay ortaya çıkabilmesi için ¼ oranında seyreltilerek kullanıldı.

Tablo 3.2: Bakır konsantrasyon serileri

Bitkilere uygulanan bakırın tipi	Konsantrasyonu (µM)	1 litre için alınacak miktar (g)
	Kontrol	-
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	50	0.012484
	100	0.024968
	250	0.062420
	500	0.124840
	1000	0.249680
	1500	0.374520

Bakır serileri tabloda belirtilen miktarlarda CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O tartılarak ¼ oranında seyreltilmiş Hoagland çözeltileri içinde çözülmesiyle hazırlandı.



### 3.4. BAKIR ANALİZİ

Büyüme odasında hidroponik ortamda kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  uygulanarak yetiştirilen 15 günlük mısır fidelerinin kök, gövde ve yapraklarındaki bakır miktarı yaş yakma metoduna (wet-ashing) göre belirlendi. Bunun için 100 er mg tartılan örnekler deiyonize su ile iyice yıkandıktan sonra 80  $^{\circ}\text{C}$  etüvde ağırlık sabit kalıncaya kadar 4-5 gün bekletildi. Kurutulan örnekler Kjeldahl tüplerine alındı ve üzerlerine  $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$  ilave edilerek 80  $^{\circ}\text{C}$  lik su banyosunda tutuldu. Daha sonra tüplere 1 er ml daha asit eklendi ve tüpler 300  $^{\circ}\text{C}$  ta yüzeysel ısıtıcı üzerinde yaklaşık 3-4 gün boyunca yanmaya bırakıldı. İşlem sonucunda bitki örnekleri şeffaf açık sarı-beyaz çözeltilere dönüştü. Çözeltilerdeki olası çözünmemiş silikat parçacıkları filtre kağıdından süzülerek arındırıldı. Berrak ve tortusuz süzüntüler distile su ile 10 ml ye tamamlanarak atomik absorpsiyon (AAS) için hazır hale getirildi. Deney materyallerindeki bakır miktarlarının ölçümleri belli standart çözeltilerle ayarlanan atomik absorpsiyon cihazında yapılarak ( $\mu\text{g Cu g}^{-1}$  K.A) şeklinde ifade edildi (Baumhardt ve Welch, 1972; Bayçu, 1995).

### 3.5. ÇİMLENME YÜZDESİNİN ÖLÇÜLMESİ

Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  içeren bakır çözeltileri ile sulanan petrilerdeki tohumlar iki gruba ayrıldı; bir kısmı karanlık 25  $^{\circ}\text{C}$  etüvde, bir kısmı ise 25  $^{\circ}\text{C}$  sıcaklık, 6000 luks ışık şiddeti ve 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyotta çalışan büyüme odasında çimlenmeye bırakıldı. Tohumların çimlenmeleri sabit kalana dek günlük olarak izlendi ve sayıları yüzde olarak ifade edildi.

### 3.6. KÖK VE GÖVDE UZUNLUĞUNUN ÖLÇÜLMESİ

Büyüme odasında hidroponik ortamda kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  uygulanarak yetiştirilen 15 günlük mısır fidelerinin kök ve gövde uzunlukları milimetrik taksimatlı cetvel kullanılarak ölçüldü.

### 3.7. TAZE VE KURU AĞIRLIK MİKTARININ ÖLÇÜLMESİ

Kontrol ve bakır serilerindeki 15 günlük fideler darası önceden belirlenmiş alüminyum folyo ile tartılarak taze ağırlıkları alındıktan sonra 80 °C etüvde ağırlık sabit kalıncaya kadar (3-4) gün bekletilerek kuru ağırlıkları tespit edildi (Okatan ve diğ., 1981).

### 3.8. ORANSAL SU İÇERİĞİNİN ÖLÇÜLMESİ

Oransal su içeriği Barr ve Weatherley (1962) metoduna göre tayin edildi. Bunun için belirtilen bakır konsantrasyonlarında yetiştirilen mısır fidelerinin yaprak örneklerinden diskler çıkarılıp taze ağırlıkları alınarak (T.A.), distile su bulunan petri kaplarında 4 saat bekletildi. Distile su içinde turgorlu (TR.A.) hale gelen örneklerin ağırlıkları alındı. Daha sonra örneklerin kuru ağırlıkları (K.A.) sabit kalıncaya kadar, 5 gün boyunca 89 °C lik etüvde bekletilerek tayin edildi. Elde edilen ağırlıklar aşağıdaki formülde (3.1) yerine konularak oransal su içeriği yüzde cinsinden hesaplandı.

$$\text{Oransal Su İçeriği (\%)} = [(T.A. - K.A.) / (TR.A. - K.A.)] \times 100 \quad (3.1)$$

### 3.9. MEMBRAN PERMEABİLİTESİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN ÖLÇÜLMESİ

Belirtilen bakır konsantrasyonlarında yetiştirilen mısır fidelerinin köklerindeki membran permeabilitesindeki değişikliklerin ölçülmesi için Poovaiah ve Leopold (1976) tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı. Kontrol ve bakır serilerindeki fidelerin kök ucundan itibaren 5 cm olacak şekilde alınan kısımlar, her bir seriden 10 ar tane olmak üzere 15 ml distile su içeren, 9 cm çapındaki petrilere yerleştirildi. 25 °C lik etüvde 24 saat inkübe edilen köklerin hücre içinden dış ortama sızan madde miktarları spektrofotometrede 280 nm dalga boyunda ölçüldü ve yüzde cinsinden hesap edildi.

### 3.10. PROLİN MİKTARININ ÖLÇÜLMESİ

Kök, gövde ve yapraklardaki prolin içeriği Bates ve diğ. (1973) metoduna göre tayin edildi. Bunun için 200 mg taze ağırlıkları alınan örnekler 1.2 ml %3 sulfosalisilik asit içinde homojenize edildi. Örnekler vorteksle karıştırıldıktan sonra 12000 rpm de 7 dakika santrifüj edildi. Supernatantlar yeni mikrotüplere alınarak 500 µl ekstrakt, distile su ile 1 ml'ye tamamlandı ve sonra 1 ml glasiyal asetik asit ve 1 ml ninhidrin ile

reaksiyona sokularak 1 saat 98 °C lik su banyosunda tutuldu. Reaksiyon buz banyosunda sonlandırıldı ve karışımın üzerine 2 ml toluen ilave edilerek karıştırıldı. Üstteki faz cam küvete alınarak 518 nm de ölçüldü. Prolin miktarları L-prolin standart eğrisi üzerinden hesaplanarak ( $\mu\text{mol prolin g}^{-1}$  T.A.) olarak ifade edildi.

### 3.11. HİDROJEN PEROKSİT ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) MİKTARININ ÖLÇÜLMESİ

Hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) miktarı, Velikova ve diğ. (2000) metoduna göre ölçüldü. 500 mg kök, gövde ve yaprak dokuları 5 ml %3 (w/v) trikloroasetik asit içeren soğuk tamponda ve buz banyosu içinde homojenize edildi. Homojenat 12000 rpm de 15 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen supernatanttan 0.5 ml alınarak üzerine 0.5 ml 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0) ve 1 ml 1 M potasyum iyodür (KI) ilave edildi. Karışımın absorbansı 390 nm de ölçülürken, hidrojen peroksit miktarı standart eğri çizilerek ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$  T.A.) cinsinden hesaplandı.

### 3.12. LİPİT PEROKSİDASYONUNUN ÖLÇÜLMESİ

Lipit peroksidasyonu sonucunda oluşan malondialdehid (MDA) gibi ürünlerin ölçümü Heath ve Packer (1968) yöntemine göre yapıldı. Kök, gövde ve yaprak kısımlarının taze ağırlıkları yaklaşık 100 mg olacak şekilde alındıktan sonra 2 ml %5 trikloroasetik asit (TCA) içeren soğuk havanda homojenize edildi. Ekstraktlar 10000 rpm de 15 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Eşit hacimlerde alınan 1 er ml supernatant üzerine 4 ml % 0.5 tiyobarbitürik asit (TBA) içeren %20 TCA eklendi ve karışım 96 °C da 30 dakika inkübe edildikten sonra çok hızlı bir şekilde buz banyosunda soğutuldu ve 10000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Supernatantların absorbansı 532 nm de okundu. Herhangi bir bulanıklıktan kaynaklanan ölçüm değerlerinin elimine edilmesi amacıyla 600 nm deki absorbans alınarak önceki absorbanstan çıkarıldı. (%0.5 TBA içeren %20 TCA çözeltisi kör olarak kullanıldı. Lipit peroksidasyon ürünleri ile oksidanlar tarafından modifiye olmuş bitki proteinleri bu şekilde MDA yöntemiyle ölçüldü ve sonuçlar ( $\text{nmol MDA g}^{-1}$  taze ağırlık) olarak ifade edildi.

$$\text{MDA (nmol MDA g}^{-1} \text{ T.A.)} = \frac{(A_{532}-A_{600}) / (155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1})}{\text{Taze yaprak ağırlığı (mg)}} \times 10^6 \quad (3.2)$$

### 3.13. ASKORBAT İÇERİĞİNİN ÖLÇÜLMESİ

Askorbat (AsA), dehidroksiaskorbat (DHA) ve total askorbat (AsA+DHA) içerikleri Gossett ve diğ. (1994) metoduna göre tayin edildi. Bunun için 500 mg taze yaprak örnekleri 5 ml % 5 m-fosforik asit içeren soğuk tamponda ekstre edildikten sonra 12000 g de 15 dakika santrifüj edildi. Total askorbat miktarının ölçümü için supernatandan 200 µl alınarak üzerine 5 mM EDTA içeren 500 µl 150 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu (pH 7.4) eklendi. AsA içeriğini belirlemek üzere aynı reaksiyon ortamına DHA'nın AsA'ya redüklenmesini sağlayan 100 µl ditiotretitol (DTT) ilave edildi ve karışım 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra üzerine 100 µl % 0.5 (w/v) *N*-etilmaleimid eklenerek aşırı DTT uzaklaştırıldı. Hazırlanan her iki reaksiyon ortamına da 400 µl % 10 trikloroasetik asit, 400 µl % 44 o-fosforik asit, 400 µl % 70 etanolde hazırlanmış α, α'-dipiridril ve 200 µl 30 g/litre FeCl<sub>3</sub> ilave edildi. Oluşan renkli karışımlar 40 °C da 1 saat inkübe edildikten sonra içeriğindeki total askorbat ve askorbat bileşikleri spektrofotometrik olarak 525 nm de ölçüldü. AsA ve AsA+DHA miktarları m-fosforik asit içinde L-askorbat standartları (0.01-0.5 mM/ml) hazırlanarak elde edilen eğriye göre hesaplandı. Her bir örnekteki DHA içeriği ise AsA+DHA miktarından AsA'nın çıkarılması ile belirlendi ve (µmol g<sup>-1</sup> T.A.) olarak ifade edildi.

### 3.14. GLUTATYON İÇERİĞİNİN ÖLÇÜLMESİ

Redüklenmiş glutatyon (GSH), okside olmuş glutatyon (GSSG) ve total glutatyon (GSSG + GSH) miktarları Gossett ve diğ. (1994) metoduna göre tayin edildi. 500 mg taze ağırlıkları alınan yaprak dokuları 1 mM EDTA içeren 5 ml % 6 soğuk m-fosforik asit (pH 2.8) içinde homojenize edildikten sonra 12000 g de 15 dakika santrifüjlendi ve elde edilen supernatant 0.45 µm lik filtre kağıdından süzülükten sonra iki grup halinde çözeltiler hazırlandı. Birinci gruptaki çözelti (solüsyon A); 8 ml 110 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O ve 8 ml 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O tamponu içinde 18 ml 5 mM EDTA, 38 ml 0.3 mM 5,5'-ditio-bis-(2-nitro benzoik asit) (DTNB) ve 10 ml 0.4 ml/litre bis (trimetilsilil) asetamid (BSA) olacak şekilde hazırlandı. İkinci gruptaki çözelti (solüsyon B) ise aynı tampon içinde 1 ml 1 mM EDTA, 5 ml 50 mM imidazol, 5 ml 0.2 ml/litre BSA ve 5 ml 1.5 ünite glutatyon redüktaz (GR) enzimi eklenerek hazırlandı. Total glutatyon içeriği; 400 µl solüsyon A, 320 µl solüsyon B, % 5 Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.5) tamponunda 1:50 oranında seyreltilmiş 400 µl supernatant ve 80 µl 0.15 mM NADPH içeren reaksiyon karışımında

spektrofotometrik olarak 412 nm de 10 dakika ölçülerek tayin edildi. Karışımdaki GSSH miktarı ise aynı reaksiyon ortamına 1 ml 1:50 oranında seyreltilen supernatant ve 40 µl 2-vinilpiridin eklenerek 25 °C da 1 saat inkübe edildikten sonra 412 nm de ölçüldü. 1 mM EDTA içeren % 6 m-fosforik asit (pH 2.8) tamponunda çözündürülen ve % 5 Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu ile 1:2000 oranında seyreltilerek hazırlanan glutatyon standartları (0.002-0.0001 g/ml GSH), örneklerdekine benzer şekilde reaksiyon ortamına eklenerek 412 nm deki ölçümleri yapıldı ve bu şekilde elde edilen standart eğri ile total glutatyon ve okside olmuş glutatyon içerikleri hesaplandı. Redüklenmiş glutatyon miktarı ise total glutatyondan okside olmuş glutatyonun çıkarılması ile saptandı ve elde edilen değerler (nmol g<sup>-1</sup> T.A.) cinsinden ifade edildi.

### **3.15. KLOROFİL VE KAROTİNOİD İÇERİĞİNİN ÖLÇÜLMESİ**

Belirtilen konsantrasyonlarda yetiştirilen mısır fidelerinin ilk yapraklarındaki klorofil ve karotinoid içerikleri Arnon (1949) metoduna göre ekstre edildi. Bunun için taze ağırlıkları alınan örnekler bir miktar CaCO<sub>3</sub> tozu içeren havanda %90 aseton içinde homojenize edildi. Ekstreler 24 saat boyunca +4 °C de bekletildikten sonra 3000 g de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra üst sıvının (supernatant) absorpsiyon değerleri spektrofotometrede 480, 630, 645, 665 ve 750 nm dalga boylarında Lichtenthaler (1987) metoduna göre ölçülerek her bir örneğin klorofil a, b ve karotinoid içerikleri (mg g<sup>-1</sup> T.A.) cinsinden tayin edildi (Parsons ve Strickland, 1963).

### **3.16. ANTOSİYANİN İÇERİĞİNİN ÖLÇÜLMESİ**

Belirtilen konsantrasyonlarda yetiştirilen mısır fidelerinin kök, yaprak kını ve ilk yapraklarındaki antosiyanin içeriği Mancinelli (1990) metoduna göre tayin edildi. Taze ağırlıkları alınan bitki kısımları %1 oranında asitlendirilmiş 6 ml metanolde ekstre edildi ve ara sıra çalkalanarak 2 gün boyunca +4 °C de bekletildikten sonra 5000 g de santrifüj edildi. Supernatantdaki antosiyanin içeriği spektrofotometrede 530 ve 657 nm dalgaboylarında ölçüldü ve (A<sub>530</sub> - 0.33 A<sub>657</sub>) formülünde yerine konularak örneklerin birim taze ağırlığındaki antosiyanin içeriği optik yoğunluk olarak ifade tayin edildi.

### 3.17. TOTAL FENOLİK BİLEŞİKLERİN İÇERİĞİNİN ÖLÇÜLMESİ

Total fenolik bileşik içeriği McCue ve diğ. (2000) metoduna göre ölçüldü. Kök, yaprak kımı ve ilk yapraklardan alınan 50 mg taze doku örnekleri 2.5 ml %95 etanole konularak 72 saat boyunca -20 °C da bekletildi. Bu şekilde dondurulan doku örnekleri homojenize edildikten sonra 10000 g de 10 dakika santrifüj edildi. Supernatanttan 1 ml alınarak üzerine 1 ml %95 etanol, 5 ml distile su ve 0.5 ml %50 Folin-Ciocalteu fenol reaktifi eklendi. Karışım 5 dakika inkübe edildikten sonra üzerine 1 ml %5 (w/v) sodyum karbonat eklendi ve vortekslendi. Elde edilen reaksiyon karışımı tekrar karanlıkta 1 saat inkübe edildi ve hafifçe vortekslendikten sonra 4000 g de 5 dakika santrifüj edilerek supernatantın 725 nm deki absorbanı ölçüldü. Total fenolik bileşik içeriği %95 etanol içerisinde ferulik asit kullanılarak çizilen standart eğriye göre hesaplandı ve (mg fenolik bileşik g<sup>-1</sup> T.A.) cinsinden ifade edildi.

### 3.18. FENİLALANİN AMONYAK LİYAZ (PAL) ENZİMİNİN TAYİNİ

Kök, yaprak kımı ve ilk yapraklarındaki fenilalanin amonyak liyaz (PAL) (E.C. 4.3.1.5) enziminin ekstraksiyonu Saunders ve McClure (1975) metoduna göre yapıldı. Yaklaşık 500 mg olacak şekilde ağırlıkları alınan bitki kısımları 0.05 g polivinilprolidin (PVP) ve 50 mM β-merkaptotanol içeren 5 ml 0.1 M sodyum borat (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-NaOH) tamponunda (pH 8.8) homojenize edildi. Homojenat 13000 rpm de 4 °C da 30 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen supernatantlar PAL enzimi aktivitesinin tayininde kullanıldı. 2 ml sodyum borat tamponu içinde (pH 8.8); 0.5 ml supernatant, 0.5 ml 3 mM L-fenilalanin içeren reaksiyon karışımı 30 °C da 1 saat inkübe edildikten sonra 290 nm deki spektrofotometrik ölçümü yapıldı ve *trans*-sinnamik asitin oluşumuna bağlı olarak absorbanısındaki artış 1 dakika boyunca 10 saniye aralıklarla kaydedildi. Kör (blank) olarak fenilalanin içermeyen karışım kullanıldı. 1 dakikada 1 µmol substratın ürüne dönüşümü olarak ifade edilen enzim aktivitesi (ΔA<sub>290</sub> dak.<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> T.A.) cinsinden gösterildi.

### 3.19. ANTIÖKSİDAN ENZİMLERİN EKSTRAKSİYONU

0.5 g olacak şekilde taze ağırlıkları alınan ve  $-20^{\circ}\text{C}$  da dondurulan kök, gövde ve yaprak kısımları, 1 mM fenil metil sulfonil florid (PMSF), 0.1 mM etilen diamin tetraasetik asit (EDTA), %1 polivinil poliprolidon (PVPP) ve yalnızca askorbat peroksidaz (APX) enzimi için sodyum askorbat içeren 5 ml 50 mM potasyum fosfat ( $\text{K}_2\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) tamponunda (pH 7.0) soğuk havanlarda ekstre edildi. Homojenatlar 2 defa  $4^{\circ}\text{C}$  da 12000 rpm de 30 dakika santrifüj edildi. Supernatlardaki total protein miktarı ve antioksidan enzim aktiviteleri  $25^{\circ}\text{C}$  da tayin edildi.

### 3.20. TOTAL ÇÖZÜNEBİLİR PROTEİN MİKTARININ TAYİNİ

Protein miktarının belirlenmesi Bradford (1976) yöntemi kullanılarak yapıldı. Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 ile hazırlanan Bio-Rad çözeltisi  $\frac{1}{4}$  sulandırılarak, 5 ml tampon içerisine 0.1 ml protein içeren supernatant konuldu. Blank (kör) için ise 5 ml tampona 0.1 ml distile su eklendi. Bu şekilde hazırlanan örnekler karanlıkta 20 dakika bekletildikten sonra 595 nm dalga boyundaki ölçümleri yapıldı. Bu yöntemde bovin serum albuminin (BSA) farklı konsantrasyonlarının 595 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerleri ölçülerek standart protein eğrisi çizildi ve total çözünebilir protein miktarları belirlenerek ( $\text{mg protein g}^{-1}\text{ T.A.}$ ) cinsinden ifade edildi.

### 3.21. ANTIÖKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİNİN ÖLÇÜMÜ

#### 3.21.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzimi (E.C. 1.15.1.1) Aktivitesinin Ölçümü

Superoksit dismutaz aktivitesi spektrofotometrik olarak Beyler ve Fridovich (1987) metoduna göre tayin edildi. 50 mM  $\text{KPO}_4$  tamponu (pH 7.8) içerisinde 13 mM metiyonin, 75  $\mu\text{M}$  nitro blue tetrazolium (NBT), 2  $\mu\text{M}$  riboflavin, 0.1 M EDTA, %0.025 Triton X-100 ve 75  $\mu\text{l}$  enzim ekstraktı içeren 2 ml reaksiyon karışımı cam test tüplerine alınarak  $25^{\circ}\text{C}$  da yüksek ışık difüzyonu koşullarında floresan lambalar altında 1 saat ışılandırıldı. NBT'nin fotoindirgenmesiyle oluşan mor renkli karışımın absorbansı 560 nm de spektrofotometrik olarak kaydedildi. Karanlıkta bekletilen örnekler ise kör (blank) olarak kullanıldı. Bir ünite SOD aktivitesi deneysel koşullar altında NBT indirgenmesinin %50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı olarak ( $\text{U g}^{-1}\text{ T.A.}$ ) cinsinden ifade edildi.

### **3.21.2. Katalaz (CAT) Enzimi (E.C. 1.11.1.6) Aktivitesinin Ölçümü**

Chance ve Maehly (1955) metoduna göre tayin edilen katalaz aktivitesi ölçümünde toplam hacim 2 ml olacak şekilde, 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA içeren 25 mM K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponuna (pH 6.8), 50 µl enzim ekstraktının eklenmesiyle reaksiyon başlatıldı ve 240 nm de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in yıkımına bağlı olarak absorbanstaki azalma 2 dakika boyunca 30 saniye aralıklarla kaydedildi. Elde edilen değerler hazırlanan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standart grafiğinde yerine konularak CAT aktivitesi (U g<sup>-1</sup> T.A.) olarak ifade edildi.

### **3.21.3. Askorbat Peroksidaz (APX) Enzimi (E.C. 1.11.1.11) Aktivitesinin Ölçümü**

Askorbat peroksidaz aktivitesi Nakano ve Asada (1981) metoduna göre tayin edildi. Toplam hacim 2 ml olacak şekilde 50 mM NaPO<sub>4</sub> tamponu (pH 7.0) içerisinde 0.5 mM L-askorbat, 1.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA ve 50 µl enzim ekstraktını içeren reaksiyon karışımındaki enzim aktivitesi askorbatın okside olmasına dayalı olarak 290 nm deki absorbanstaki azalışı spektrofotometrede 2 dakika boyunca 20 saniye aralıklarla izlenerek kaydedildi ve (U g<sup>-1</sup> T.A.) olarak ifade edildi.

### **3.21.4. Guaiakol Peroksidaz (GuPX) Enzimi (E.C. 1.11.1.7) Aktivitesinin Ölçümü**

Glutasyon peroksidaz aktivitesinin ölçümü Çakmak (1994) metoduna göre yapıldı. 25 mM KPO<sub>4</sub> tamponunda (pH 7.0), 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 9 mM guaiakol ve 50 µl enzim ekstraktını içeren reaksiyon karışımındaki enzim aktivitesi 470 nm deki absorbanstaki artışına bağlı olarak spektrofotometrede 2 dakika boyunca 10 saniye aralıklarla izlenerek kaydedildi. Elde edilen değerler (U g<sup>-1</sup> T.A.) olarak ifade edildi.

### **3.21.5. Glutasyon Redüktaz (GR) Enzimi (E.C. 1.6.4.2) Aktivitesinin Ölçümü**

Glutasyon redüktaz aktivitesi Foyer ve Halliwell (1976) metoduna göre ölçüldü. Toplam hacim 2 ml olacak şekilde, 25 mM NaPO<sub>4</sub> tamponu (pH 7.5) içerisinde 0.2 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM GSSG, 50 mM NADPH ve 50 µl enzim ekstraktı içeren reaksiyon karışımındaki enzim aktivitesi 340 nm de NADPH konsantrasyonunun azalışına bağlı olarak 3 dakika boyunca 30 saniye aralıklarla kaydedildi. NADPH'ın enzimatik olmayan oksidasyonunun düzeltilmesi için reaksiyon karışımına bu kez GSSG eklenmeyerek 340 nm deki azalış tekrar kaydedildi. Enzim aktivitesi hesaplanırken bu değer ilk kaydedilen aktiviteden çıkartılarak (U g<sup>-1</sup> T.A.) olarak ifade edildi.



### 3.22. ANATOMİK ANALİZLER

#### 3.22.1. Işık Mikroskopu Analizleri

Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$  Cu uygulanan mısır fidelerinin kök, gövde ve yapraklarından jilet yardımı ile elde alınan enine kesitleri su ve %10 HCl içeren floroglusin uygulanarak LEICA BM E ışık mikroskopunda X10 ve X40 büyütmelerde incelendi ve ilgili kısımların fotoğrafları Kodak EasyShare CX7525 dijital fotoğraf makinesi ile çekildi.

#### 3.22.2. Elektron Mikroskopu Analizleri

Alınan bitki doku parçaları PH 7.4 olan fosfat tamponlu %2.5 gluteraldehit solüsyonu ile birinci fiksasyonu takiben %1 osmium tetraoksit solüsyonunda ikincil olarak fikse edildi. Artan alkol serilerinden (%30-50-70-90-100-100) geçirilen parçalar propilen oksit ara geçişi kullanılarak kademeli olarak epon gömme ortamına alındı. Plastik bloklardan 0.5 mikrometre kalınlıkta alınmış olan yarı ince kesitler metilen mavisi ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda seçilen bölgelerden alınan yaklaşık 60 nm'lik ince kesitler uranil asetat ve Reynauld's solüsyonları ile ikili boyamayı takiben elektron mikroskopunda (Jeol JEM 1011) yapı yönünden incelendi ve elektron mikro fotoğrafları elde edildi (Bancroft ve Stevens, 1990; Hayat, 2000).

### 3.23. İSTATİSTİKSEL HESAPLAMALAR

Araştırmada deneyler en az üç tekrar şeklinde yapılmış olup, standart hataları aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

$$X: \sum X_i / N$$

X: Aritmetik ortalama

$\sum X_i$ : Değerlerin toplamı (birinciden N'inciye kadar değişkenin bütün değerlerinin toplamı)

N: Tekrarlanan deney sayısı

$$S = \sqrt{\sum X_i / N}$$

S: Standart sapma

Standart Hata:  $S / \sqrt{N}$

## 4. BULGULAR

### 4.1. BAKIRIN MISIR FİDELERİNDEKİ GENEL FİZYOLOJİK ETKİLERİ

Petri kaplarına ekilen ve eşit miktarlarda kontrol, 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  çözeltileri uygulanan mısır tohumlarının bir kısmı karanlıkta diğer kısmı da uygun fotoperiyotta çalışan büyüme odasında çimlenmeye bırakıldı. Bakırın mısır fidelerinin kök, gövde ve yaprak gibi çeşitli kısımlarındaki morfolojik ve fizyolojik etkilerinin, Cu konsantrasyonu ve uygulama süresinin yanı sıra özellikle bitkinin gelişim evresine göre de önemli değişimler gösterdiği gözlemlendi. Çimlenmelerinden itibaren çeşitli Cu konsantrasyonlarına maruz bırakılan 4 günlük fidelerde bakıra bağlı toksik etkilerin daha hızlı ve oldukça belirgin olarak ortaya çıktığı; bunlardan özellikle köklerin en fazla zararın meydana geldiği kısımlar olduğu belirlendi. Kök uzunluğunda ve yan kök oluşumunda gerilemeler, kök uçlarında kahverengi oluşumlar gözlenirken; koleoptillerin bundan fazla etkilenmediği saptandı (Şekil 4.1.a).

4. günün sonunda çimlenmelerini tamamlayan tohumların büyüme ve gelişiminde bakır toksisitesinin karanlık ya da ışığa göre fazla bir değişim göstermediği ve belirtilerinin her iki koşulda da benzer sonuçlar ortaya koyduğu kaydedildi (Şekil 4.1.b), ancak karanlıkta çimlendirilen mısır tohumlarından gelişen fidelerde ışıkta gelişenlere göre bazı morfolojik farklılıklar belirlendi. Poaceae familyasına özgü olan ve kök ile gövde arasında bir geçiş yeri olarak kabul edilen mezokotil denilen kısmın karanlıktaki fidelerde iyi bir gelişim gösterirken; ışıkta bu bölgenin çok gerilemiş olduğu görüldü (Şekil 4.1.b, Şekil 4.1.c).

Karanlıkta yetiştirilen ve 4. günün sonunda gelişmelerini ışıkta sürdüren 7 günlük fidelerin bakır artışına bağlı olarak kök, gövde ve yapraklarında belirgin gerilemeler meydana geldiği, belli bir konsantrasyondan itibaren kök büyümesinin inhibe olduğu, yaprakların koleoptilden çıkamayıp kıvrık halde kaldığı ve özellikle kök, mezokotil ve gövdede gözle görülür bir antosiyanin birikimi olduğu da gözlemlendi (Şekil 4.1.c).



Şekil 4.1: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  çözeltileri uygulanmış (a) karanlıkta, (b) ışıktaki yetiştirilmiş 4 günlük mısır fideleri ile (c) karanlıktan alınarak gelişimini ışıktaki sürdürmüş 7 günlük mısır fidelerinde meydana gelen çeşitli değişimler

Bakırın erken gelişim evrelerindeki fidelerde oldukça toksik özelliklere sahip olması, kök gelişimini inhibe etmesinin yanı sıra yaprak oluşumunu durdurması nedeniyle kök, gövde ve yapraklardaki analizlerin yapılabilmesi amacıyla mısır tohumları önce perlit içeren kaplarda büyüme odasında uygun koşullar altında bir süre yetiştirildikten sonra bakır uygulamalarına maruz bırakıldı. Bunun için fideler 8 günlük iken perlitten dikkatli bir şekilde çıkarılarak kökleri iyice yıkandı ve kontrol, 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  çözeltileri içeren hidroponik kültüre transfer edildi. 7 gün boyunca belirtilen konsantrasyonlardaki Cu serilerinde tutulan fideler 15 günlük iken (Şekil 4.2) hasat edilerek ilgili fizyolojik ve anatomik incelemeler yapıldı.



Şekil 4.2: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarında meydana gelen çeşitli değişimler

Belli bir gelişim evresinden sonra bakıra maruz bırakılan mısır fidelerinin ağır metal uygulamalarına daha dayanıklı olduğu; toksik belirtilerin daha geç ve daha yüksek konsantrasyonlarda ortaya çıktığı gözlemlendi. Köklerde 50  $\mu\text{M}$  Cu'da kontrole göre önemli bir değişim oluşmazken; 100 ve üzerindeki Cu serilerinde kök uzunluğu ve yan kök oluşumunda gerilemeler meydana geldi. 500, 1000 ve 1500  $\mu\text{M}$  Cu'da ise bunlara ek olarak köklerde özellikle uçlardan başlayan kahverengileşme görüldü (Şekil 4.2).

Gövdede bakır uygulamaları 50, 100 ve 250  $\mu\text{M}$  Cu'da önemli etkilere yol açmazken; 500 ve üzerindeki serilerde turgor kaybına ve özellikle enine büyümedeki azalmaya bağlı olarak gövde çapında incelmelere neden oldu. Yapraklarda ise 50 ve 100  $\mu\text{M}$  Cu'da uçlardan başlayan sararma; 250  $\mu\text{M}$  Cu'dan itibaren özellikle yaşlı yapraklarda nekrotik lezyonlar ile birlikte 500, 1000 ve 1500  $\mu\text{M}$ 'da aşırı su kaybına bağlı solma, yanma ve kuruma gibi belirtiler ortaya çıktı (Şekil 4.2).

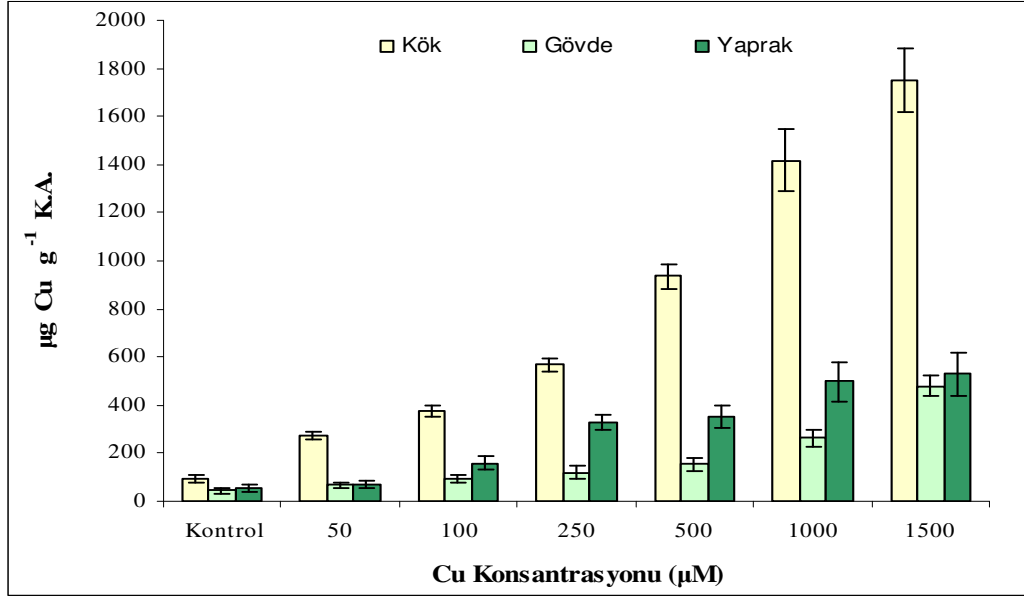
## 4.2. BAKIR İÇERİĞİ

Perlitte yetiştirilen mısır fideleri 8 günlük iken hidroponik kültüre alındı ve 7 gün boyunca  $\frac{1}{4}$  Hoagland çözeltileri içinde hazırlanan 50, 100, 250, 500, 1000 ve 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  içeren bakır serileri uygulandı. 15. günün sonunda hasat edilen bitkilerin kök, gövde ve yapraklarındaki bakır içeriği Tablo 4.1 ve Şekil 4.3 de gösterildi.

Tablo 4.1: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki bakır içerikleri

<i>Bakır konsantrasyonu (<math>\mu\text{M}</math>)</i>	<i>Cu İçeriği (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math> kuru ağırlık)</i>		
	<b>Kök</b>	<b>Gövde</b>	<b>Yaprak</b>
Kontrol	92.60 $\pm$ 15.20	45.80 $\pm$ 12.08	56.40 $\pm$ 14.33
50	274.20 $\pm$ 14.20	68.60 $\pm$ 13.02	72.80 $\pm$ 16.61
100	373.90 $\pm$ 22.60	92.80 $\pm$ 16.24	159.30 $\pm$ 29.20
250	569.00 $\pm$ 26.40	119.4 $\pm$ 25.50	326.50 $\pm$ 32.40
500	933.80 $\pm$ 52.20	154.6 $\pm$ 27.30	354.20 $\pm$ 47.80
1000	1416.7 $\pm$ 126.5	263.8 $\pm$ 36.60	496.60 $\pm$ 84.70
1500	1746.8 $\pm$ 133.4	479.6 $\pm$ 42.80	528.4 $\pm$ 92.60

Tablo 4.1, Şekil 4.3 deki verilere göre bakırın en çok köklerde birikim gösterdiği ve içeriğinin kontrolde gövdeden yaklaşık 2 kat, yapraklardan ise 1.6 kat fazla olduğu saptandı. Her bir bitki kısmında konsantrasyona bağlı olarak artan bakır içeriğinin en fazla 1746.8  $\mu\text{g g}^{-1}$  kuru ağırlık olmak üzere 1500  $\mu\text{M}$  Cu uygulanan 15 günlük mısır fidelerinin köklerinde bulunduğu belirlendi. Bakırın 1500  $\mu\text{M}$  Cu'da kontrole göre sırasıyla köklerde 18.8 kat, gövdede 10.4 kat, yapraklarda ise 9.3 kat artışa neden olduğu kaydedildi (Tablo 4.1, Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO<sub>4</sub> uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki bakır içerikleri

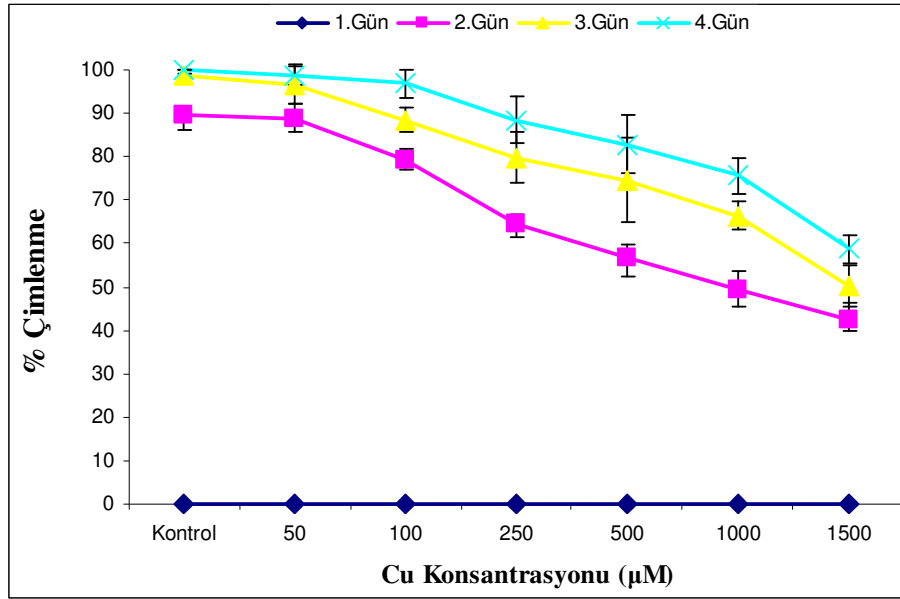
### 4.3. ÇİMLENME YÜZDESİ

Petri kaplarına eşit sayıda ekilen ve eşit miktarlarda kontrol, 50, 100, 250, 500, 1000 ve 1500 µM CuSO<sub>4</sub> serileri uygulanan mısır tohumlarının 25 °C karanlık etüvdeki çimlenme yüzdeleri Tablo 4.2 ve Şekil 4.4 de gösterildi. Işıktaki çimlendirilen ve aynı bakır serilerine maruz bırakılan deney grubundaki tohumlardan da benzer sonuçlar elde edildiği için tablo ve grafik olarak ifade edilmesine gerek görülmedi.

Tablo 4.2: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO<sub>4</sub> çözeltileri uygulanan mısır tohumlarının çimlenme yüzdeleri

Bakır konsantrasyonu (µM)	Çimlenen Tohum Yüzdesi (%)			
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	4. Gün
Kontrol	0	89.7 ± 3.6	98.6 ± 0.5	100.0 ± 0.0
50	0	88.6 ± 2.7	96.7 ± 4.5	98.6 ± 2.2
100	0	79.3 ± 2.2	88.5 ± 2.7	96.7 ± 3.1
250	0	64.6 ± 3.0	79.8 ± 5.8	88.5 ± 5.4
500	0	56.8 ± 4.4	74.6 ± 9.8	82.9 ± 6.9
1000	0	49.2 ± 3.6	66.4 ± 3.4	75.6 ± 4.0
1500	0	42.6 ± 2.8	50.2 ± 4.6	58.8 ± 3.2

Kontrol ve deney grubundaki tohumların 2. günden itibaren radikulanın çıkmasıyla birlikte çimlenmeye başladığı görüldü. 4. günün sonunda bütün serilerdeki tohumların çimlenmesini tamamladığı, bu arada radikulanın uzarken mezokotil ve koleoptillerin de geliştiği belirlendi. Kontrolde %100 çimlenme olurken; 50 ve 100  $\mu\text{M}$  Cu serilerinde sırasıyla %98.6 ve %96.7 olmak üzere kontrole yakın değerler elde edildi. 250  $\mu\text{M}$  Cu dan itibaren çimlenmede kontrole göre % 11.5 lik bir azalma meydana gelirken, bu düşüşün konsantrasyona bağlı olarak giderek arttığı; 1500  $\mu\text{M}$  Cu'da ise % 41.2 lik bir gerilemeye kadar gittiği tespit edildi (Tablo 4.2, Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  çözeltileri uygulanan mısır tohumlarının çimlenme yüzdeleri

Bakır içeriğindeki artışın özellikle radikula gelişimini inhibe ederken koleoptillerde belirgin değişimlere yol açmadığı (Şekil 4.1.a, Şekil 4.1.b), ancak 250  $\mu\text{M}$  ve üzerindeki toksik konsantrasyonlarda radikula ile birlikte koleoptillerde de önemli indirgenmeler olduğu saptandı (Şekil 4.1.a, Şekil 4.1.b).

#### 4.4. KÖK VE GÖVDE UZUNLUĞU

Kontrol, 50, 100, 250, 500, 1000 ve 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  çözeltileri olarak uygulanan bakırın 15 günlük mısır fidelerinin büyümesi üzerindeki etkileri kök ve gövde uzunluk ölçümleri yapılarak tespit edildi; ilgili değerler Tablo 4.3 ile Şekil 4.5 de gösterildi. Kök uzunluğu ölçümünde primer kökler kullanılırken; gövde uzunluğu kökün bittiği yer ile en uzun yapağın ucuna kadar olan kısım olarak ifade edildi.

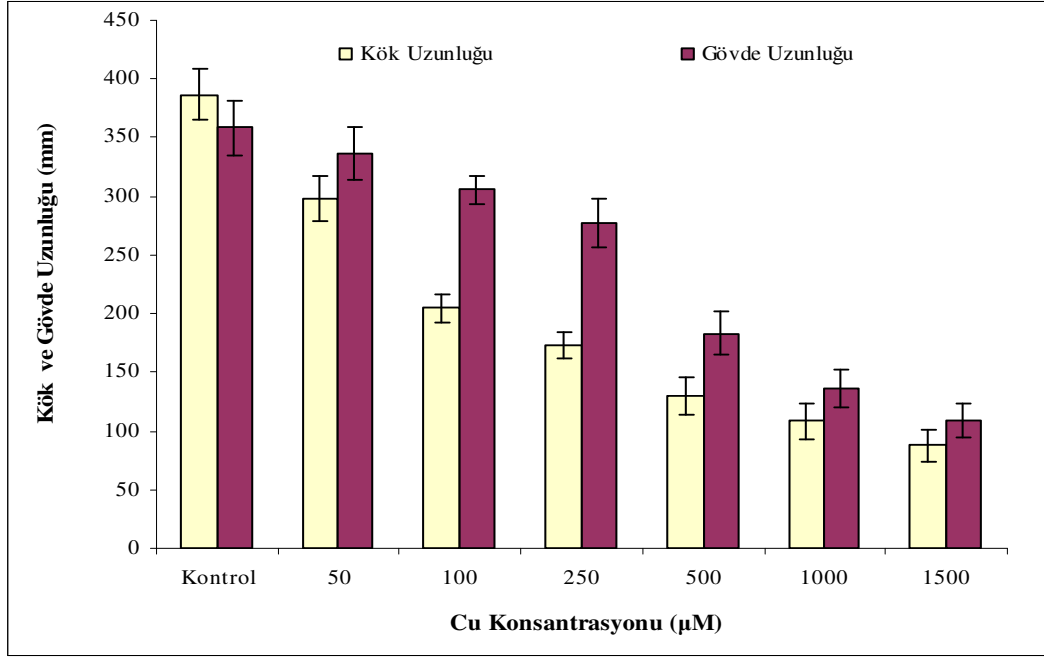
Tablo 4.3: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök ve gövde uzunlukları

<i>Bakır konsantrasyonu (<math>\mu\text{M}</math>)</i>	<i>Kök Uzunluğu (mm)</i>	<i>Gövde Uzunluğu (mm)</i>
Kontrol	386.6 $\pm$ 21.71	358.4 $\pm$ 23.22
50	298.2 $\pm$ 19.35	336.3 $\pm$ 22.54
100	204.4 $\pm$ 12.24	305.6 $\pm$ 11.78
250	172.8 $\pm$ 10.64	276.6 $\pm$ 20.84
500	129.40 $\pm$ 16.33	183.2 $\pm$ 18.12
1000	108.50 $\pm$ 14.86	135.8 $\pm$ 16.44
1500	87.40 $\pm$ 13.56	108.6 $\pm$ 14.22

Mısır fidelerinin kök ve gövde uzunluklarının bakır uygulamalarına bağlı olarak azaldığı, en belirgin gerilemenin konsantrasyon artışına paralel olarak köklerde meydana geldiği belirlendi (Tablo 4.3, Şekil 4.5, Şekil 4.6).

Kontrolde kök ve gövde uzunluğunun yaklaşık olarak birbirine yakın olduğu, 50  $\mu\text{M}$  Cu'daki fidelerin büyüme oranında kontrole göre belirgin bir değişim olmadığı, 100  $\mu\text{M}$  Cu'da ise kontrol ile kıyaslandığında köklerde %47.1, gövdede %14.7 lik bir azalmanın gerçekleştiği kaydedildi. 250  $\mu\text{M}$  Cu'dan itibaren ise özellikle köklerde olmak üzere her iki bitki kısmında da belirgin düşüşler olduğu saptandı (Şekil 4.6). En yüksek konsantrasyon olan 1500  $\mu\text{M}$  Cu serisindeki fidelerin köklerinde kontrole göre %77.4, gövdelerinde ise %69.7 oranında gerilemeler tespit edildi (Tablo 4.3, Şekil 4.5).





Şekil 4.5: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 μM CuSO<sub>4</sub> çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök ve gövde uzunlukları



Şekil 4.6: Kontrol ve 250 μM CuSO<sub>4</sub> çözeltisi uygulanmış 15 günlük mısır fidelerinin kök, gövde ve yapraklarının genel görünüşleri

#### 4.5. TAZE VE KURU AĞIRLIK MİKTARI

7 gün boyunca kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  serilerine maruz bırakılan 15 günlük mısır fidelerinin kök, gövde ve yapraklarının taze-kuru ağırlıkları ölçülerek elde edilen sonuçlar Tablo 4.4, Şekil 4.7.a ve Şekil 4.7.b de gösterildi.

Tablo 4.4: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarının taze ve kuru ağırlıkları

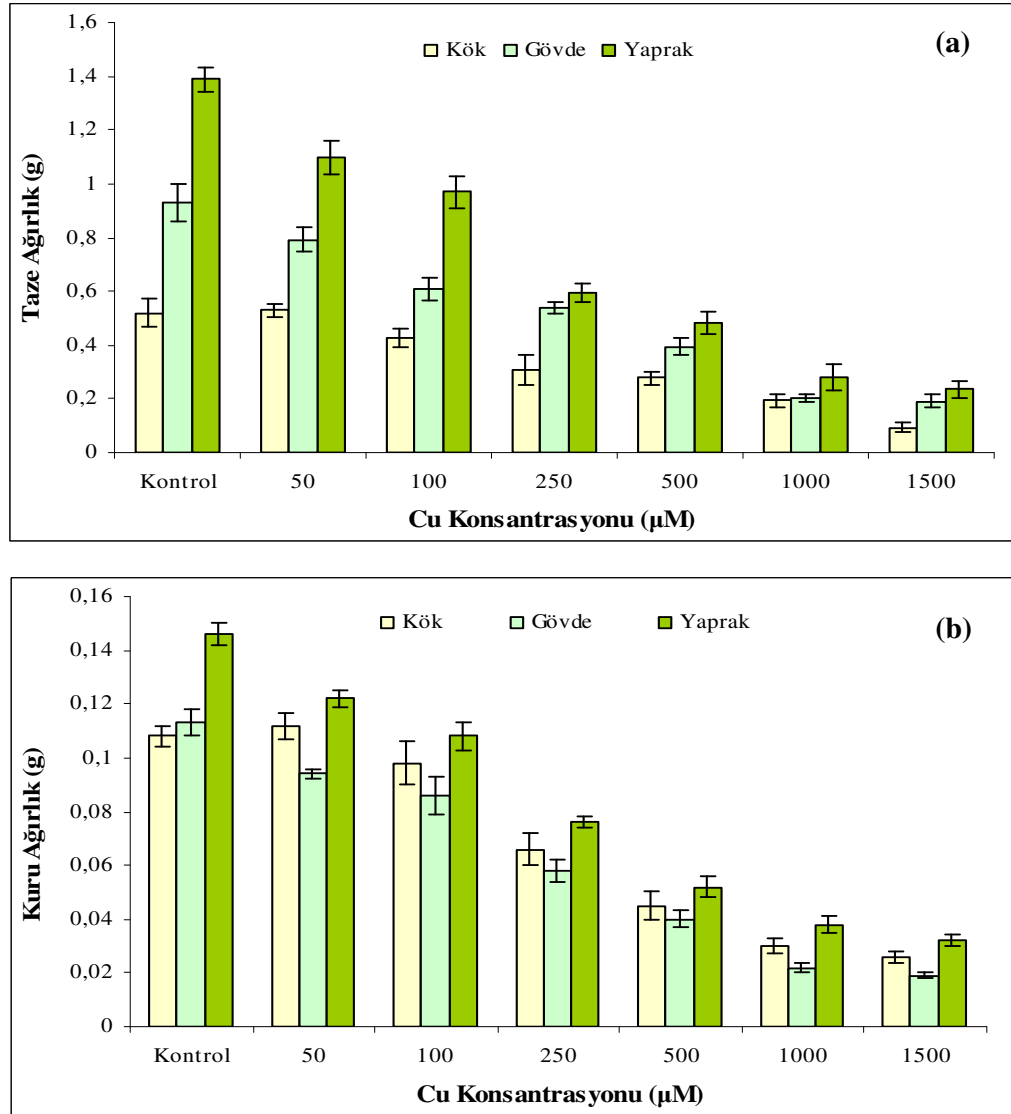
<i>Bakır konsantrasyonu (<math>\mu\text{M}</math>)</i>	<i>Taze Ağırlık (g)</i>		
	<i>Kök</i>	<i>Gövde</i>	<i>Yaprak</i>
Kontrol	0.518 $\pm$ 0.052	0.928 $\pm$ 0.068	1.388 $\pm$ 0.046
50	0.529 $\pm$ 0.024	0.792 $\pm$ 0.045	1.099 $\pm$ 0.062
100	0.426 $\pm$ 0.036	0.606 $\pm$ 0.042	0.968 $\pm$ 0.059
250	0.305 $\pm$ 0.056	0.538 $\pm$ 0.024	0.596 $\pm$ 0.034
500	0.276 $\pm$ 0.024	0.392 $\pm$ 0.032	0.481 $\pm$ 0.042
1000	0.194 $\pm$ 0.026	0.205 $\pm$ 0.014	0.278 $\pm$ 0.048
1500	0.092 $\pm$ 0.018	0.192 $\pm$ 0.026	0.236 $\pm$ 0.032

	<b>Kuru Ağırlık (g)</b>		
	<b>Kök</b>	<b>Gövde</b>	<b>Yaprak</b>
Kontrol	0.108 $\pm$ 0.034	0.113 $\pm$ 0.015	0.146 $\pm$ 0.014
50	0.112 $\pm$ 0.045	0.094 $\pm$ 0.012	0.122 $\pm$ 0.023
100	0.098 $\pm$ 0.023	0.086 $\pm$ 0.021	0.108 $\pm$ 0.018
250	0.066 $\pm$ 0.016	0.058 $\pm$ 0.011	0.076 $\pm$ 0.021
500	0.045 $\pm$ 0.025	0.040 $\pm$ 0.014	0.052 $\pm$ 0.014
1000	0.030 $\pm$ 0.030	0.022 $\pm$ 0.008	0.038 $\pm$ 0.009
1500	0.026 $\pm$ 0.012	0.019 $\pm$ 0.006	0.032 $\pm$ 0.001

Kök ve gövdelerdeki taze ağırlık miktarları 50  $\mu\text{M}$  Cu'da kontrole yakın değerler verirken, gövdede %14.6, yapraklarda ise %20.8 azalma gösterdi. 100  $\mu\text{M}$  Cu'dan itibaren her üç bitki kısmındaki taze ağırlık azalışı konsantrasyon artışına bağlı olarak hızla devam etti. 1500  $\mu\text{M}$  Cu'daki fidelerin çeşitli kısımlarının taze ağırlıklarındaki düşüşler kontrole göre sırasıyla köklerde %82.2, gövdede %79.3 yapraklarda ise %82.9 olarak tespit edildi (Tablo 4.4, Şekil 4.7.a, Şekil 4.7.b).

Kuru ağırlık miktarlarında ise kontrole göre 50  $\mu\text{M}$  Cu uygulanan köklerde %3.7 lik bir artış meydana gelirken; gövde ve yapraklarda sırasıyla %16.8 ve %16.4 olmak üzere bir miktar azalma kaydedildi. 100  $\mu\text{M}$  Cu'dan itibaren kuru ağırlıktaki düşüşün kontrole göre önemli farklılıklar ortaya koyduğu belirlendi. 1500  $\mu\text{M}$  Cu serisindeki fidelerin köklerindeki indirgenme kontrol ile karşılaştırıldığında %75.9 iken, bu oran gövdede %83.1, yapraklarda ise %78.0 olarak saptandı. (Tablo 4.4, Şekil 4.7.a, Şekil 4.7.b).



Şekil 4.7: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$  CuSO<sub>4</sub> uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarının taze (a) ve kuru (b) ağırlık miktarları

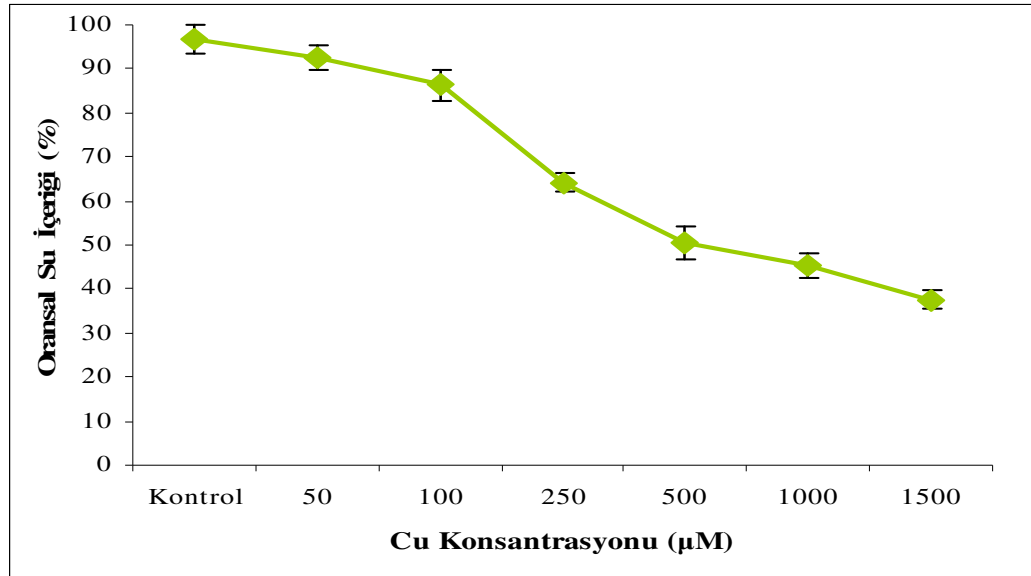
#### 4.6. ORANSAL SU İÇERİĞİ

Kontrol, 50, 100, 250, 500, 1000 ve 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  çözeltileri olarak uygulanan bakırın 15 günlük mısır fidelerinin yapraklarındaki oransal su içeriğine etkileri yüzde cinsinden tespit edildi ve ilgili değerler Tablo 4.5 ve Şekil 4.8 de gösterildi.

Tablo 4.5: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin yapraklarındaki oransal su içeriği

<i>Bakır konsantrasyonu (<math>\mu\text{M}</math>)</i>	<i>Oransal Su İçeriği (%)</i>
Kontrol	96.8 $\pm$ 3.3
50	92.6 $\pm$ 2.8
100	86.4 $\pm$ 3.5
250	64.2 $\pm$ 2.2
500	50.4 $\pm$ 3.6
1000	45.2 $\pm$ 2.8
1500	37.4 $\pm$ 2.1

50 ve 100  $\mu\text{M}$  Cu uygulanan fidelerin yapraklarındaki oransal su içeriğinde kontrole göre sırasıyla %4.2 ve %12.4 oranında; 250, 500, 1000 ve 1500  $\mu\text{M}$ 'da ise %32.6, %46.4, %51.6 ve %59.4 civarında azalmalar olduğu saptandı (Tablo 4.5, Şekil 4.8).



Şekil 4.8: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin yapraklarındaki oransal su içeriği

#### 4.7. MEMBRAN PERMEABİLİTESİNDE MEYDANA GELEN DEĞİŞİMLER

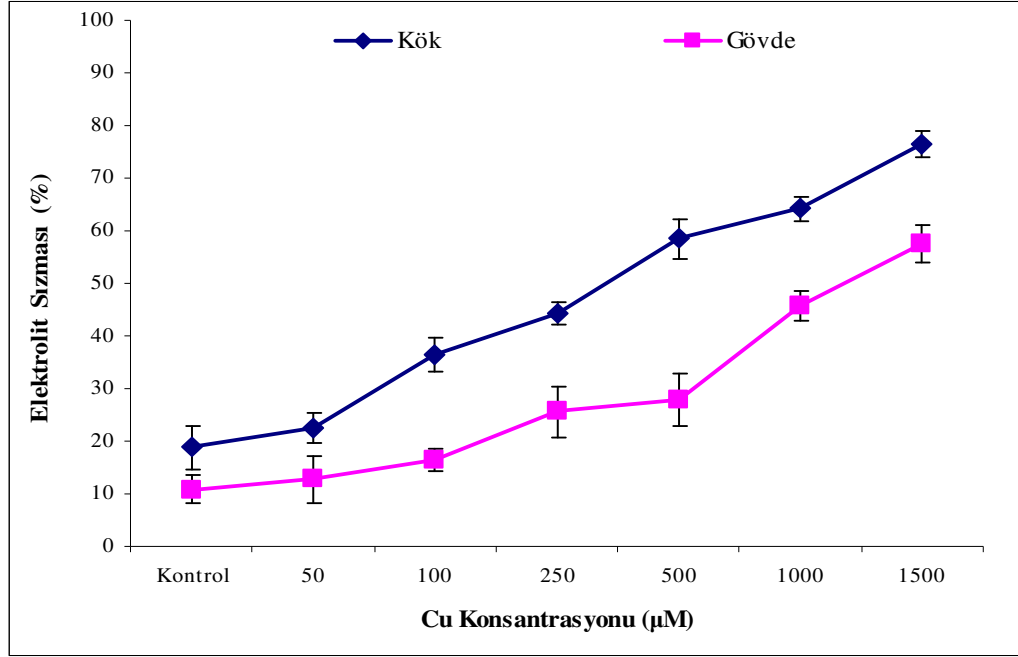
Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  serilerine maruz bırakılan 15 günlük mısır fidelerindeki hücrelerin membran permeabilitesinde meydana gelen değişimler; kök ve yapraklardaki elektrolit sızma miktarları ölçülerek yüzde cinsinden ifade edildi. Elde edilen değerler Tablo 4.6 ile Şekil 4.9 da gösterildi.

Tablo 4.6: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök ve yapraklarındaki elektrolit sızma yüzdesi

<i>Bakır konsantrasyonu (<math>\mu\text{M}</math>)</i>	<i>Elektrolit Sızma Yüzdesi (%)</i>	
	<b>Kök</b>	<b>Yaprak</b>
Kontrol	18.8 $\pm$ 4.2	10.8 $\pm$ 2.7
50	22.6 $\pm$ 2.8	12.7 $\pm$ 4.5
100	36.4 $\pm$ 3.3	16.5 $\pm$ 2.2
250	44.2 $\pm$ 2.2	25.6 $\pm$ 4.8
500	58.4 $\pm$ 3.6	27.8 $\pm$ 5.1
1000	64.2 $\pm$ 2.3	45.6 $\pm$ 2.8
1500	76.4 $\pm$ 2.6	57.6 $\pm$ 3.6

Tablo 4.6 ve Şekil 4.9 da görüldüğü gibi, köklerdeki elektrolit sızma yüzdeleri kontrole göre 50  $\mu\text{M}$ 'da %3.8 fazla iken; 100, 250, 500, 1000 ve 1500  $\mu\text{M}$ 'da sırasıyla %17.6, %25.4, %39.6, %45.4 ve %57.6 oranlarında artış saptandı. Yapraklarda ise kontrol ile karşılaştırıldığında deney gruplarında sırasıyla %1.9, %5.7, %14.8, %17.0, %34.8 ve %46.8 olmak üzere hücrelerden elektrolit kaybının arttığı kaydedildi.

Elde edilen bulgulara göre, bakır uygulamalarına paralel olarak kök ve yaprak hücrelerinden dış ortama sızan elektrolit yüzdelerinde önemli artışlar meydana gelirken; bu oranların Cu konsantrasyonlarına bağlı olarak köklerde yapraklara göre daha fazla olduğu tespit edildi (Tablo 4.6, Şekil 4.9).



Şekil 4.9: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök ve yapraklarındaki elektrolit sızma yüzdesi

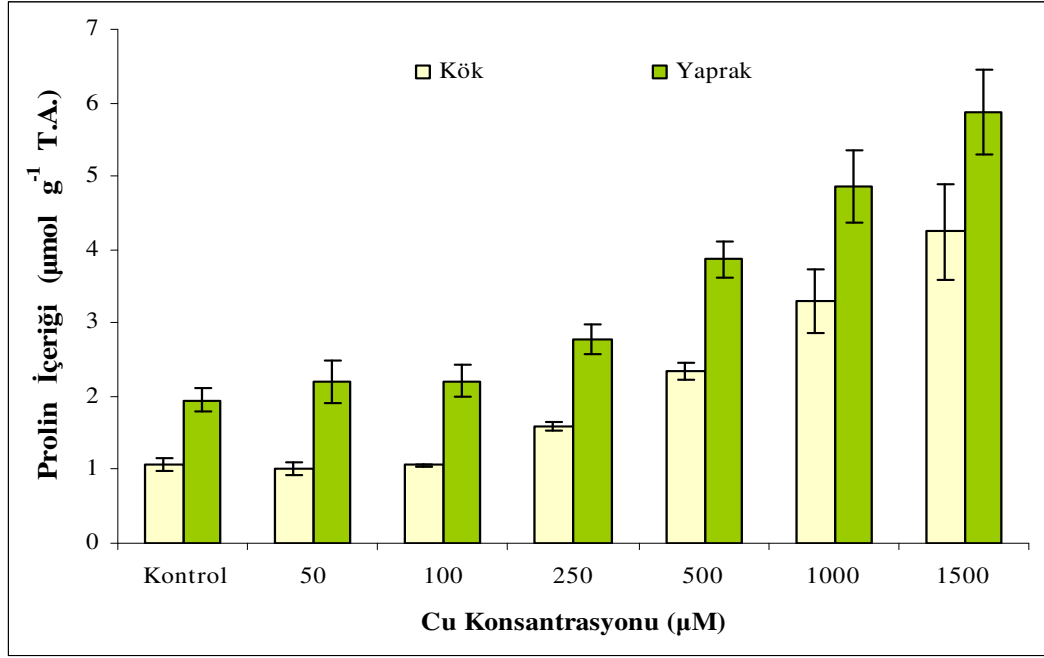
#### 4.8. PROLİN İÇERİĞİ

7 gün boyunca kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  serilerine maruz bırakılan 15 günlük mısır fidelerinin kök ve yapraklarındaki prolin içerikleri Tablo 4.7 ve Şekil 4.10 da gösterildi.

Tablo 4.7: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök ve yapraklarındaki prolin içeriği

Bakır konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ )	Prolin İçeriği ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ T.A.)	
	Kök	Yaprak
Kontrol	1.07 $\pm$ 0.09	1.95 $\pm$ 0.16
50	1.02 $\pm$ 0.08	2.20 $\pm$ 0.28
100	1.06 $\pm$ 0.02	2.21 $\pm$ 0.22
250	1.59 $\pm$ 0.07	2.78 $\pm$ 0.21
500	2.34 $\pm$ 0.12	3.87 $\pm$ 0.24
1000	3.30 $\pm$ 0.44	4.85 $\pm$ 0.49
1500	4.24 $\pm$ 0.66	5.86 $\pm$ 0.58

Tablo 4.7 ve Şekil 4.10 da görüldüğü gibi, bakır konsantrasyonu artışı 50 ve 100  $\mu\text{M}$  Cu uygulanan fidelerin kök ve yapraklarındaki prolin içeriğinde kontrole göre önemli bir değişime neden olmazken; 250  $\mu\text{M}$  dan itibaren her iki bitki kısmında da belirgin miktarlarda prolin birikiminin meydana geldiği belirlendi. 1500  $\mu\text{M}$  da köklerdeki prolin içeriği kontrolün yaklaşık 4 katı iken; yapraklarda 3 katına kadar çıktığı saptandı.



Şekil 4.10: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök ve yapraklarındaki prolin içeriği

#### 4.9. TOTAL ÇÖZÜNEBİLİR PROTEİN İÇERİĞİ

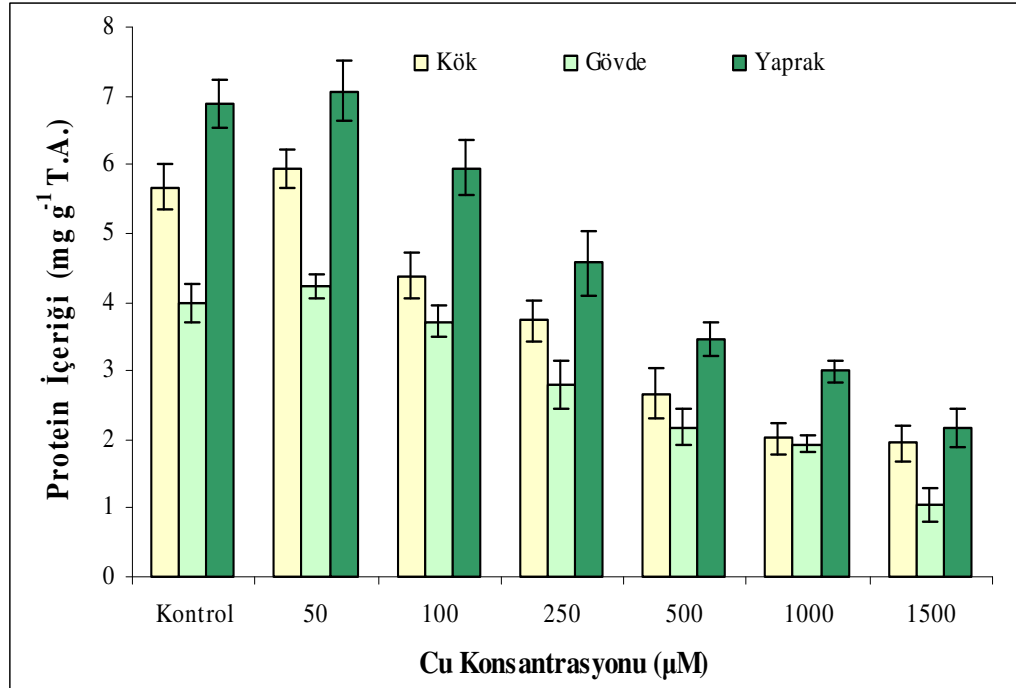
Çeşitli konsantrasyonlardaki bakır uygulamalarının 15 günlük mısır fidelerinin kök, gövde ve yapraklarındaki total çözünebilir protein içerikleri üzerindeki etkileri tayin edilerek elde edilen değerler Tablo 4.8 ve Şekil 4.11 da gösterildi.

Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  serilerine maruz bırakılan 15 günlük mısır fidelerinin kök, gövde ve yapraklarındaki total protein içeriklerinin bu konsantrasyonlardaki bakır uygulamalarından farklı şekillerde etkilendiği tespit edildi. 50  $\mu\text{M}$  Cu her üç bitki kısmında da kontrole göre sırasıyla köklerde %4.76, gövdede %6.28 ve yapraklarda %2.76 lık artışına neden olurken; 100  $\mu\text{M}$  Cu dan itibaren protein miktarlarında düşüşler görülmeye başlandı (Tablo 4.8, Şekil 4.11).

Tablo 4.8: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki total protein içeriği

Bakır konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ )	Total protein içeriği ( $\text{mg g}^{-1}$ T.A.)		
	Kök	Gövde	Yaprak
Kontrol	5.67 $\pm$ 0.34	3.98 $\pm$ 0.27	6.88 $\pm$ 0.35
50	5.94 $\pm$ 0.48	4.23 $\pm$ 0.18	7.07 $\pm$ 0.44
100	4.38 $\pm$ 0.33	3.72 $\pm$ 0.24	5.95 $\pm$ 0.40
250	3.73 $\pm$ 0.29	2.79 $\pm$ 0.35	4.56 $\pm$ 0.48
500	2.67 $\pm$ 0.36	2.18 $\pm$ 0.26	3.45 $\pm$ 0.24
1000	2.02 $\pm$ 0.23	1.93 $\pm$ 0.12	2.99 $\pm$ 0.17
1500	1.94 $\pm$ 0.25	1.06 $\pm$ 0.24	2.16 $\pm$ 0.29

Bakır konsantrasyonu artışının özellikle 250  $\mu\text{M}$  dan itibaren protein yıkımını hızlandırdığı saptandı. 1500  $\mu\text{M}$  Cu serisindeki fidelerin total protein miktarlarında köklerde kontrole göre %67.5, gövdede %73.3, yapraklarda ise %68.6 ya kadar varan gerilemeler meydana geldiği belirlendi (Tablo 4.8, Şekil 4.11).



Şekil 4.11: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki total protein içeriği



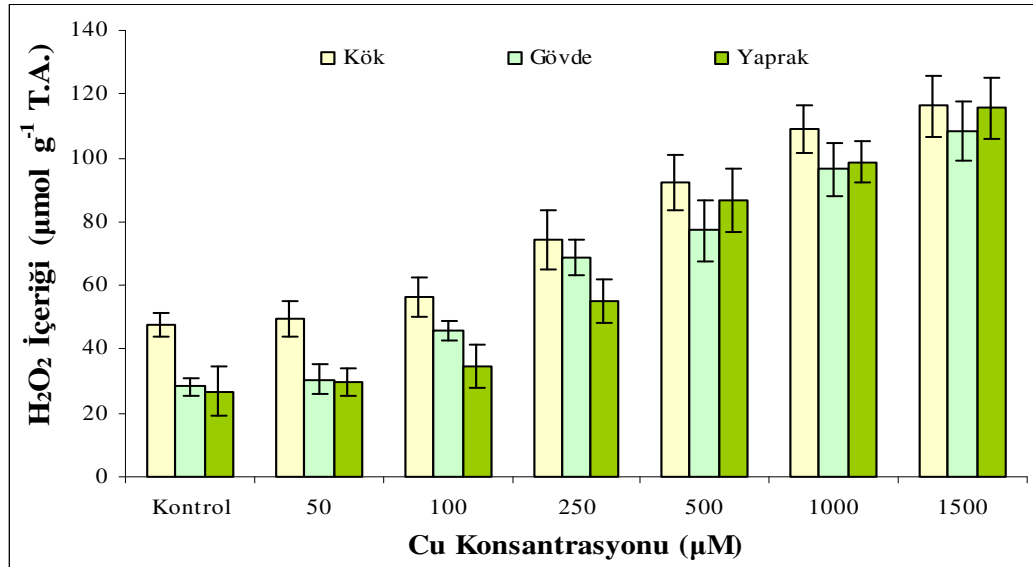
#### 4.10. HİDROJEN PEROKSİT İÇERİĞİ

Tablo 4.9 ile Şekil 4.12 de gösterilen verilere göre bakır konsantrasyonu artışının başta kökler olmak üzere gövde ve yapraklardaki  $H_2O_2$  oluşumunu teşvik ettiği tespit edildi.

Tablo 4.9: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu M$   $CuSO_4$  çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) içeriği

<i>Bakır konsantrasyonu (<math>\mu M</math>)</i>	<i><math>H_2O_2</math> içeriği (<math>\mu mol g^{-1} T.A.</math>)</i>		
	<b>Kök</b>	<b>Gövde</b>	<b>Yaprak</b>
Kontrol	37.80 $\pm$ 3.7	28.30 $\pm$ 2.6	26.80 $\pm$ 7.7
50	49.60 $\pm$ 5.8	30.60 $\pm$ 4.7	29.70 $\pm$ 4.5
100	56.40 $\pm$ 6.3	45.80 $\pm$ 2.9	34.50 $\pm$ 6.7
250	74.20 $\pm$ 9.2	68.60 $\pm$ 5.7	55.00 $\pm$ 6.8
500	92.40 $\pm$ 8.6	77.30 $\pm$ 9.5	86.60 $\pm$ 9.8
1000	109.2 $\pm$ 7.3	96.40 $\pm$ 8.2	98.70 $\pm$ 6.6
1500	116.4 $\pm$ 9.6	108.3 $\pm$ 9.1	115.6 $\pm$ 9.4

500  $\mu M$  ve üzerindeki Cu uygulamalarına maruz kalan her üç bitki kısmında da kontrolün oldukça üzerinde değerlerin ortaya çıktığı saptandı. 1500  $\mu M$  Cu çözeltilisinde yetiştirilen mısır fidelerindeki  $H_2O_2$  birikiminin köklerde kontrole göre yaklaşık 3.0 kat, gövdede 3.8 kat, yapraklarda ise 4.3 kat arttığı belirlendi (Tablo 4.9, Şekil 4.12).



Şekil 4.12: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu M$   $CuSO_4$  çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) içeriği

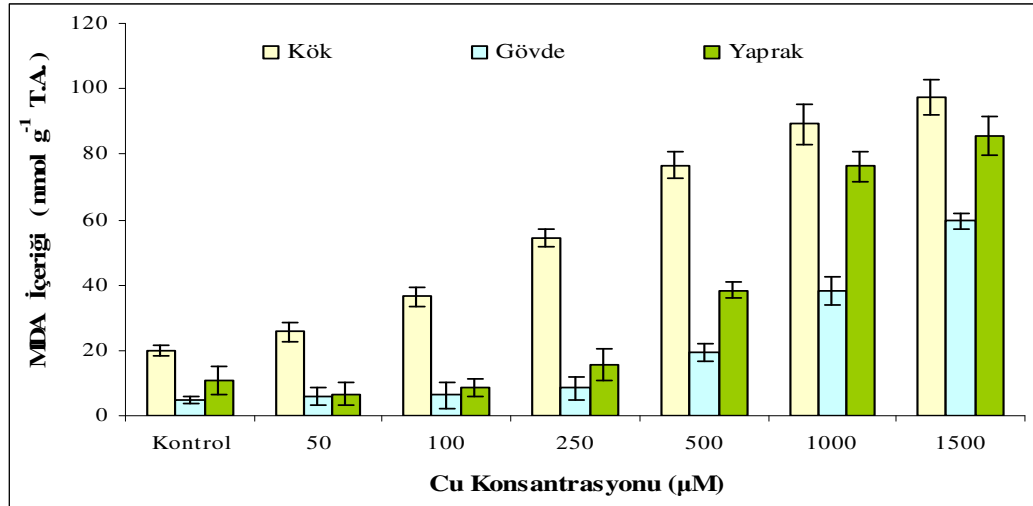
#### 4.11. MALONDIALDEHİT İÇERİĞİ

Bakır uygulamalarının 15 günlük mısır fidelerinin çeşitli kısımlarındaki lipit peroksidasyonu üzerindeki etkileri yıkım ürünlerinden birisi olan malondialdehit (MDA) miktarının ölçülmesi ile tespit edildi. Kök, gövde ve yapraklardaki MDA içeriğinin bakır konsantrasyonu artışına paralel olarak teşvik edildiği; 50, 100 ve 250  $\mu\text{M}$  Cu da kontrole yakın değerler verirken; 500  $\mu\text{M}$  ve üzerindeki serilerde kontrolün oldukça üzerine çıktığı saptandı (Tablo 4.10, Şekil 4.13).

Tablo 4.10: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki malondialdehit (MDA) içeriği

Bakır konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ )	MDA içeriği ( $\text{nmol g}^{-1}$ T.A.)		
	Kök	Gövde	Yaprak
Kontrol	19.9 $\pm$ 1.4	4.77 $\pm$ 1.2	10.8 $\pm$ 4.5
50	25.6 $\pm$ 2.8	5.86 $\pm$ 2.5	6.70 $\pm$ 3.4
100	36.4 $\pm$ 3.0	6.22 $\pm$ 3.8	8.50 $\pm$ 2.7
250	54.2 $\pm$ 2.6	8.39 $\pm$ 3.5	15.6 $\pm$ 4.8
500	76.6 $\pm$ 3.9	19.2 $\pm$ 2.6	38.4 $\pm$ 2.4
1000	89.2 $\pm$ 6.3	38.3 $\pm$ 4.2	76.2 $\pm$ 4.5
1500	97.4 $\pm$ 5.6	59.6 $\pm$ 2.4	85.8 $\pm$ 5.9

1500  $\mu\text{M}$  da MDA miktarının köklerde kontrole göre yaklaşık 5 kat, gövdede 12 kat, yapraklarda ise 8 kat fazla birikim gösterdiği saptandı (Tablo 4.10, Şekil 4.13).



Şekil 4.13: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki malondialdehit (MDA) içeriği

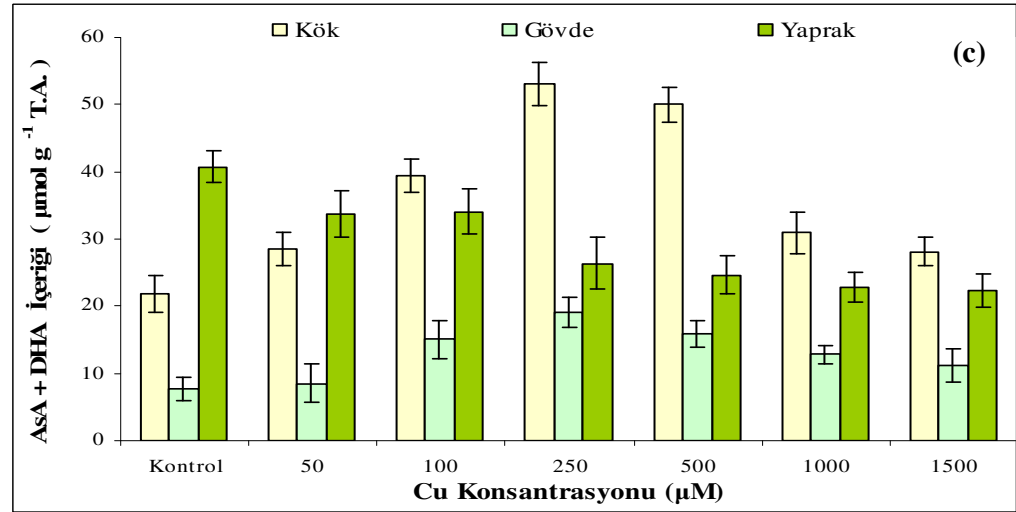
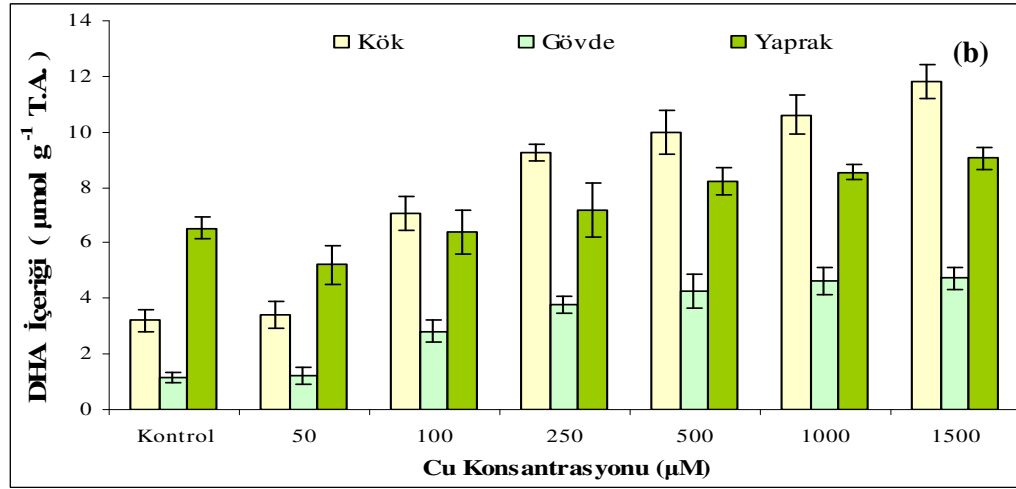
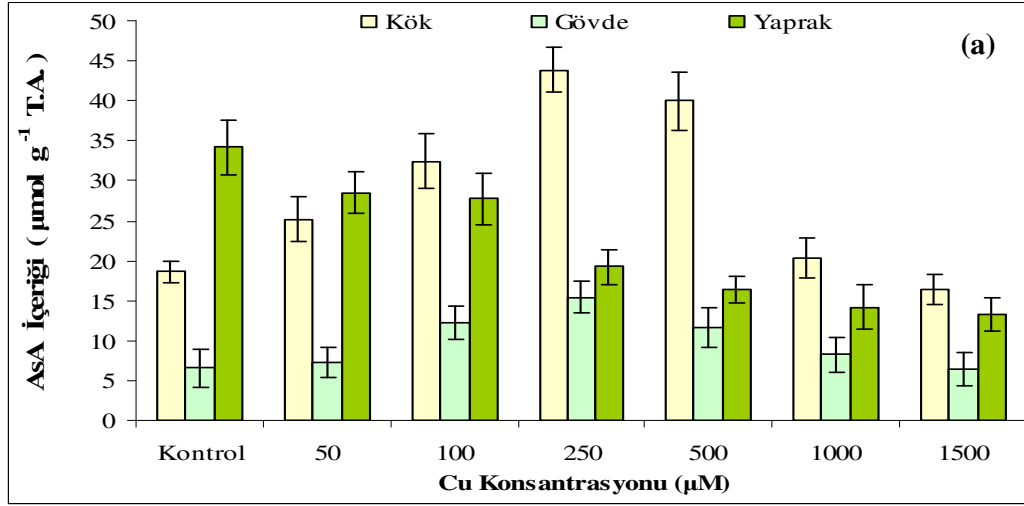
#### 4.12. ASKORBAT İÇERİĞİ

Tablo 4.11 ve Şekil 4.14'e göre, 50, 100 ve 250  $\mu\text{M}$  Cu serilerindeki fidelerin kök ve gövdelerindeki AsA ve total AsA içeriğinde kontrole göre artış kaydedilirken; 500  $\mu\text{M}$  ve üzerindeki konsantrasyonlarda tekrar azalmaya başladığı belirlendi.

Tablo 4.11: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki redüklenmiş askorbat (AsA), dehidroaskorbat (DHA) ve total askorbat (AsA+DHA) içeriği

<i>Bakır konsantrasyonu (<math>\mu\text{M}</math>)</i>	<i>AsA içeriği</i>	<i>DHA içeriği</i>	<i>AsA + DHA içeriği (<math>\mu\text{mol g}^{-1}</math> T.A. )</i>
<b><u>Kök</u></b>			
Kontrol	18.60 $\pm$ 1.4	3.20 $\pm$ 0.4	21.80 $\pm$ 2.7
50	25.20 $\pm$ 2.8	3.40 $\pm$ 0.5	28.60 $\pm$ 2.5
100	32.40 $\pm$ 3.4	7.05 $\pm$ 0.6	39.45 $\pm$ 2.4
250	43.80 $\pm$ 2.8	9.25 $\pm$ 0.3	53.05 $\pm$ 3.3
500	39.98 $\pm$ 3.6	9.98 $\pm$ 0.8	49.96 $\pm$ 2.6
1000	20.27 $\pm$ 2.5	10.6 $\pm$ 0.7	30.87 $\pm$ 3.0
1500	16.33 $\pm$ 1.9	11.8 $\pm$ 0.6	28.13 $\pm$ 2.1
<b><u>Gövde</u></b>			
Kontrol	6.58 $\pm$ 2.4	1.15 $\pm$ 0.2	7.73 $\pm$ 1.7
50	7.29 $\pm$ 1.8	1.21 $\pm$ 0.3	8.50 $\pm$ 2.8
100	12.2 $\pm$ 2.1	2.82 $\pm$ 0.4	15.02 $\pm$ 2.9
250	15.4 $\pm$ 2.0	3.76 $\pm$ 0.3	19.16 $\pm$ 2.2
500	11.6 $\pm$ 2.5	4.25 $\pm$ 0.6	15.85 $\pm$ 1.9
1000	8.21 $\pm$ 2.2	4.64 $\pm$ 0.5	12.85 $\pm$ 1.4
1500	6.44 $\pm$ 2.0	4.72 $\pm$ 0.4	11.16 $\pm$ 2.6
<b><u>Yaprak</u></b>			
Kontrol	34.2 $\pm$ 3.4	6.54 $\pm$ 0.4	40.74 $\pm$ 2.3
50	28.5 $\pm$ 2.6	5.22 $\pm$ 0.7	33.72 $\pm$ 3.5
100	27.7 $\pm$ 3.2	6.39 $\pm$ 0.8	34.09 $\pm$ 3.3
250	19.2 $\pm$ 2.2	7.18 $\pm$ 1.0	26.38 $\pm$ 3.8
500	16.4 $\pm$ 1.6	8.22 $\pm$ 0.5	24.62 $\pm$ 2.9
1000	14.2 $\pm$ 2.8	8.55 $\pm$ 0.3	22.75 $\pm$ 2.2
1500	13.3 $\pm$ 2.1	9.04 $\pm$ 0.4	22.34 $\pm$ 2.4

Yapraklarda ise AsA ve total AsA birikimi bakır uygulamalarına bağlı olarak kontrole göre azalırken; DHA içeriğinin bir miktar yükseldiği saptandı (Tablo 4.11, Şekil 4.14).



Şekil 4.14: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO<sub>4</sub> çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki (a) redüklenmiş askorbat (AsA), (b) dehidroaskorbat (DHA) ve (c) total askorbat (AsA+DHA) içeriği

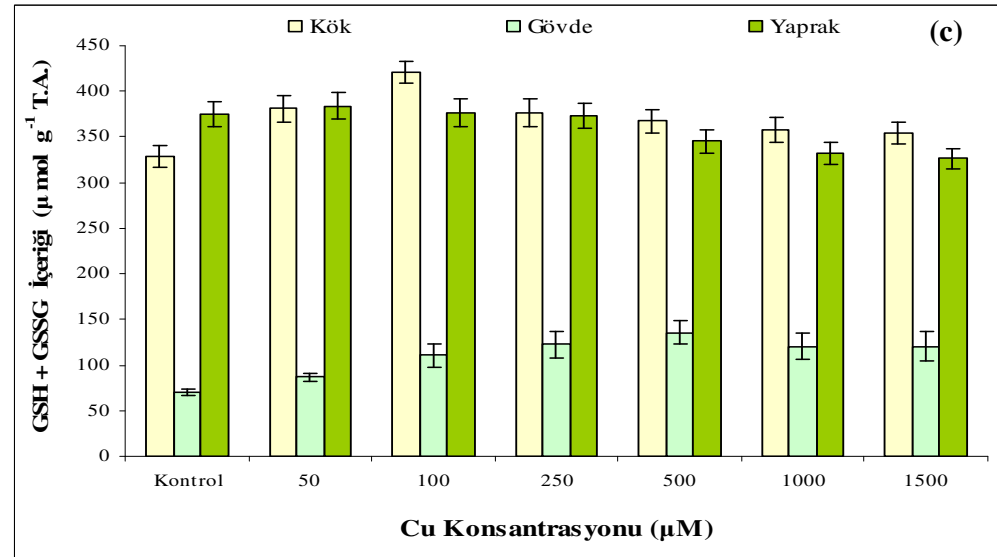
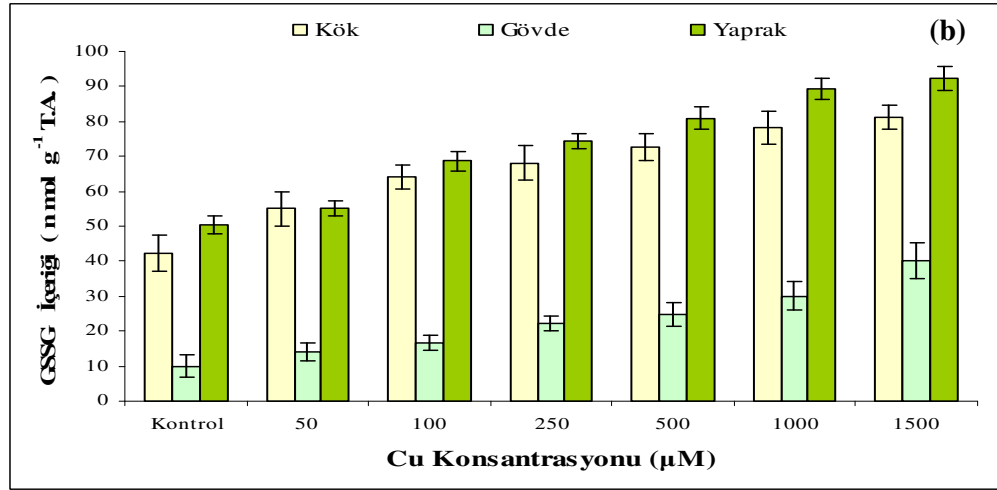
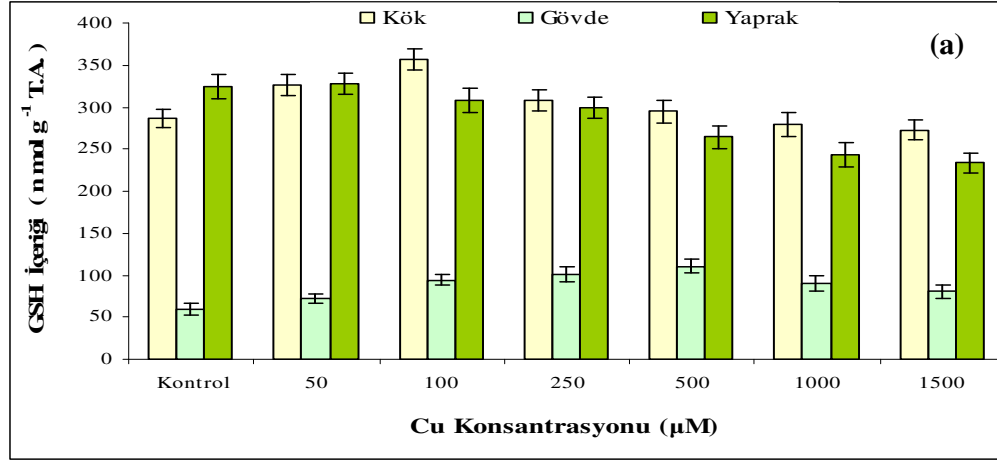
### 4.13. GLUTATYON İÇERİĞİ

Tablo 4.12 ve Şekil 4.15 den izlendiği gibi 50, 100 ve 250  $\mu\text{M}$  daki fidelerin kök, gövde ve yapraklarındaki GSH ve total GSH içerikleri kontrole göre artarken; 500, 1000 ve 1500  $\mu\text{M}$  da bir miktar azalma görülmekle birlikte kontrole yakın değerler elde edildi.

Tablo 4.12: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin yapraklarındaki redüklenmiş glutatyon (GSH), oksitlenmiş glutatyon (GSSG) ve total glutatyon (GSH+GSSG) içeriği

<i>Bakır konsantrasyonu (<math>\mu\text{M}</math>)</i>	<i>GSH içeriği</i>	<i>GSSG içeriği</i>	<i>GSH+GSSG içeriği (<math>\text{nmol g}^{-1} \text{T.A}</math>)</i>
<b><u>Kök</u></b>			
Kontrol	286.6 $\pm$ 11.4	42.2 $\pm$ 5.2	328.8 $\pm$ 12.3
50	326.2 $\pm$ 12.8	55.0 $\pm$ 4.8	381.2 $\pm$ 14.5
100	356.8 $\pm$ 13.4	64.1 $\pm$ 3.6	420.9 $\pm$ 12.7
250	308.5 $\pm$ 12.8	68.0 $\pm$ 4.9	376.5 $\pm$ 14.8
500	294.6 $\pm$ 13.6	72.6 $\pm$ 3.8	367.2 $\pm$ 12.6
1000	280.0 $\pm$ 14.5	78.2 $\pm$ 4.6	358.2 $\pm$ 13.5
1500	272.4 $\pm$ 11.9	81.3 $\pm$ 3.4	353.7 $\pm$ 12.1
<b><u>Gövde</u></b>			
Kontrol	60.06 $\pm$ 7.4	10.04 $\pm$ 3.1	70.10 $\pm$ 3.7
50	72.29 $\pm$ 5.8	14.21 $\pm$ 2.6	86.50 $\pm$ 4.5
100	94.22 $\pm$ 6.4	16.50 $\pm$ 2.1	110.72 $\pm$ 13.3
250	100.4 $\pm$ 9.0	22.20 $\pm$ 2.3	122.60 $\pm$ 14.2
500	110.6 $\pm$ 8.6	24.80 $\pm$ 3.4	135.40 $\pm$ 12.8
1000	90.21 $\pm$ 9.2	30.09 $\pm$ 4.0	120.30 $\pm$ 14.4
1500	80.44 $\pm$ 8.7	40.16 $\pm$ 5.2	120.60 $\pm$ 15.6
<b><u>Yaprak</u></b>			
Kontrol	324.2 $\pm$ 14.4	50.4 $\pm$ 2.4	374.6 $\pm$ 13.7
50	328.5 $\pm$ 12.6	55.2 $\pm$ 2.2	383.7 $\pm$ 14.5
100	307.7 $\pm$ 14.2	68.6 $\pm$ 2.6	376.3 $\pm$ 15.3
250	299.2 $\pm$ 12.2	74.4 $\pm$ 2.0	373.6 $\pm$ 13.8
500	264.4 $\pm$ 13.6	80.9 $\pm$ 3.2	345.3 $\pm$ 12.9
1000	242.5 $\pm$ 14.5	89.3 $\pm$ 2.9	331.8 $\pm$ 12.4
1500	233.6 $\pm$ 12.1	92.4 $\pm$ 3.4	326.0 $\pm$ 11.2

GSSG birikiminde ise bakır konsantrasyonu artışına paralel olarak her üç bitki kısmında da önemli yükselmeler olduğu kaydedildi (Tablo 4.12 ve Şekil 4.15).



Şekil 4.15: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO<sub>4</sub> çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki (a) redüklenmiş glutatyon (GSH), (b) oksitlenmiş glutatyon (GSSG) ve (c) total glutatyon (GSH+GSSG) içeriği

#### 4.14. KLOROFİL VE KAROTİNOİD İÇERİĞİ

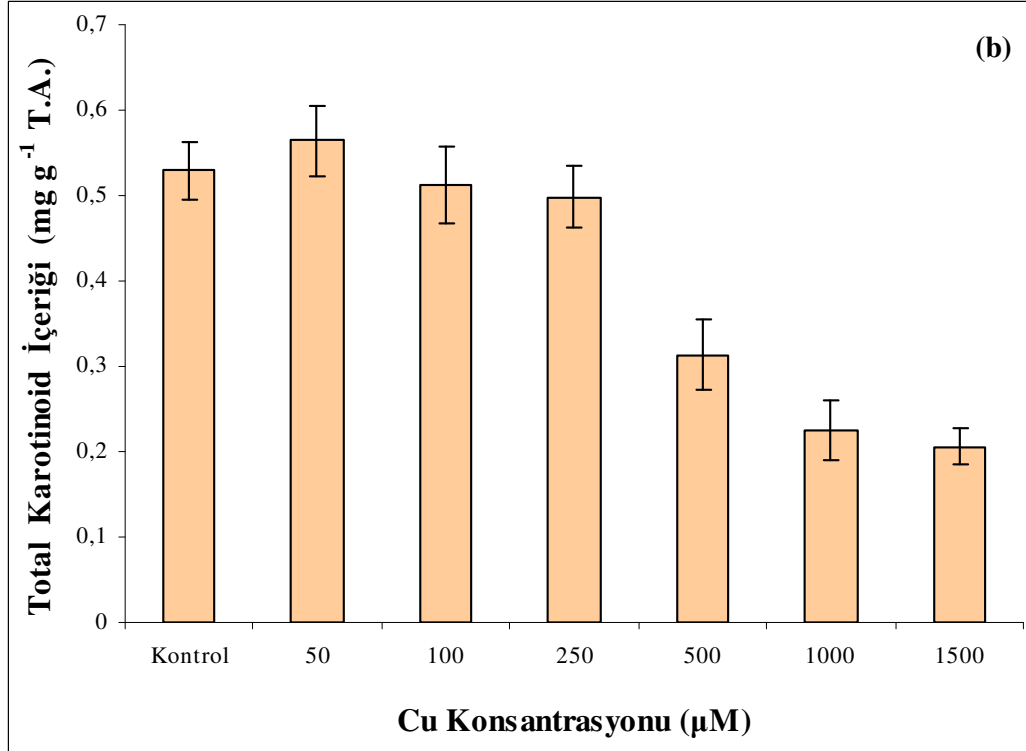
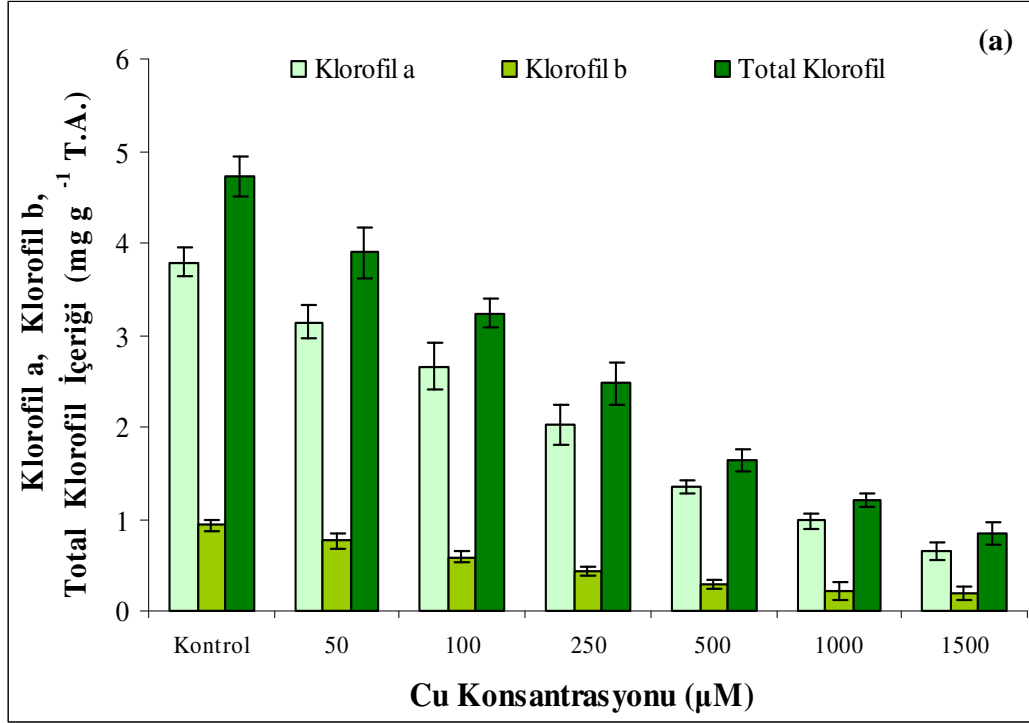
Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  serileri uygulanan 15 günlük mısır fidelerinin ikinci yapraklarındaki klorofil a, klorofil b, total klorofil ve total karotinoid miktarları Tablo 4.13, Şekil 4.16.a ve Şekil 4.16.b de gösterildi.

Tablo 4.13: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin yapraklarındaki klorofil a, klorofil b, total klorofil ve total karotinoid içeriği

<i>Klorofil a, Klorofil b, Total Klorofil ve Total Karotinoid İçeriği (<math>\text{mg g}^{-1}</math> T.A.)</i>				
<b>Bakır Konsantrasyonu (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Klorofil a</b>	<b>Klorofil b</b>	<b>Total Klorofil</b>	<b>Total Karotinoid</b>
Kontrol	3.79 $\pm$ 0.15	0.93 $\pm$ 0.07	4.72 $\pm$ 0.22	0.529 $\pm$ 0.034
50	3.14 $\pm$ 0.18	0.76 $\pm$ 0.09	3.90 $\pm$ 0.28	0.564 $\pm$ 0.042
100	2.66 $\pm$ 0.26	0.58 $\pm$ 0.06	3.24 $\pm$ 0.16	0.512 $\pm$ 0.045
250	2.03 $\pm$ 0.22	0.44 $\pm$ 0.05	2.47 $\pm$ 0.22	0.498 $\pm$ 0.036
500	1.35 $\pm$ 0.07	0.29 $\pm$ 0.04	1.64 $\pm$ 0.12	0.313 $\pm$ 0.041
1000	0.98 $\pm$ 0.08	0.22 $\pm$ 0.09	1.20 $\pm$ 0.07	0.226 $\pm$ 0.035
1500	0.65 $\pm$ 0.09	0.19 $\pm$ 0.08	0.84 $\pm$ 0.12	0.206 $\pm$ 0.022

Tablo 4.13 ve Şekil 4.14.a dan elde edilen bulgulardan da anlaşılacağı gibi bakır konsantrasyonu artışının pigment içeriği üzerinde önemli etkileri olduğu gözlemlendi. 50  $\mu\text{M}$  Cu serisindeki fidelerin yapraklarındaki klorofil a değerleri kontrole yakın bulunurken; klorofil b ve total klorofil içeriğinde %18.27 ve %17.37 lik azalmalar kaydedildi. 100  $\mu\text{M}$  ve üzerindeki bakır uygulamalarında ise kontrole göre belirgin düşüşlerin meydana geldiği saptandı. 1500  $\mu\text{M}$  da klorofil a, klorofil b ve total klorofil içeriğinde kontrol ile karşılaştırıldığında sırasıyla %82.8, %79.5 ve %82.2 olmak üzere önemli indirgenmelerin olduğu belirlendi (Tablo 4.13, Şekil 4.16.a).

Total karotinoid miktarında ise 50  $\mu\text{M}$  Cu serisindeki fidelerin yapraklarında %6.6 lık bir artış saptanırken; 100  $\mu\text{M}$  da %3.2 lik bir azalma görüldü. 250  $\mu\text{M}$  dan itibaren ise pigment içeriğindeki düşüşün kontrole göre daha belirgin olduğu, 1500  $\mu\text{M}$  da total karotinoidlerin %61 lik indirgenme gösterdiği tespit edildi (Tablo 4.13, Şekil 4.16.b).



Şekil 4.16: (a) Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin yapraklarındaki klorofil a, klorofil b ve total klorofil içeriği; (b) total karotinoid içeriği



#### 4.15. ANTOSİYANİN İÇERİĞİ

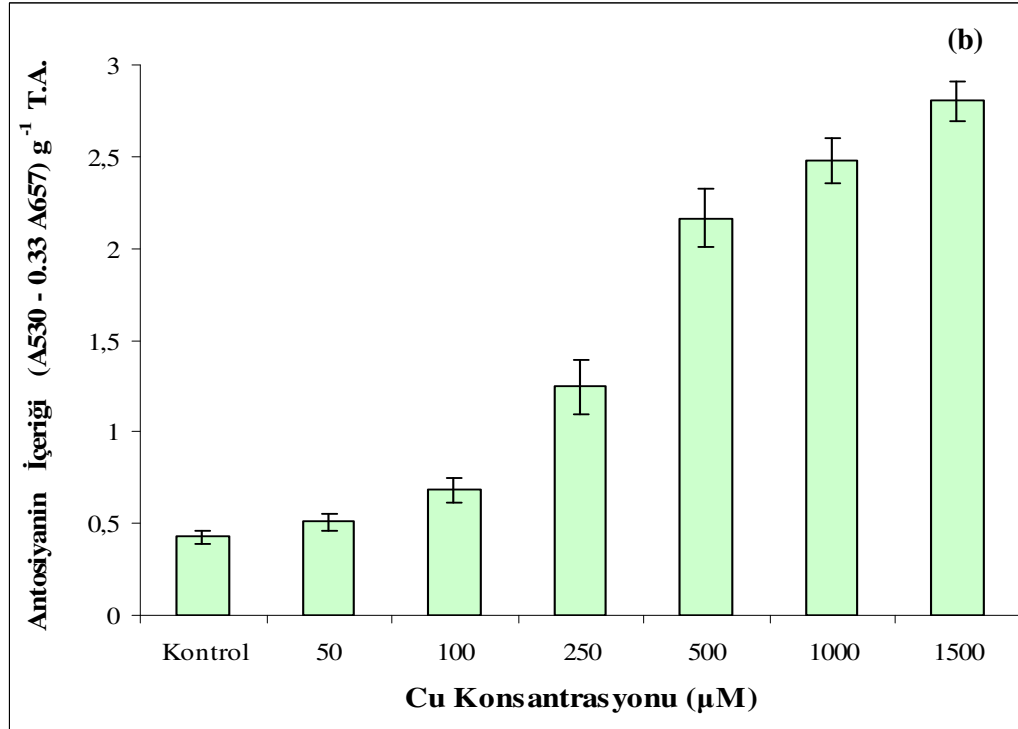
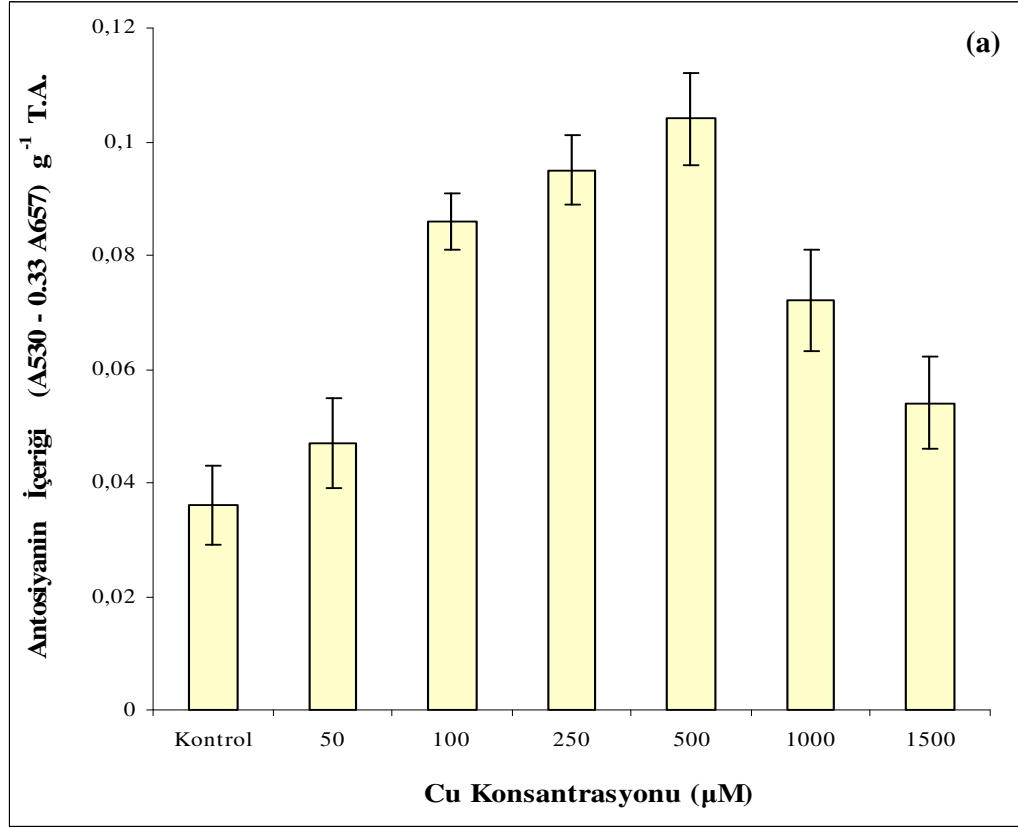
Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  serileri uygulanan 15 günlük mısır fidelerinin kök, yaprak kını ve ilk yapraklarındaki antosiyanin içerikleri Tablo 4.14, Şekil 4.17.a, Şekil 4.17.b ve Şekil 4.17.c de gösterildi.

Tablo 4.14: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, yaprak kını ve ilk yapraklarındaki antosiyanin içeriği

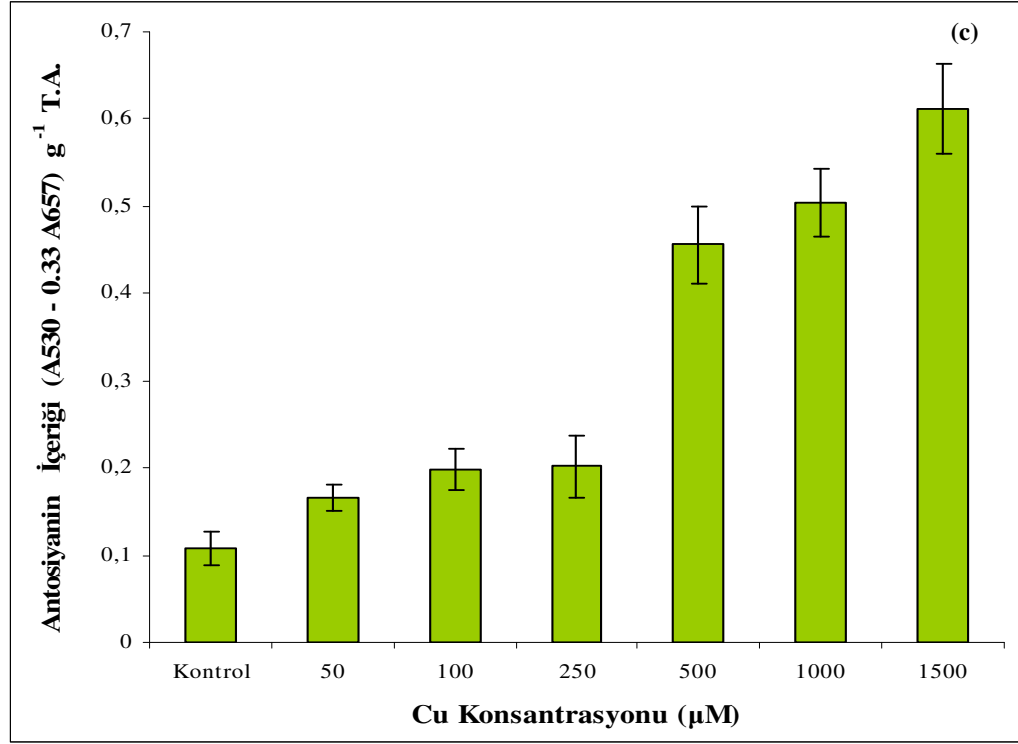
<i>Bakır konsantrasyonu (<math>\mu\text{M}</math>)</i>	<i>Antosiyanin İçeriği (<math>A_{530}-0.33 A_{657}</math>) <math>\text{g}^{-1}</math> T.A.</i>		
	<b>Kök</b>	<b>Yaprak Kını</b>	<b>İlk Yapraklar</b>
Kontrol	0.036 $\pm$ 0.037	0.426 $\pm$ 0.037	0.108 $\pm$ 0.020
50	0.047 $\pm$ 0.048	0.507 $\pm$ 0.048	0.166 $\pm$ 0.015
100	0.086 $\pm$ 0.065	0.684 $\pm$ 0.065	0.198 $\pm$ 0.024
250	0.095 $\pm$ 0.046	1.245 $\pm$ 0.146	0.202 $\pm$ 0.036
500	0.104 $\pm$ 0.033	2.164 $\pm$ 0.162	0.456 $\pm$ 0.044
1000	0.072 $\pm$ 0.022	2.476 $\pm$ 0.122	0.504 $\pm$ 0.039
1500	0.054 $\pm$ 0.028	2.803 $\pm$ 0.143	0.612 $\pm$ 0.052

Tablo 4.14, Şekil 4.17.a, Şekil 4.17.b ve Şekil 4.17.c den izlendiği gibi çeşitli bakır serileri uygulanan mısır fidelerinin kök, yaprak kını ve ilk yapraklarındaki antosiyanin içeriklerinin konsantrasyon artışına paralel olarak teşvik edildiği, köklerde 500  $\mu\text{M}$  Cu dan itibaren düşüş göstermeye başlasa bile özellikle yaprak kını ve ilk yapraklardaki pigment miktarının kontrolün oldukça üzerinde değerlere sahip olduğu saptandı.

Kontrolde yaprak kınındaki antosiyanin içeriğinin köklerden yaklaşık 11.8 kat, ilk yapraklardan ise 3.9 kat fazla olduğu belirlendi. 1500  $\mu\text{M}$  Cu serisindeki fidelerin antosiyanin birikiminin kontrol ile kıyaslandığında yaklaşık olarak köklerde 1.5 kat, yaprak kınında 6.5 kat ve ilk yapraklarda 5.6 kat artış gösterdiği kaydedildi (Tablo 4.14 ve Şekil 4.17.a, Şekil 4.17.b, Şekil 4.17.c).



Şekil 4.17: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO<sub>4</sub> çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin (a) kök, (b) yaprak kınındaki antosiyanın içeriği



Şekil 4.17: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO<sub>4</sub> çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin (c) ilk yapraklarındaki antosiyamin içeriği

#### 4.16. TOTAL FENOLİK BİLEŞİKLERİN İÇERİĞİ

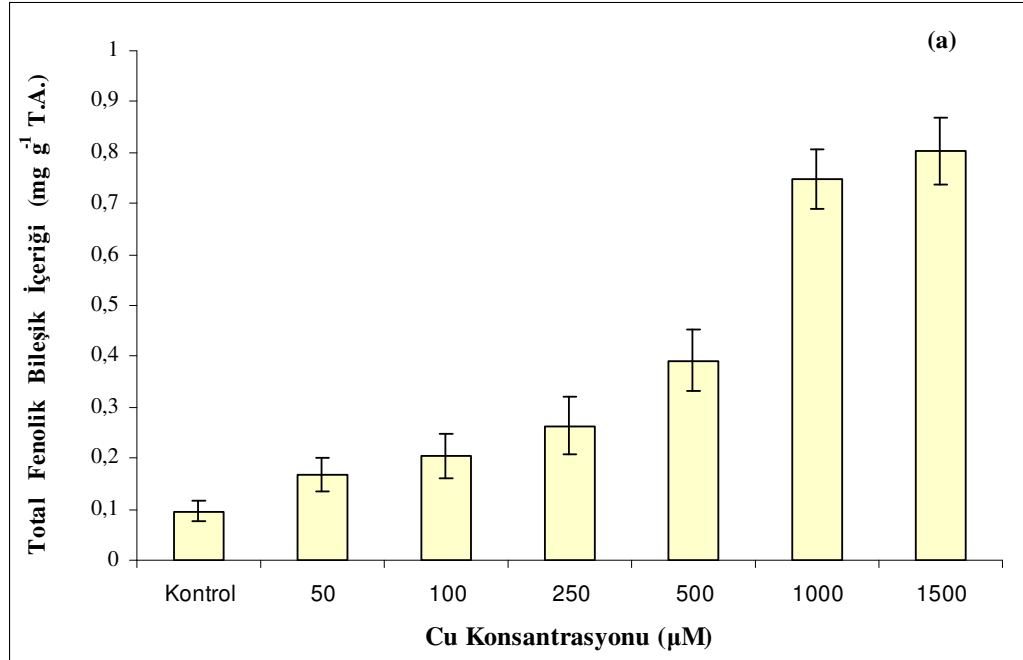
Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO<sub>4</sub> serileri uygulanan 15 günlük mısır fidelerinin kök, yaprak kımı ve ilk yapraklarındaki total fenolik bileşiklerin içerikleri Tablo 4.15, Şekil 4.18.a, Şekil 4.18.b ve Şekil 4.18.c de gösterildi. Elde edilen verilere göre bakır konsantrasyonu artışına bağlı olarak 15 günlük mısır fidelerinin kök, yaprak kımı ve ilk yapraklarındaki total fenoliklerin sentezinin teşvik edildiği tespit edildi.

Kontrolde yaprak kımı ve ilk yapraklar köklere göre sırasıyla yaklaşık 21.4 ve 34.2 kat fazla sekonder metabolit birikimine sahiptir ve bakır uygulamaları sonucunda her üç bitki kısmındaki total fenolik bileşiklerin miktarı kontrolün oldukça üzerinde değerler ortaya koymaktadır (Tablo 4.15, Şekil 4.18.a, Şekil 4.18.b, Şekil 4.18.c).

Tablo 4.15: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, yaprak kını ve ilk yapraklarındaki total fenolik bileşiklerin içeriği

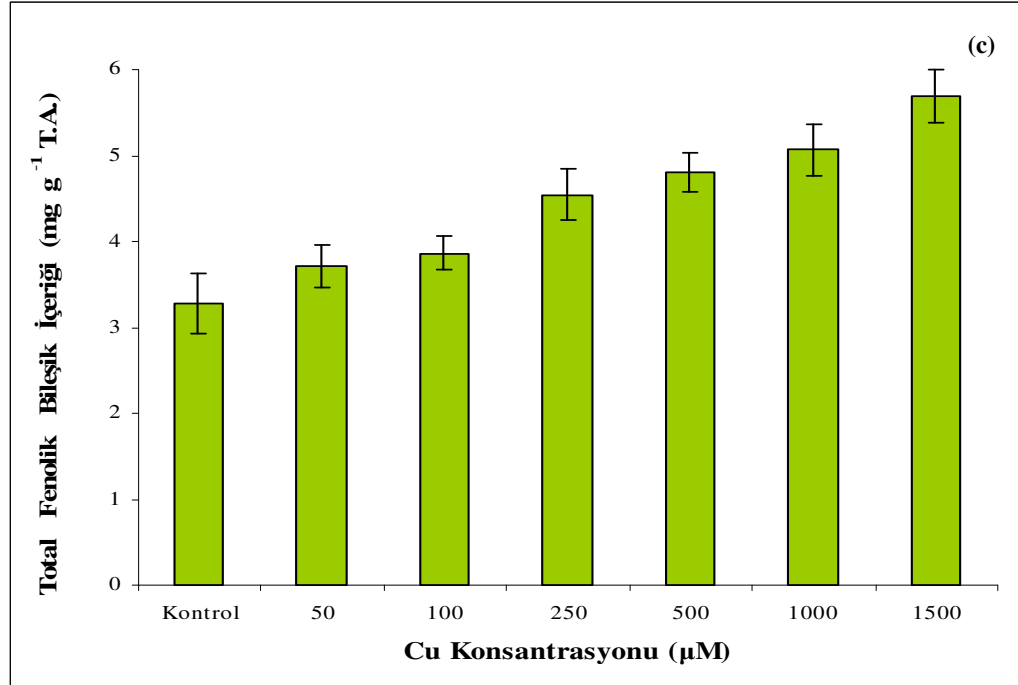
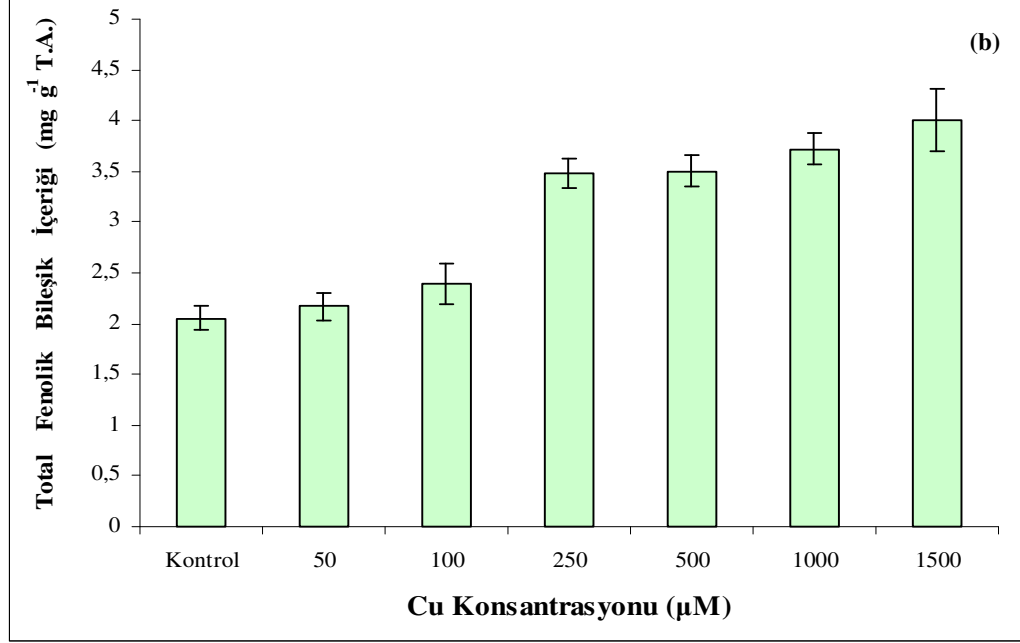
<i>Bakır konsantrasyonu (<math>\mu\text{M}</math>)</i>	<i>Total Fenolik Bileşiklerin İçeriği (<math>\text{mg g}^{-1}</math> T.A.)</i>		
	<b>Kök</b>	<b>Yaprak Kını</b>	<b>İlk Yapraklar</b>
Kontrol	0.096 $\pm$ 0.021	2.056 $\pm$ 0.122	3.288 $\pm$ 0.350
50	0.168 $\pm$ 0.032	2.168 $\pm$ 0.134	3.707 $\pm$ 0.242
100	0.205 $\pm$ 0.044	2.395 $\pm$ 0.202	3.865 $\pm$ 0.204
250	0.264 $\pm$ 0.056	3.486 $\pm$ 0.146	4.546 $\pm$ 0.306
500	0.392 $\pm$ 0.060	3.504 $\pm$ 0.155	4.802 $\pm$ 0.225
1000	0.747 $\pm$ 0.058	3.722 $\pm$ 0.149	5.063 $\pm$ 0.298
1500	0.803 $\pm$ 0.067	4.009 $\pm$ 0.308	5.690 $\pm$ 0.317

50 ve 100  $\mu\text{M}$  Cu serisindeki fidelerin kök, yaprak kını ve ilk yapraklarındaki total fenolik bileşiklerin sentezindeki artışa rağmen elde edilen değerlerin kontrole yakın olduğu; 250 ve üzerindeki serilerde ise bunlara göre belirgin yükselmeler meydana geldiği saptandı. 1500  $\mu\text{M}$  Cu uygulanan mısır bitkisinin fenolik bileşik birikiminde kontrole göre köklerinde yaklaşık 8.3 kat, yaprak kınında 1.9 kat, ilk yapraklarda ise 1.7 kat artış olduğu kaydedildi (Tablo 4.15, Şekil 4.18.a, Şekil 4.18.b, Şekil 4.18.c).



Şekil 4.18: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin (a) köklerindeki total fenolik bileşiklerin içeriği

Bu sonuçlara göre kontrol serilerindeki fidelerin yaprak kımı ve ilk yapraklarındaki total fenolik içerikleri köklere göre belirgin bir şekilde fazla olmasına rağmen bakır uygulamalarına bağlı olarak en fazla artışın köklerde meydana geldiği tespit edildi (Tablo 4.15, Şekil 4.18.a, Şekil 4.18.b, Şekil 4.18.c).



Şekil 4.18: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO<sub>4</sub> uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin (b) yaprak kımı ve (c) ilk yapraklarındaki total fenolik bileşiklerin içeriği

#### 4.17. FENİLALANİN AMONYAK LIYAZ (PAL) ENZİMİ AKTİVİTESİ

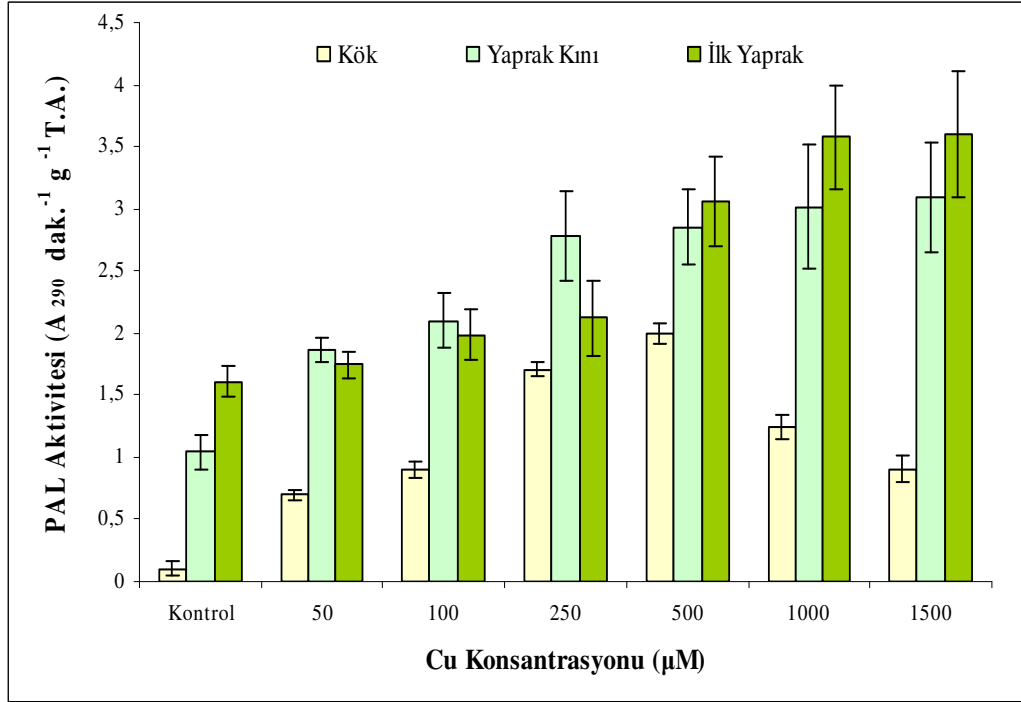
Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  serilerine 7 gün boyunca maruz bırakılan 15 günlük mısır fidelerinin kök, yaprak kını ve ilk yapraklarındaki PAL enzimi aktiviteleri ile ilgili veriler Tablo 4.16 ve Şekil 4.19 da verildi.

Tablo 4.16: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, yaprak kını ve ilk yapraklarındaki fenilalanin amonyak liyaz (PAL) aktivitesi

Bakır konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ )	PAL aktivitesi ( $\Delta A_{290} \text{ dak.}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ T.A.}$ )		
	Kök	Yaprak Kını	İlk Yapraklar
Kontrol	0.402 $\pm$ 0.021	1.242 $\pm$ 0.140	1.605 $\pm$ 0.124
50	0.686 $\pm$ 0.044	1.564 $\pm$ 0.192	1.746 $\pm$ 0.109
100	0.702 $\pm$ 0.020	1.660 $\pm$ 0.220	1.985 $\pm$ 0.206
250	0.855 $\pm$ 0.036	1.782 $\pm$ 0.362	2.122 $\pm$ 0.300
500	1.064 $\pm$ 0.082	1.855 $\pm$ 0.306	3.060 $\pm$ 0.355
1000	1.222 $\pm$ 0.095	2.016 $\pm$ 0.504	3.576 $\pm$ 0.616
1500	1.306 $\pm$ 0.104	2.098 $\pm$ 0.441	3.604 $\pm$ 0.595

Tablo 4.16 ve Şekil 4.19 da görüldüğü gibi bakır konsantrasyonu artışının kök, yaprak kını ve ilk yapraklardaki PAL enzimi aktivitesini teşvik ettiği; özellikle 500  $\mu\text{M}$ 'ın üzerindeki Cu serilerindeki fidelerin her üç kısmındaki enzim aktivitelerinde kontrole göre önemli artışlara neden olduğu kaydedildi. 1500  $\mu\text{M}$  Cu çözeltisine maruz bırakılan mısır fidelerinin kök, yaprak kını ve ilk yapraklarında kontrole göre sırasıyla yaklaşık %224, %69 ve %124 oranlarında yükselme meydana geldiği saptandı.

Elde edilen bu bulgulara göre başlangıçta köklerle karşılaştırıldığında yaprak kınında 3 kat ilk yapraklarda ise yaklaşık 4 kat fazla PAL etkinliği olmasına rağmen, köklerdeki enzim aktivitesinin diğer kısımlardakine göre daha hızlı teşvik edilerek (% 224) artış gösterdiği belirlendi (Tablo 4.16, Şekil 4.19).



Şekil 4.19: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO<sub>4</sub> uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, yaprak kıvı ve ilk yapraklarındaki fenilalanin amonyak liyaz (PAL) aktiviteleri

#### 4.18. SUPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) ENZİMİ AKTİVİTESİ

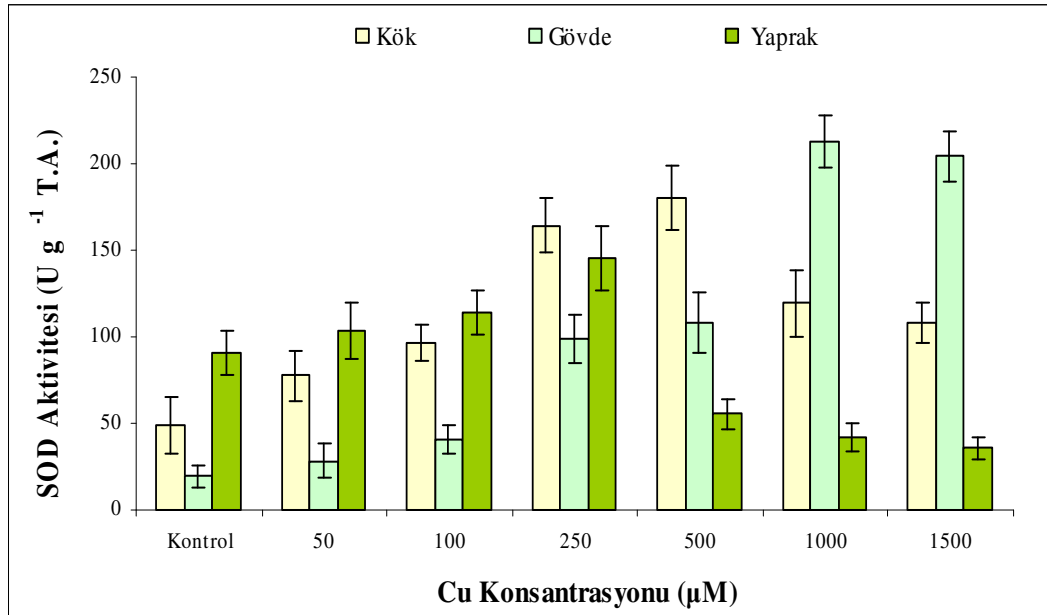
Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO<sub>4</sub> serileri uygulanan 15 günlük mısır fidelerinin kök, gövde ve yapraklarındaki superoksit dismutaz (SOD) enzimi aktiviteleri ile ilgili veriler Tablo 4.17 ve Şekil 4.20 de gösterildi.

Tablo 4.17: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO<sub>4</sub> uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki superoksit dismutaz (SOD) aktivitesi

Bakır konsantrasyonu (µM)	SOD aktivitesi (U g <sup>-1</sup> T.A.)		
	Kök	Gövde	Yaprak
Kontrol	48.85 ± 16.1	19.66 ± 6.44	90.85 ± 12.9
50	77.61 ± 14.4	28.33 ± 10.2	103.7 ± 16.6
100	96.49 ± 10.5	40.25 ± 8.22	114.5 ± 12.8
250	164.2 ± 15.6	98.96 ± 13.6	145.6 ± 18.4
500	180.4 ± 18.2	108.0 ± 17.5	55.20 ± 8.82
1000	119.2 ± 19.5	212.6 ± 15.0	41.72 ± 8.55
1500	107.8 ± 11.4	204.3 ± 14.7	35.63 ± 6.42

Tablo 4.17 ve Şekil 4.20 den de anlaşılacağı gibi farklı bakır serilerindeki fidelerin kök, gövde ve yapraklarındaki SOD aktivitelerinde kontrole göre önemli artışların meydana geldiği ancak belli bir konsantrasyondan sonra ilgili bitki kısmına göre bazı değişikliklerin ortaya çıktığı saptandı.

Köklerde 50, 100, 250 ve 500  $\mu\text{M}$  Cu serilerine kadar SOD aktivitesinin indüklendiği, en yüksek aktivitenin kontrole göre %269 artışla 500  $\mu\text{M}$  Cu konsantrasyonunda meydana geldiği, bundan sonra bir miktar düşüş göstermesine rağmen 1000 ve 1500  $\mu\text{M}$  daki değerlerin, sırasıyla %144 ve %120 artışla, kontrolün üzerinde olduğu belirlendi (Tablo 4.17, Şekil 4.20). Gövdede bakır artışına paralel olarak SOD aktivitesinin teşvik edildiği, 250  $\mu\text{M}$  dan itibaren etkinliğinin daha da yükseldiği, 1500  $\mu\text{M}$  Cu daki değerlerin kontrolün yaklaşık 10 katına çıktığı kaydedildi (Tablo 4.17, Şekil 4.20). Yapraklarda 250  $\mu\text{M}$  a kadar SOD aktivitesinde önemli yükselmeler olduğu, en fazla etkinliğin %60 artışla 250  $\mu\text{M}$  Cu da gerçekleştiği, daha yüksek konsantrasyonlarda ise 500  $\mu\text{M}$  da %39, 1000  $\mu\text{M}$  da %54 ve 1500  $\mu\text{M}$  da %60 olmak üzere kontrole göre belirgin düşüşlerin meydana geldiği saptandı (Tablo 4.17, Şekil 4.20).



Şekil 4.20: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki superoksit dismutaz (SOD) enzimi aktivitesi



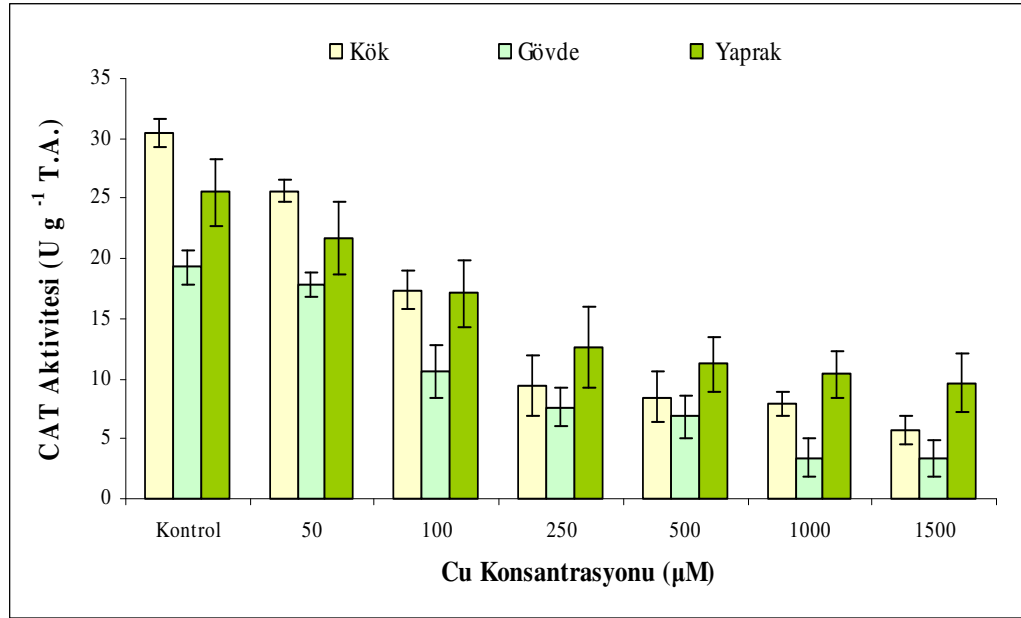
#### 4.19. KATALAZ (CAT) ENZİMİ AKTİVİTESİ

Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  serileri uygulanan 15 günlük mısır fidelerinin kök, gövde ve yapraklarındaki CAT enzimi aktiviteleri ile ilgili değerler Tablo 4.18 ve Şekil 4.21 de verildi.

Tablo 4.18: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki katalaz (CAT) enzimi aktivitesi

Bakır konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ )	CAT aktivitesi ( $\text{U g}^{-1}$ T.A.)		
	Kök	Gövde	Yaprak
Kontrol	30.5 $\pm$ 1.21	19.3 $\pm$ 1.44	25.5 $\pm$ 2.79
50	25.6 $\pm$ 0.94	17.8 $\pm$ 1.02	21.7 $\pm$ 2.96
100	17.4 $\pm$ 1.55	10.6 $\pm$ 2.22	17.1 $\pm$ 2.80
250	9.42 $\pm$ 2.60	7.64 $\pm$ 1.60	12.6 $\pm$ 3.40
500	8.44 $\pm$ 2.12	6.83 $\pm$ 1.75	11.2 $\pm$ 2.28
1000	7.92 $\pm$ 0.95	3.44 $\pm$ 1.59	10.4 $\pm$ 1.95
1500	5.74 $\pm$ 1.24	3.37 $\pm$ 1.47	9.66 $\pm$ 2.42

Tablo 4.18 ve Şekil 4.21'e göre çözeltilerdeki bakır miktarı artışının kök, gövde ve yapraklardaki CAT aktivitesinin azalmasına neden olduğu görüldü.



Şekil 4.21: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki katalaz (CAT) enzimi aktivitesi

Tablo 4.18 ve Şekil 4.21 dan elde edilen bulgulara göre, 50 ve 100  $\mu\text{M}$  Cu da her üç bitki kısmındaki enzim etkinliğinin azalmasına rağmen kontrole yakın sonuçlar verdiği ancak 250  $\mu\text{M}$  ve üzerindeki Cu uygulamalarında enzim değerlerinin kontrolün oldukça altına indiği kaydedildi. En toksik konsantrasyon olan 1500  $\mu\text{M}$  Cu serisindeki fidelerin CAT aktivitelerinin ise kontrole göre sırasıyla köklerde %81, gövdede %82.5, yapraklarda ise %62 oranında düşüşler gösterdiği saptandı (Tablo 4.18, Şekil 4.21).

#### 4.20. ASKORBAT PEROKSİDAZ (APX) ENZİMİ AKTİVİTESİ

Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  çözeltileri uygulanan 15 günlük mısır fidelerinin kök, gövde ve yapraklarındaki askorbat peroksidaz (APX) enzimi aktiviteleri ile ilgili veriler Tablo 4.19 ve Şekil 4.22 de gösterildi.

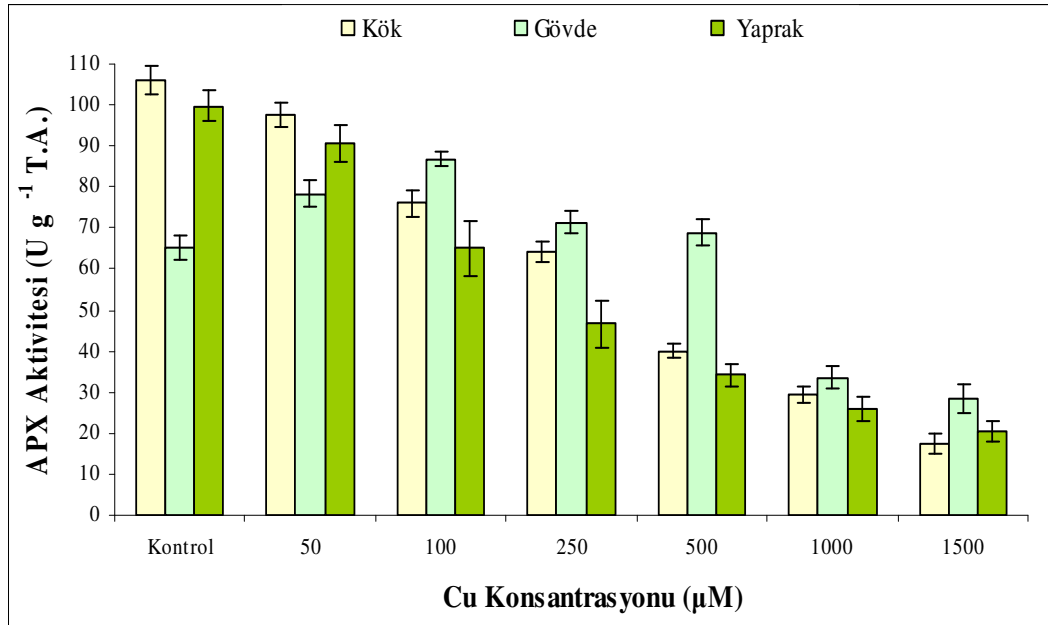
Tablo 4.19: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki askorbat peroksidaz (APX) enzimi aktivitesi

Bakır konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ )	APX aktivitesi ( $\text{U g}^{-1}$ T.A.)		
	Kök	Gövde	Yaprak
Kontrol	105.8 $\pm$ 3.5	65.34 $\pm$ 3.0	99.59 $\pm$ 3.7
50	97.50 $\pm$ 2.8	78.32 $\pm$ 3.2	90.77 $\pm$ 4.5
100	76.05 $\pm$ 3.3	86.67 $\pm$ 1.7	65.00 $\pm$ 6.7
250	64.22 $\pm$ 2.6	71.30 $\pm$ 2.8	46.66 $\pm$ 5.8
500	40.04 $\pm$ 1.9	68.91 $\pm$ 3.1	34.20 $\pm$ 2.6
1000	29.26 $\pm$ 2.0	33.39 $\pm$ 2.7	25.91 $\pm$ 2.8
1500	17.41 $\pm$ 2.6	28.36 $\pm$ 3.6	20.56 $\pm$ 2.5

Tablo 4.19 ve Şekil 4.22 den elde edilen bulgulara göre kontrolde en yüksek enzim etkinliğinin köklerde meydana gelirken bunu yaprakların takip ettiği, en düşük aktivitenin ise gövdede olduğu görülmektedir. Farklı konsantrasyonlarda bakır uygulamalarına maruz bırakılan fidelerin çeşitli kısımları incelendiğinde ise köklerde çözeltilerdeki Cu içeriği artışının APX aktivitesini indirdiği; 50 ve 100  $\mu\text{M}$  da kontrole yakın değerler verirken, aşırı Cu içeren toksik konsantrasyonlardaki düşüşün daha belirgin olarak ortaya çıktığı saptandı. 1500  $\mu\text{M}$  Cu serisindeki fidelerin köklerindeki APX aktivitesinin kontrole göre %83.5 lik bir azalma gösterdiği belirlendi (Tablo 4.19, Şekil 4.22).

Gövdede, 50 ve 100  $\mu\text{M}$  Cu daki APX etkinliklerinde bazı yükselmeler olduğu kaydedilirken; en yüksek aktivitenin % 32.6 lık artışla 100  $\mu\text{M}$  da meydana geldiği, 250 ve 500  $\mu\text{M}$  da ise bir miktar düşüş olmasına rağmen, elde edilen değerlerin kontrole yakın olduğu gözlemlendi. 1000 ve 1500  $\mu\text{M}$  da ise APX enziminin kontrolün yaklaşık yarısı kadar indirgenme gösterdiği tespit edildi (Tablo 4.19, Şekil 4.22).

Yapraklarda bakır konsantrasyonu artışının bütün serilerdeki APX aktivitesinde azalmalara neden olduğu; 50  $\mu\text{M}$  da kontrole yakın sonuçlar ortaya çıkarken daha üstündeki değerlerde önemli düşüşler meydana geldiği belirlendi. 1500  $\mu\text{M}$  da yapraklardaki APX enziminin kontrol ile kıyaslandığında %79.3 oranında indirgenildiği saptandı (Tablo 4.19, Şekil 4.22).



Şekil 4.22: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki askorbat peroksidaz (APX) enzimi aktivitesi

#### 4.21. GUAIAKOL PEROKSİDAZ (GuPX) ENZİMİ AKTİVİTESİ

Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  konsantrasyonları uygulanan 15 günlük mısır fidelerinin kök, gövde ve yapraklarındaki guaiakol peroksidaz (GuPX) enzimi aktiviteleri ile ilgili bulgular Tablo 4.20 ve Şekil 4.23 de gösterildi.

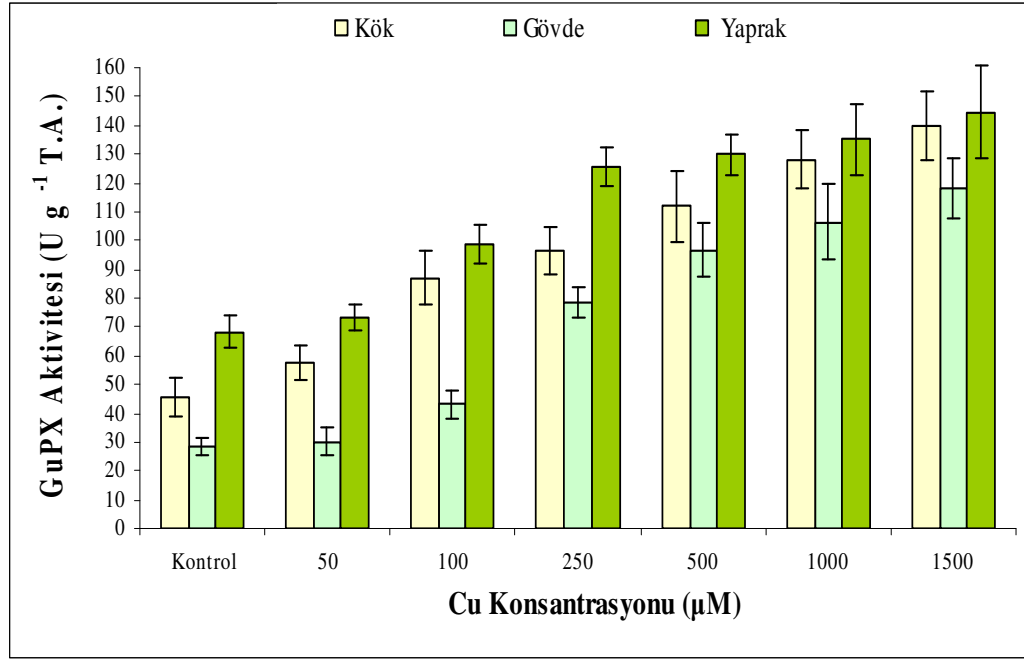
Tablo 4.20 ve Şekil 4.23 deki verilere göre 7 gün boyunca farklı miktarlardaki bakır uygulamalarına maruz bırakılan 15 günlük fidelerin çeşitli kısımları incelendiğinde artan Cu konsantrasyonlarının kök, gövde ve yapraklardaki GuPX aktivitelerini belirgin bir şekilde indüklediği görülmektedir.

Tablo 4.20: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki guaiakol peroksidaz (GuPX) aktivitesi

Bakır konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ )	GuPX aktivitesi ( $\text{U g}^{-1}$ T.A.)		
	Kök	Gövde	Yaprak
Kontrol	45.46 $\pm$ 6.77	28.32 $\pm$ 3.02	68.38 $\pm$ 5.66
50	57.50 $\pm$ 5.85	30.17 $\pm$ 5.12	73.07 $\pm$ 4.52
100	86.84 $\pm$ 9.35	43.10 $\pm$ 4.76	98.52 $\pm$ 6.70
250	96.12 $\pm$ 8.22	78.39 $\pm$ 5.07	125.6 $\pm$ 6.88
500	111.8 $\pm$ 12.6	96.72 $\pm$ 9.48	129.9 $\pm$ 7.08
1000	128.2 $\pm$ 10.3	106.5 $\pm$ 13.0	135.0 $\pm$ 12.3
1500	139.6 $\pm$ 12.0	118.2 $\pm$ 10.4	144.6 $\pm$ 16.0

50, 100, 250, 500, 1000 ve 1500  $\mu\text{M}$  Cu içeren besi çözeltilerinde yetiştirilen mısır bitkisinin köklerindeki GuPX aktivitelerinin kontrole göre sırasıyla %26, %91, %111, %146, %181 ve %207 düzeylerinde artış gösterdiği saptanırken; ilgili fidelerin gövde kısımlarındaki enzim aktivitelerinde sırasıyla %6.5, %52, %176, %241, %276 ve %317 lik yükselmelerin meydana geldiği belirlendi (Tablo 4.20, Şekil 4.23). Yapraklarda ise artan Cu konsantrasyonlarına bağlı olarak GuPX aktivitelerinin kontrol ile karşılaştırıldığında sırasıyla %7.7, %44, %83, %90, %97 ve %111 oranlarında teşvik edildiği açığa çıkarıldı (Tablo 4.20, Şekil 4.23).

Elde edilen bu verilere göre incelenen bitki kısımları arasında kontrolde en yüksek GuPX aktivitesinin yapraklarda bulunmasına karşın; bakır uygulamaları sonucunda en fazla enzim etkinliğinin 1500  $\mu\text{M}$  Cu daki değerlere göre %317 lik artışla gövdede meydana geldiği ve bunu %207 ile köklerin, %111 lik yükselme ile de yaprakların izlediği tespit edildi (Tablo 4.20, Şekil 4.23).



Şekil 4.23: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO<sub>4</sub> çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki guaiakol peroksidaz (GuPX) aktivitesi

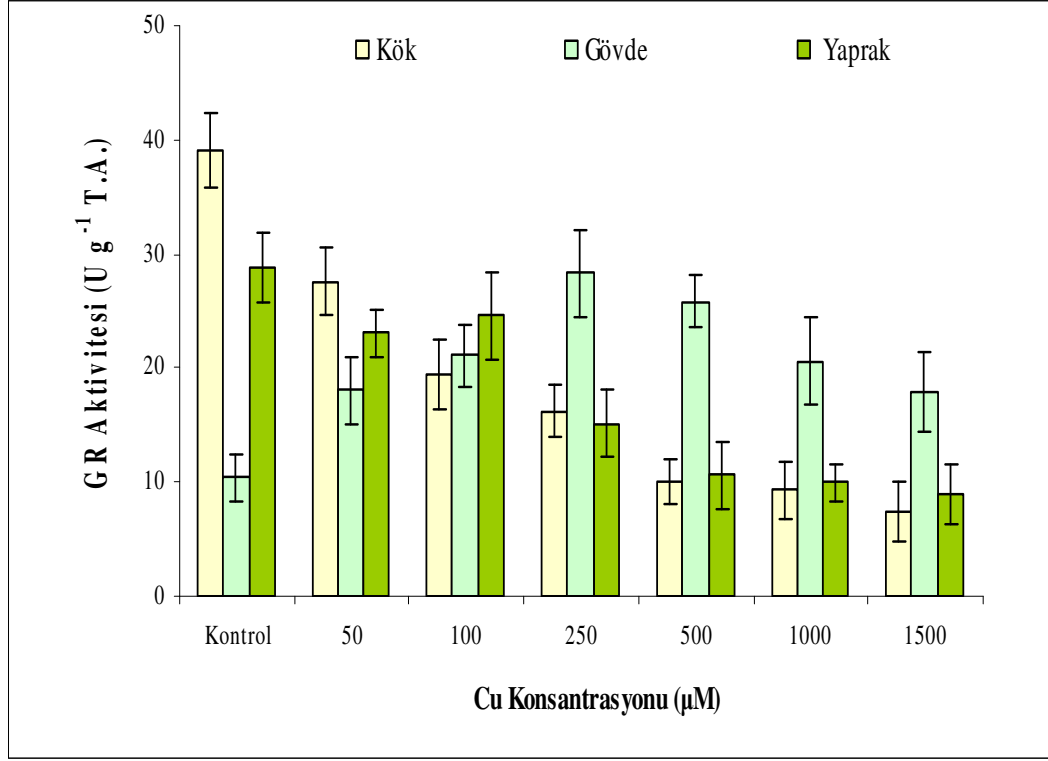
#### 4.22. GLUTATYON REDÜKTAZ (GR) ENZİMİ AKTİVİTESİ

7 gün boyunca kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO<sub>4</sub> serilerine maruz bırakılan 15 günlük mısır fidelerinin kök, gövde ve yapraklarındaki glutatyon redüktaz (GR) enzimi aktiviteleri ile ilgili veriler Tablo 4.21 ve Şekil 4.24 de gösterildi.

Tablo 4.21: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO<sub>4</sub> çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki glutatyon redüktaz (GR) aktiviteleri

Bakır konsantrasyonu (µM)	GR aktivitesi (U g <sup>-1</sup> T.A.)		
	Kök	Gövde	Yaprak
Kontrol	39.08 ± 3.33	10.43 ± 2.12	28.86 ± 3.09
50	27.62 ± 2.87	18.06 ± 3.00	23.04 ± 2.15
100	19.44 ± 3.08	21.13 ± 2.76	24.58 ± 3.75
250	16.25 ± 2.20	28.33 ± 3.82	15.16 ± 2.86
500	10.07 ± 2.00	25.79 ± 2.27	10.62 ± 3.00
1000	9.28 ± 2.56	20.55 ± 3.80	9.98 ± 1.67
1500	7.46 ± 2.64	17.90 ± 3.56	8.90 ± 2.58

Tablo 4.21 ve Şekil 4.24 deki bulgulara göre çeşitli bakır çözeltilerine maruz bırakılan mısır fidelerindeki GR aktivitelerinin değişiklikler gösterdiği ve uygulanan Cu serilerine bağlı olarak ilgili bitki kısımlarının farklı şekillerde etkilendiği ortaya konuldu.



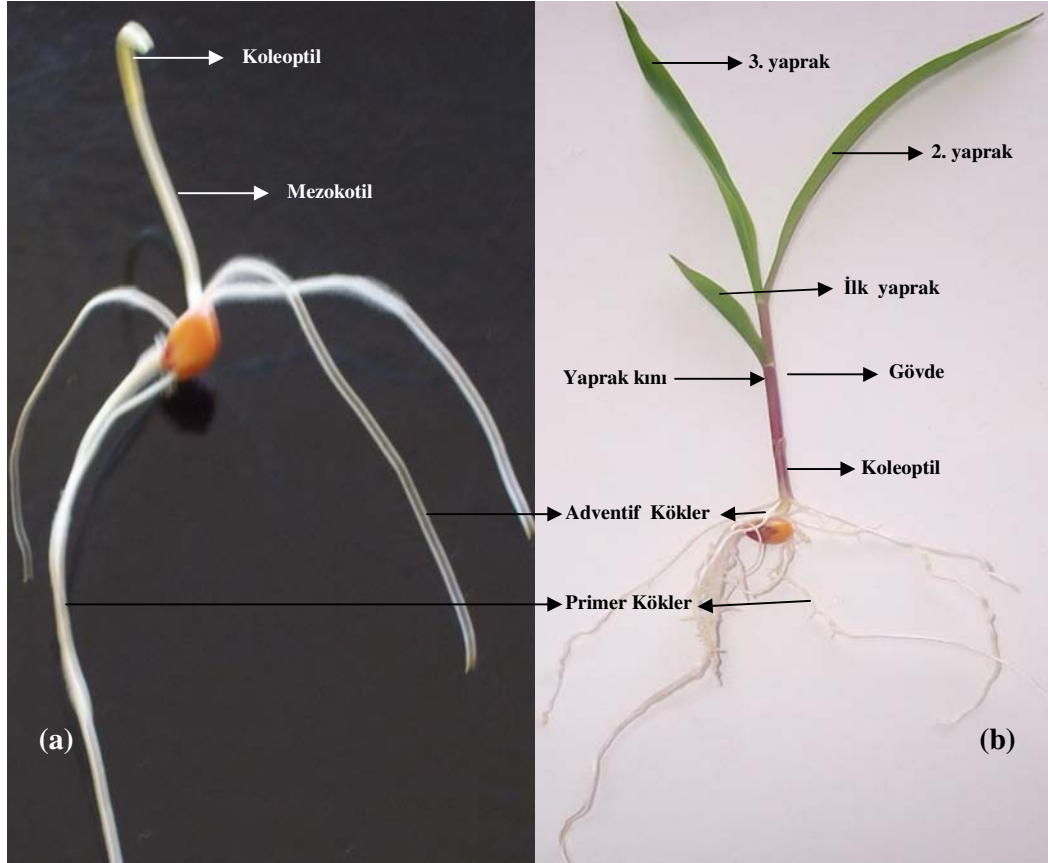
Şekil 4.24: Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µM CuSO<sub>4</sub> çözeltileri uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki glutatyon redüktaz (GR) aktiviteleri

Tablo 4.21 ve Şekil 4.24 de görüldüğü gibi artan Cu içeriğinin kök ve yapraklardaki GR aktivitelerinde belirgin düşümlere yol açarken; bunun aksine gövdede kontrole göre önemli yükselmelere neden olduğu kaydedildi. Uygulanan en toksik konsantrasyon olan 1500 µM daki fidelerin GR aktivitelerinde kontrol ile kıyaslandığında köklerde %80 azalma görülürken; gövdede %71 lik artış; yapraklarda ise %69 oranında düşüş meydana geldiği saptandı (Tablo 4.21, Şekil 4.24).

## 4.23. MORFOLOJİK VE ANATOMİK BULGULAR

### 4.23.1. Morfolojik Bulgular

Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  konsantrasyonlarındaki bakır uygulamaları sonucunda mısır bitkisinin başta kök, gövde, yaprak ve yaprak kını olmak üzere çeşitli kısımlarında ortaya çıkan bazı fizyolojik ve biyokimyasal değişimler yapılan ilgili deneylerle gösterildi. Bakır toksisitesinin anatomik yapılara olan etkileri ise bu kısımlardan alınan enine kesitlerin ışık ve elektron mikroskopu analizleri ile ifade edilmeye çalışıldı. Bunun için öncelikle kontrol ve deney gruplarındaki fidelerin çeşitli gelişim evrelerindeki morfolojik görünüşleri ortaya konularak bunlardan anatomik incelemeleri yapılacak olan bölgeler seçilerek tespit edildi (Şekil 4.25.a, Şekil 4.25.b).



Şekil 4.25: Kontrol çözeltisinde yetiştirilen (a) erken gelişim evresindeki 4 günlük mısır fidesinin, (b) ileri gelişim evresindeki 15 günlük mısır fidesinin genel görünüşleri

Aşırı bakır uygulamalarının kökler üzerindeki etkileri bitkilerin erken gelişim evrelerinden itibaren gözlemlendi (Şekil 4.26, Şekil 4.27).



Şekil 4.26: Aşırı bakır uygulamalarına maruz kalmış 4 günlük mısır bitkisinin kök uçlarında meydana gelen kahverengi oluşumlar

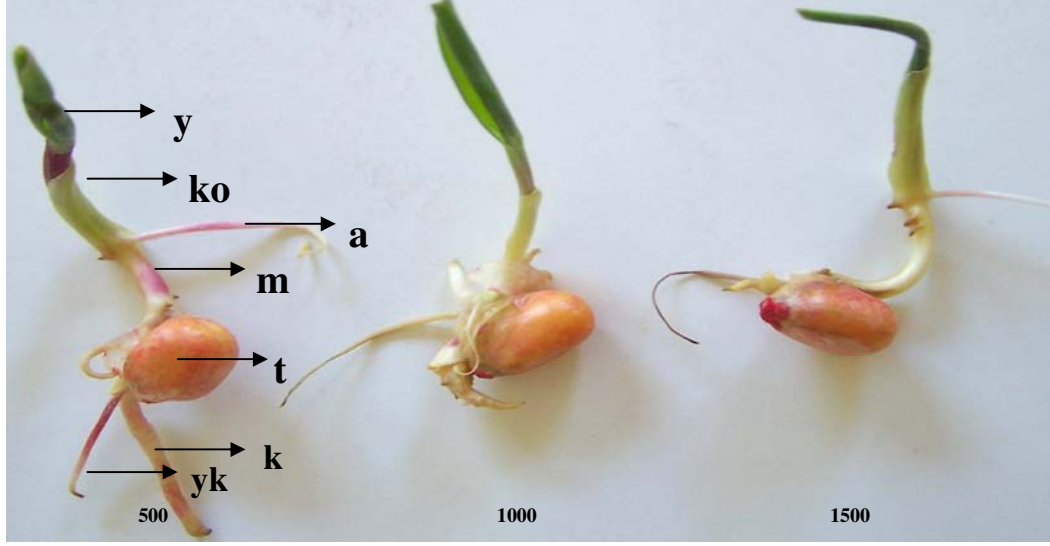
Şekil 4.26 da 1500  $\mu\text{M}$  bakır uygulanmış 4 günlük fidelerin kök uçlarındaki kahverengi birikimler dikkat çekmektedir.



Şekil 4.27: Aşırı bakır uygulamalarına maruz bırakılmış 7 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarında meydana gelen bazı değişimler

Erken gelişim evrelerinden itibaren toksik konsantrasyonlarda bakır uygulanan fidelerin kök uçlarındaki kahverengi oluşumlara ilaveten; kök, yan kök, adventif kök, mezokotil, koleoptil ve yaprak kınında kırmızı renkli antosiyanin sentezlendiği, yaprakların koleoptillerden tam olarak çıkamayarak kıvrık halde kaldığı hatta uçlarında solma, yanma ve kurumaların meydana geldiği izlendi (Şekil 4.27).





Şekil 4.28: 500, 1000 ve 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  konsantrasyonlarındaki aşırı bakır uygulamalarına maruz bırakılan 7 günlük mısır fidelerinin genel görünüşleri (y) yaprak; (ko) koleoptil; (a) adventif kök; (m) mezokotil; (t) tohum; (k) kök; (yk) yan kök

Aşırı bakır uygulamalarının kök ve yapraklarda oldukça belirgin gerilemelere neden olduğu; büyümedeki indirgenmenin yanı sıra yan kök oluşumunu inhibe ettiği ve kök uçlarında kahverengi madde birikimini teşvik ettiği saptandı (Şekil 4.28, Şekil 4.29).



Şekil 4.29: 500, 1000 ve 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  konsantrasyonlarındaki aşırı bakır uygulamalarına maruz bırakılan 15 günlük mısır fidelerinin genel görünüşleri

İleri evrelerden itibaren bakır uygulamalarına maruz bırakılan köklerin ise artan Cu konsantrasyonlarına daha dayanıklı olduğu; gövde ve yaprak gibi kısımlarındaki toksik etkilerin bakır içeriği ve bitkinin ağır metal direncine bağlı olarak daha geç ortaya çıktığı tespit edildi (Şekil 4.29, Şekil 4.30).



Şekil 4.30: 50, 100, 250, 500, 1000 ve 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  konsantrasyonlarındaki bakır uygulamalarına maruz bırakılan 15 günlük mısır fidelerinin köklerinin genel görünümü

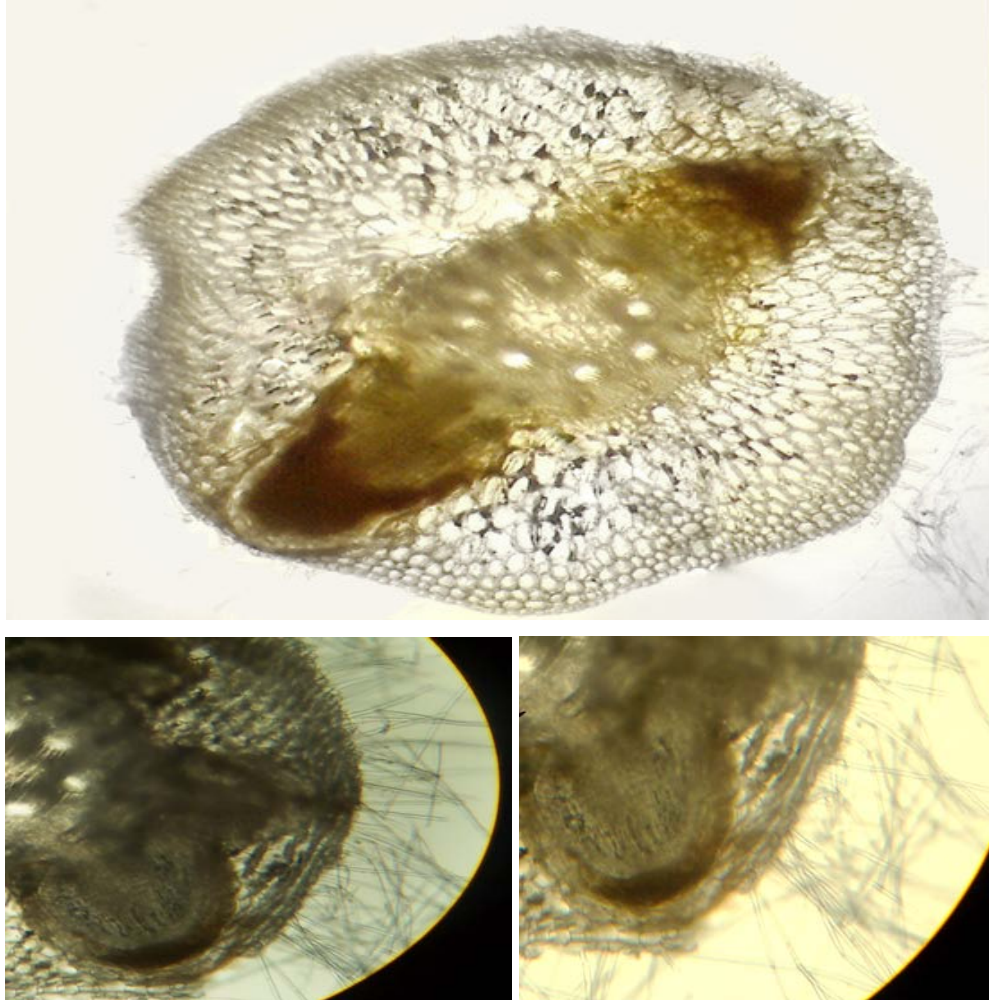
Şekil 4.30 da, 7 gün boyunca ilgili konsantrasyonlardaki Cu serilerinde yetiştirilen 15 günlük mısır fidelerinin köklerindeki değişimler izlenmektedir. Buna göre 50  $\mu\text{M}$  Cu içeriğinin köklerde kontrole göre belirgin etkilere neden olmazken 100 ve üzerindeki değerlerin kök uzunluğu ve yan kök oluşumunda azalmalara neden olduğu saptanmıştır.

500, 1000 ve 1500  $\mu\text{M}$  gibi aşırı Cu miktarlarında ise büyümedeki indirgenmenin yanı sıra köklerin renklerinde koyulaşma ve kahverengiye dönüşüm gibi belirtiler de görülmektedir. İlgili şekil üzerinde ayrıca bakır artışına bağlı olarak gövde kalınlığının kontrole göre azalarak çapının incelendiği de gözlemlenebilmektedir (Şekil 4.30).

#### 4.23.2. Anatomik Bulgular (Işık Mikroskopu Analizleri)

Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  çözeltileri uygulanan mısır fidelerinin kök, gövde ve yaprak gibi çeşitli kısımlarından jilet yardımı ile elde alınan enine kesitler su ya da %10 HCl içeren floroglusin ile muamele edilerek LEICA BM E ışık mikroskopunda X10 ve X40 büyütmelerde incelendi ve ilgili kısımların fotoğrafları Kodak EasyShare CX7525 dijital fotoğraf makinesi ile çekildi.

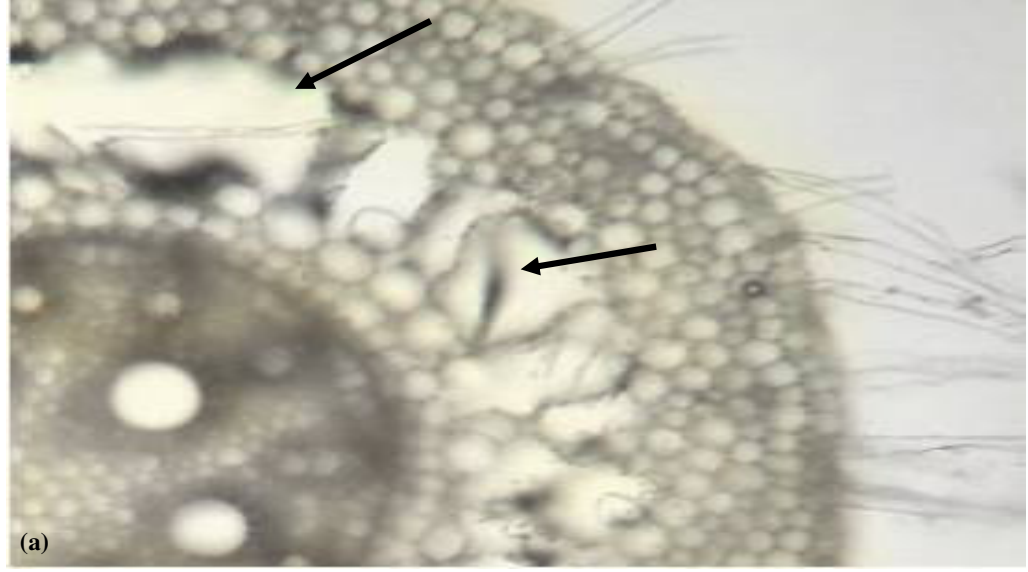
Aşırı bakır uygulanmış 7 günlük mısır fidelerinin köklerinden alınan enine kesitlerde periskıldan oluşan yan köklerin tam olarak gelişemediği ve kaliptralarında kahverengi birikimlerin meydana geldiği görülürken; epidermal kök tüylerinin sıklığı da dikkat çekmektedir (Şekil 4.31).



Şekil 4.31: Aşırı bakır uygulanmış 7 günlük mısır fidelerinin köklerinden alınan enine kesitlerde yan kök gelişimi ve epidermal kök tüylerinin görünümü

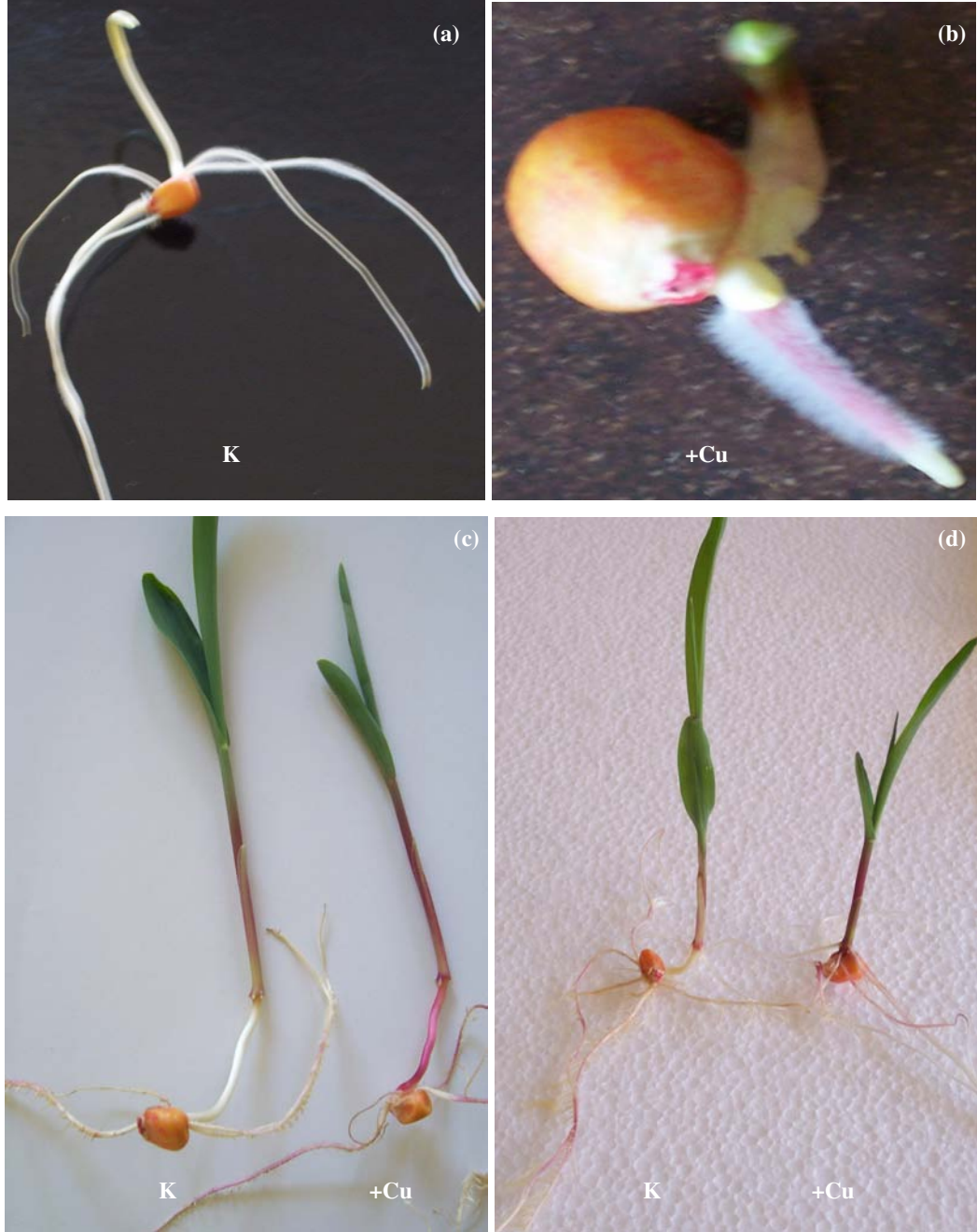


Artan konsantrasyonlarda bakır uygulanmış 15 günlük mısır fidelerinin köklerinden alınan enine kesitlerde ise başta vaskular silindir ve öz tabakasındaki hücreler olmak üzere korteks parenkiması hücrelerinde yoğun miktarda kırmızı-kahverengi birikimler olduğu saptanırken (Şekil 4.32.a, Şekil 4.32.c); aşırı bakır içeriğinin korteks parenkiması tabakasında yırtılmalara neden olduğu da tespit edildi (Şekil 4.32.b).



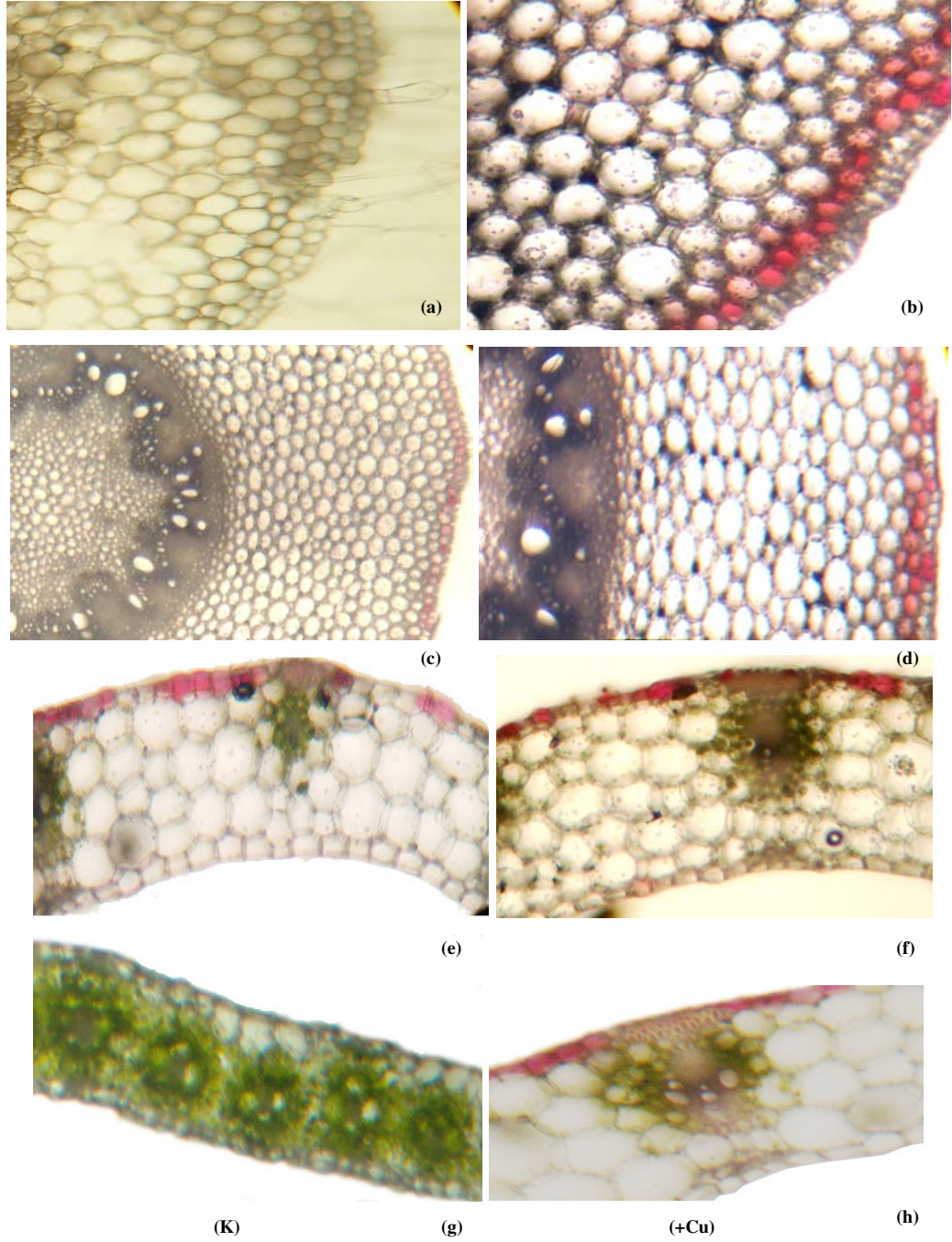
Şekil 4.32: Aşırı bakır uygulanmış 15 günlük mısır fidelerinin köklerinden alınan enine kesitlerde (a) korteks tabakasındaki parenkimatik hücrelerde meydana gelen bozulmalar, (b) korteks parenkiması, iletim sistemi ve öz tabakası hücrelerindeki kahverengi madde birikimi

Kontrol ve bakır uygulanmış 4, 7 ve 15 günlük mısır fidelerinin kök, mezokotil, yaprak kını ve ilk yapraklarında antosiyanin pigmentinin bulunduğu kısımlar Şekil 4.33.a, Şekil 4.33.b, Şekil 4.33.c ve Şekil 4.33.d de görülmektedir.



Şekil 4.33: Kontrol (K) ve bakır uygulanmış (+Cu) 4 günlük (a), (b); 7 günlük (c) ve 15 günlük (d) mısır fidelerinin kök, mezokotil, koleoptil, yaprak kını ve ilk yapraklarındaki antosiyanin birikiminin genel görünümü



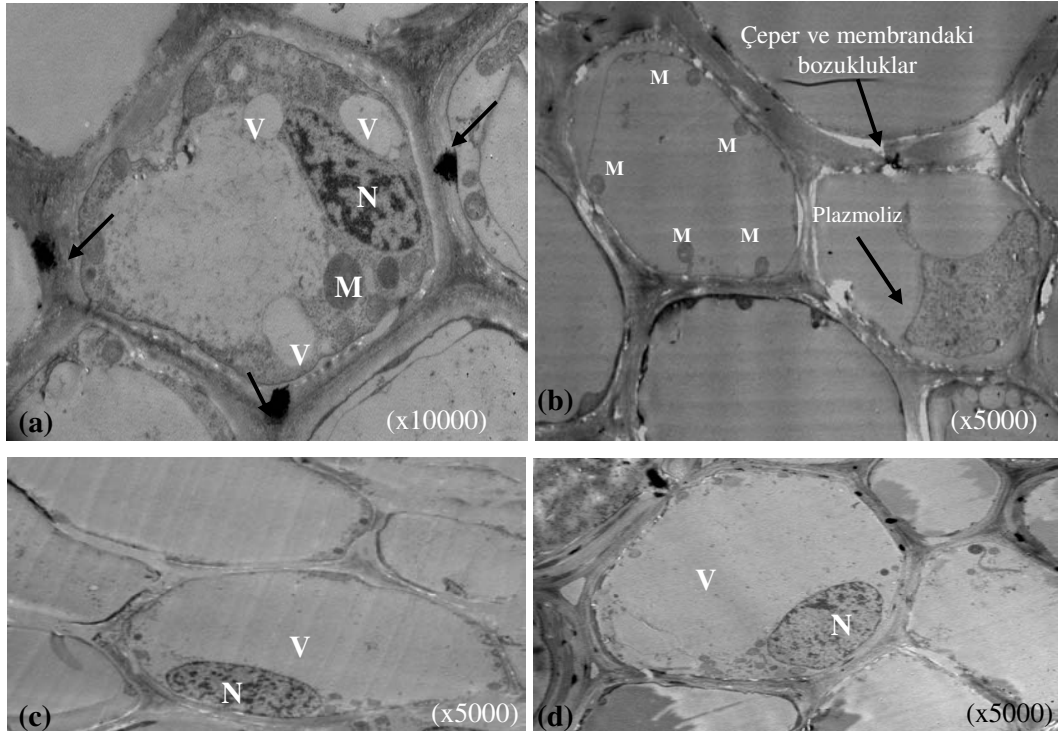


Şekil 4.34: Kontrol (K) ve bakır uygulanmış (+Cu) 7 günlük mısır fidelerinin kök (a), (b); mezokotil (c), (d); yaprak kını (e), (f) ve ilk yapraklarındaki (g), (h) antosiyanin birikimi (Anatomik kesitler ışık mikroskopunda x10 ve x40 büyütmelemlerde incelenmiş ve resimleri çekilmiştir)

Şekil 4.34 de, aşırı bakıra maruz bırakılmış 7 günlük mısır fidelerinin kök (a), (b); mezokotil (c), (d); yaprak kını (e), (f) ve ilk yapraklarında (g), (h) özellikle epidermal ve subepidermal hücrelerin vakuollerinde antosiyanin birikimi olduğu izlenmektedir.

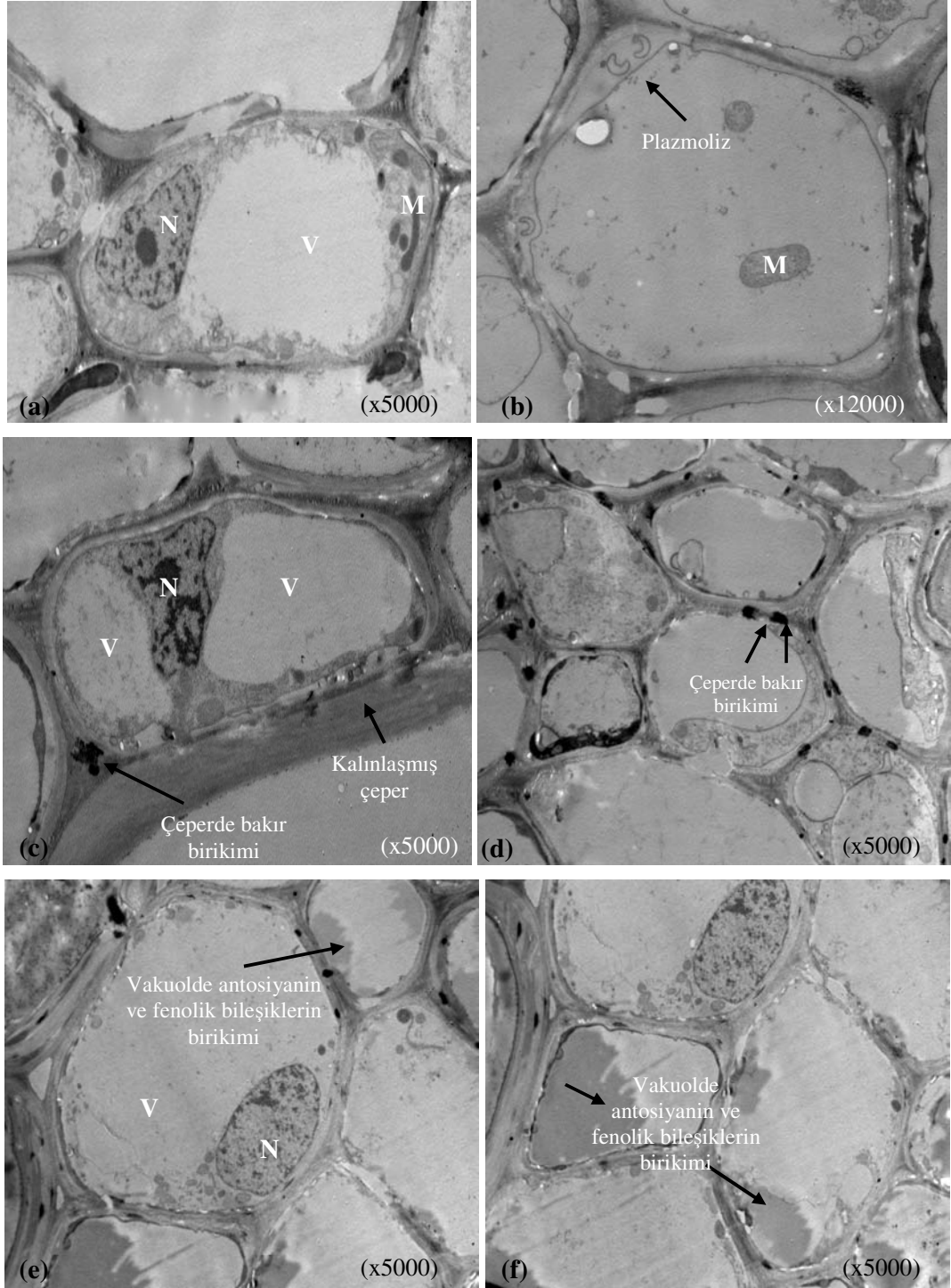
### 4.23.3. Anatomik Bulgular (Elektron Mikroskopu Analizleri)

Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  çözeltileri uygulanan mısır fidelerinin kök, gövde ve yaprak gibi çeşitli kısımlarından alınan bitki doku parçaları PH 7.4 olan fosfat tamponlu %2.5 gluteraldehit solüsyonu ile birinci fiksasyonu takiben %1 osmium tetraoksit solüsyonunda ikincil olarak fikse edildi. Artan alkol serilerinden (%30-50-70-90-100-100) geçirilen parçalar propilen oksit ara geçişi kullanılarak kademeli olarak epon gömme ortamına alındı. Plastik bloklardan 0.5 mikrometre kalınlıkta alınmış olan yarı ince kesitler metilen mavisi ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda seçilen bölgelerden alınan yaklaşık 60 nm'lik ince kesitler uranil asetat ve Reynauld's solüsyonları ile ikili boyamayı takiben elektron mikroskopunda (Jeol JEM 1011) yapı yönünden incelendi ve transmisyon elektron mikroskopu (TEM) mikrofotografaları elde edildi.



Şekil 4.35: 50  $\mu\text{M}$  (düşük miktarda) bakıra maruz bırakılmış 15 günlük mısır bitkisinin köklerinden alınan enine kesitlerin TEM mikrofotografaları (V, vakuol; N, nukleus; M, mitokondri)

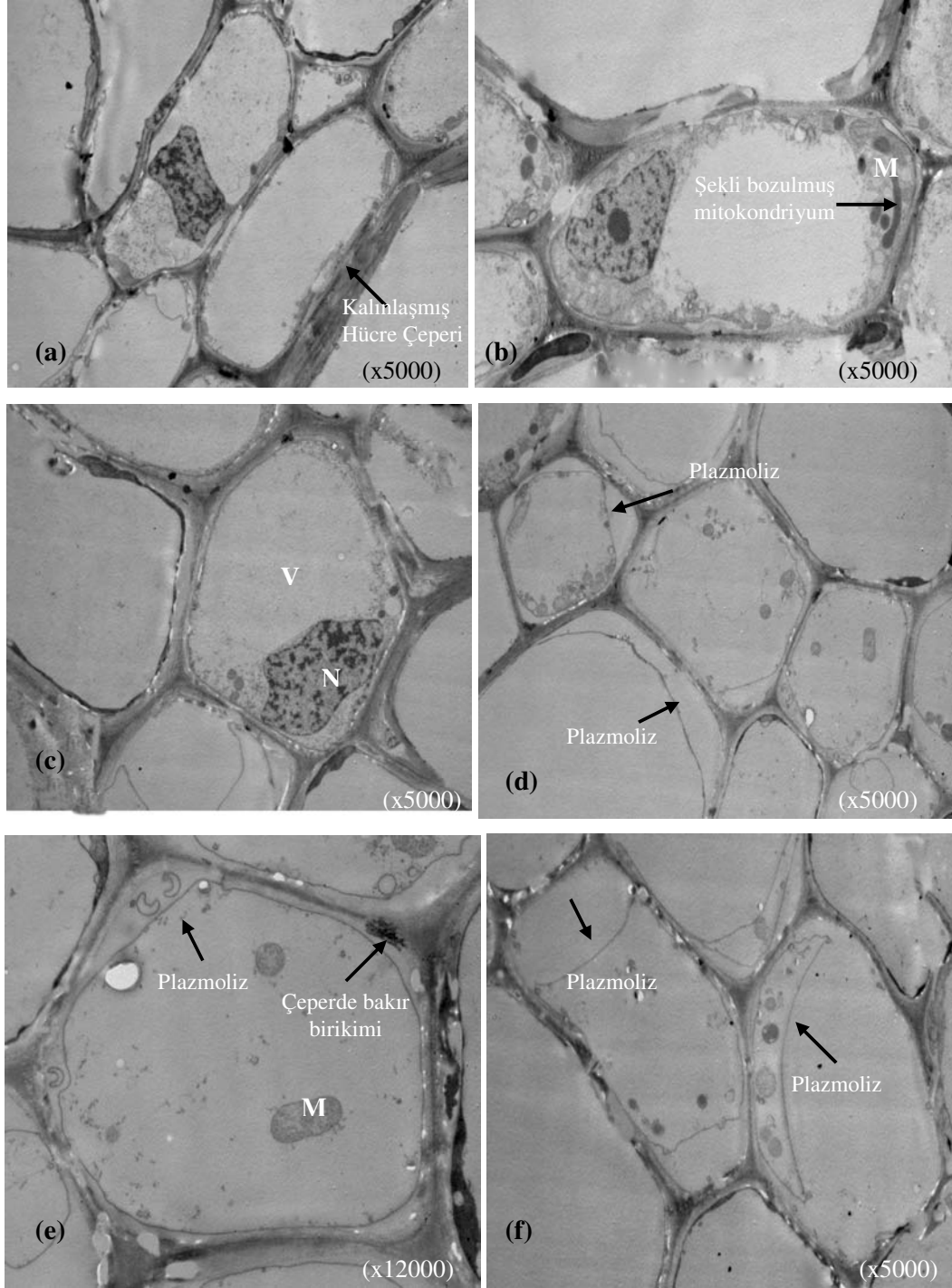
Şekil 4.35 de hücre çeperlerindeki koyu renkli birikimler (bakır) dikkat çekerken (a); mitokondriyum sayısının arttığı (b), çeper ile membranın zarar gördüğü (b), sitoplazmanın hücrenin ortasında toplandığı (plazmoliz) (b) görülmektedir.



Şekil 4.36: 50  $\mu\text{M}$  bakıra maruz bırakılmış 7 günlük mısır bitkisinin mezokotilinden alınan enine kesitlerin TEM mikrofotografı (V, vakuol; N, nukleus; M, mitokondri)

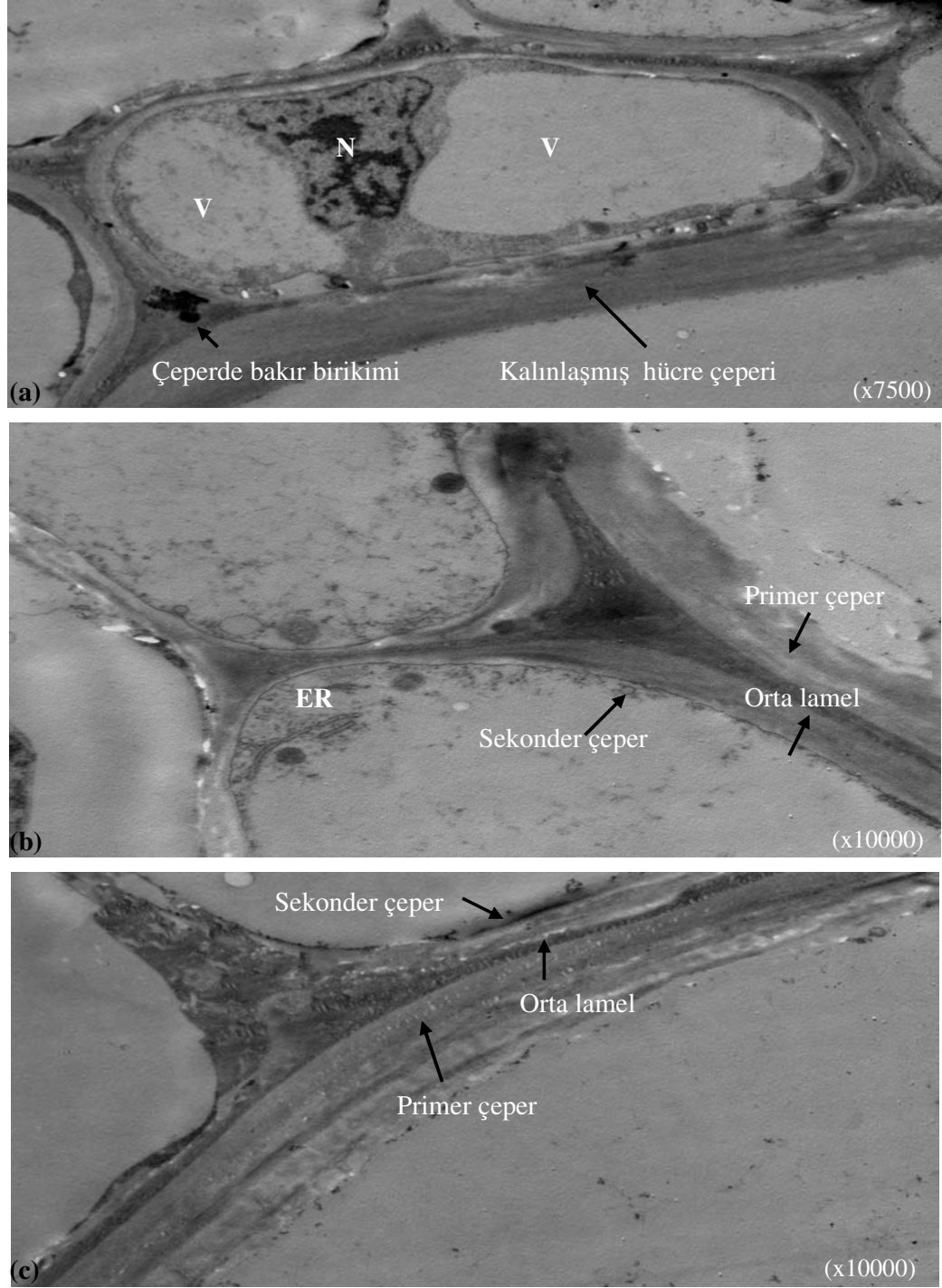
Şekil 4.36 da, 50  $\mu\text{M}$  bakır uygulanmış hücrelerdeki şekli bozulmuş ve uzamış mitokondri (a), (b); kalınlaşmış hücre çeperi (c); çeperde bakır birikimi (d) ve vakuolde antosiyanin ile diğer fenolik bileşiklerin birikimi (e), (f) izlenmektedir.





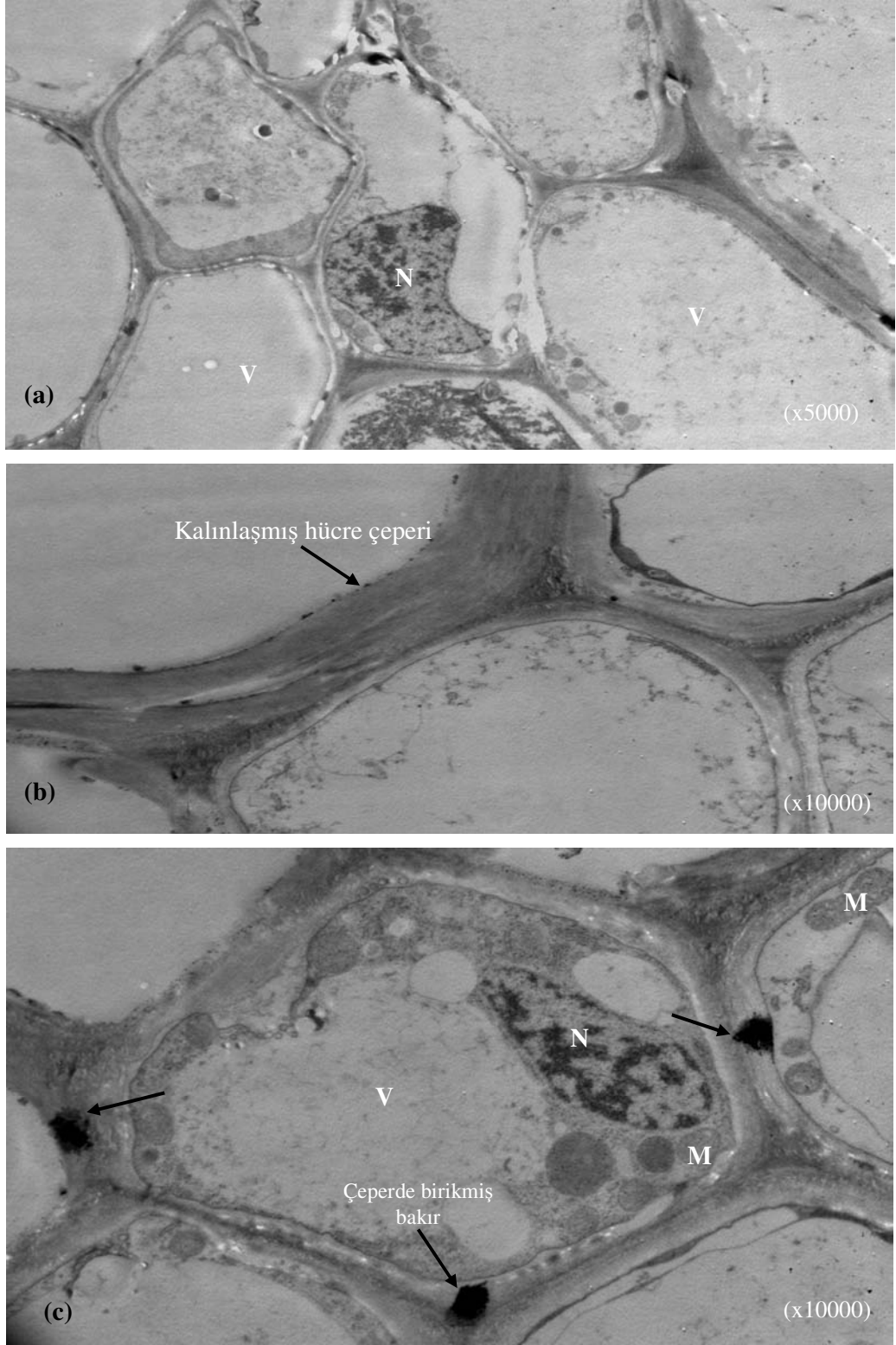
Şekil 4.37: 50  $\mu$ M bakır uygulanmış 7 ve 15 günlük mısır bitkisinin kök ve mezokotilinden alınan enine kesitlerin TEM mikrofotoğrafları (V, vakuol; N, nükleus; M, mitokondri)

Şekil 4.37 de, plazmoliz (d), (e), (f); çeper kalınlaşması (a), çeperlerde bakır birikimi (e) ve mitokondrideki şekil değişimleri (b) görülmektedir.



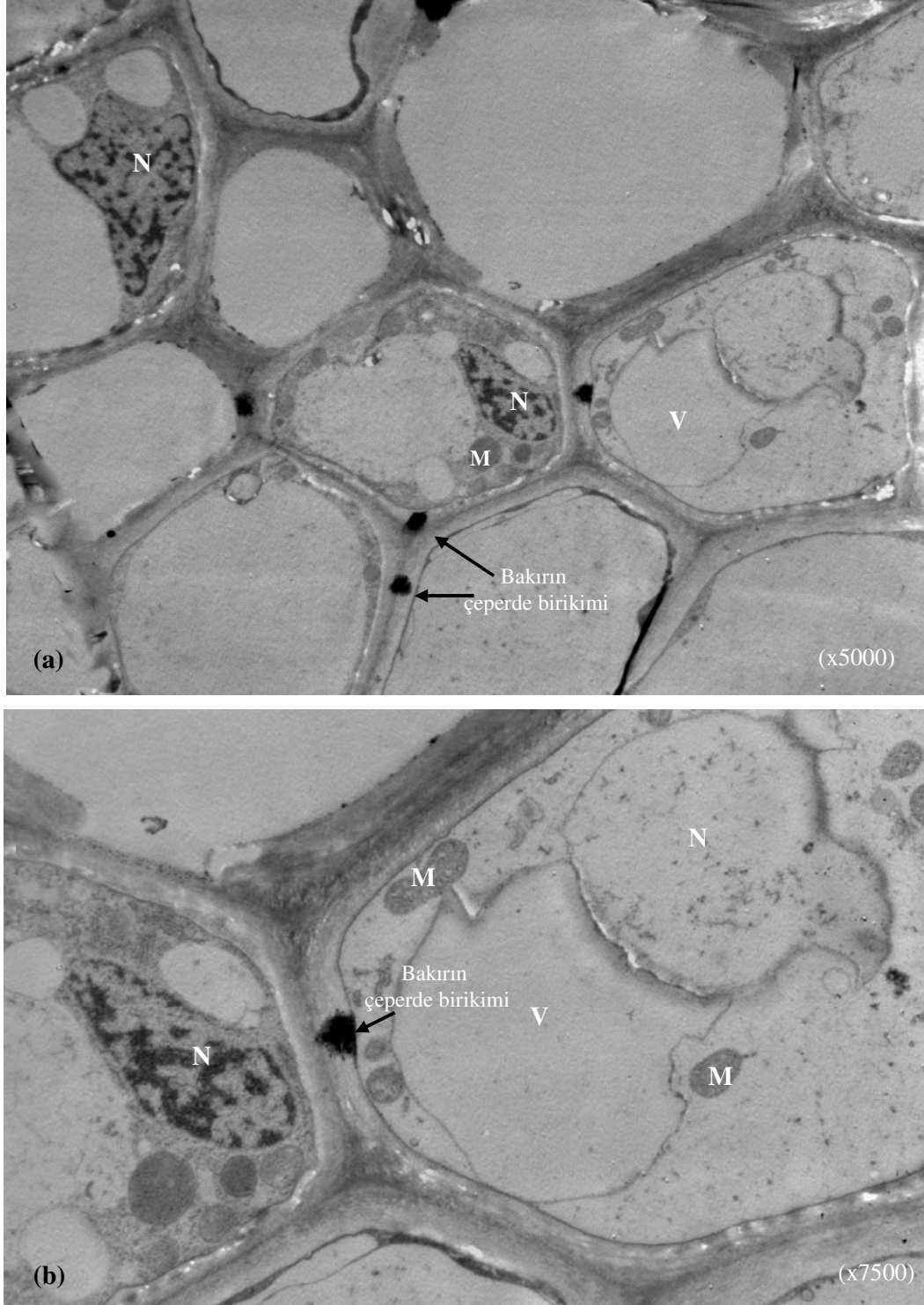
Şekil 4.38: 50  $\mu\text{M}$  bakıra maruz bırakılmış 7 ve 15 günlük mısır bitkisinin kök ve mezokotilinden alınan enine kesitlerde hücre çeperinin TEM mikrofotoğrafları (V, vakuol; N, nukleus, ER, endoplazmik retikulum)

Şekil 4.38 de, 50  $\mu\text{M}$  bakır uygulamaları sonucunda aşırı miktarda lignin biriktirerek kalınlaşmış hücre çeperinin orta lamel, primer çeper ve sekonder çeperden oluşan ayrıntılı görünümleri (a), (b), (c) izlenmektedir.



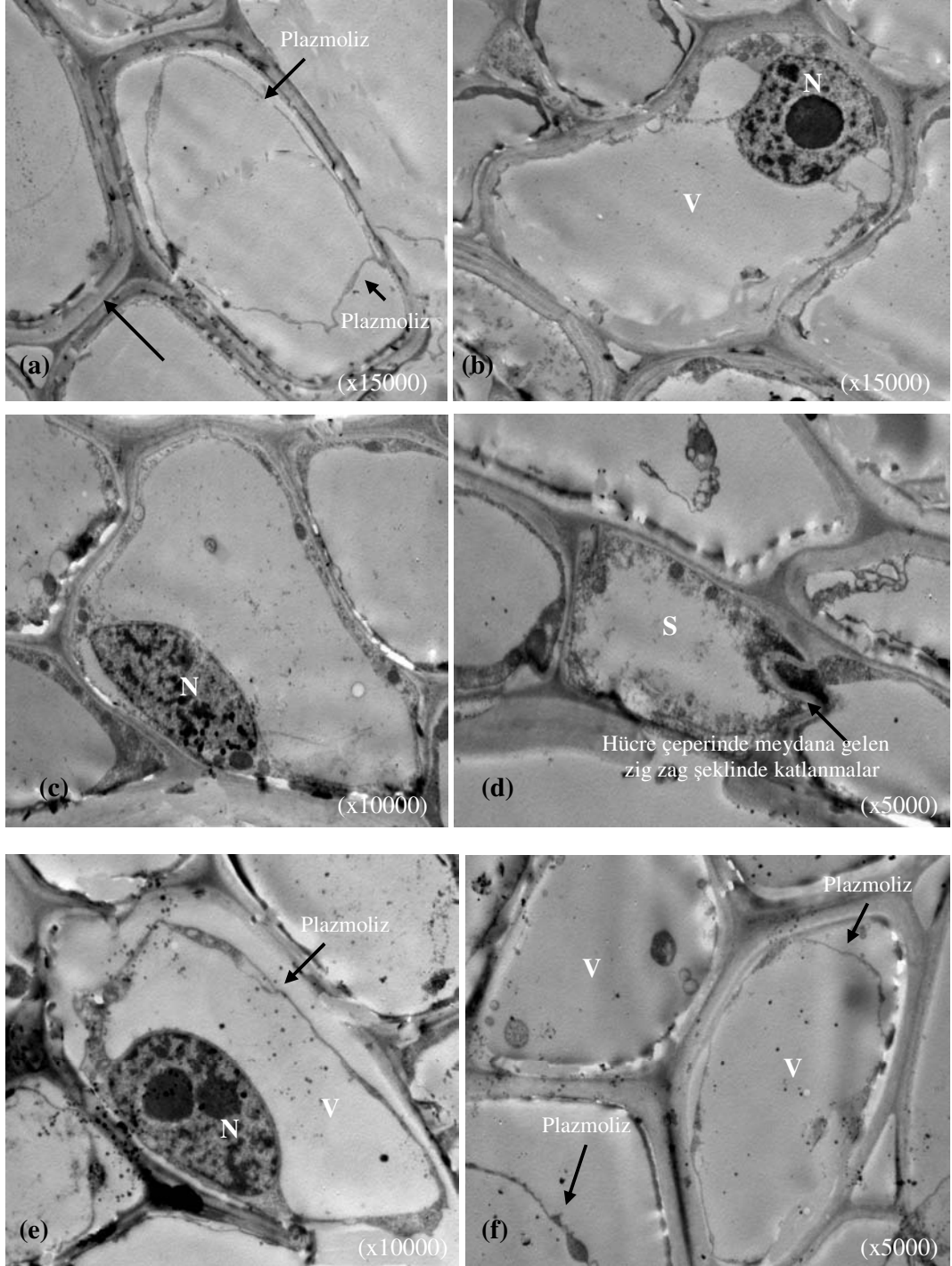
Şekil 4.39: 50  $\mu$ M bakıra maruz bırakılmış 15 günlük mısır bitkisinin kök ve mezokotilinden alınan enine kesitlerde hücre çeperi ve diğer kısımların ayrıntılı görünümü

Şekil 4.39 da yukarıda belirtilen hücre kısımlarının ayrıntılı görünümü izlenmektedir.



Şekil 4.40: 50  $\mu$ M bakıra maruz bırakılmış 15 günlük mısır bitkisinin kök ve mezokotilinden alınan enine kesitlerde hücre çeperi ve diğer kısımların ayrıntılı görünüşleri

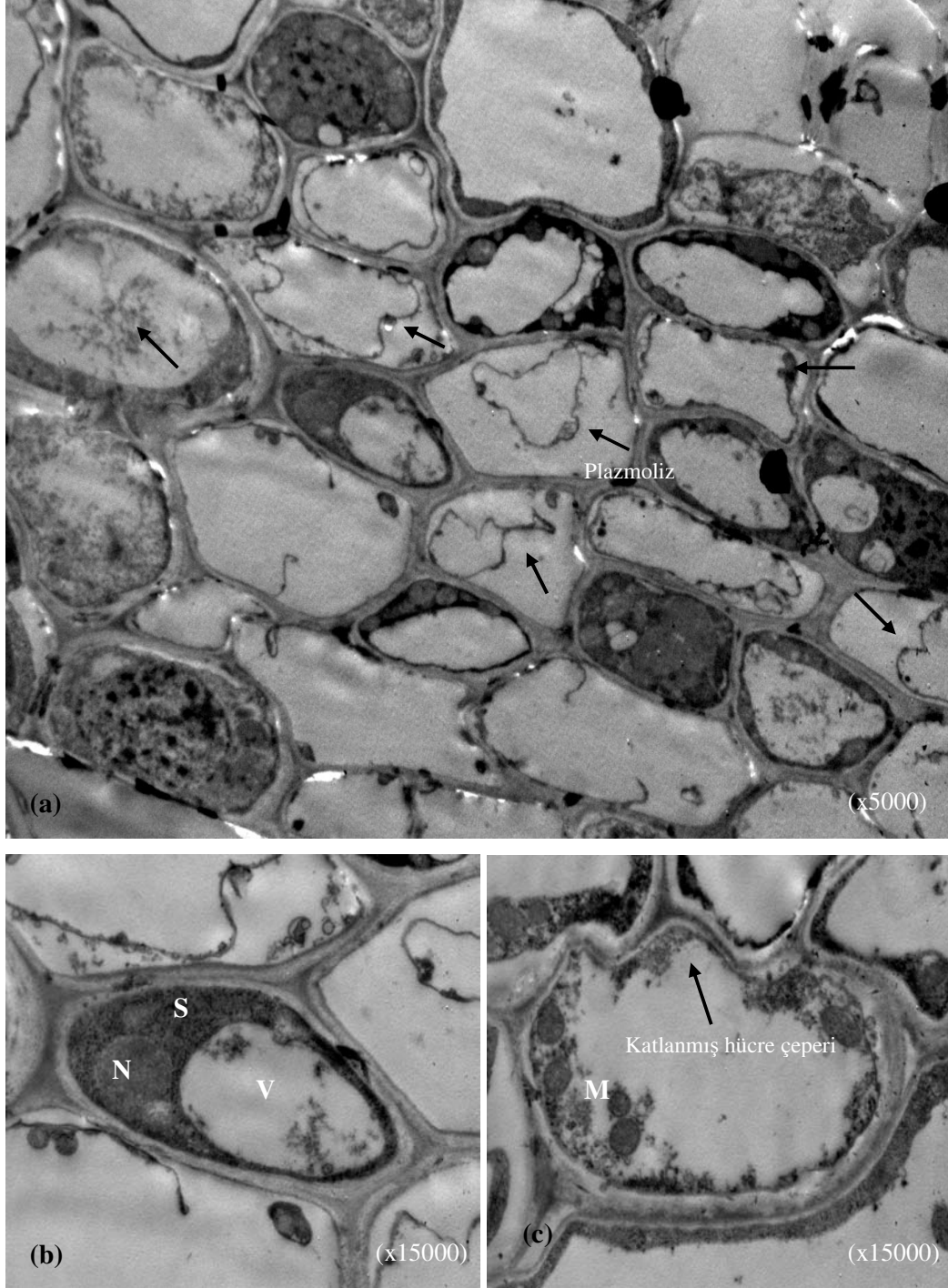
Şekil 4.40 dan da benzer veriler elde edilirken; çeperlerdeki bakır birikimi daha ayrıntılı olarak izlenmektedir.



Şekil 4.41: Aşırı (1500  $\mu$ M) bakıra maruz bırakılmış 7 ve 15 günlük mısır bitkisinin kök ve mezokotilinden alınan enine kesitlerin TEM mikrofotografı (V, vakuol; N, nukleus; S, sitoplazma)

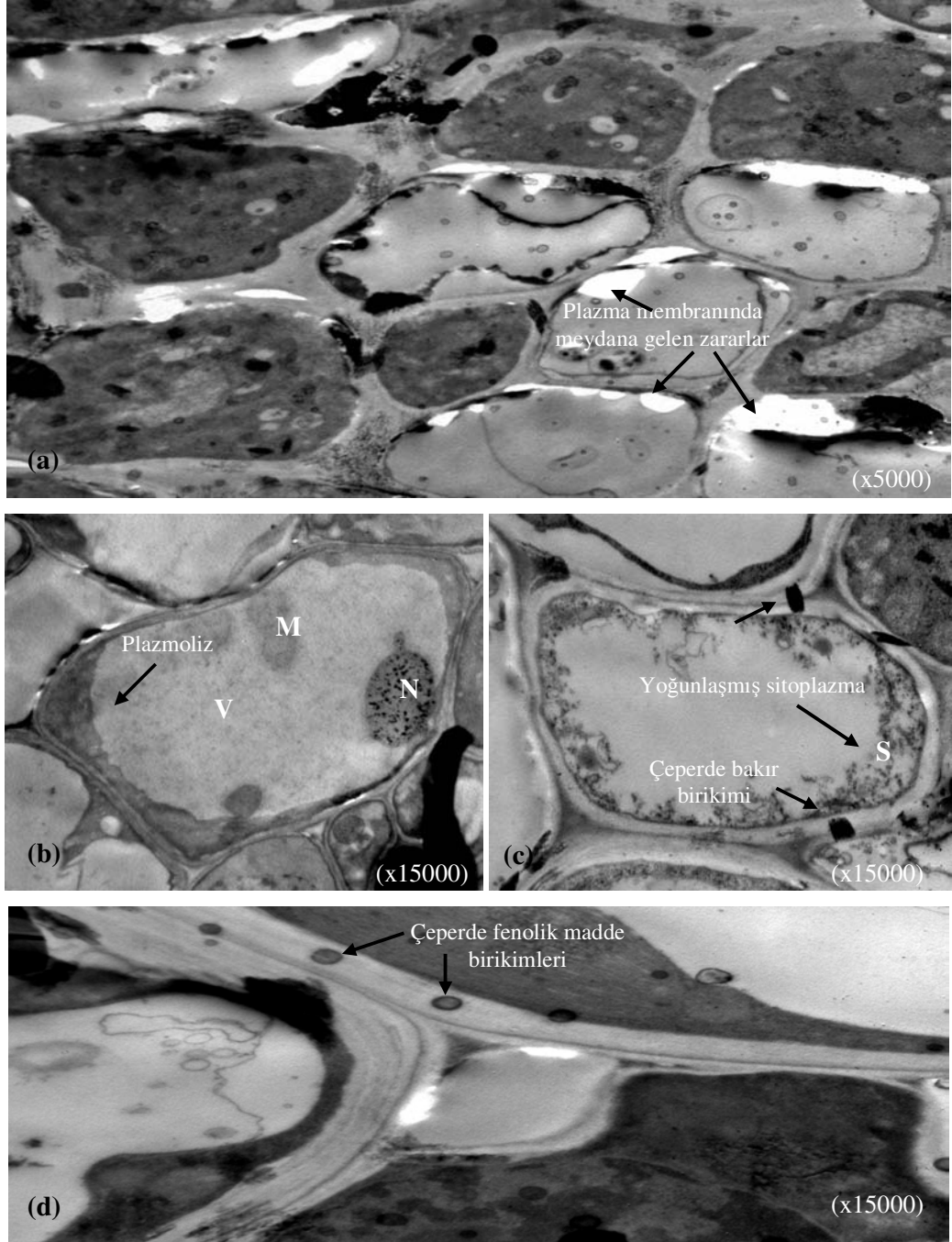
Şekil 4.41 de aşırı bakır uygulanmış mısır fidelerinin kök ve mezokotillerinden alınan enine kesitlerde plazmoliz (a), (e), (f); hücre şeklindeki bozulmalar (çeperin zig zag şeklinde katlanması) (d) ve yoğunlaşmış sitoplazma (d) dikkat çekmektedir.





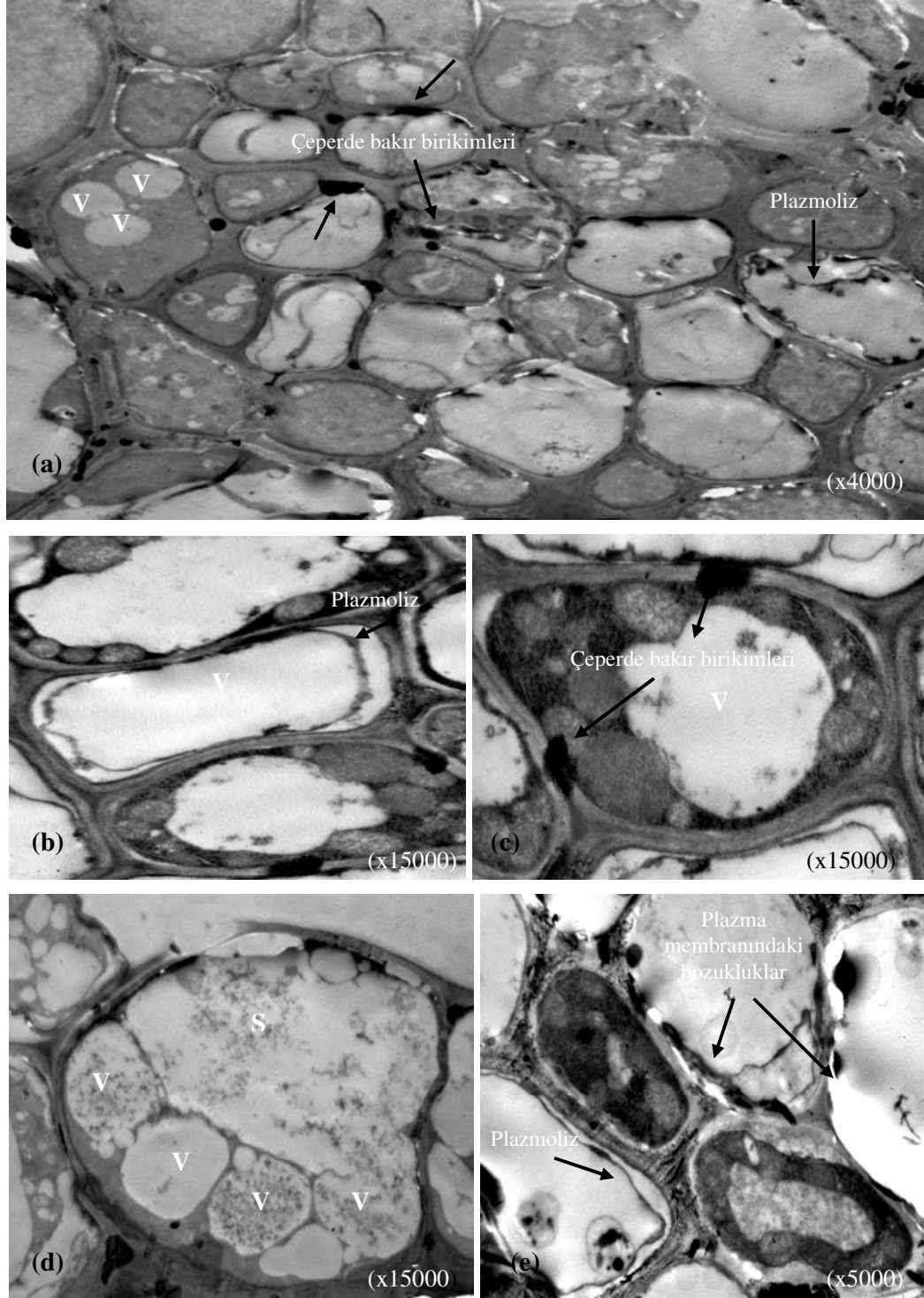
Şekil 4.42: Aşırı bakıra maruz bırakılmış 15 günlük mısır bitkisinin gövdesinden alınan enine kesitlerin TEM mikrofotografı (V, vakuol; N, nukleus; M, mitokondri; S, sitoplazma)

Şekil 4.42 de aşırı bakıra maruz bırakılmış 15 günlük mısır bitkisinin gövdesinden alınan kesitlerde yine plazmoliz (a); yoğunlaşmış sitoplazma (a), (b); katlanmış çeper (c) ve şekli bozulmuş hücreler (a), (b), (c) izlenmektedir.



Şekil 4.43: Aşırı bakıra maruz bırakılmış 15 günlük mısır bitkisinin gövdesinden alınan enine kesitlerde hücre çeperi ve diğer kısımların ayrıntılı görüntüleri (V, vakuol; N, nukleus; M, mitokondri; S, sitoplazma)

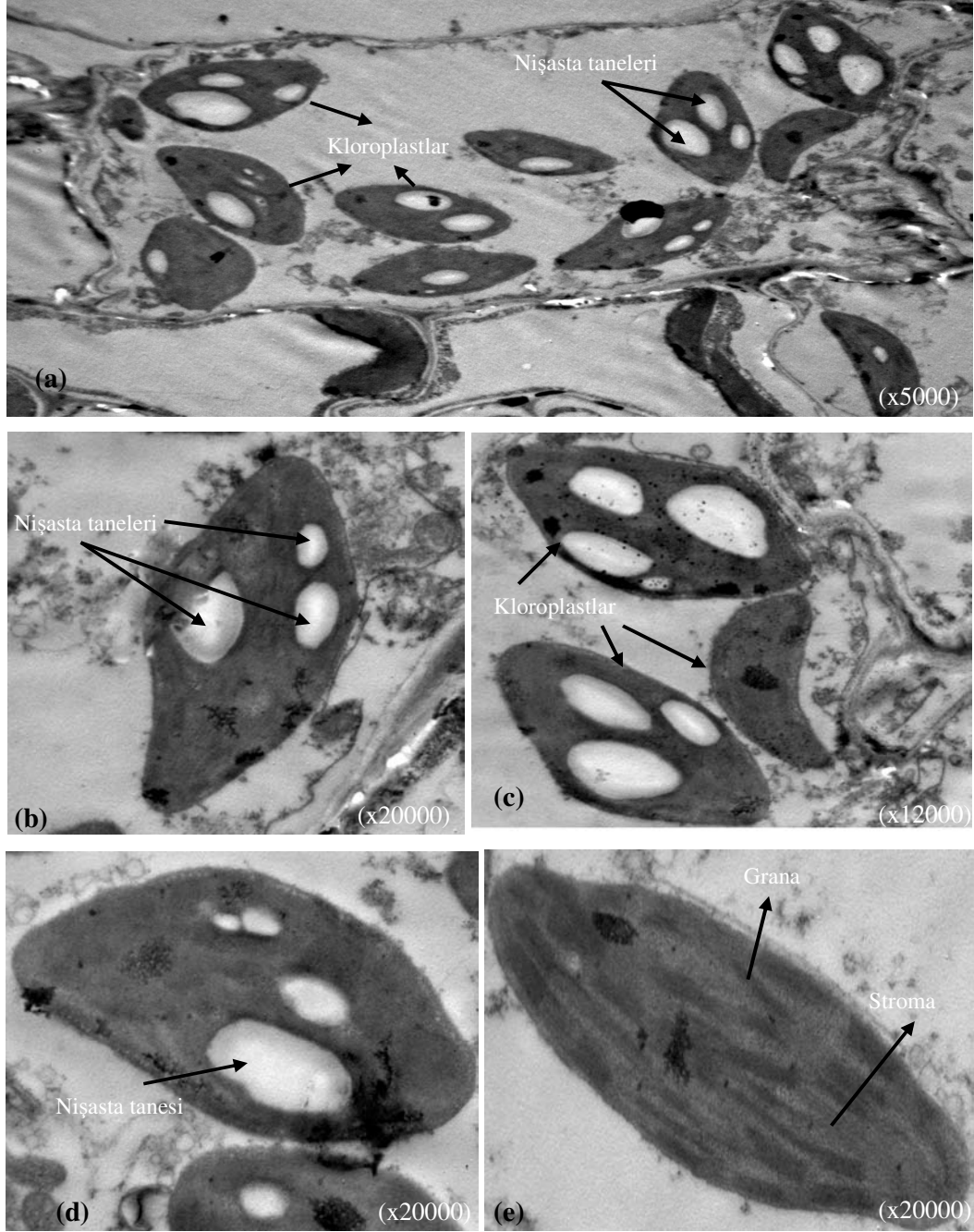
Aşırı bakır uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin gövdesinden alınan kesitlerde hücre membranında meydana gelmiş bozukluklar (a); plazmoliz (b); yoğunlaşmış sitoplazma (c); kalınlaşmış çeper (d) ve çeperde bakır ile birlikte fenolik madde birikimleri (c), (d) izlenmektedir (Şekil 4.43).



Şekil 4.44: Aşırı bakıra maruz bırakılmış 15 günlük mısır bitkisinin gövdesinden alınan enine kesitlerde hücrelerdeki bazı yapısal değişimlerin görünümü (V, vakuol; S, sitoplazma)

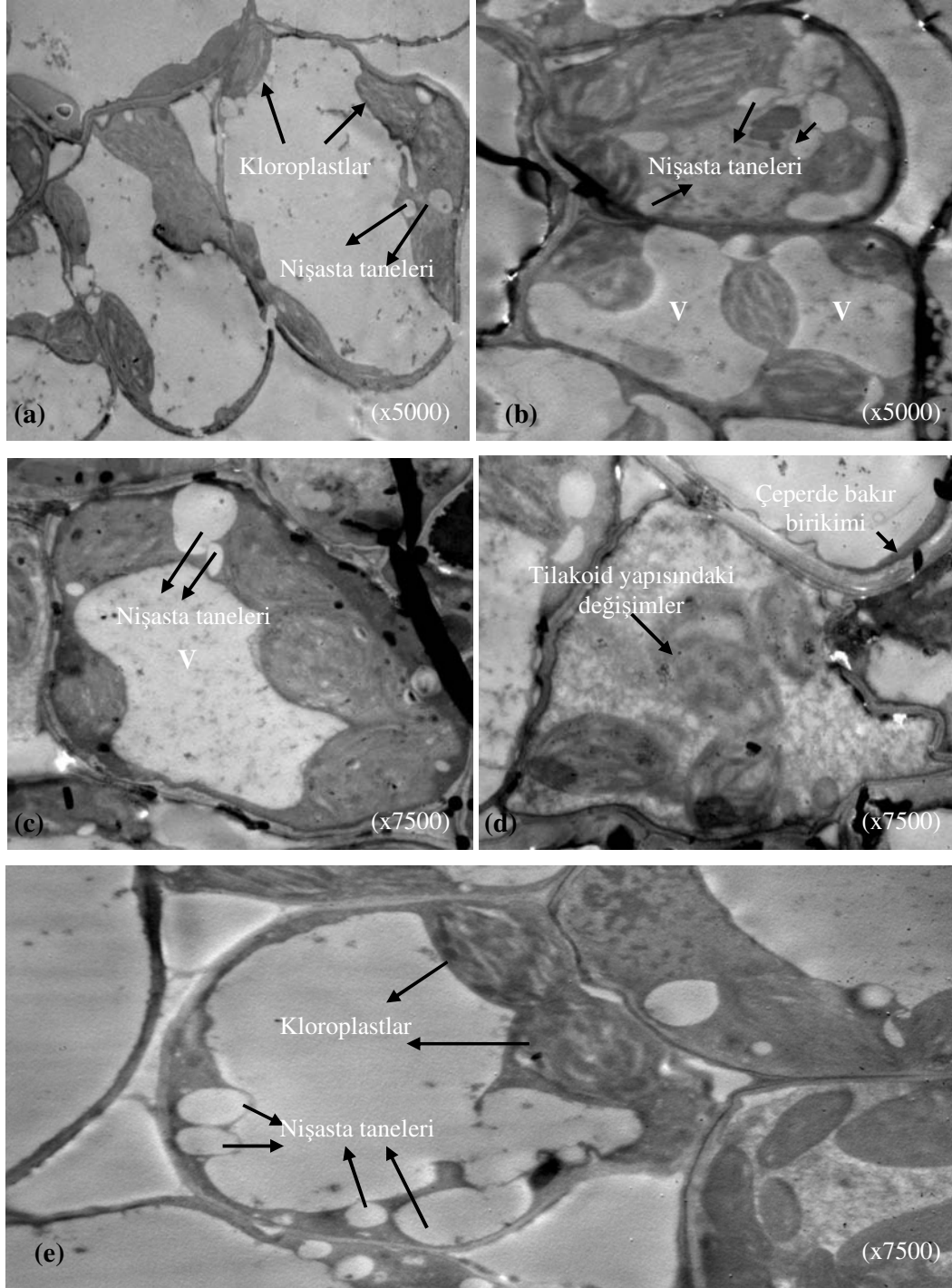
Şekil 4.44 de plazmoliz (a), (b), (e); vakuolleşme (a), (d), plazma membranında bozukluklar (e) ve hücre çeperlerindeki bakır birikimleri dikkat çekmektedir.





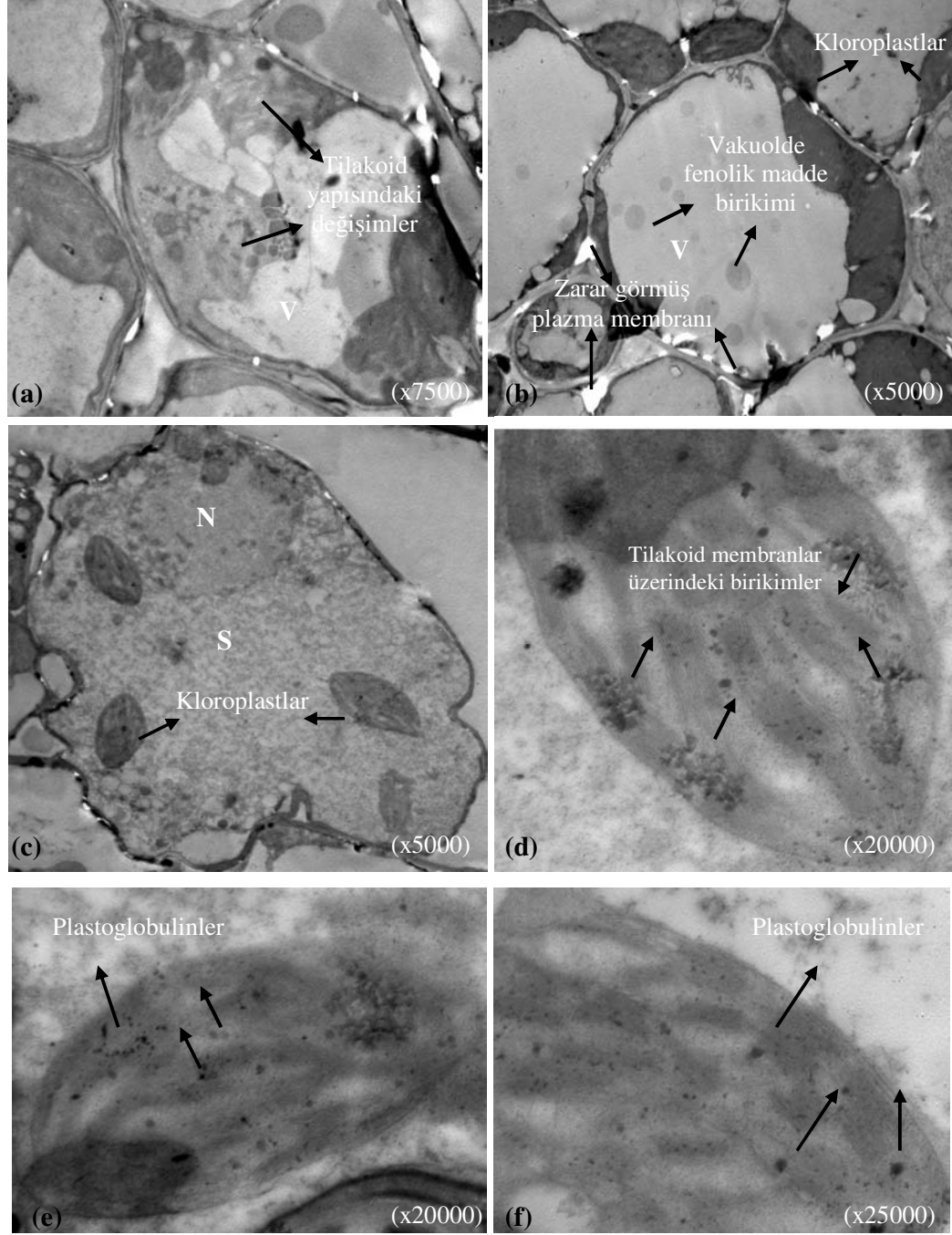
Şekil 4.45: 50 µM bakıra maruz bırakılmış 15 günlük mısır bitkisinin yapraklarından alınan enine kesitlerin TEM mikrograflarında kloroplastların görünümü

Şekil 4.45 de 50 µM bakır uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin yapraklarından alınan enine kesitlerin TEM mikrografları incelendiğinde; çok sayıda kloroplast ve kloroplastlarda da bol miktarda nişasta taneciği görülmektedir (a), (b), (c), (d). Kloroplastın ince yapısında herhangi bir bozulmanın olmadığı; grana, stroma ve tilakoid membranların zarar görmediği (e) izlenmektedir (Şekil 4.45).



Şekil 4.46: Aşırı bakıra (1500  $\mu\text{M}$ ) maruz bırakılmış 15 günlük mısır bitkisinin yapraklarından alınan enine kesitlerin TEM mikrograflarında hücre ve kloroplastların görünümü

Şekil 4.46 da, aşırı bakır uygulanmış 15 günlük mısır bitkisinin yapraklarında kloroplast yapısının değiştiği; sayısının indirgendiği, nişasta tanelerinin azaldığı (a), (b), (c), (d), (e) izlenirken; tilakoid yapılarında bozulmalar meydana geldiği de (d) görülmektedir.



Şekil 4.47: Aşırı bakıra maruz bırakılmış 15 günlük mısır bitkisinin yapraklarından alınan enine kesitlerin TEM mikrograflarında hücre ve kloroplastlarda meydana gelen bazı değişimler (V, vakuol; N, nukleus; S, sitoplazma)

Şekil 4.47 de, boyut olarak küçülmüş ve sayıları azalmış kloroplastlar (c), tilakoid yapısında değişimler (a) ve tilakoid membranları üzerinde birikmiş yapılar (d); stroma ve granalarda plastoglobulinlerin artışı (e), (f); yoğunlaşmış sitoplazma (c); zarar görmüş plazma membranı (b) ve vakuolde fenolik madde birikimi (b) izlenmektedir.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mısır bitkisinde kök, gövde ve yapraklardaki bakır birikimi ve bunun büyüme, gelişme, pigment içeriği ve antioksidan yanıtlar üzerindeki etkileri fizyolojik ve anatomik yönden incelenmiştir. Bakır gibi ağır metallerin normal konsantrasyonları bitkilerin büyümesi ve gelişmesi için gerekli bir mikroelement olmasına karşın yüksek konsantrasyonlarda büyümenin gerilemesi, genç yapraklarda klorosis, pigment içeriğinde azalma, membran yapısında ve enzim aktivitelerinde değişimler gibi çeşitli fitotoksik etkiler göstermektedir (Stiborová ve diğ., 1986; Srivastava ve diğ., 2006; Zhang ve diğ., 2007). Bitkiler için gerekli olsun ya da olmasın ağır metallerin doku ve organlardaki aşırı birikimi toksik etki yapmakta ve sonunda bitkiyi ölüme götürmektedir (Munzuroğlu ve Geçgil, 2002; Xiong ve diğ., 2006; Sahi ve diğ., 2007).

Bu çalışmada çeşitli konsantrasyonlardaki bakır uygulamalarının kök, gövde ve yapraklarda bu iyonların artışı teşvik ettiği saptanmıştır (Tablo 4.1, Şekil 4.3). Metal birikiminin daha çok köklerde meydana geldiği, böylece aşırı miktardaki bakırın gövde ve yapraklara geçişinin engellendiği belirlenmiştir (Tablo 4.1, Şekil 4.3). Mısır bitkisi 50  $\mu\text{M}$  da köklerde 274.2  $\mu\text{g}$  Cu biriktirmiş ancak kök ve gövde büyümesi bundan fazla etkilenmemiştir. 100  $\mu\text{M}$  dan itibaren köklerdeki bakır birikimi artış gösterirken kök büyümesi ve yan kök oluşumu da indirgenmeye başlamıştır. Tablo 4.1, Şekil 4.3 deki verilere göre bakırın en çok köklerde depo edildiği ve miktarının kontrolde gövdeden yaklaşık 2 kat, yapraklardan ise 1.6 kat fazla olduğu saptanmıştır. Her bir bitki kısmında konsantrasyona bağlı olarak artan bakır içeriğinin en fazla 1746.8  $\mu\text{g g}^{-1}$  kuru ağırlık olmak üzere 1500  $\mu\text{M}$  Cu uygulanan 15 günlük mısır fidelerinin köklerinde bulunduğu belirlenmiştir. Bakırın 1500  $\mu\text{M}$  Cu'da kontrole göre sırasıyla köklerde 18.8 kat, gövdede 10.4 kat, yapraklarda ise 9.3 kat artışa neden olduğu kaydedilmiştir (Tablo 4.1, Şekil 4.3). Erdei ve diğ.'in (2002) ağır metallerin bitkilerin fizyolojik değişimleri üzerine yaptığı bir çalışma da bu bulguları desteklemektedir. Lin ve diğ.'in (2003) *Helianthus annuus* L. bitkisinin kök, hipokotil, kotiledon ve yapraklarındaki bakır birikimi ile ilgili yaptıkları araştırmadan da benzer veriler elde edilmiştir.

Bakırın köklerden gövdeye geçişinin keskin bir düşüş göstermesi; bunların büyük bir kısmının kökler tarafından bağlandığını göstermekle beraber ve Cu iyonlarının ksilemle taşınma kapasitesinin de oldukça düşük olduğunu ortaya koymaktadır (Loneragan, 1981; Nellessen ve Fletcher, 1993; Himelblau ve Amasino, 2000). Bazı çalışmalarda bakırın ksilemlerdeki konsantrasyonunun gövdede birikmiş olan bakırdan daha fazla olduğu hatta floemle tekrar köklere taşındığı da bildirilmektedir (Loneragan, 1981; Nellessen ve Fletcher, 1993; Himelblau ve Amasino, 2000; Pilon ve diğ., 2006). Bu durumda 50, 100 ve 250  $\mu\text{M}$  Cu uygulamalarında gövde ve yapraklardaki bakır içeriğinin diğer kısımlardan daha az olması bakırın ksilem ile taşınmasının oldukça yavaş olduğunu göstermektedir. Yapraklarda toksik belirtilerin hemen ortaya çıkmayışı mısırın antioksidan savunma sistemi ilgili konsantrasyonlardaki bakıra bağlı zararları önleyebildiğini kanıtlamaktadır. 500  $\mu\text{M}$  ve üzerindeki uygulamalarda yapraklardaki bakır miktarının kontrolün oldukça üzerinde artış göstermesi ise bu elementin kısmen de olsa köklerden yapraklara kadar taşınabildiğini (Tablo 4.1, Şekil 4.3) ve ayrıca toksik konsantrasyonun üzerindeki değerlerde artan oksidan strese bağlı olarak hücrel savunma sisteminin yetersiz kaldığını ortaya koymaktadır. Munzuroğlu ve Geçgil'in (2002) bazı metallerin *Triticum aestivum* ve *Cucumis sativus* bitkilerinde tohum çimlenmesi, kök uzaması ile koleoptil ve hipokotil büyümesi üzerindeki etkileri ile ilgili araştırmasının bu bulguları destekler nitelikte olduğu belirlenmiştir.

Bitkilerin ağır metal stresini hafifletmek için çeşitli savunma stratejileri geliştirdiği, bunlardan bir tanesinin metalin köklerde tutularak gövdeye dağılımının engellenmesi olduğu rapor edilmiştir (Fernandes ve Henriques, 2001). Bakır iyonlarının bu kısımlarda biriktirilmesinin köklerin morfolojik, fizyolojik ve anatomik yönden diğer organlara göre daha fazla etkilenmesi sonucunu beraberinde getirdiği (Şekil 4.1.a, Şekil 4.1.b, Şekil 4.1.c., Şekil 4.2, Şekil 4.5, Şekil 4.27, Şekil 4.29, Şekil 4.30) saptanmıştır. Ağır metal iyonları bitkilerde hücre çeperinde tutulma, vakuol gibi belli kısımlarda biriktirilme, metalotiyonin ve fitokelatinlere bağlanma ve salgılanan bazı metabolitlerle hücre dışına atılma gibi çeşitli yöntemlerle detoksifiye edilmektedir (Zenk, 1996; Rauser, 1999; Ogra ve diğ., 2006; Sahi ve diğ., 2007), bu durum bitkinin türüne ve maruz kalınan metalin toksisite derecesine göre değişim göstermektedir (Salt ve diğ., 1995; Reeves ve Baker, 2000; Skelly, 2003; Peer ve diğ., 2005; Gupta ve Sinha, 2007).

Kök dokularındaki metal birikiminin hücre çeperinde ya da vakuolde meydana gelmesinin özellikle elementin tipine bağlı olarak gerçekleştiği belirtilmektedir (Nishizono,1987; Verkleij ve Schat, 1990; Nishikawa ve diğ., 2003; Sahi ve diğ., 2007). Mısır bitkisinde de bakır birikiminin özellikle kök hücrelerinin çeperlerinde ve vakuollerinde meydana geldiği saptanmıştır (Şekil 4.36, Şekil 4.37, Şekil 4.38). Brooks ve diğ. (1991), kadmiyum ve kurşunun özellikle çeperlerde tutulurken bakır ve kurşunun vakuolde depo edildiğini ileri sürmektedir. Souza ve Rauser (2003) ise mısır bitkisinin aşırı kadmiyum ve çinko iyonlarını çeşitli yollarla değişik hücre kısımlarında tutarak diğer önemli yerlerden ayrı tutulmasını sağladığını bildirmektedir.

Elde edilen bu sonuçların ışığında, mısır bitkisinin 50, 100 ve 250  $\mu\text{M}$  Cu serilerinde fazla bakırı köklerinde tutarak gövde ve yapraklara geçişini engellemek üzere bazı stratejiler geliştirdiği; ancak 500, 1000 ve 1500  $\mu\text{M}$  gibi toksik konsantrasyonun üzerindeki uygulamalarda Cu iyonlarının gövde ve yapraklara geçişindeki belirgin bir artışa paralel olarak bunların bazı bileşiklere bağlanarak özellikle merkezi vakuolde depo edildiği ve böylece çeşitli bitki kısımlarındaki fizyolojik, morfolojik ve anatomik belirtilerinin daha belirgin olarak ortaya çıktığı ileri sürülebilir.

Bakır toksisitesinin mısır bitkisinin özellikle erken gelişim evrelerinde etkili olduğu (Şekil 4.1.a, Şekil 4.1.b, Şekil 4.1.c) belirlenmiştir. Kontrolde %100 çimlenme olurken; 50 ve 100  $\mu\text{M}$  Cu serilerinde sırasıyla %98.6 ve %96.7 olmak üzere kontrole yakın değerler elde edilmiştir. Bu sonuçlar, mısırdaki tohum çimlenmesinin 50 ve 100  $\mu\text{M}$  bakır uygulamalarından fazla etkilenmezken; belirli bir konsantrasyondan sonra 250  $\mu\text{M}$  Cu dan itibaren çimlenmede kontrole göre % 11.5 lik bir azalmanın meydana geldiğini ortaya koymaktadır. Bu düşüşün konsantrasyona bağlı olarak giderek arttığı; 1500  $\mu\text{M}$  Cu'da ise % 41.2 lik bir gerilemeye kadar gittiği kaydedilmiştir (Tablo 4.2, Şekil 4.4). Bakır içeriğindeki artışın tohum çimlenmesini geriletirerek radikulanın büyümesini engellediği ancak koleoptillerde belirgin değişimlere yol açmadığı (Şekil 4.1.a, Şekil 4.1.b) saptanmıştır. 250  $\mu\text{M}$  ve üzerindeki toksik konsantrasyonlarda ise radikula gelişimi inhibe olurken; koleoptillerde de önemli indirgenmelerin meydana geldiği tespit edilmiştir (Şekil 4.1.a, Şekil 4.1.b). Guo ve diğ. (2007), alüminyum, bakır ve kadmiyum birarada uygulandığı arpa bitkisindeki ağır metal toksisitesinin fidelerin fizyolojik değişimlerine etkileri ile ilgili çalışmasında benzer sonuçlara ulaşmıştır.

Çimlenmenin azalması, sitotoksik özelliklere sahip olan aşırı bakırın kromozomal bozuklukların artmasını teşvik ederek hücre bölünmesinin inhibisyonuna neden olmasıyla açıklanmaktadır (Ahsan ve diğ., 2007; Glińska ve diğ., 2007). Bakır uygulamalarının tohum çimlenmesinde nişastanın glukoza yıkımını sağlayan  $\alpha$ -amilaz enziminin aktivitesini azalttığı ve embriyonun büyüüp gelişmesini geriletmediği de ileri sürülmektedir (Puntarulo ve diğ., 1991; Ahsan ve diğ., 2007). Aşırı bakırın bitkilerde, mitozun bozulması, kök epidermal hücrelerinin ve kök hücre membranlarının zarar görmesi ve kök uzamasının inhibe olması gibi çeşitli sitotoksik etkilerinin de mevcut olduğu (Ouzounidou ve diğ., 1995; Jiang ve diğ., 2000) bildirilmektedir. Glińska ve diğ., (2007), ağır metallerin; hücre döngüsünün bozulması, mitotik indeksin azalması, bölünen hücre sayısının indirgenmesi, c-mitoz, kromozomlarda yapışma ve kromozom köprüleri gibi sitotoksik etkileri ile özellikle kök büyümesini geriletmediğini belirtmektedir. Bazı araştırmacılar kurşun ve kadmiyumun kromatin iplikçiklerinde yoğunlaşmaya neden olduğunu ve kök meristemlerinde sitokinezin inhibisyonuna bağlı iki nukleuslu hücrelere rastlandığını da bildirmektedir (Wierzbicka, 1999; Glińska ve diğ., 2007). Ağır metallerin DNA ve RNA sentezinde de hatalara yol açarak kök hücrelerinin ince yapısındaki değişimleri teşvik ettikleri de bilinmektedir (Wierzbicka, 1999).

Tohum çimlenmesinde aktif oksijen türlerinin ve antioksidanların da önemli rolleri olduğu bildirilmiştir (Bailly, 2004). Çakmak ve diğ. (1993), hidrojen peroksidin yıkımında rol alan enzimlerin buğday tohumlarının çimlenmesindeki etkilerini araştırmıştır. Benzer şekilde, Puntarulo ve diğ. (1991), superoksit anyonu ve hidrojen peroksidin soya fasulyesinin çimlenmesi sırasındaki embriyonik gelişimde etkili olduğunu ileri sürmektedir. Gara ve diğ. (2000), yüksek üretkenliğe sahip bir mısır hibritinin çimlenmesinde ROS bileşiklerine karşı geliştirilen detoksifikasyon mekanizmalarında ve özellikle hidrojen peroksidin yıkımında askorbatın rolüne dikkat çekmektedir. Glińska ve diğ., (2007) ise kırmızı lahanadan elde edilen antosiyanin ekstraktlarının ağır metal uygulanmış soğan kökünün meristematik hücrelerindeki çeşitli sitotoksik ve genotoksik etkileri azalttığını belirtmektedir. Bitkilerde çimlenme ve büyümenin gerilemesi; turgorun inhibisyonu, total protein içeriğinde azalmalar, lipoperoksidasyon ve serbest radikallerin oluşumu gibi birbiri ile bağlantılı pek çok nedene dayandırılmaktadır (Fernandes ve Henriques, 1991; De Gara ve diğ., 2000; Gapper ve Dolan, 2006; Ahsan ve diğ., 2007; Guo ve diğ., 2007; Ke ve diğ., 2007).

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan bakır serilerine maruz bırakılan mısırın morfolojik ve fizyolojik yanıtları 7 gün boyunca incelenmiş her bir bitki kısmının büyüme ve gelişmesindeki gerilemeler uygulamaların 4. gününden itibaren belirgin şekilde görülmeye başlanmıştır (Şekil 4.1.a, Şekil 4.1.b, Şekil 4.1.c). Daha sonraki günlerde ise özellikle 500, 1000 ve 1500  $\mu\text{M}$  Cu daki fidelerin solma ve kuruma gibi belirtilerle canlılıklarını yitirmeye başladığı izlenmektedir (Şekil 4.2). Erken gelişim evrelerindeki mısır fidelerinde bakır toksisitesinin büyümede benzer gerilemelere yol açtığı Mocquot ve diğ. (1996) ile Tanyolaç ve diğ. (2007) tarafından da belirtilmektedir. 7. günün sonunda hasat edilen 15 günlük mısır fidelerinin kök ve gövde uzunlukları karşılaştırıldığında kontrolde yaklaşık olarak birbirine yakın oldukları; 50  $\mu\text{M}$  daki fidelerin Cu uygulamasından fazla etkilenmediği ve büyüme oranlarında kontrole göre belirgin değişimlerin ortaya çıkmadığı belirlenmiştir (Tablo 4.3, Şekil 4.5). Bu sonuçların aksine Mazhoudi ve diğ. (1997), aşırı bakıra maruz bırakılan domates bitkisi ile yaptığı çalışmasında 50  $\mu\text{M}$  Cu içeriğinin fidelerin büyüme ve gelişmesini inhibe ettiğini rapor etmektedir. Mısır bitkisinin ise bu konsantrasyonun oldukça üstündeki değerlerde bile gelişimini sürdürdüğü kaydedilmiştir. 100  $\mu\text{M}$  Cu'da köklerde %47.1, gövdede ise %14.7'lik bir azalma görülürken (Tablo 4.3, Şekil 4.5); 250  $\mu\text{M}$  Cu'dan itibaren başta kökler olmak üzere her iki bitki kısmında da belirgin düşüşlerin meydana geldiği (Şekil 4.6) saptanmıştır. En yüksek konsantrasyon olan 1500  $\mu\text{M}$  Cu'da fidelerin köklerindeki gerilemenin kontrole göre %77.4'e kadar vardığı, gövdelerinde ise bu oranın %69.7'de kaldığı tespit edilmiştir (Tablo 4.3, Şekil 4.5). Bu bulgular, Kıran ve Munzuroğlu'nun (2004), kurşunun mercimek tohumlarının çimlenmesi ve fide büyümesi üzerindeki etkileri ile ilgili çalışmasındaki veriler ile de desteklemektedir.

Kök ve gövdelerdeki taze ağırlık miktarları 50  $\mu\text{M}$  Cu'da kontrole yakın değerler verirken, gövdede %14.6, yapraklarda ise %20.8 azalma göstermiştir. 100  $\mu\text{M}$  Cu'dan itibaren her üç bitki kısmındaki taze ağırlıkların indirgenmesi konsantrasyon artışına bağlı olarak hızla devam etmiştir. 1500  $\mu\text{M}$  Cu'daki fidelerin çeşitli kısımlarının taze ağırlıklarındaki düşüşler kontrole göre sırasıyla köklerde %82.2, gövdede %79.3 yapraklarda ise %82.9 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.4, Şekil 4.7.a, Şekil 4.7.b). Taze ağırlık miktarlarında görülen bu azalışın yüksek bakır konsantrasyonlardaki su kaybının yanı sıra protein yıkımının teşvik edilmesinden kaynaklandığı da ileri sürülmektedir (Luna ve diğ., 2004; Cuypers ve diğ., 2005; Perales-Vela ve diğ., 2007).



Kuru ağırlık oranlarında ise 50  $\mu\text{M}$  Cu uygulanan köklerde kontrole göre %3.7 lik bir artış meydana gelirken; gövde ve yapraklarda sırasıyla %16.8 ve %16.4 olmak üzere azalmalar kaydedilmiştir (Tablo 4.4, Şekil 4.7.a, Şekil 4.7.b). 100  $\mu\text{M}$  Cu'dan itibaren kuru ağırlık miktarlarında kontrole göre belirgin düşüşlerin meydana geldiği belirlenmiştir. 1500  $\mu\text{M}$  Cu serisindeki fidelerin kuru ağırlıkları kontrol ile karşılaştırıldığında köklerde %75.9, gövdede %83.1, yapraklarda ise %78.0 oranında indirgenmelerin olduğu saptanmıştır (Tablo 4.4, Şekil 4.7.a, Şekil 4.7.b). Bu sonuçlar, Kırbağ-Zengin ve Munzuroğlu'nun (2004), kurşun ve bakır uygulanmış fasulye fidelerindeki kök, gövde ve yaprak büyümesi ile yaptıkları çalışmadan elde ettikleri veriler ile paralellik göstermektedir. Pandit ve Prasannakumar'ın (1999), ağır metallerin *Sorghum bicolor* bitkisindeki çimlenme, fide büyümesi ve minerallerin absorpsiyonu ile ilgili araştırmasında da benzer bulgulara rastlanmıştır.

Farklı miktarlarda bakır içeren serilerde yetiştirilen 15 günlük mısır bitkisinin yapraklarındaki oransal su içeriğinin çözeltinin konsantrasyonu ve uygulama süresine bağlı olarak azaldığı gözlemlenmiştir (Tablo 4.5, Şekil 4.8). Buna göre, 50 ve 100  $\mu\text{M}$  Cu'da kontrole göre sırasıyla %4.2 ve %12.4 oranında; 250, 500, 1000 ve 1500  $\mu\text{M}$ 'da ise %32.6, %46.4, %51.6 ve %59.4 olmak üzere azalmalar olduğu saptanmıştır (Tablo 4.5, Şekil 4.8). Aşırı bakıra maruz kalan bitkilerin yapraklarındaki oransal su içeriğinde görülen azalmanın bu iyonların köklerden gövde ve yapraklara geçişini önlemek üzere bir adaptasyon mekanizması olduğu da ileri sürülmektedir (Barceló ve Poschenrieder, 1990; Song ve diğ., 2004). Bakır toksisitesinin oransal su içeriğindeki değişimlere bağlı olarak bitki için gerekli bazı iz elementlerin alımındaki aksaklıklardan kaynaklandığı kaydedilmiştir (Van Assche ve Clijsters, 1990). Bakır uygulamalarının bitkilerde gerekli mineral maddelerin alımında ve bitkinin çeşitli kısımlarına dağılımında dengesizliklere yol açarak büyümenin gerilemesine, turgorun azalmasına ve fotosentezin inhibe olmasına neden olduğu saptanmıştır (Burzynski, 1987; Nellessen ve Fletcher, 1993). Ağır metallerin köklerdeki birikimi ile Ca, K, Mg, Fe, P ve Zn gibi elementlerin hücre membranlarından geçiş yerlerinin bloke edildiği ve bu iyonların taşıyıcı yapılara bağlanmalarının engellendiği bilinmektedir (Tani ve Barrington, 2005). Buna göre, aşırı bakıra maruz kalmış bitki kısımlarındaki büyümenin azalması, topraktan bitkinin gereksinim duyduğu minerallerin alımının indirgenerek bitkide besin eksikliğine yol açmasına dayandırılmaktadır (Dučić ve Polle, 2005; Grotz ve Guerinot, 2006).

Farklı konsantrasyonlardaki Cu serilerinde yetiştirilen 15 günlük mısır fidelerinin köklerdeki değişimler Şekil 4.30 da izlenmektedir. Buna göre 50  $\mu\text{M}$  Cu içeriğinin köklerde kontrole göre belirgin etkilere neden olmazken; 100  $\mu\text{M}$  ve üzerindeki değerlerin kök uzunluğu ve yan kök oluşumunda azalmalara neden olduğu saptanmıştır. 500, 1000 ve 1500  $\mu\text{M}$  gibi aşırı bakır uygulamalarının ise mısır bitkisinin kök ve yapraklarında oldukça belirgin gerilemelere neden olduğu; büyümedeki indirgenmenin yanı sıra yan kök oluşumunu inhibe ettiği ve kök uçlarında kahverengi madde birikimini teşvik ettiği saptanmıştır (Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.29). İlgili şekil üzerinde bakır artışına bağlı olarak gövde kalınlığının kontrole göre azaldığı ve çapının incelendiği de gözlemlenebilmektedir (Şekil 4.30). Wisniewski ve Dickinson (2003), bakır açısından zengin topraktan alınan meşe örnekleri ile yaptıkları bir çalışmada litresinde 0.5 mg Cu içeren solüsyonlarda yetiştirilen bitkilerin toplam kök uzunluğunun %21 azaldığını, lateral kök büyümesinin gerilediğini; 1.0 mg Cu içeren besi ortamında yetiştirilen bitkilerin ise köklerinin tamamen inhibe olduğunu ve yeni kök oluşumunun durduğunu saptamışlardır. Aynı çalışmada köklerde kahverengileşme, kalınlaşma ve ligninleşmenin arttığı tespit edilirken; yapraklarda ise küçülme ve sararmaların meydana geldiği kaydedilmiştir (Wisniewski ve Dickinson., 2003). Bu bulgular pek çok araştırmacının benzer çalışmalardan elde ettikleri verileri destekler niteliktedir (De Vos ve diğ., 1989; Luna ve diğ., 1994; Weckx ve Clijsters, 1996; Lin ve diğ., 2003). Bakır toksisitesinin, büyümenin gerilemesi, hücrelerin su ve besin dengesinin bozulması, klorosis ve köklerde kahverengi oluşumların artması gibi çeşitli belirtileri vardır.

Metallerin farklı mekanizmalarla kök, gövde ve yaprak büyümesine engel olduğu, bu durumun bitkinin türüne ve gelişme koşullarına göre değişim gösterdiği bilinmektedir (Kırbağ-Zengin ve Munzuroğlu, 2004). Bu çalışmada, mısır bitkisinin 50, 100 ve 250  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarındaki bakır uygulamalarına 7 gün boyunca direnç gösterdiği; diğer kültür bitkileri ile karşılaştırıldığında önemli miktarlardaki metal iyonlarını özellikle köklerinde olmak üzere çeşitli kısımlarında biriktirebildiği; daha yüksek konsantrasyonlarda ise çeşitli toksik belirtilerle birlikte bazı morfolojik ve anatomik değişimlerin meydana geldiği saptanmıştır (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.30, Şekil 4.31, Şekil 4.32, Şekil 4.35, Şekil 4.36, Şekil 4.37, Şekil 4.39, Şekil 4.40, Şekil 4.41).

Artan konsantrasyonlarda bakır uygulanmış 15 günlük mısır fidelerinin köklerinden alınan enine kesitler incelendiğinde; kahverengi birikimlerin görüldüğü korteks parenkiması hücrelerinde bazı parçalanma ve yırtılmaların da meydana geldiği tespit edilmiştir (Şekil 4.32.a). Köklerde çeşitli maddelerin geçişini engelleyen bir bariyer olarak görev yapan endodermisin varlığından dolayı, metal birikiminin merkezdeki hücelere göre korteks tabakasında daha fazla olduğu ve buradaki parenkimatik hücrelerin öz ve iletim sistemindeki hücrelerden daha erken zarar gördüğü bildirilmiştir (Barcelo ve Poschenrieder, 1990). *Zea mays* bitkisinde yapılan bir başka çalışmada ise alüminyumun kök kaliptrasındaki polisakkarit metabolizması ve golgi aktivitesi üzerindeki etkileri ile hücre bölünmesini engellediği (Bennet ve diğ., 1985) saptanmıştır. Bu veriler aşırı bakır içeriğinin parenkimatik hücrelerin membran ve çeperlerindeki bozulma ve parçalanmaların (Şekil 4.32.a) nedenini açıklar niteliktedir. Krom ve alüminyuma maruz bırakılan bitkilerin köklerinde ise korteks parenkiması ve epidermal hücrelerde plazmoliz gözlenirken; kök uzamasının korteks hücre gelişimi ile sınırlanmadığı belirtilmiştir (Vazquez ve diğ., 1987). Aşırı bakır uygulanmış mısır fidelerinin enine kesitlerinin elektron mikroskopu incelemelerinde de kök hücrelerinin plazmolize uğradığı belirgin bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.35, Şekil 4.36, Şekil 4.37, Şekil 4.41). Maksymiec (1997), yüksek bitkilerde bakırın hücre yapısı ve işlevleri üzerindeki etkilerini incelediği çalışmada benzer verilere ulaşmıştır. Elde edilen bu sonuçlar, ağır metallerin diğer zararlı etkilerinin yanı sıra hücrelerin osmotik dengesini bozarak su kaybının artmasına neden olduğunu anatomik yönden kanıtlamaktadır.

Aşırı bakıra maruz bırakılmış mısır fidelerinin köklerinde tespit edilen kırmızı-kahverengi birikimlerin (Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.29), alınan enine kesitlerde korteks parenkiması ve özellikle vaskular silindir ile öz kısmında yoğunlaşma gösterdiği (Şekil 4.32.a, Şekil 4.32.b) saptanmıştır. Barcelo ve Poschenrieder (1990), ağır metallerin etkisiyle köklerde görülen kahverengileşmenin suberin miktarının artmasıyla oluştuğunu ve bu durumun su alımını sınırladığını ileri sürmektedir. Souza ve Rauser, (2003) ise mısır bitkisinin aşırı miktardaki kadmiyum ve çinko metallerinin toksik etkilerini farklı şekillerde detoksifiye ettiğini ve bu metal iyonlarına karşı farklı savunma sistemleri geliştirdiğini belirtmektedir. Benzer şekilde, Bayçu (1995), kadmiyum uygulanmış *Ailanthus altissima* bitkisinin köklerindeki kahverengi birikimlerin ağır metal stresine karşı sentezlenen fitokelatinler olduğunu savunmaktadır.

Kök büyümesinin azalması bakır toksisitesinin önemli morfolojik belirtilerinden birisi olarak kabul edilirken (Kukkola ve diğ., 2000); lateral kök gelişimi ve uzamasının bakır toksisitesine karşı kök inisiyasyonundan daha duyarlı olduğu belirtilmektedir (Fernandes ve Henriques, 1991). Bu durum, aşırı bakır uygulanmış 7 günlük mısır fidelerinin köklerinden alınan enine kesitlerde de tespit edilmiştir (Şekil 4.31). İlgili şekiller incelendiğinde; periskıldan yan köklerin oluşmaya başladığı ancak büyüme ve uzamasına devam edemediği için epidermisten dışarı çıkamadığı (Şekil 4.31) görülmektedir. Aynı kesitte epidermal kök tüylerinin sıklığı ve kalıptalardaki kahverengi birikimler de dikkat çekmektedir (Şekil 4.31). Panou-Filothou ve Bosabalidis (2004), bakır toksisitesinin *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* bitkisinde köklerin yapısal özelliklerinde önemli değişimlerin meydana geldiğini saptamıştır. Vazquez ve diğ. (1987), krom metallerinin *Phaseolus vulgaris* L. bitkisindeki yapısal değişimleri indüklediğini bildirmektedir. Bu bulgular Ouzounidou ve diğ.'in (1995), mısır bitkisinde bakır stresinin büyüme, mineral içeriği ve köklerin ince yapısı ile ilgili verilerle de desteklenmektedir. Pek çok kültür bitkisinin bu koşullarda ancak 50 µM bakıra tolerans geliştirdiği bilinmektedir (Luna ve diğ., 1994; Mazhoudi ve diğ., 1997; Blokhina ve diğ., 2003; Demirevska-Kepova ve diğ., 2004). Buna göre mısırın bakıra karşı oldukça dayanıklı bir kültür bitkisi olduğu ve fitoremediyasyon çalışmaları için de uygun nitelikler taşıdığı ileri sürülebilir.

Ağır metal kirliliği gösteren bölgelerde yetişen bitkilerin fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin tespit edilerek; bunların toprağın temizlenmesinde kullanımı oldukça ilgi çeken bir çalışma alanıdır ve fitoremediyasyon denilen bu yöntemin tercih edilmesi ucuz ve ekolojik olarak uyumlu olduğu için ilgili diğer teknolojilere bir alternatif oluşturmaktadır (Salt ve diğ., 1995; Peer ve diğ., 2005; Eapen ve diğ., 2007). Bu konuda, Baker ve Walker (1990), bitkilerde ağır metal toleransının evrimsel gelişimlerini tespit etmiş ve bakıra dirençli bitkilerdeki metal alımının ekofizyolojisi üzerinde araştırmalar yapmıştır. Jie ve diğ. (2004) ile Ke ve diğ. (2007), yaptıkları iki farklı çalışmada metal kirliliği gösteren ve göstermeyen bölgelerden toplanan *Rumex* bitkilerinin her iki popülasyonundaki bakır birikimini ve ekofizyolojik etkilerini tespit etmişlerdir. Johansson ve diğ. (2005) ise Kıbrıs'taki bir bakır madeninde yetişen bitkilerin büyümesini ve çeşitli kısımlardaki Cu birikimini saptamıştır.

Boojar ve Goodarzi (2007), bakır madeninde yetişen üç tane bitki türünün ağır metal toleransında antioksidan enzimlerin rollerini araştırmıştır. Marchiol ve diğ.'in (2007) yaptıkları bir çalışmada endüstriyel atıklarla kirlenmiş topraklardaki ağır metallerin uzaklaştırılarak ilgili bölgenin temizlenmesinde *Sorghum bicolor* ve *Helianthus annuus* bitkilerinin kullanıldığı ve etkilerinin yapılan tarla deneyleri ile kanıtlandığı belirtilmektedir. Calzoni ve diğ. (2007), *Rosa rugosa* bitkisinin topraklardaki ağır metal kirliliğinin temizlenmesi için uygun özellikler taşıdığını; Komárek ve diğ. (2007) ise mısır bitkisinin kurşun kirliliği gösteren tarım topraklarındaki ağır metallerin kelatlanarak fitoekstraksiyonunda kullanıldığını kaydetmiştir. Bu ve diğer çalışmalardan yola çıkarak, bir kültür bitkisi olmasına rağmen sahip olduğu yüksek bakır toleransı ile dikkat çeken mısır bitkisinin metal iyonu alımı, gövde ve diğer kısımlara taşınımı ve çeşitli yerlerdeki birikimi üzerinde fizyolojik, biyokimyasal, anatomik ve genetiksel yeni araştırmaların yapılarak bu konuda daha fazla bilgi sahibi olunması ve ilgili bitkinin ağır metal kirliliği gösteren tarla koşullarında yetiştirilerek toprağın temizlenmesinde faydalı olması ümit edilmektedir.

Kültür bitkilerinde yetiştirme ortamının fazla miktarlarda bakır içermesinin; su ve besin alımındaki dengesizliğe bağlı olarak ortaya çıkan osmotik uyumsuzluk, genel gelişim yetersizliği, oksidan stresin teşviki, karbonhidrat, protein, lipit ve nükleik asitler gibi makromoleküllerin yıkımı, enzim aktivasyonunun bozulması, membran bütünlüğünün ortadan kalkması, fotosentez, solunum ve diğer genel metabolik süreçlerde aksamalar ve stresin derecesine göre mutasyon, senesens, yaşlanma ve ölüme kadar varan birçok olumsuz etkiyi de beraberinde getirdiği bilinmektedir (Fernandes ve Henriques, 1991; Kwon ve diğ., 2003; Shao ve diğ., 2005; Smirnoff, 2005; ; Mittler, 2006; Getoff, 2007).

Bakırın mikroelement olarak bitkilerdeki etkinlikleri ve dağılımı çok çalışılmış bir konu olmasına karşın bakır içeriği ve antioksidan aktivite arasındaki ilişki henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Aşırı miktardaki bakır iyonlarının hücrelerde zararlı serbest radikaller ile reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve peroksit bileşiklerinin oluşumunu teşvik ettiği, bunların hücrelere saldırarak tahrip ettiği ve yeni radikaller oluşturarak kontrol edilemeyen zincirleme tepkimelerin başlamasına neden olduğu pek çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Eltner ve diğ., 1988; Sies, 1991; Erdei ve diğ., 2002; Grene, 2002; Schützendübel ve Polle, 2002; Mercan, 2004; Halliwell, 2006).

Elektron transferi, enerji üretimi ve diğer pek çok metabolik olaylarda yer alan serbest radikaller aynı zamanda yaşam için gerekli olan moleküllerdir (Gapper ve Dolan, 2006). Düşük düzeylerdeki ROS; mitoz, farklılaşma, apoptosis ve senesens gibi olaylarda fizyolojik rol almakta (Greene, 2002; Mittler, 2002; Halliwell, 2006), ancak hücrelerdeki konsantrasyonları çeşitli nedenlerle arttığında sahip oldukları yüksek tepkime özelliklerinden dolayı kontrolsüz davranışlar göstermekte ve çeşitli yapısal ve işlevsel bozuklukların oluşumuna sebep olmaktadır. Bu aşamada koruyucu bileşikler olarak devreye giren antioksidanlar, serbest radikaller için kolay bir elektron hedefi oluşturmakta ve onları nötralize ederek zararlı etkilerini hafifletmektedir.

Bitki hücreleri de serbest radikalleri tanıyan ve etkisiz hale getiren gelişmiş antioksidan sisteme sahiptir (Smirnoff, 2005). Enzimatik ve enzimatik olmayan yapıdaki bu antioksidan bileşikler, aşırı bakır uygulamalarına bağlı olarak miktarı artan serbest oksijen türlerinin zararlı etkilerini azaltan; mutasyon, senesens, yaşlanma ve dejeneratif hastalıklara neden olabilecek zincir reaksiyonlarını engelleyen moleküllerdir (Mittler, 2002; Shao ve diğ. 2005; Gechev ve diğ., 2006; Mittler, 2006; Genestra, 2007). Reaktif oksijen türlerinin; özellikle lipid molekülerini değişime uğratarak membranın bütünlüğünü ve işlevlerini bozduğu, yapısal bileşenlerin parçalanıp dağılmasına sebep olduğu, hücre içi bileşiklerin dışarıya sızması ile etraftaki dokulara da zarar verdiği rapor edilmiştir (Lidon ve Henriques, 1993a; Pompella, 1997; Richard ve diğ., 1998; Weckx ve Clijsters, 1996; Berglund ve diğ., 2002; Greene, 2002). Mısır fidelerinde bakır uygulamalarına paralel olarak kök ve yaprak hücrelerinden dış ortama sızan elektrolit yüzdelerinde önemli artışlar meydana gelirken; bu oranların Cu konsantrasyonlarına bağlı olarak köklerde yapraklara göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.7, Şekil 4.9). Köklerdeki elektrolit sızma yüzdelerinin kontrole göre 50, 100, 250, 500, 1000 ve 1500  $\mu\text{M}$ 'da sırasıyla %3.8, %17.6, %25.4, %39.6, %45.4 ve %57.6 oranlarında artış gösterdiği saptanmıştır. Yapraklarda ise kontrol ile karşılaştırıldığında deney gruplarında sırasıyla %1.9, %5.7, %14.8, %17.0, %34.8 ve %46.8 olmak üzere hücrelerden elektrolit kaybının arttığı kaydedilmiştir (Tablo 4.6, Şekil 4.9). Bu sonuçlar, De Vos ve diğ.'in (1989, 1991), bakır iyonlarının plazma membranının permeabilitesini arttırarak potasyum iyonu ve diğer elektrolitlerin hücre dışına sızmasına neden olduğunu tespit ettiği araştırmalarından elde edilen bulgularla paralellik göstermektedir.

Birçok araştırmacı, membran permeabilitesinin; bakır stresi sonucunda indüklenen hidroksil, peroksil, alkoksil radikalleri ile lipit yıkım ürünleri olan organik hidroperoksitlerin başlattığı lipit peroksidasyonunun derecesine bağlı olduğunu ileri sürmektedir (De Filippis, 1979; Halliwell, 1987; Pompella, 1997; Ishikawa ve Wagatsuma, 1998). Bunun aksine, Weckx ve Clijsters (1996), toksik miktarlarda bakıra maruz bırakılmış fasulye bitkisinin yapraklarındaki membran lipit peroksidasyonu ile K<sup>+</sup> iyonu sızmasının doğrudan bağlantılı olmadığını rapor etmiştir. Bazı araştırmacılar ise, membran permeabilitesindeki değişimlerin senesens olayında ya da çeşitli stres koşullarında miktarı artan serbest radikallerin lipit peroksidasyonunu teşvik etmesinden kaynaklandığını bildirmektedir (Leshem, 1988; Lin ve diė., 1988; Li ve diė., 2006). Berglund ve diė. (2002), bakır stresinin buğday bitkisinin kök hücre membranlarının lipit içeriği ve fizikokimyasal özelliklerinde önemli değişimlere yol açtığını belirtmektedir. Mckersie ve Leshem (1994) de kültür bitkilerinde stres ve buna bağlı etkileri incelediği çalışmasında benzer konulara vurgu yapmıştır. Dhindsa ve diė. (1981), yaprak senesensinin membran permeabilitesinin ve lipit peroksidasyonunun artışı ile SOD ve CAT enzimlerinin düzeylerindeki azalışa bağlı olduğunu öne sürerken; Prochazkova ve diė. (2001), mısır bitkisinin yapraklarındaki senesensin oksidan stres ve antioksidan aktivite ile yakından ilgili olduğunu belirtmektedir. Bačkor ve diė., (2004) ise metal toksisitesine bağlı olarak permeabilitedeki değişimlerin su stresine benzer şekilde prolin düzeylerinin artmasına neden olduğunu kaydetmiştir.

Bitkilerde prolin birikiminin çeşitli stres etmenlerine karşı bitkinin adaptasyon mekanizması olarak iş gördüğü bilinmektedir (Alia ve Saradhi, 1991; Ali ve diė., 1998). Son yıllarda bitki stres fizyolojisinde üzerinde en çok çalışılan bileşiklerden birisi olan prolin içeriğinin; özellikle kuraklık ve tuzluluk gibi hücrelerin osmotik değerlerinin değişmesine sebep olan durumlarda, önemli oranlarda yükselerek hücrelerin savunma sistemini harekete geçirdiği ve bitkinin olumsuz çevre koşullarına karşı koyma mekanizmasını desteklediği ileri sürülmektedir (Alia ve Saradhi, 1991; Ali ve diė., 1998). Çevresel stres koşullarında önemli rollere sahip olan bitki fenoliklerinin de proline bağlı pentoz fosfat metabolik yolundan sentezlendiği bildirilmiştir (Shetty, 2004). Prolin miktarlarındaki düşüşün ise membran geçirgenliğindeki azalma ve oransal su içeriğindeki artışla doğru orantılı olduğu savunulmaktadır (Alia ve Saradhi, 1991; Ali ve diė., 1998; Wu ve diė., 1998; Bačkor ve diė., 2004).

Artan konsantrasyonlarda bakır içeren çözeltilerde yetiştirilen mısır bitkisinde ise 50 ve 100  $\mu\text{M}$  Cu uygulamalarının fidelerin kök ve yapraklarındaki prolin içeriğinde kontrole göre önemli bir değişime neden olmazken; 250  $\mu\text{M}$  dan itibaren her iki bitki kısmında da belirgin miktarlarda prolin birikiminin meydana geldiği belirlenmiştir (Tablo 4.7, Şekil 4.10). 1500  $\mu\text{M}$  da köklerdeki prolin miktarının kontrolün yaklaşık 4 katı iken; yapraklarda 3 katına kadar çıktığı saptanmıştır (Tablo 4.7, Şekil 4.10). Aşırı bakırın köklerde lipit peroksidasyonunu ve prolin birikimini indüklediği; yapraklardaki lipit peroksidasyonunda ise azalmaya neden olduğu bildirilmektedir (Li ve diğ., 2006; Peng ve diğ., 2006). Bu çalışmada da bakır toksisitesinin özellikle 250  $\mu\text{M}$  Cu'dan itibaren kök ve yaprak hücrelerinde su kaybına, osmotik değerlerinde değişimlere ve prolin miktarlarında artışa yol açtığı kaydedilmiştir (Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10). Elde edilen bulgular, Bassi ve Sharma (1993a) nın çinko ve bakır toksisitesine maruz kalan *Lemna minor* bitkisinde yaptığı çalışmayı destekler niteliktedir. Alia ve Saradhi (1991), ağır metal stresinin prolin birikimini teşvik ettiğini; Bačkor ve diğ. (2004) ise likenlerde bakır toleransının serbest prolin içeriği ile doğrudan ilişkili olduğunu belirtmektedir.

Bu çalışmadan elde edilen ilginç sonuçlardan birisi de 500, 1000 ve 1500  $\mu\text{M}$  gibi toksik konsantrasyonun üstündeki değerlerde Cu içeren serilerde yetiştirilen fidelerin antioksidan sistemlerinde meydana gelen önemli düşüşler ile fizyolojik ve anatomik yönden meydana gelen belirgin gerilemelere karşın bitkilerin en az düzeyde de olsa yaşamlarını sürdürmesidir. Bu durum Cu toksisitesine yanıt olarak hücrelerde antioksidan sistemin dışında geliştirilen diğer bazı koruyucu bileşiklerin sentezini akla getirmektedir. Bunlardan birisi olan prolinin; sitoplazmadaki ağır metalleri kelatladığı, hidroksil radikallerini uzaklaştırdığı, su dengesini sağladığı ve fazla metal alımını engellediği (Alia ve Saradhi, 1991; Bassi ve Sharma, 1993a; Ali ve diğ., 1998; Bačkor ve diğ., 2004) bildirilmiştir. Wu ve diğ. (1998), prolinin Cu ile bazı etkileşimlere girerek bu iyonların hücrelere girişinin önlenmesinin; metale bağlı bazı toksisiteleri ve lipit peroksidasyonunu azaltarak plazma membranını stabilize ettiğini ve böylece hücrelerden aşırı  $\text{K}^+$  iyonu kaybının da önüne geçildiğini belirtmektedir. Bitkilerde prolin birikiminin ancak stres düzeylerinin belli bir sınırı aştığında indüklendiği de belirtilmektedir. Bu sonuçlar, bakırın belli bir düzeyden itibaren toksik konsantrasyon sınırını da aştığını ve antioksidan savunma sistemini de inhibe ettiğini göstermektedir.



Elde edilen bu verilerin ışığında, prolin birikimindeki artışın bitkilerde osmotik düzenleyici olarak bakır stresinin neden olduğu oransal su içerisindeki azalmaya karşı koruyucu görev aldığı ileri sürülebilir. Prolin sentezinin; bakır stresine bağlı enzim inaktivasyonunu ve protein denatürasyonunu gibi oksidan zararların önlenmesinde de önemli rolleri olduğu saptanmıştır (Wu ve diğ., 1998; Bačkor ve diğ., 2004 ).

Bitkilerde çözünebilir protein içeriğinin ölçülmesi, ağır metal toksisitesi gibi çeşitli stres koşullarında hücrelerin fizyolojik durumlarının belirlenmesi için önemli bir belirteç olarak kabul edilmektedir (Davies, 1987; Fernandes ve diğ., 1990; Palma ve diğ., 2002; Cuypers ve diğ., 2005). Kontrol olarak alınan ¼ Hoagland çözeltisi içinde 50, 100, 250, 500, 1000 ve 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  olmak üzere artan miktarlarda bakır serilerine maruz bırakılmış 15 günlük mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarındaki total çözünebilir protein içeriklerinin bu konsantrasyonlardaki ağır metal uygulamalarından farklı şekillerde etkilendiği tespit edilmiştir (Tablo 4.8, Şekil 4.11). Besi çözeltisindeki 50  $\mu\text{M}$  Cu içeriğinin, kontrole göre sırasıyla köklerde %4.76, gövdede %6.28 ve yapraklarda %2.76 oranlarında protein artışına neden olduğu kaydedilirken; 100  $\mu\text{M}$  Cu daki fidelerin her üç kısmındaki protein miktarlarında önemli düşüşler görülmeye başlanmıştır (Tablo 4.8, Şekil 4.11). 250  $\mu\text{M}$  Cu dan itibaren ise protein yıkımının hızlandığı saptanmıştır. En toksik konsantrasyon olan 1500  $\mu\text{M}$  Cu serisindeki fidelerin total protein içeriğinde köklerde kontrole göre %67.5, gövdede %73.3, yapraklarda ise %68.6 oranında gerilemeler meydana geldiği belirlenmiştir (Tablo 4.8, Şekil 4.11).

Elde edilen bulgulara göre, 50  $\mu\text{M}$  Cu serisinde kök, gövde ve yapraklardaki total protein sentezi teşvik edilirken; daha yüksek konsantrasyonlarda yıkım olaylarının arttığı ve kontrole göre belirgin bir azalışın başladığı kaydedilmiştir (Tablo 4.8, Şekil 4.11). Bu değerler, Jouili ve El Ferjani'nin (2003), aşırı miktarda bakır uygulanan ayçiçeği bitkisi ile yaptıkları deneyle benzerlikler göstermektedir. Cuypers ve diğ. (2005), *Phaseolus vulgaris* L. bitkisinin protein içeriğinin bakır stresine bağlı olarak etkilendiğini belirtmektedir. Bakırın çok güçlü bir inhibitör olduğu (Davies, 1987; Palma ve diğ., 2002; Cuypers ve diğ., 2005) ve yüksek konsantrasyonlardaki Cu iyonlarının protein yapı ve işlevlerine zarar vererek bunların yıkımına neden olan toksik oksijen türlerinin üretilmesinde etkin rol aldıkları bilinmektedir (Palma ve diğ., 2002).

Serbest radikallerin özellikle de hidroksil iyonunun biyomoleküllerin kendine özgü yapısal şekillerinde değişimlere neden olduğu, proteinleri bu şekilde modifiye ederek proteolitik saldırılara duyarlı hale getirdiği kaydedilmiştir (Davies, 1987). Zarar gören proteinlerin ise endopeptidazlar ile yıkıma uğradığı hatta bazı yıkım ürünlerinin tilakoid membranına bağlandığı da ileri sürülmektedir (Casano ve diğ., 1994). Kök, gövde ve yapraklardaki protein miktarındaki azalmanın bakıra bağlı oksidan stresin katabolik işlemleri arttırması ve protein sentezinin azalmasından kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Palma ve diğ., 2002; Cuypers ve diğ., 2005). Bu çalışmada da aşırı bakır stresi altında protein yıkımında artış saptanmış olup (Tablo 4.8, Şekil 4.11); bu durum etkinliği ve miktarı artan serbest radikallerin proteolitik olayları teşvik ederek hızlandırması ile açıklanmaktadır (Davies, 1987). Vassilev (1998), Cd uygulanmış *H. vulgare* L. ile yaptığı bir çalışmada, proteinlerin amino asitlere yıkımının hücrelerin özellikle karbonhidrat eksikliğine karşı geliştirdiği bir adaptasyon mekanizması olduğunu ifade etmektedir. Sharma ve Dietz (2006) ise ağır metal stresinde miktarları artan amino asit ve amino asitlerden türetilen moleküllerin, hücrelerin bu koşullara uyumunda önemli etkilere sahip olduğunu ileri sürmektedir. Bunun aksine, katabolik aktivitelerin artmasının metal fitotoksitesinin bir yanıtı olarak membran sistemlerinde ciddi bozulmalara neden olduğu bilinmektedir (Jouili ve El Ferjani, 2003).

Protein miktarındaki indirgenmenin Cu iyonunun pek çok enzimin tiyol gruplarına bağlanmasıyla protein metabolizmasının zarar görmesinden kaynaklandığı da ileri sürülmektedir (Fernandes ve diğ., 1990). Metalloproteinler (MTs) gibi kelatlayıcı proteinlerin aşırı Cu uygulamalarına maruz kalan bitkilerde bir savunma bileşiği olduğu bilinmektedir (Cuypers ve diğ., 2005). Tukendorf (1987) ise köklerdeki sitosol proteinlerinin *in vitro*da bakır iyonlarını bağladığını tespit etmiştir. Aşırı bakırın metalloproteinlerin yapısında bulunan diğer metal elementlerinin yerini aldığı ya da proteinlerdeki sülfidril (-SH) gruplarına doğrudan bağlandığı da kaydedilmiştir (Cuypers ve diğ., 2005). Bakırın protein sentezinin azalmasına ya da inhibe olmasına yol açarak enzim aktivitelerinde değişime yol açtığı (Palma ve diğ., 2002) ve senesens olayının yapraklarda özellikle protein ve klorofil yıkımının artması ile karakterize edildiği (Lin ve diğ., 1988; Prochazkova ve diğ., 2001) bilinmektedir. MDA miktarının ve lipit peroksidasyonunun artmasının da senesensi teşvik ettiği saptanmıştır (Dhindsa ve diğ., 1981; Lehsem, 1988; Lin ve diğ., 1988; Zhang ve diğ., 2007).

Çeşitli bitki türleri ile yapılan çalışmalarda bakırın oksidan strese neden olduğu ve buna bağlı olarak hücrelerdeki reaktif oksijen türlerinin üretimini teşvik ettiği kanıtlanmıştır (Luna ve diğ., 1994; Gupta ve diğ., 1996; Cuypers ve diğ., 2005). Bunlardan birisi olan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ); bitkilerde özellikle peroksizom, mitokondri ve kloroplastlardaki metabolik etkinlikler sonucunda oluşan bir oksidan üründür.  $H_2O_2$ , bitkilerin abiyotik ve biyotik stres etmenleri ile hormon ve yerçekimi gibi uyarıcılara karşı yanıt olarak sentezlenen bir sinyal molekülü olarak da bilinmektedir (Dat ve diğ., 2000; Grene, 2002; Apel ve Hirt, 2004; Shao ve diğ., 2005; Gechev ve diğ., 2006; Mittler, 2006). Normal konsantrasyonlarda toksisitesi diğer oksijen bileşiklerine göre daha az olan  $H_2O_2$ , ortamda Fe ve Cu gibi geçiş metallerinin varlığında superoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ) ile tepkimeye girerek biyolojik sistemlerdeki en tehlikeli serbest radikal olan hidroksilin ( $OH^{\cdot}$ ) oluşumuna neden olmaktadır (Liochev ve Fridovich, 2007). Bunların hücrelerdeki birikiminin membran lipitlerinin peroksidasyonu ve enzim aktivitelerinin inaktivasyonu gibi pek çok yapısal ve fizyolojik zarara yol açtığı bilinmektedir (Gutteridge, 1995; Halliwell ve Gutteridge, 1998; Chen ve diğ., 2000; Hegedus ve diğ., 2001).

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre bakır konsantrasyonu artışının başta kökler olmak üzere gövde ve yapraklardaki  $H_2O_2$  oluşumunu teşvik ettiği tespit edilmiştir. 500  $\mu M$  ve üzerindeki Cu uygulamalarına maruz kalan her üç bitki kısmında da kontrolün oldukça üzerinde değerlerin ortaya çıktığı saptanmış; 1500  $\mu M$  Cu çözeltisinde yetiştirilen mısır fidelerindeki  $H_2O_2$  birikiminin köklerde kontrole göre yaklaşık 3.0 kat, gövdede 3.8 kat, yapraklarda ise 4.3 kat arttığı belirlenmiştir (Tablo 4.9, Şekil 4.12). Benzer şekilde, Chen ve diğ. (2000), pirinç bitkisinde bakır toksisitesinin hücrelerdeki antioksidan enzim aktivitelerini,  $H_2O_2$  düzeyini arttırdığına dikkat çekmektedir. Fang ve Kao (2000) ise pirinç bitkisinin yapraklarındaki aşırı demir, bakır ve çinko uygulamalarına bağlı olarak  $H_2O_2$  miktarının ve peroksidaz aktivitesinin arttığını saptamıştır. Fielding ve Hall (1978), peroksidaz aktivitesinin *Pisum sativum* köklerindeki biyokimyasal ve sitolojik etkilerini incelediği çalışmasında  $H_2O_2$ 'in önemli rolleri olduğunu ifade etmektedir. Bu bulgular Gallego ve diğ.'in (1996) aşırı ağır metale maruz kalan ayçiçeği bitkisi ile yaptığı çalışmadaki oksidan stresin etkileri ile benzerlik göstermektedir. Mittler (2002) ise yüksek konsantrasyonlardaki  $H_2O_2$ 'in; Haber-Weiss tepkimesi sonucunda  $OH^{\cdot}$  oluşumuna yol açarak lipid peroksidasyonu ve dolayısıyla membran yapısının bozulmasına neden olduğunu ileri sürmektedir.

Buna göre, ortamda bulunan demir ve bakır iyonlarının lipit peroksidasyonunu hızlandırdığı ve oluşan lipit radikallerinin yüksek derecede sitotoksik ürünlere dönüştüğü bilinmektedir (Girotti, 1985). Bunlar arasında en çok bilinen ürün aldehit grubundan malondialdehit (MDA) tir.

Ağır metale maruz kalmış bitkilerde MDA içeriğinin ölçülmesi, lipit peroksidasyonun ve oksidan zararların tespitinde bir indikatör olarak çok yaygın bir biçimde kullanılmaktadır (Weckx ve Clijsters, 1996; Mazhoudi ve diğ., 1997). Çakmak ve diğ. (1991), bakırın lipit peroksidasyonunu teşvik ederek membran yapısının kararlılığını bozduğunu ileri sürmekte; benzer sonuçlar Luna ve diğ.'in (1994), arpa bitkisi ile yaptıkları çalışmada da ileri sürülmektedir.

Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$  Cu serilerinde yetiştirilen 15 günlük mısır fidelerinin çeşitli kısımlarında ilgili bakır uygulamalarının lipit peroksidasyonu üzerindeki etkileri; yıkım ürünlerinden birisi olan MDA miktarının ölçülmesi ile tespit edilmiştir. Buna göre; kök, gövde ve yapraklardaki MDA içeriğinin bakır konsantrasyonu artışına paralel olarak teşvik edildiği belirlenirken; 50, 100 ve 250  $\mu\text{M}$  Cu da kontrole yakın değerler elde edilmiştir. 500  $\mu\text{M}$  ve üzerindeki serilerde ise MDA miktarındaki artışın kontrolün oldukça üzerine çıktığı saptanmıştır (Tablo 4.10, Şekil 4.13). 1500  $\mu\text{M}$  Cu uygulamış fidelerindeki MDA miktarının köklerde kontrole göre yaklaşık 5 kat, gövdede 12 kat, yapraklarda ise 8 kat fazla birikim gösterdiği kaydedilmiştir (Tablo 4.10, Şekil 4.13). Bitkilerde hücre membranının yapısal bütünlüğü ile bazı kültür bitkilerinin strese duyarlı ya da dirençli olup olmadığını test etmek üzere sıklıkla kullanılan bir yöntem olan MDA içeriğinin ölçümünden elde edilen bu sonuçlara göre; artan bakır konsantrasyonlarının MDA miktarında belirgin artışlara neden olduğu ve bu toksik bileşiklerin başta kökler olmak üzere çeşitli bitki kısımlarındaki birikiminin yükseldiği belirlenmiştir (Tablo 4.10, Şekil 4.13). Biyomembranlardaki doymamış çoklu yağ asitlerinin yıkım ürünü olan MDA'in, diğer stres etmenlerinde olduğu gibi bakır uygulanan mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarında da yüksek birikim gösterdiği kanıtlanmıştır. Bu durumlarda yüksek membran kararlılığı bitkinin abiyotik stres toleransındaki bir ölçüt olarak kabul edilmektedir (Gutteridge, 1995; Ishikawa ve Wagatsuma, 1998; Berglund ve diğ., 2002; Mittler, 2000; Shao ve diğ., 2005; Mittler, 2006).

Elde edilen bu verilerin ışığında, mısırın yüksek bakır koşullarında bile hücrelerin membran bütünlüğünün korunmasını sağlayan gelişmiş bir savunma sistemine sahip; ağır metallere dirençli bir kültür bitkisi olduğu ileri sürülebilir. Yapılan bazı çalışmalarda, ayçiçeğinin de çeşitli kısımlarında yüksek miktarlarda ağır metal biriktirebilme yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu özellikleri ile aşırı bakıra dayanıklı nadir kültür bitkilerinden birisi olan ayçiçeği, mısır bitkisi ile benzerlikler göstermekte ve fitoremediyasyon çalışmalarında tercih edilmektedir (Marchiol ve diğ., 2007). Bu bulgular bazı araştırmacıların aşırı bakıra maruz bırakılmış ayçiçeğinin (*Helianthus annuus* L.) çeşitli kısımlarında tespit ettikleri yüksek MDA içeriği ve antioksidan aktiviteler ile ilgili çalışmalarından elde edilen sonuçlarla da desteklenmektedir (Gallego ve diğ., 1996; Jouili ve El Ferjani, 2003; Lin ve diğ., 2003).

Lipit peroksidasyonu ve MDA miktarındaki artış; bitkilerde çevresel stres etmenlerince teşvik edilen aktif oksijen bileşiklerine bağlı olarak meydana gelen çeşitli zararların biyokimyasal belirteci olarak da kabul görmektedir (Girotti, 1985). Aşırı bakır uygulamalarının da bitkilerde Haber-Weiss ve Fenton tepkimeleri sonucunda, OH<sup>-</sup> gibi serbest radikal bileşiklerinin oluşumuna neden olarak lipoperoksidasyonu başlattığı ve zincir reaksiyonları sonucunda oluşan peroksil radikallerinin membran yapısını bozarak iyon transportunda değişimlere neden olduğu bilinmektedir (Baryl ve diğ., 2000). Bakıra stresine maruz kalmış bitkilerdeki hücre membranlarının bu şekilde zarar görmesi; turgorun ve hücre büyümesinin olumsuz etkilenmesi ile oransal su içeriğindeki indirgenmenin de nedeni olarak gösterilmektedir (Jouili ve El Ferjani, 2003). Membran permeabilitesindeki artışın indüklenmiş lipit peroksidasyonuna bağlı olarak artan MDA içeriğinden kaynaklandığı da ileri sürülmektedir (Dhindsa ve diğ., 1981; Halliwell, 1987; De Vos ve diğ., 1989; Zhang ve diğ., 2007). Buna göre, çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucunda lipit peroksidasyon ürünleri oluşmakta ve hücre membran akışkanlığında azalmalar, permeabilitede ve membrana bağlı enzimlerin aktivitelerinde değişiklikler meydana gelmektedir (Girotti, 1985; Gutteridge, 1995; Pompella, 1997; Li ve diğ., 2006; Zhang ve diğ., 2007). Yapraklarda meydana gelen klorofil içeriğindeki azalma ve klorosis gibi toksisite belirtilerinin ise, yüksek bakır içeriğine bağlı olarak kloroplast membranlarının lipit bileşenlerinin peroksidasyonundan kaynaklanan yapısal bozulmalardan ileri geldiği belirtilmektedir (Çakmak, 1994; Mocquot ve diğ., 1996; Weckx ve Clijstres, 1996; Tanyolaç ve diğ., 2007).

Bu hipotez yapraklarda saptanan yüksek MDA içeriği ile de desteklenmektedir (Dhindsa, ve diğ., 1981; Lin ve diğ., 1988; Luna ve diğ., 1994). Mazhoudi ve diğ. (1997), bakır uygulanan bitkilerde lipit peroksidasyonunun arttığına dair benzer sonuçlar elde etmişlerdir. De Vos ve diğ. (1991) ise ağır metallerin serbest oksijen radikallerini temizlemek üzere bazı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemleri teşvik ederek aktivitesini arttırdığını ileri sürmektedir.

Bunlardan enzimatik olmayan antioksidan bileşiklerden birisi olan askorbatın; serbest oksijen radikallerini temizlediği ve membranlarda strese bağlı olarak oluşan lipit peroksidasyonu sonucunda artan elektrolit sızmasını önlediği bildirilmiştir (Mckersie ve Leshem, 1994). Çeşitli stres etmenlerinde artan MDA birikimindeki artışın eksojen olarak bitkinin yetiştirme ortamına eklenen askorbat ile indirildiği ancak bu mekanizmanın henüz açıklığa kavuşmadığı belirtilmektedir (Zhang ve diğ., 2007).

Askorbat (AsA) (C vitamini), özellikle meyve ve yapraklarda olmak üzere bütün bitki kısımlarında bulunan önemli bir antioksidan bileşiktir. Çevresel stres koşullarında artan  $H_2O_2$  ve diğer aktif oksijen türlerinin temizlenmesinde çok önemli rolleri olan askorbat bileşiği, kloroplast ve sitoplazmada lokalize olan askorbat peroksidaz (APX) enziminin elektron vericisi ve substratı olarak diğer antioksidanlarla birlikte iş görmektedir (Mehlhorn ve diğ., 1996). Bitkilerdeki reaktif oksijen türlerinin detoksifiye edilmesinde Halliwell-Asada yolu da denilen askorbat-glutasyon çemberi anahtar rol oynamaktadır (Noctor ve Foyer, 1998). Askorbat, çeşitli antioksidan bileşik ve enzimlerin görev aldığı bu döngünün önemli bir bileşeni olarak serbest radikallerin temizlenmesinde doğrudan rol almakta; ayrıca okside olmuş  $\alpha$ -tokoferölü indirgeyerek membranların zarar görmesinin önlenmesinde dolaylı olarak işlev görmektedir (Bodannes ve Chan, 1979; Dalton ve diğ., 1986; Çakmak, 1994; Alscher ve diğ., 1997; Gara ve diğ., 2000; Asada, 2006). Askorbat, güçlü antioksidan özelliklerinin yanısıra; büyüme, hücre bölünmesinin uyarılması, hücre çeperi bileşenlerinin çapraz bağlanması, geçiş metallerinin kofaktör olarak yer aldığı bazı oksidaz enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, fotosentez, elektron transportu ve fotooksidan etkilerden korunum gibi bitkilerdeki çeşitli biyokimyasal ve savunma yanıtlarının oluşmasında da etkin roller almaktadır (Noctor ve Foyer, 1998). Askorbat,  $H_2O_2$  varlığında demir ya da bakır iyonlarıyla birlikte tepkimeye girerek proooksidan özellik de gösterebilmektedir (Aust ve diğ., 1985; Baskin ve Salem, 1997).

Artan konsantrasyonlarda bakır serilerinde yetiştirilmiş 15 günlük mısırdaki incelenen redüklenmiş askorbat (AsA), dehidroaskorbat (DHA) ve total askorbat (AsA+DHA) miktarlarının bitkinin çeşitli kısımlarında farklı değerler verdiği gözlemlenmiştir. 50, 100 ve 250 µM Cu serilerindeki fidelerin kök ve gövdelerindeki AsA ve total AsA içeriğinde kontrole göre artış kaydedilirken; 500 µM ve üzerindeki konsantrasyonlarda tekrar azalmaya başladığı belirlenmiştir. Yapraklarda AsA ve total AsA birikiminin bakır uygulamalarına bağlı olarak kontrole göre azaldığı; DHA içeriğinin ise bir miktar yükseldiği saptanmıştır (Tablo 4.11, Şekil 4.14). Nagalakshimi ve Prasad (1998), bitki hücrelerindeki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in özellikle askorbat-glutasyon döngüsü ve ilgili enzimler tarafından detoksifiye edildiğini; AsA ve total AsA miktarlarında düşüşler meydana gelirken; DHA içeriğinin arttığını rapor etmiştir. Cuypers ve diğ. (2000), bakır uygulanmış *Phaseolus vulgaris* bitkisi ile yaptıkları bir çalışmada metal asimilasyonunun erken evrelerindeki primer yaprakların askorbat sentezinde benzer verilere rastlamışlardır. Arrigoni (1994), glutasyon ve askorbatın özellikle yapraklardaki başlıca antioksidan bileşikler olduğunu bildirirken; De Gara ve diğ. (1997) ile Apel ve Hirt (2004), güçlü bir antiradikal olan askorbatın aynı zamanda askorbat peroksidaz enziminin substratı olarak da görev yaptığını ifade etmektedir.

Bunun aksine, Burkitt ve Gilbert (1990), demir ve bakır gibi geçiş metallerinin katalize ettiği Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonunlarını incelediği model çalışmaların sonucunda askorbatın oksitlenerek prooksidan yapılara dönüştüğünü ve serbest radikaller gibi etkilere de sahip olabildiğini göstermiştir. Caillet ve diğ. (2007) de doğal antioksidanların ağır metallerin indüklediği bu tepkimelerdeki rollerini araştırmış ve benzer bulgulara ulaşmıştır. Dolayısıyla antioksidan savunma işlevleri sırasında oksitlenen askorbatın tekrar redüklenerek eski haline dönüşümü büyük önem taşımaktadır. Bunun için, askorbat-glutasyon döngüsündeki diğer bir antioksidan bileşik olan glutasyon devreye girmekte ve dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) enzimi aracılığıyla oksitlenmiş askorbatın indirgenerek rejenere olmasını sağlamaktadır (De Gara ve diğ., 1996, 1997; Nagalakshimi ve Prasad, 1998; Gupta ve diğ., 1999; Cuypers ve diğ., 2000; De Gara ve diğ., 2000; Cuypers ve diğ., 2001). Elde edilen bu bulgular, başta H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> olmak üzere diğer reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinde askorbat ve glutasyon bileşiklerinin doğrudan ya da dolaylı olarak önemli roller üstlendiklerini göstermektedir.

Glutasyon (GSH), protein yapıda olmayan bir tiyol bileşiği, bir indirgenme yükseltgenme tamponu ve askorbat-glutasyon çemberinde askorbatın redüklenmesi için gerekli olan bir substrat olarak hücrelerde yaşamsal önem taşıyan çok etkili bir antioksidan bileşiktir (Rennenberg, 1982; Rennenberg ve Lamoureux,1990; Noctor ve Foyer, 1998; Morelli ve Scarano, 2004). GSH'un, singlet oksijen ( $O_2^1$ ) ve hidroksil radikalleri (OH $\cdot$ ) ile de tepkimeye girerek enzimlerin tiyol gruplarını koruduğu ileri sürülmektedir (Hausladen ve Alscher, 1993). Çeşitli stres koşulları altında bitkilerdeki GSH üretiminin kontrolü önemli bir savunma yanıtıdır (May ve diğ., 1998a). Ağır metallerin detoksifikasyonunda ve serbest oksijen türlerinin temizlenmesinde görev alan GSH; aynı zamanda fitokelatinlerin de öncül maddesidir (Meister, 1981, Grene, 2002).

Artan konsantrasyonlarda bakır uygulanmış mısır bitkisindeki redüklenmiş glutasyon (GSH), oksitlenmiş glutasyon (glutasyon disülfit, GSSG) ve total glutasyon (GSH+GSSG) içerikleri incelenmiştir. Buna göre; 50, 100 ve 250  $\mu$ M Cu serilerindeki fidelerin kök, gövde, yapraklarındaki GSH ve total GSH miktarlarının kontrole göre arttığı; 500, 1000 ve 1500  $\mu$ M da bir miktar azalma görülmekle birlikte kontrole yakın değerlerin ortaya çıktığı saptanmıştır (Tablo 4.12 ve Şekil 4.15). GSSG birikiminde ise bakır konsantrasyonu artışına paralel olarak her üç bitki kısmında da önemli yükselmeler olduğu kaydedilmiştir (Tablo 4.12 ve Şekil 4.15). Cuypers ve diğ. (2000), *Phaseolus vulgaris* bitkisinde bakırın etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, 50  $\mu$ M Cu içeriğinin yapraklardaki indirgenmiş GSH düzeylerinde önemli düşüslere yol açarken; GSSG oranının yükseldiğini belirtmektedir. Benzer şekilde, Wang ve diğ. (2004), bakırın *Brassica* bitkisinin köklerindeki GSH miktarında azalmalara neden olurken GSSG miktarının arttığını rapor etmiştir. Bakır birikiminin GSH içeriğinde düşüslere neden olduğu Gupta ve diğ., (1999) tarafından da desteklenmektedir. Çinko uygulanmış *Phaseolus vulgaris* bitkisinin kök ve yapraklarındaki GSH ve GSSG oranlarında da benzer sonuçlara ulaşılmıştır (Cuypers ve diğ., 2001). Yapraklardaki GSH miktarındaki azalışın bu bileşiklerin, aşırı bakırın birikim gösterdiği köklere taşınmasından kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir (Demirevska-Kepova ve diğ., 2004). Elde edilen bu bulgular, bakırın glutasyonu okside ettiğini ve serbest oksijen türlerinin toksik düzeylere ulaştığını göstermektedir.



Bunun aksine, bakırın tiyol içeren bileşiklerin sentezini teşvik ettiği de kaydedilmiştir (Morelli ve Scarano, 2004). Domates bitkisinin hücrelerinde saptanan yüksek GSH düzeylerinin ağır metal toleransı ile ilgili olduğu bildirilmektedir (Chen ve Goldsbrough, 1994). Soya bitkisinin kök nodüllerinde artan askorbat ve glutatyonun peroksidasyona bağlı zararları engellediği de tespit edilmiştir (Dalton ve diğ., 1986). Bu sonuçlar, hücrelerde GSH gibi tiyol içeren bileşiklerin yüksek miktarlarda depo edildiğini ve stres koşullarında bitkiyi korumak üzere kullanılarak GSSG'ye dönüştüğünü; ancak bu durumun savunma sisteminin bir yıkımı olarak ifade edilemeyeceğini göstermektedir. GSH'un, çevresel stres koşullarında bitkilerde bir savunma yanıtı olarak sentezlendiği ve çeşitli antioksidan genlerin transkripsiyonunu regüle ettiği bilinmektedir (Rennenberg, 1982; Rennenberg ve Lamoureux, 1990).

Hücrelerde AsA ve GSH depolarında meydana gelen azalmalar strese bağlı ortaya çıkan metabolik belirtilerden bazılarıdır ve oksitlenmiş olan bu bileşiklerin ilgili enzimlerce redüklenerek tekrar üretilmesi bitkinin sağlıklı bir şekilde canlılığını sürdürmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Meister, 1981; Hausladen ve Alschler, 1993). Askorbat-glutatyon döngüsü olarak adlandırılan metabolik yolda gerçekleşen olaylar sonucunda oksitlenen glutatyonun (GSSG) rejenerasyonu; önemli antioksidan enzimlerden bir diğeri olan NADPH'a bağlı glutatyon redüktaz (GR) enzimi tarafından gerçekleşmektedir (Foyer ve Halliwell, 1976). Bu verilerin ışığında, AsA ve GSH'un hücrelerin indirgenme yükseltgenme olaylarını düzenleyen antioksidan bileşikler olarak organizmaların oksidan strese karşı savunmasında önemli rol oynadıkları kanıtlanmıştır.

Çevresel stres etmenlerinin bitkiler üzerindeki etkilerini anlamak için sıkça başvurulan yöntemlerden biri de klorofil içeriğinin belirlenmesidir (Kupper ve diğ., 1996; Bogoeva, 1998; Garnczarska ve Ratajczak, 2000; Dai ve diğ., 2006). Ağır metaller gibi çeşitli çevresel kirlleticilerin bitkiler üzerindeki etkileri; klorofil yıkımı ve membran yapısının bozulması gibi toksik özellikleri dikkate alınarak incelenmektedir (Chettri ve diğ., 1998; Frankart ve diğ., 2002). Bazı araştırmacılar metal kirliliğine bağlı olarak değişik bitki türlerinde klorofil miktarının azaldığını rapor etmiştir (Mocquot ve diğ., 1996; Kırbag-Zengin ve Munzuroğlu, 2005). Fotosentez aşırı bakıra oldukça duyarlı bir metabolik olaydır ve kloroplastların membranları ile pigment ve protein yapıları bakırın etki ettiği başlıca hedeflerdir (Stiborová ve diğ., 1986; Vinit-Dunand ve diğ., 2002).

Bu çalışmada, kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  serileri uygulanan 15 günlük mısır fidelerinin ikinci yapraklarındaki klorofil a, klorofil b, total klorofil ve total karotinoid miktarları incelenmiş ve bakır konsantrasyonu artışının pigment içeriği üzerinde önemli etkileri olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 4.13, Şekil 4.16.a, Şekil 4.16.b). 50  $\mu\text{M}$  Cu serisindeki fidelerin yapraklarındaki klorofil a değerleri kontrole yakın bulunurken; klorofil b ve total klorofil içeriğinde %18.27 ve %17.37 lik azalmalar olduğu kaydedilmiştir. Klorofil sentezindeki bu düşüş 100  $\mu\text{M}$  Cu serisindeki fidelerden itibaren gözle görülebilir düzeyde olup; özellikle ilk yapraklarda önce sararma sonra da yaprak uçlarından başlayan kararma, yanma ve kuruma şeklinde ortaya çıkmıştır (Şekil 4.2). 1500  $\mu\text{M}$  da klorofil a, klorofil b ve total klorofil içeriğinde kontrol ile karşılaştırıldığında sırasıyla %82.8, %79.5 ve %82.2 olmak üzere önemli indirgenmeler meydana geldiği belirlenmiştir (Tablo 4.13, Şekil 4.16.a). Ağır metal uygulamalarına maruz kalan bitkilerin klorofil içeriğindeki azalmalar diğer araştırmacıların da dikkatini çeken önemli bir konudur (Stiborová ve diğ., 1986; Vassilev, 1997; Chettri ve diğ., 1998; Devi ve Prasad, 1998; Perales-Vela ve diğ., 2007).

Cu-Ni içeren topraklarda yetişen *Empetrum nigrum*'un klorofil miktarının kontrol bitkilerine göre azalma gösterdiği kaydedilmiştir (Monni ve diğ., 2001). *Cladonia convoluta* ve *Cladonia rangiformis* likenlerine bakır, çinko ve kurşun uygulandığında klorofil a ve b'nin miktarında bir azalmanın olduğu, stroma ve grana lamellerinde yapısal bozuklukların olduğu ve bunun sonucunda yapraklarda nekrosiz ve klorosizin meydana geldiği bildirilmiştir (Chettri ve diğ., 1998). Tanyolaç ve diğ. (2007), bakır uygulanan mısır bitkilerinin yapraklarındaki klorofil a ve b miktarlarında belirgin azalışlar olduğunu rapor etmiştir. Chettri ve diğ. (1998) ise, bakır tarafından indüklenen değişimlere bağlı olarak klorofil yıkımının arttığını belirtmektedir. Ağır metallerin topraktan özellikle  $\text{Fe}^{+2}$  ve  $\text{Mg}^{+2}$  alımını indirgeyerek klorofil sentezini engelledikleri tespit edilmiştir (Lidon ve Henriques, 1993a; Bogoeva, 1998; Guo ve diğ., 2007). Bitkilerdeki aşırı  $\text{Cu}^{+2}$  iyonlarının, anten kompleksleri ve reaksiyon merkezlerindeki klorofil moleküllerinin yapısındaki  $\text{Mg}^{+2}$  iyonunun yerini aldığı ve böylece klorofilin yapı ve işlevlerine zarar verdiği saptanmıştır (Kupper ve diğ., 1996). Bakırın hücrelerdeki demirin dağılım ve dolaşımını da etkilediği (Grotz ve Guerinot, 2006); mısır bitkisinin yapraklarında Fe:Cu oranındaki değişimin, Fe eksikliğine bağlı olarak klorofil yıkımını teşvik ettiği de ileri sürülmektedir (Mocquot ve diğ., 1996).

Van Assche ve Clijsters (1990) ise, klorofil yıkımını metal iyonlarının pigment yapısı ve işlevleri üzerindeki toksik etkilerine dayandırmaktadır. Buna göre, klorofil içeriğinde görülen azalmanın;  $\delta$ -aminolevulinik asit dehidrataz ve protoklorofillid redüktaz gibi klorofil biyosentezinde iş gören önemli enzimlerin tiyol gruplarına  $\text{Cu}^{+2}$  iyonunun bağlanmasıyla aktivitelerinin inhibe olmasından kaynaklandığı da ileri sürülmektedir (Prasad ve Prasad, 1987). Kadmiyum uygulanan arpa bitkisinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir (Hegedus ve diğ., 2001; Guo ve diğ., 2007). Kırbağ-Zengin ve Munzuroğlu'nun (2005), bakır stresinde klorofil yıkımının arttığına dair yaptıkları çalışmalar da bu sonuçları destekler niteliktedir.

Bakırın pigment içeriği üzerinde de oldukça etkili olduğu (Bogoeva, 1998; Bačkor ve Vaczi, 2001); ksantofil ve karotinoidlerin klorofil moleküllerini fotooksidan zararlardan koruduğu bilinmektedir (Nobel, 1974; Young ve Britton, 1993; Niyogi, 1999). Bu tez çalışmasında mısır bitkisinin total karotinoid miktarları ölçülmüş ve 50  $\mu\text{M}$  Cu serisindeki fidelerin yapraklarında %6.6 artış meydana gelirken; 100  $\mu\text{M}$  da %3.2 azalma kaydedilmiştir. 250  $\mu\text{M}$  dan itibaren pigment içeriğindeki düşüşün kontrole göre daha belirgin olduğu; 1500  $\mu\text{M}$  da total karotinoidlerin %61 oranında indirgendiği tespit edilmiştir (Tablo 4.13, Şekil 4.16.b). Van Assche ve Clijsters (1990), aşırı bakıra maruz kalmış bitkilerde klorofil a, klorofil b ve yardımcı fotosentetik pigmentler olan karotinoidlerin de indirgendiğini belirtmektedir. 50  $\mu\text{M}$  Cu daki fidelerin yapraklarında görülen karotinoid içeriğindeki artış bu molekülün stres koşullarının yıkıcı etkilerine karşı daha dirençli ve koruyucu özellikler taşıyan kararlı bir pigment olduğunu göstermektedir.

Ağır metal düzeyindeki artışa bağlı olarak klorofil ve karotinoid miktarlarında meydana gelen bu değişimler; Bogoeva'nın (1998) bakırla kirlenmiş topraklarda yetiştirilen tahıl bitkilerindeki pigment içeriğini incelediği bir çalışma ile de desteklenmektedir. Vinit-Dunand ve diğ. (2002), bakırın salatalık bitkisinin büyüme ve fotosentetik etkinliklerinde benzer etkilere sahip olduğunu belirtmektedir. Elde edilen bu veriler, klorofil ve karotinoid biyosentezinin bakırın miktarı ve uygulama süresi ile yakından ilişkili olduğunu ve yüksek konsantrasyonlarda oldukça toksik özelliklere sahip olan bu metal iyonlarının klorofil ve karotinoid yıkımını arttırarak pigmentlerin yapısını bozduğunu ve işlevlerinde aksaklıklara neden olduğunu ortaya koymaktadır.

Çeşitli stres etmenlerinde olduğu gibi, aşırı bakıra maruz kalmış bitki hücrelerinde de miktarı artan serbest oksijen türleri fotosentezin elektron transport zincirinde hatalara neden olarak tilakoid membranın zarar görmesine yol açmaktadır (Heath ve Packer, 1968; Asada, 1984; Halliwell ve Gutteridge, 1984; Clijsters ve Van Assche, 1985; Baszynski ve diğ., 1988; Maksymiec, 1997; Frankart ve diğ., 2002; Asada, 2006; Halliwell, 2006). Bu durumda, klorofil içerisindeki azalmanın; lipit peroksidasyonu ve hücrelerden dışarı elektrolit sızmasının artması ile hücre ve dokuların gördüğü zararlardan kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Dhindsa ve diğ., 1981; Halliwell, 1987; Lin ve diğ., 1988). Casano ve diğ. (1994), yulaf bitkisinin kloroplastlarında aşırı ışık şiddeti ve oksijenin teşvik ettiği protein oksidasyonunda hidroksil radikallerinin ve tilakoide bağlı endopeptidazların rol aldıklarını belirtmektedir. Elde edilen bu verilere göre, ağır metallerin indüklediği serbest radikallerin tilakoid membranlarının protein ve lipitlerinin oksidatif yıkımına sebep olarak, klorofil miktarında indirgenmelere neden olduğu anlaşılmıştır (Halliwell, 1987; Halliwell ve Gutteridge, 1998; Halliwell, 2006).

Klorofil ve karotinoid içerisindeki azalmanın olumsuz çevre koşullarında oksidan strese bağlı senesens ve doku yaşlanmasının da bir belirtici olduğu ifade edilmektedir (Dhindsa ve diğ., 1981; Leshem, 1988; Prochazkova ve diğ., 2001; Getoff, 2007). Yapraklardaki klorofil yıkımı ile lipit peroksidasyonundan kaynaklanan hücre ve dokuların zarar görmesinin; bitkilerde büyüme ve gelişmenin indirgenerek senesense neden olduğu bilinmektedir (Stiborová ve diğ., 1986; Vassilev, 1997; Vinit-Dunand ve diğ., 2002; Xiong ve diğ., 2006). Elde edilen sonuçlar, bu çalışmada mısır bitkisinin özellikle ilk yapraklarında görülen ve uygulanan bakır konsantrasyonuna göre artış gösteren klorosis, nekrosis ve kuruma gibi belirtilerin (Şekil 4.2) nedenini açıklar niteliktedir. Benzer şekilde, Prochazkova ve diğ. (2001), yaptıkları bir çalışmada oksidan stresin mısır bitkisinin özellikle ilk yapraklarındaki klorofil, protein ve lipitlerin yıkımını hızlandırarak senesensi teşvik ettiğini; buna karşı bitkideki çeşitli koruyucu enzim ve bileşiklerin etkinliğinin arttığını bildirmektedir. Hernandez-Jimenez ve diğ. (2002) de, senesens olayında ortaya çıkan zararların engellenmesinde antioksidan savunma sisteminin önemine dikkat çekmektedir. Çeşitli stres etmenlerinin karotinoid birikimine neden olduğu, bu pigmentlerin özellikle oksidan zararlara karşı klorofillerin parçalanmasını engelleyerek koruyucu ve tamir edici özelliklere sahip olduğu rapor edilmiştir (Lichtenthaler, 1987; Hirayama ve diğ., 1994; Sies ve Stahl, 1995).

Sies ve Stahl, (1995) ile Edge ve diğ., (1997) ise, karotinoidlerin antioksidan işlevleri üzerinde incelemeler yapmıştır. Hirayama ve diğ. (1994), doğal karotinoid bileşiklerinin singlet oksijen bileşiklerini sönmüleme özelliklerine sahip olduklarını belirtmektedir. Elde edilen verilere göre, karotinoidlerin artışı bu pigmentlerin serbest oksijen türlerinin uzaklaştırılmasındaki rollerini kanıtlamaktadır. Bitkilerde koruyucu etkileri ve antioksidan özellikleri ile dikkat çeken bir diğer önemli pigment grubu ise sekonder metabolitlerden birisi olan antosiyaninlerdir.

Bitkilerde primer metabolitler genellikle büyüme ve gelişmede rol alırken; sekonder metabolitler bitkilerin çevreleri ile olan ilişkilerinin düzenlenmesi ve uyumunu sağlamaktadır (Iwashina, 2000; Harborne ve Williams, 2000; Williams ve diğ., 2004). Antosiyaninler yüksek derecede indükleyici güce sahip olan flavonoid bileşikleridir (Wang ve diğ., 1997; Rice-Evans, 2001). Williams ve diğ. (2004), flavonoidlerin antioksidan özelliklerine ilaveten sinyal molekülleri olarak da görev aldıklarına dikkat çekmektedir. Antosiyaninlerin metal stresi de dahil olmak üzere çeşitli stres koşullarında miktarının artarak çeşitli bitki kısımlarındaki birikiminin teşvik edildiği bilinmektedir (Chalker-Scott, 1999; Hale ve diğ., 2001).

Hidroponik kültürde yetiştirilen 15 günlük mısır fidelerinin kök, yaprak kını ve ilk yapraklarında incelenen antosiyanin içeriğinin artan bakır serilerine paralel olarak teşvik edildiği; belli bir toksik konsantrasyonun üzerinde köklerdeki antosiyanin sentezinde düşüş görülmeye başlansa bile başta yaprak kını ve ilk yapraklar olmak üzere bütün bitki kısımlarındaki pigment miktarının kontrolün oldukça üzerinde değerlere sahip olduğu saptanmıştır (Tablo 4.14, Şekil 4.17). Yaprak kını incelenen bitki dokuları arasında en yüksek antosiyanin içeriğine sahip olan kısımlardır ve kontrol serisindeki fidelerin yaprak kınındaki antosiyanin içeriğinin köklerden yaklaşık 11.8 kat, ilk yapraklardan ise 3.9 kat fazla olduğu belirlenmiştir. En toksik konsantrasyon olan 1500  $\mu\text{M}$  Cu serisindeki fidelerin antosiyanin birikiminin kontrol ile kıyaslandığında yaklaşık olarak köklerde 1.5 kat, yaprak kınında 6.5 kat ve ilk yapraklarda 5.6 kat artış gösterdiği kaydedilmiştir (Tablo 4.14 ve Şekil 4.17). Halbworth ve diğ. (2003), *Zea mays* bitkisinde antosiyaninlerin biyokimyasal oluşumunu incelemiş ve bu bileşiklerin özellikle kök, mezokotil, koleoptil ve yaprak kınında birikim gösterdiğini saptamıştır.

Bu sonuçlar, antosiyaninlerin bakır uygulamalarıyla teşvik edildiğini ve bakırın neden olduğu zararlı etkilerin detoksifiye edilmesinde önemli rolleri olduğunu ortaya koymaktadır (Krupa, ve diğ., 1996; Kukkola ve diğ., 2000; Esparza ve diğ., 2005). Bogoeva (1998), bakır kirliliği gösteren topraklarda yetişen tahıl bitkilerinin pigment içeriğini incelediği çalışmasında da benzer bulgulara ulaşmıştır. Douglis ve diğ. (1997), mısır bitkisinin farklı kısımlarında antioksidan bileşiklerin birikim gösterdiğini belirtmektedir. Bakırın özellikle kök, mezokotil, koleoptil, yaprak kını ve ilk yapraklardaki antosiyanin birikimini arttırdığı morfolojik ve anatomik olarak da tespit edilmiştir (Şekil 4.33. a, b, c, d, Şekil 4.34. a, b, c, d, e, f, g, h). Elde edilen sonuçlar Dai ve diğ.'in (2006), kadmiyum uygulanmış *Azolla imbricata* bitkisinde yaptıkları çalışma ile de benzerlikler göstermektedir. Krupa ve diğ. (1996), yüksek bitkilerde antosiyaninlerin bir ağır metal indikatörü olabileceğini ileri sürmektedir. Benzer şekilde, Kukkola ve diğ. (2000), antosiyanin ve diğer fenolik bileşiklerin bakır ve nikel maruz kalmış bitkilerdeki stres göstergesi olduğunu belirtmektedir. Singh ve diğ. (1999) ile Steyn ve diğ. (2002), mısırın vejetatif dokularındaki antosiyanin pigmentasyonunun ışık başta olmak üzere çeşitli çevresel etkenlerle indüklendiğini belirtmektedir. Stapleton ve Walbot (1994), flavonoidlerin mısır bitkisinin DNA'sını ultraviyole radyasyonunun indüklediği zararlı etkilerden koruduğunu ileri sürmektedir. Stinzing ve diğ. (2002) ise, antosiyanin pigmentlerinin renkleri ile antioksidan özellikleri üzerinde durmaktadır. Antosiyaninlerin bitki hücrelerindeki reaktif oksijen radikallerinin toksik etkilerini azaltarak antioksidan bileşikler olarak da görev aldıkları bilinmektedir (Wang ve diğ., 1997; Gabrielska ve diğ., 1999). Flavonoidler ve antosiyaninlerin yapısal özelliklerinin antioksidan aktivitede önemli rolleri olduğu kanıtlanmıştır (Rice-Evans ve diğ., 1996; Rice-Evans ve diğ., 1997; Rice-Evans, 2001). Antosiyaninlerin antioksidan işlevlerinin, pigmentin yapısında bulunan B halkasındaki hidroksil gruplarının sayısına ve bunların halka üzerindeki bulunduğu yere bağlı olduğu bildirilmiştir (Rice-Evans ve diğ., 1996; Sarma ve Sharma, 1997; Esparza ve diğ., 2004). Gülçin ve diğ. (2005), *Perilla pankinensis* bitkisinden elde edilen total antosiyaninlerin;  $\alpha$ -tokoferol ve askorbat gibi standart antioksidan bileşiklerle karşılaştırıldığında çok daha güçlü redükleyici etkileri, serbest radikal temizleyici özellikleri ve metal kelatlama aktiviteleri olduğunu ileri sürmektedir. Antosiyaninlerin askorbik asit bileşiklerini oksidasyondan korurken; oluşan antosiyanin-DNA kopigmentasyonunun oksidan zararların engellenmesinde önemli rolleri olduğu rapor edilmiştir (Sarma ve diğ., 1997; Sarma ve Sharma, 1997).

Antosiyaninler ve taninlerin ağır metaller ile etkileşime girdiği (Esparza ve diğ., 2005) ve bitkilerin kendine özgü renklerinin oluşumunda özellikle  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+3}$  ve  $\text{Mg}^{+2}$  gibi metal iyonları ile güçlü bağlar kurarak gelişmiş yapılar oluşturduğu uzun zamandır bilinmesine karşın (Rice-Evans ve diğ., 1996; Elhabiri ve diğ., 1997; Sarma ve Sharma, 1997; Esparza ve diğ., 2004, 2005); bu pigmentlerin bitkilerin metal birikimi ve toleransındaki rolleri hakkındaki bilgiler oldukça kısıtlıdır (Krupa ve diğ., 1996; Kukkola ve diğ., 2000; Hale ve diğ., 2001). *Salvia* çiçeklerindeki mavi rengin antosiyaninlerin magnezyum iyonlarıyla oluşturdukları yapıya bağlı olarak elde edildiği; bakır uygulamaları sonucunda ise  $\text{Mg}^{+2}$  nin yerini  $\text{Cu}^{+2}$  iyonunun aldığı belirlenmiştir (Takeda ve diğ., 1994). Elhabiri ve diğ. (1997) ise sulu çözeltilerde antosiyanin-alüminyum-gallik asit oluşumunu tespit etmişlerdir. Antosiyanin içermeyen mutant *Brassica rapa* bitkileri ile yapılan bir çalışmada molibden (Mo) uygulamalarının mutant bitkilerde herhangi bir renk değişikliğine neden olmazken; yabani tip bitkilerin özellikle hipokotillerinin mavi renge dönüştüğü saptanmıştır (Hale ve diğ., 2001). Alınan enine kesitlerde Mo-antosiyanin etkileşimine bağlı renk değişiminin özellikle epidermis ve hipodermiste meydana geldiği belirlenerek antosiyaninlerin bu kısımlardaki hücrelerin vakuollerinde çözünür halde buldukları gözlemlenmiştir. Hale ve diğ. (2001), Mo-antosiyanin bileşiminin; bu iyonun vakuolde tutulmasını sağlayarak bitki hücrelerinin biyokimyasal işlevler açısından önemli olan diğer kısımlarından ayırdığını; bu işlemin hücrelerdeki metal toksisitesini azalttığını ve bitkinin büyüme gelişmesini kolaylaştırdığını ileri sürmektedir. Bu çalışmada, aşırı bakır uygulamalarına maruz bırakılmış mısır bitkisinin çeşitli kısımlarından alınan enine kesitlerde de antosiyaninlerin daha çok epidermal ve subepidermal hücrelerin vakuollerinde çözünmüş halde birikim gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.34.a, b, c, d, e, f, g, h). Elde edilen bulgular pek çok araştırmacının bu konudaki verileri ile benzerlik göstermektedir. Lidon ve Henriques (1998), bakır toksisitesinin azaltılmasında pirinç bitkisinin gövdesindeki vakuollerin rollerine dikkat çekmektedir. Heath ve diğ. (1997), *Thlaspi montanum* bitkisinde nikel elementinin özellikle yaprakların epidermisinde birikim gösterdiğini belirtmekte; Küpper ve diğ. (1999) ise, bir hiperakümülatör olan *Thlaspi caerulescens* bitkisinin yapraklarında çinko elementinin özellikle epidermal hücrelerin vakuollerinde yerleşim gösterdiğini bildirmektedir. *Nymphaeae* bitkisindeki kadmiyum birikiminin ise polimerize olmuş fenolik bileşiklerin kadmiyuma bağlanmasıyla meydana geldiği kanıtlanmıştır (Lavid ve diğ., 2001).

Antosiyaninlerin metal iyonları ile etkileşime girerek karmaşık yapılar oluşturduğu ve böylece bu iyonları kelatlayarak zararlı etkilerini ortadan kaldırdığı bildirilmiştir (Sarma ve diğ., 1997). *In vitro* yapılan deneyde meydana gelen metal-antosiyanin kompleksi üzerine askorbat eklendiğinde ise bu bileşiğin de yapıya katıldığı gözlemlenmiştir. Burada askorbatın bir tür ko-pigment olarak görev yaptığı ve metalle kelatlanmış antosiyanin bileşiği ile doğrudan etkileşime girdiği saptanmıştır (Sarma ve diğ., 1997; Sarma ve Sharma, 1997). Sonuç olarak antosiyaninlerin yapısal özelliklerinden dolayı kolaylıkla ortamdaki hidroksil iyonlarını bağladığı ve böylece askorbatın metale bağlı oksidasyonunu önlediği de ileri sürülmüştür (Sarma ve diğ., 1997). Bu çalışma antosiyaninlerin antioksidan ve ağır metal kelatlayıcı özelliklerinin bir arada gösterildiği oldukça ilginç sonuçlara sahiptir ve mısır bitkisinde bakır artışına paralel olarak birikimi teşvik edilen antosiyanin biyosentezini açıklar niteliktedir.

Flavonoidler; Fe, Cu ve Mo gibi metallerle güçlü bağlar oluşturarak bu toksik maddeleri hücrenin diğer kısımlarından izole etmekte ve böylece protein, lipit ve nukleik asitler gibi metabolik yönden aktif olan biyomoleküllerinin oksidasyonunu engellemektedir (Rice-Evans ve diğ., 1997; Hale ve diğ., 2001). Lazzé ve diğ. (2003), bir antosiyanidin bileşiği olan delfinidin; tert-bütül-hidroperoksite indüklediği lipit peroksidasyonu ve DNA sarmal yapısının bozulmasını etkili bir şekilde önlediğini saptamıştır. Delfinidin ve siyanidin bileşiklerinin askorbat ve  $\alpha$ -tokoferolden dört kat daha aktif oldukları da belirtilmektedir (Rice-Evans ve diğ., 1997). Serbest radikal temizleyici, hidrojen verici ve ağır metal kelatlayıcı özelliklerinin yanı sıra antosiyaninler; antimutajenik özellikleri ile bitkilerde olduğu kadar insan sağlığı için de büyük önem taşımaktadır (Gasirowski ve diğ., 1997). *Abies koreana* bitkisinin antosiyanince zengin kozalaklarından elde edilen ekstraktların; E vitamini eksik diyetle beslenen farelerdeki lipit peroksidasyonunun önlenmesi ve zarar görmüş DNA'nın onarımındaki koruyucu özellikleri saptanmıştır (Ramirez-Tortosa ve diğ., 2001). *Aronia melanocarpa* bitkisinin meyvelerinden izole edilen antosiyaninlerin ise *in vitro*da benzoaminopiren uygulanmış insan lenfosit kültüründeki hücrelerde görülen kromatit bozukluklarının meydana gelme sıklığını azalttığı da belirtilmektedir (Gasirowski ve diğ., 1997). Wang ve diğ. (1997), antosiyaninlerin oksijen radikallerini absorbe etme özellikleri olduğunu da ileri sürmektedir. Jovanovic ve diğ. (1997) ile Kähkönen ve Heinonen (2003) ise, flavonoidlerin indirgeyici etkileri ve antioksidan özelliklerine dikkat çekmektedir.



Tsuda ve diğ. (1996), *Phaseolus vulgaris* L. bitkisinden izole edilen antosiyanin pigmentlerinin aktif oksijen radikallerini temizleyici etkilerinin yanı sıra lipit peroksidasyonunu inhibe ettiklerini ileri sürmektedir. Nagata ve diğ. (2003), *Arabidopsis* bitkisinde aktif oksijen türlerinin düzeylerinin askorbik asit ve antosiyanin bileşiklerince kontrol altında tutulduğunu; Brown ve Kelly (2007) ise, antosiyaninler ve bunların fenolik yıkım ürünlerinin bitkilerdeki lipit peroksidasyonunu inhibe edici özelliklere sahip olduklarını ileri sürmektedir. Bu bileşiklerin aktif oksijen türlerini ya da lipit hidroperoksit radikallerini uzaklaştırma aktiviteleri *in vitro*da yapılan deneyler ile de kanıtlanmıştır (Gabrielska ve diğ., 1999; Bors ve diğ., 2001; Kim ve diğ., 2003). Hodges ve diğ. (1999), antosiyanin içeren bitki dokularında lipit peroksidasyonunu tayin ettiği çalışmasından elde ettiği bulgular bu verilerle paralellik göstermektedir. Gould ve diğ. (2002), kırmızı ve yeşil pigment içeren bitkilerle yaptıkları karşılaştırmalı bir çalışmada; aşırı miktarda oluşmuş H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bileşiğinin, antosiyanin içeren hücreler tarafından uzaklaştırılırken; aynı bitkinin yeşil pigment içeren hücrelerinde bunun yeteri kadar gerçekleştirilemediğini gözlemlemişlerdir. Buna göre, yaprakların kırmızı renkli bölgelerinden elde edilen ekstraktlar incelendiğinde bu kısımların antosiyaninler, flavonoller, dihidroflavonoller ve hidrosinamik asitlerce oldukça zengin olduğu saptanmış; ekstreler saflaştırıldığında ise bunlardan yalnızca antosiyaninlerin ortamdaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in uzaklaştırılmasında etkin rol aldığı tespit edilmiştir. Edreva ve diğ. (2002) ile Yağmur ve diğ. (2003) ise pamuk bitkisinin yapraklarındaki kırmızı renk oluşumunu 'antioksidan bileşik-ROS temizlenmesi' hipotezi ile açıklamışlardır. Edreva (2005), yapraklardaki kırmızı rengin bitkide sodyum iyonunun aşırı birikimi sonucunda üretilen yüksek konsantrasyonlardaki OH<sup>•</sup> radikalinin; antosiyaninlerin B halkasının hidroksilasyonuna neden olmasından kaynaklandığını ileri sürmektedir. O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radikalinin ise antosiyanin içeren yabancı tipteki *A. thaliana* bitkisinin hücrelerindeki indirgenme düzeyinin; antosiyanin içermeyen mutant tip *tt3* ve *ttg1* *A. thaliana* bitkisinden oldukça yüksek olduğu ortaya konmuştur (Nagata ve diğ., 2003). Benzer sonuçlar *Lactuca sativa* ile yapılan bir başka çalışma ile de desteklenmiştir (Neill ve Gould, 2003). Yapıları ve buldukları bitki kısımları antosiyaninlerden farklı olan ancak Centrospermeae familyasına ait *Beta vulgaris* L. (kırmızı pancar) gibi bitkilerin kırmızı renklerinden sorumlu olan betasiyaninlerin de antioksidan özelliklerinin olduğu ve zengin bir elektron vericisi olarak serbest oksijen türlerinin temizlenmesinde etkin rol aldıkları tespit edilmiştir (Escribano ve diğ. (1998).

Sarma ve diğ. (1997), antosiyaninlerin metal iyonlarını kelatlamasının yanı sıra askorbat-metal-antosiyanin yapıları oluşturarak hidroperoksil ve diğ. oksijen radikallerinin uzaklaştırılmasında etkin rol aldıklarını bildirmektedir. Bu durumda antosiyaninlerin; ROS bileşiklerinin temizlenmesinde ve metal iyonlarının kelatlanmasında diğ. antioksidan bileşiklerle birlikte görev yaparak etkili bir mekanizma oluşturdukları ileri sürülebilir. Bu verilerin ışığında, toksik metallerin zararlı etkilerinin azaltılmasında daha çok bazı kısa peptidler ile organik asitlerin rol aldığı bilinmesine karşın; antosiyanin ve diğ. fenolik bileşiklerin de bu amaçla metallerin vakuol gibi bazı özel hücre kısımlarında tutulması ve kelatlanmasındaki görevleri nedeniyle bitkilerin ağır metal direncinde iş gördüğü ileri sürülebilir. Ancak bu konu henüz tam olarak açığa kavuşmuş değildir ve ilgili alanda daha pek çok araştırmaya gereksinim duyulmaktadır.

Fenoliklerin diğ. bir antioksidan bileşik olan askorbat ile birlikte  $H_2O_2$ 'in yıkımında rol aldıkları (Yamasaki ve Grace, 1998; Sakihama ve diğ., 2000, 2002) ve böylece bitkiyi oksidan strese korudukları bildirilmiştir (Buettner, 1993; Çakmak, 1994). Yamamoto ve diğ. (1998), fenoliklerin kültüre alınmış tütün hücrelerini alüminyum toksisitesinden koruduklarını ileri sürmektedir. *Phyllanthus tenellus* bitkisinin yapraklarına sprey şeklinde bakır sülfat çözeltisi uygulandığında, sünger tabakasındaki vakuollerde yüksek konsantrasyonlarda antimikrobiyal fenolik birikimi saptandığı, bunun patojen infeksiyonu sonucunda indüklenen yanıt ile benzer olduğu bildirilmektedir (Santiago ve diğ., 2000). Ağır metal kirliliği bulunan ortamda yetiştirilen *Nymphaea* bitkisinin epidermal salgı hücrelerinde metallerle birlikte antibakteriyel özellikteki polifenoller de biriktirdiği ve aynı zamanda yüksek düzeyde peroksidaz aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Lavid ve diğ., 2001).

Hidroponik kültürde yetiştirilen 15 günlük mısır fidelerinin kök, yaprak kını ve ilk yapraklarındaki total fenolik içerikleri spektrofotometrik olarak Folin-Ciocalteu ayırıcı yöntemiyle belirlenmiş ve artan bakır konsantrasyonlarına paralel olarak sentezinin teşvik edildiği tespit edilmiştir. Kontrolde yaprak kını ve ilk yapraklar köklere göre sırasıyla yaklaşık 21.4 ve 34.2 kat fazla sekonder metabolit birikimine sahipken; bakır uygulamaları sonucunda her üç bitki kısmındaki total fenolik miktarlarının kontrolün oldukça üzerinde değerler ortaya koyduğu saptanmıştır (Tablo 4.15, Şekil 4.18).

50 ve 100  $\mu\text{M}$  Cu serisindeki fidelerin kök, yaprak kını ve ilk yapraklarındaki total fenolik bileşiklerin sentezindeki artışa rağmen elde edilen değerlerin kontrole yakın olduğu; 250 ve üzerindeki serilerde ise bunlara göre belirgin yükselmeler meydana geldiği belirlenmiştir. 1500  $\mu\text{M}$  Cu uygulanan mısır bitkisinin fenolik bileşik birikiminde kontrol ile karşılaştırıldığında köklerinde yaklaşık 8.3 kat, yaprak kınında 1.9 kat, ilk yapraklarda ise 1.7 kat artış olduğu kaydedilmiştir (Tablo 4.15, Şekil 4.18). Bu sonuçlara göre kontrol serilerindeki fidelerin yaprak kını ve ilk yapraklarındaki total fenolik içerikleri köklere göre belirgin bir şekilde fazla olmasına rağmen bakır uygulamalarına bağlı olarak en fazla artışın köklerde meydana geldiği tespit edilmiştir (Tablo 4.15, Şekil 4.18).

Yapılan histokimyasal deneylerde, fenolik bileşiklerin yaprakların özellikle sünger parenkiması hücrelerinde birikim gösterdiği belirlenmiştir. Tanin ve flavonoidlerin bitkilerde en yaygın bulunan fenolik bileşikler olduğu ve bunların abiyotik stres koşullarında bitkinin savunma sistemi olarak görev yaptığı bilinmektedir (Dixon ve Paiva, 1995; Chalker-Scott, 1999; Winkel-Shirley, 2002). Buna karşın, bu fenolik bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarının toksik ve hatta öldürücü özelliklere sahip olduğu ve bunun bitki dokularında mikrolezyonlar şeklinde ortaya çıktığı ileri sürülmektedir (Dixon ve Paiva, 1995). Bu çalışmada da aşırı bakır uygulanmış mısır fidelerinin köklerinden alınan enine kesitlerde öz tabakası, iletim sistemi ve korteks parenkiması hücrelerinde birikim gösteren kahverengi bileşiklerin (Şekil 4.30.a, b, c), oksitlenmiş fenolikler olabileceği düşünülebilir. Bakır uygulanmış bitkilerin köklerinde ksilem ve floemin hücre çeperlerinde bakırın kahverengi birikim halinde görüldüğü ileri sürülmektedir (Peng ve diğ., 2005). Nishizono (1987), kök hücre çeperinin *Athyrium yokoscence* bitkisindeki ağır metal toleransında oldukça önemli rollere sahip olduğunu bildirmiştir. Paivöke (1983) de bezelye fidelerinin köklerinde kurşun ve arsenat iyonlarının neden olduğu anatomik değişimleri incelediği çalışmasında benzer bulgular elde etmiştir. Liu ve Kottke'nin (2004), *Allium sativum* bitkisinin kök hücrelerindeki bakır birikiminin olduğu kısımları incelediği özel spektroskopik yöntemlerden elde ettiği veriler bu bulguları desteklemektedir. Dehon ve diğ., (2002), *Juglans nigra* bitkisinin odun kalbinde oluşan kahverengileşme olayında fenolik bileşiklerle birlikte peroksidaz izoenzimlerinin rol aldıklarını belirtmektedir. Nishikawa ve diğ. (2003), ağır metallerin *Chlamydomonas* alginde yapısal değişimleri indüklediğini ileri sürmektedir.

Bu sonuçlar, Hutzler ve diğ.'in (1998), lazer tarayıcı mikroskopta incelediği bitki dokularındaki fenolik bileşiklerin birikim gösterdiği kısımları tespit ettiği çalışmasındaki bilgiler ile benzerlikler göstermektedir. Matsumoto ve diğ. (1976), bezelye bitkisinin kökleri tarafından absorbe edilen alüminyumun hücredeki birikim yerini tespit ettiği çalışmasında bunların nukleik asitlere bağlandığını belirlemiştir. Sgherri ve diğ. (2007), aşırı bakır uygulanmış buğday bitkisinin kök hücrelerindeki aktif oksijen türlerin normalden daha erken ve fazla miktarda üretildiğini bildirmektedir. Wang ve diğ. (2004), *Brassica juncea* L. bitkisinin köklerinde bakırın indüklediği stres ve antioksidan yanıtlar ile ilgili araştırmasında benzer sonuçları elde etmiştir. Zhang ve diğ. (2001), meyve perikarplarında oksidasyona bağlı olarak meydana gelen kahverengi oluşumlarda antosiyanin yıkımının etkili olduğunu belirtmektedir. Jiang (2000), antosiyaninlerin meyve perikarpının kahverengileşmesinde polifenol oksidazlar ve fenoller ile birlikte rol aldıklarını bildirmektedir. Nishizono (1987), dirençli bitkilerin ağır metalleri hücre çeperlerinde immobilize ederek membrandan içeriye girişinin önlediğini belirtmektedir. Sekonder çeperlerdeki lignifikasyonun artışı metal iyonlarının bağlanarak tutulmasını sağlayan bir savunma yöntemi olarak bunu destekler niteliktedir. Fernandez ve diğ. (2002), yaptıkları elektrosprey iyonizasyonu kütle spektrokopisi (ESI-MS) çalışmasında demir ve bakırın flavonoidler tarafından bağlandığını belirlemişlerdir. Ağır metallerin kelatlanması radikal üretiminin engellenmesi ve dolayısıyla bunların hedefi olan biyomoleküllerin korunması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmalarda flavonoidlerin özellikle 4-okso grubu ile B halkasındaki 5-hidroksil gruplarının bakırın bağlanmasında etkin olduğu saptanmış ve bu doğal fenolik bileşiklerin kullanımının toksik özellikler de taşıyabilen diğer sentetik kelatlayıcılardan daha etkin ve yararlı olduğu da bildirilmiştir (Fernandez ve diğ., 2002).

Metal iyonlarının varlığında, fenolik bileşiklerin doğal yapısının bundan etkilendiği ve strese bağlı oluşan serbest radikaller tarafından oksitlenerek fenoksil radikallerinin meydana geldiği bildirilmiştir (Takahama ve Oniki, 1992; Yamasaki ve Grace, 1998). Bu durumda doğal antioksidan bileşikler olan fenolikler, aşırı metale maruz kalan bitkilerde prooksidan yapılara da dönüşebilmekte ve toksik özelliklere sahip olabilmektedir (Sakihama ve diğ., 2000, 2002; Takahama, 2004). Pourcel ve diğ. (2007), bitkilerde flavonoidlerin oksidasyonunun biyokimyasal özellikleri ile fizyolojik etkinliklerini saptadıkları çalışmalarında benzer verileri ileri sürmektedir.

Winkel-Shirley (1998) ise, fenilpropanoidlerin tohum ve tahıllardaki fizyolojik özellikleri ile tarımsal önemi üzerinde durarak fenolik bileşiklerin biyosentezlerinin genetiksel olarak incelenmesi gerektiğini ifade etmektedir. Son yıllarda flavonoidlerin antioksidan özellikleri ve bakır gibi geçiş elementlerinin bu bileşikler tarafından kelatlanma mekanzimaları oldukça dikkat çeken konular olarak bu konuda daha fazla araştırmaya gereksinim duyulmaktadır.

Fenolik bileşikler bitkilerde serbest radikallerin oluşumunun engellenmesi ve böylece hücrelerin zarar görmesinin önlenmesinde rol alan maddeler olarak kabul edilirler (Zielinski ve Kozłowska, 2000; Shetty, 2004; Soobrattee ve diğ., 2005; Treutter, 2006). Bors ve diğ. (2001), flavonoidlerin ve diğer polifenollerin yapısal özelliklerine dayanan güçlü antioksidan etkilere sahip olduklarını ileri sürmektedir. Fenoliklerin, serbest radikallerin detoksifikasyonu ve metal iyonlarının kelatlanmasındaki rolleri nedeniyle insan sağlığı için de koruyucu işlevlere sahip oldukları bildirilmiştir (Bors ve diğ., 1990; Jovanovic ve diğ., 1997; Yamamoto ve diğ., 1999; Takahama ve Oniki, 2000; Williams ve diğ., 2004). Polifenolik bileşiklerin antioksidan özelliklerinin; güçlü birer hidrojen ya da elektron vericisi olmaları, serbest oksijen türlerinin yapısında yer alan eşleşmemiş elektronların yerlerini değiştirme yetenekleri, radikal zincir tepkimelerini sonlandırıcı özellikleri ile geçiş metal iyonlarını kelatlayıcı etkilerinden kaynaklandığı bildirilmektedir (Rice-Evans, 1995; Rice-Evans ve diğ., 1996, 1997; Rice-Evans, 2001). Chimi ve diğ. (1991), bazı doğal fenolik antioksidanların hidroksil ve peroksil radikallerini uzaklaştırıcı ve zararlı etkilerini önleyici özelliklere sahip olduklarını belirtmektedir. Prakash ve diğ. (2007), *Allium cepa* bitkisindeki fenolik bileşiklerin antioksidan ve serbest radikal temizleyici özelliklerine dikkat çekmektedir. Ito ve diğ. (2005) ise, fenolik bileşiklerin antioksidan etkilerinin yanı sıra metal iyonlarının neden olduğu lipit peroksidasyonunun engellenmesinde de rol aldıklarını rapor etmiştir. Başka bir araştırmada ise fenoliklerin antioksidan yetenekleri ile lipit peroksidasyonu kinetiğini değiştirdikleri ve membran akışkanlığını azalttıkları saptanmıştır (Buettner, 1993; Tsuda ve diğ., 1996; Da Silva ve diğ., 1998; Hodges ve diğ., 1999; Ramirez-Tortosa ve diğ., 2001; Ito ve diğ., 2005). Terao ve Piskula (1997), flavonoidlerin lipit peroksidasyonunu baskıladığını ileri sürmektedir. Treutter (2006) ise, flavonoidlerin bitkilerin gelişim ve çeşitli savunma etkinliklerindeki önemine dikkat çekmektedir.

Flavonoidlerin tahılların çimlenme, büyüme, gelişim ve çeşitli savunma yanıtlarının oluşumunda önemli rolleri olduğu; mısırdaki *C1* lokusundaki genlerin alevron tabakasının ve embriyonun antosiyanin biyosentezinden sorumlu olduğu ve aynı zamanda dormansi, absisik asit ve protein sentezini düzenledikleri bildirilmiştir (Winkel-Shirley, 1998). Mısırdaki 3-hidroksiantosiyaninlerin bütün dokularda bulunabildiği ve fitoaleksinler olarak tanımlanan bu bileşiklerin bitkinin patojen organizmalara karşı savunmasında görev aldığı kaydedilmiştir (Halbwirth ve diğ., 2003). Härtling ve Schultz (1998) ise, fenolik bileşiklerin çevresel kirlenmenin erken tanısında kullanılan bir biyokimyasal belirteç olarak da görev aldıklarını bildirmektedir.

Ağır metal uygulamalarının çeşitli bitki türlerinde fenolik bileşiklerin birikiminde artışı teşvik ettiği bilinmesine karşın (Santiago ve diğ., 2000; Fernandez ve diğ., 2002; Ali ve diğ., 2006; Dai ve diğ., 2006; Ferreira ve diğ., 2007); bunların fenolik metabolizma üzerindeki etkileri henüz açığa kavuşmamıştır (Diaz ve diğ., 2001). Eugenol ve izoeugenol gibi fenolik bileşiklerin iki değerlikli bakır ( $\text{Cu}^{+2}$ ) bir değerlikli bakıra ( $\text{Cu}^{+1}$ ) indirgediği ve böylece ortamdaki  $\text{Cu}^{+2}$  konsantrasyonunu azaltarak düşük yoğunluklu lipidlerin (LDL) oksitlenmesini önlediği de bildirilmektedir (Ito ve diğ., 2005). Son ve Lewis (2002) ise bir başka fenolik bileşik olan kafeik asitlerin serbest radikallerin temizlenmesi ve antioksidan aktivitede yapısal özelliklerine bağlı olarak oldukça etkin olduklarını ileri sürmektedir. Benbelkacem (1996), tahıl bitkilerinin aşırı olumsuz koşullara sahip agroekolojik çevrelerdeki adaptasyonunu incelemiştir. Peng ve diğ. (2006), bakır toksisitesinin önlenmesinde antioksidan enzim sisteminin etkinliğinin arttığına dikkat çekmektedir. Bunlardan birisi olan fenilalanin amonyak liyaz (PAL) enzimi fenolik metabolizmada anahtar rol oynamaktadır (Dixon-Paiva, 1995).

Basit fenoller, antosiyaninler, flavonoidler ve ligninler gibi çeşitli fenilpropanoid ürünlerinin biyosentezini katalizlemesinin yanı sıra; bitkilerin savunma sisteminde önemli roller alan PAL enziminin (Dixon-Paiva, 1995; El-Shora ve diğ., 2002); tuzluluk, kuraklık, aşırı sıcaklık, radyasyon ve ağır metaller gibi çeşitli çevresel stres koşullarında aktivitesinin arttığı kaydedilmiştir (Saunders ve McClure, 1975; Dixon-Paiva, 1995; Dai ve diğ., 2006; Peng ve diğ., 2006). Aşırı bakır uygulamalarında da antosiyanin ve total fenolik bileşiklerin artışına paralel olarak PAL aktivitesinin de teşvik edildiği bildirilmektedir (Santiago ve diğ., 2000; Grene, 2002; Ito ve diğ., 2005).

Bu tez çalışmasında, kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  serilerine 7 gün boyunca maruz bırakılan 15 günlük mısır fidelerinin PAL enzimi aktiviteleri tespit edilmiş ve bakır konsantrasyonu artışının kök, yaprak kını ve ilk yapraklarındaki enzim aktivitelerini teşvik ettiği ortaya konmuştur (Tablo 4.16, Şekil 4.19). 500  $\mu\text{M}$ 'ın üzerindeki Cu serilerindeki fidelerin her üç kısmındaki PAL aktivitelerinin kontrole göre önemli artışlar gösterdiği kaydedilirken; 1500  $\mu\text{M}$  Cu çözeltilisine maruz bırakılan mısır fidelerinin kök, yaprak kını ve ilk yapraklarında sırasıyla yaklaşık %224, %69 ve %124 oranlarında yükselmelerin meydana geldiği saptanmıştır. Bu bulgulara göre, başlangıçta köklerle karşılaştırıldığında yaprak kınında 3 kat ilk yapraklarda ise yaklaşık 4 kat fazla PAL etkinliği olmasına rağmen, bakır uygulamalarına paralel olarak, köklerdeki enzim aktivitesinin diğer kısımlardakine göre daha hızlı teşvik edildiği ve kontrole göre % 224 artış gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 4.16, Şekil 4.19). Elde edilen sonuçlar, aşırı bakırın antosiyanin ve total fenolik bileşiklerin içeriğine paralel olarak PAL aktivitesini de belirgin bir şekilde teşvik ettiğini göstermektedir (Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19). El-Shora (2002), kabak bitkisinin kotiledonlarında PAL enziminin özelliklerini incelemiş ve benzer verilere ulaşmıştır. Santiago ve diğ. (2000), *Phyllanthus tenellus* Roxb. bitkisinde ağır metallerin abiyotik uyarıcılar olarak fenilpropanoid metabolizmasında yer alan PAL gibi çeşitli enzimleri aktive ettiklerini ve fenolik bileşiklerin sentezini indüklerini saptamışlardır. Dai ve diğ. (2006) ise kadmiyum uygulanmış *Azolla imbricata* bitkisinde antosiyanin ve fenolik bileşiklerin artmasına karşın PAL enziminde azalma kaydetmişlerdir. Bu durum, belli bir konsantrasyonun üzerindeki ağır metal uygulamalarının hücreler için toksik ve letal değerlere ulaşarak PAL ve diğer enzim aktivitelerinde inhibisyona neden olduğunu ortaya koymaktadır. Başak ve diğ. (2001) ise bakır, civa ve nikel maruz bırakılan *Camellia sinensis* bitkisinin yapraklarındaki PAL aktivitesinin arttığını bildirmektedir. PAL aktivitesine paralel olarak antosiyanin ve total fenolik düzeylerindeki artış çilek kültürleri ile yapılan diğer bir çalışma ile de desteklenmiştir (Jiang ve Joyce, 2003). Dai ve diğ. (2006) ise *Azolla imbricata* bitkisinin yüksek Cd uygulamaları sonucunda bazı kısımlarının kırmızı reneye dönüştüğünü ve bu durumun klorofil ve karotinoid içeriğindeki azalmanın yanı sıra antosiyanin içeriğindeki artıştan kaynaklandığını belirtmektedir. Sonuç olarak, Cu toksisitesinde, total fenolikler, antosiyaninler ve PAL enziminin hücre içi detoksifikasyon mekanizmalarında önemli roller aldıklarını ileri sürülmektedir (Santiago ve diğ., 2000; Başak ve diğ., 2001; Dai ve diğ., 2006).

Fenolik bileşikler ayrıca, lignan ve ligninlerin polimerizasyonunda ve hücrelerin büyümesi sırasında çeper yapısının sertleşmesinde rol almaktadır (Sato ve diğ., 1993; Chen ve diğ., 2002; Ali ve diğ., 2006). Metale bağlı olarak artan lignifikasyon mekanizmasında; antioksidan etkinliğin azaldığı, bunun sonucunda içsel  $H_2O_2$  birikiminin teşvik edildiği ve miktarı artan bu sinyal molekülünün lignin sentezinin artmasına bağlı olarak hücre çeperlerinde mekaniksel olarak sertleşmeye neden olduğu bildirilmektedir (Chen ve diğ., 2000; Santiago ve diğ., 2000; Shao ve diğ., 2005; Dai ve diğ., 2006; Gechev ve diğ., 2006). Milosevic ve Slusarenko (1996) ise, fasulyede aktif oksijen metabolizmasının lignifikasyonu teşvik ettiğini tespit etmiştir. Bitki fenollerini daha çok vakuollerde ve hücre çeperinde yerleşim göstermektedir ve lignin biyosentezi sırasında oluşan fenoksil radikallerinin tekrar indirgenmesi diğer bir antioksidan bileşik olan askorbat tarafından sağlanmaktadır (Sakihama ve diğ., 2000). Bakıra bağlı oksidan stresin neden olduğu zararların önlenmesi için bitkiler gelişmiş antioksidan savunma sistemine sahiptir (Mocquot ve diğ., 1996; Mazhoudi ve diğ., 1997).

Başlıca antioksidan enzimlerden olan SOD, CAT, APX, GuPX ve GR aktivitelerinin birbirlerine göre dengede bulunması; hücrelerdeki  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$ 'in kararlı düzeylerde tutularak zararlı etkilerinin önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Mitler, 2002; Halliwell, 2006). Metal iyonlarının hücrenin vakuol gibi belli kısımlarında tutulması ve dolayısıyla Haber-Weiss ya da Fenton tepkimeleri ile biyolojik sistemlerdeki bilinen en toksik radikal olan  $OH^\cdot$ 'in oluşumunun engellenmesi de bitkiler için yaşamsal bir değere sahiptir (Halliwell, 2006). ROS temizleyici enzimlerin çeşitli abiyotik ve biyotik stres koşullarında teşvik edildiği ve oksidan zararların önlenmesinde görev aldığı bilinmektedir (Halliwell, 2006; Mitler, 2006).

SOD, oksidan strese karşı geliştirilen antioksidan savunma yanıtlarından ilki olması nedeniyle, bu enzimin aktivitesindeki değişimler hücrelerdeki serbest oksijen türlerinin düzeyi hakkında bilgi sağlamaktadır (Bowler ve diğ., 1992; Fridovich, 1993). SOD aktivitesinin indüklenmesi, hücrede  $O_2^-$  radikalinin biriktiğinin bir göstergesi olmakla birlikte, bir başka oksijen bileşiği olan  $H_2O_2$  miktarının da arttığına bir kanıt sayılmaktadır (Liochev ve Fridovich, 2007). Bu durum SOD enziminin aşırı miktardaki  $O_2^-$  radikalini uzaklaştırarak bakır stresi altında bitkinin direncini arttırdığını ortaya koymaktadır (Lombardi ve Sebastiani, 1995; Li ve diğ., 2006; Tanyolac ve diğ., 2007).



Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  serileri uygulanan 15 günlük mısır fidelerinin çeşitli kısımlarındaki SOD aktiviteleri tayin edilmiş ve farklı bakır serilerindeki fidelerin kök, gövde ve yapraklarındaki enzim aktivitelerinde kontrole göre önemli artışların meydana geldiği; ancak belli bir konsantrasyondan sonra ilgili bitki kısmına göre bazı değişikliklerin ortaya çıktığı saptanmıştır (Tablo 4.17, Şekil 4.20). Köklerde 50, 100, 250 ve 500  $\mu\text{M}$  Cu serilerine kadar SOD aktivitesinin indüklendiği, en yüksek etkinliğin kontrole göre %269 artışla 500  $\mu\text{M}$  Cu serisinde meydana geldiği, bundan sonra bir miktar düşüş göstermesine rağmen 1000 ve 1500  $\mu\text{M}$  daki değerlerin, sırasıyla %144 ve %120 artışla, kontrolün üzerinde olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.17, Şekil 4.20). Gövdede bakır artışına paralel olarak SOD aktivitesinin teşvik edildiği, 250  $\mu\text{M}$  dan itibaren etkinliğinin daha da yükseldiği, 1500  $\mu\text{M}$  Cu daki değerlerin kontrolün yaklaşık 10 katına çıktığı kaydedilmiştir (Tablo 4.17, Şekil 4.20). Yapraklardaki SOD aktivitelerinde de önemli yükselmeler olduğu, en fazla etkinliğin %60 artışla 250  $\mu\text{M}$  Cu da gerçekleştiği, daha yüksek konsantrasyonlarda ise 500  $\mu\text{M}$  da %39, 1000  $\mu\text{M}$  da %54 ve 1500  $\mu\text{M}$  da %60 olmak üzere kontrole göre belirgin düşüşlerin meydana geldiği saptanmıştır (Tablo 4.17, Şekil 4.20). Elde edilen bu bulgular, Peng ve diğ.'in (2006), benzer bir çalışmada ileri sürdükleri veriler ile paralellik göstermektedir. Bowler ve diğ. (1992), bitkilerin stres etmenlerine karşı savunmasında SOD enziminin önemli rolleri olduğunu bildirmektedir. Luna ve diğ. (1994), bakır uygulanmış *Avena sativa* bitkisinde SOD aktivitesinin artarken; APX aktivitesinin azaldığını saptamıştır. Arsenik uygulanan erken gelişim evrelerindeki mısır fidelerinde de CAT ve SOD aktivitelerinin belirgin olarak arttığı kaydedilmiştir (Mylona ve diğ., 1998). Bu sonuçlara göre, SOD aktivitesindeki artış bakır stresi sonucunda oluşan serbest radikal üretiminin bir kanıtı sayılabilir (Fridovich, 1993). Bunun aksine, Chen ve diğ., (2000), SOD aktivitesinin bakır uygulamalarından etkilenmediğini ileri sürmektedir. Mazhoudi ve diğ. (1997) ise, 50  $\mu\text{M}$  Cu çözeltilisinde yetiştirilmiş domates bitkisinde SOD aktivitesinin azalırken; APX aktivitesinin teşvik edildiğini bildirmektedir. Aşırı bakırın SOD aktivitesinin inhibe olmasına yol açtığı da saptanmıştır (Fernandes ve Henriques, 1991). Weckx ve Clijsters (1996) ise benzer etkilerin fazla bakıra maruz bırakılmış fasulye bitkisinin MnSOD aktivitesinde ortaya çıktığını belirtmektedir. Bu sonuçlara göre CAT ve APX bakıra bağlı oksidan stres koşullarında koruyucu rol alırken, SOD bu durumdan fazla bir şekilde etkilenmemektedir. Weckx ve Clijsters (1996) ile Palma ve diğ.'in (2002) farklı çalışmalardan elde ettiği değerler de bu sonuçları destekler niteliktedir.

Bakırın SOD, CAT, APX, GuPX ve GR enzimlerinin aktivitelerini farklı şekillerde etkilediğine dair çalışmalar mevcuttur (Mocquot ve diğ., 1996; Weckx ve Clijsters, 1996; Devi ve Prasad, 1998; Li ve diğ., 2006; Tanyolaç ve diğ., 2007). Antioksidan enzimlerin bakır stresine karşı oluşturdukları yanıtların bu şekilde çok çeşitli olması bitki türlerinin serbest radikal üretiminin ve buna karşı geliştirdikleri savunma sisteminin farklılığına dayandırılmaktadır (Lombardi ve Sebastiani, 1995; Peng ve diğ., 2006). Metale bağlı oksidan stres sonucunda miktarı artan aktif oksijen türlerinden  $H_2O_2$ 'in yıkımını katalize ederek detoksifiye olmasında görev alan CAT; antioksidan metabolizmanın başlıca enzimlerden birisidir. Willekens ve diğ. (1997), bitkilerde CAT enziminin  $H_2O_2$ 'in yıkımının yanı sıra stres savunma sisteminin önemli bir bileşeni olduğunu da ifade etmektedir.

Bu çalışmada, kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu M$   $CuSO_4$  serileri uygulanan 15 günlük mısır fidelerinin kök, gövde ve yapraklarındaki CAT enzimi aktivitelerinin çözeltilerdeki bakır miktarı artışına göre azalma gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 4.18, Şekil 4.21). 50 ve 100  $\mu M$  Cu da her üç bitki kısmındaki enzim aktivitesinin azalmasına rağmen kontrole yakın sonuçlar verdiği; 250  $\mu M$  ve üzerindeki Cu uygulamalarında ise, enzim değerlerinin kontrolün oldukça altına indiği kaydedilmiştir. En toksik konsantrasyon olan 1500  $\mu M$  Cu serisindeki fidelerin CAT aktivitelerinin ise kontrole göre sırasıyla köklerde %81, gövdede %82.5, yapraklarda ise %62 oranında düşüşler gösterdiği saptanmıştır (Tablo 4.18, Şekil 4.21). Peng ve diğ. (2006), farklı konsantrasyonlarda Cu uygulanmış *Elsholtzia splendens* bitkisinin yapraklarındaki CAT aktivitesinin 50 ve 100  $\mu M$  Cu da düşüş gösterirken; 500  $\mu M$  da kontrole göre yaklaşık 6 kat artış olduğunu rapor etmiştir. Benzer şekilde, De Vos ve diğ. (1989) ile Weckx ve Clijsters (1996) toksik konsantrasyonlarda Cu uygulanan köklerdeki CAT aktivitesinde belirgin artışlar kaydetmişlerdir. Mazhoudi ve diğ. (1997), bakırın CAT ve APX aktivitelerinde bir değişime yol açmadığını ileri sürmektedir. Weckx ve Clijsters (1996) ise, artan CAT aktivitesinin hücrelerde  $H_2O_2$  miktarının azaldığının belirtisi olduğunu ve bu enzimin fasulye bitkisinde bakıra bağlı oksidan strese karşı önemli bir savunma görevi gördüğünü bildirmektedir. Buna karşın, Wang ve diğ. (2004), *Brassica juncea* bitkisinin köklerinde bakır konsantrasyonu arttıkça CAT aktivitesinde düşüşler meydana geldiğini saptamıştır.

Benzer şekilde, Scandalios (1994), endojen katalazın özellikle mitokondriyal bileşenleri oksidan zararlardan korurken hücrenin diğer kısımlarındaki  $H_2O_2$ 'in yıkımında yetersiz kaldığını kaydetmiştir. CAT aktivitesindeki azalışın ayrıca protein sentezinin inhibe olmasından kaynaklandığı da belirlenmiştir. Bu araştırmacılar, bakır stresi altında CAT aktivitesinde görülen belirgin düşüşlerin;  $H_2O_2$  miktarındaki artışa karşılık bitkinin bunların yıkımında yetersiz kaldığının bir göstergesi olduğunu ve bu durumda diğer önemli antioksidan izoenzimleri olan APX ve GuPX ile güçlü indirgeyici bileşikler olan askorbat ve glutatyonun  $H_2O_2$ 'in yıkımında görev aldığını belirtmektedir.

Çeşitli çevresel stres koşullarında aktiviteleri artan ve bitki hücrelerinde etkili birer savunma sistemi şeklinde görev yapan peroksidazlar (POD); genellikle stres enzimleri olarak da kabul edilmektedir (Fang ve Kao, 2000). Bunlardan, askorbat peroksidazlar (APX); glutatyon peroksidaz enzimi (GPX) ile birlikte askorbat-glutatyon çemberinde yer almakta ve başta kloroplastlar olmak üzere diğer organellerde bulunan  $H_2O_2$ 'in temizlenmesinde iş görmektedir (Klapheck ve diğ., 1990; Çakmak ve diğ., 1993; Çakmak, 1994; De Gara ve diğ., 1996; Laloue ve diğ., 1997). Sitosol, hücre çeperi ve vakuolde bulunan guaiakol peroksidazlar (GuPX) ise; bu kısımlardaki  $H_2O_2$ 'in uzaklaştırılmasında fenolik bileşikler ile birlikte rol almaktadır (Sanchez ve diğ., 1995; Morales ve Barcelo, 1997; Chen ve diğ., 2000; Bishop, 2002; Chen ve diğ., 2002; Lepeduš ve diğ., 2004). APX ve GuPX aktivitelerindeki değişimler; bakırın indüklediği oksidan stres sonucunda oluşan  $H_2O_2$ 'in detoksifikasyonunda önemli ölçütlerden biri olarak kabul edilmektedir (Çakmak, 1994; Diaz ve diğ., 2001; Chen ve diğ., 2002).

Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu M$   $CuSO_4$  çözeltileri uygulanan 15 günlük mısır fidelerinin kök, gövde ve yapraklarındaki APX enzim aktivitelerinin bakır konsantrasyonu ve incelenen bitki kısmına göre değişimler gösterdiği saptanmıştır (Tablo 4.19, Şekil 4.22). Elde edilen bulgulara göre, kontrolde en yüksek enzim etkinliğinin köklerde meydana gelirken; bunu yaprakların takip ettiği, en düşük aktivitenin ise gövdede olduğu ortaya konmuştur. Köklerde, Cu konsantrasyonu artışının APX aktivitesini indirgediği; 50 ve 100  $\mu M$  da kontrole yakın değerler verirken; toksik konsantrasyonlarda düşüşün hızlandığı ve 1500  $\mu M$  Cu serisindeki fidelerin köklerindeki APX aktivitesinin kontrole göre %83.5 lik bir azalma gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 4.19, Şekil 4.22).

Gövdede, 50 ve 100  $\mu\text{M}$  Cu daki APX düzeylerinde bazı yükselmelerin olduğu kaydedilirken; en yüksek aktivitenin % 32.6 lık artışla 100  $\mu\text{M}$  da meydana geldiği saptanmıştır. 250 ve 500  $\mu\text{M}$  da bir miktar düşüş olmasına rağmen, elde edilen değerlerin kontrole yakın olduğu gözlenmiştir. 1000 ve 1500  $\mu\text{M}$  da ise APX aktivitesinin kontrolün yaklaşık yarısı kadar indirgenme gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 4.19, Şekil 4.22). Yapraklarda bakır konsantrasyonu artışının bütün serilerdeki APX aktivitesinde azalmalara neden olduğu; 50  $\mu\text{M}$  da kontrole yakın sonuçlar ortaya çıkarken daha üstündeki değerlerde önemli düşüşlerin meydana geldiği belirlenmiştir. 1500  $\mu\text{M}$  da yapraklardaki APX enzimi aktivitesinin kontrol ile kıyaslandığında %79.3 oranında gerilediği saptanmıştır (Tablo 4.19, Şekil 4.22). Buna göre, 50 ve 100  $\mu\text{M}$  Cu uygulamaları APX aktivitelerinde, köklerde kontrole yakın değerler veririrken; gövdede bir miktar yükselmelere yol açmış; yapraklarda ise önemli bir düşüşe neden olmamıştır (Tablo 4.19, Şekil 4.22). Toksik konsantrasyonlarda ise her üç bitki kısmında da APX aktivitelerinin belirgin indirgenmeler gösterdiği izlenmektedir (Tablo 4.19, Şekil 4.22). Bu sonuçlar pek çok araştırmacının yaptığı benzer çalışmalar ile de desteklenmektedir (Luna ve diğ., 1994; Mocquot ve diğ., 1996; Mazhoudi ve diğ., 1997). Bakır uygulanmış *Avena sativa* bitkisinde APX aktivitesinin azaldığı rapor edilmiştir (Luna ve diğ., 1994). Mazhoudi ve diğ. (1997) ise, 50  $\mu\text{M}$  Cu uygulanmış domates bitkisinde APX aktivitesinin teşvik edildiğini bildirmektedir. Çakmak ve Horst (1991), alüminyumun soya fasulyesinin kök uçlarındaki lipit peroksidasyonu ve POD aktiviteleri üzerindeki etkilerini tespit etmiş ve benzer bulgulara ulaşmışlardır. Bunun aksine, Wang ve diğ. (2004), Cu uygulamalarının APX aktivitesinde belirgin artışlara neden olduğunu bildirmektedir. Peng ve diğ. (2006) ise, 500  $\mu\text{M}$  Cu da APX ve GuPX aktivitelerinin kontrole göre sırasıyla %300 ve %170 arttığını saptamıştır. Van Assche ve Clijsters (1990), peroksidaz aktivitesindeki artışın ağır metal toksisitesine karşı geliştirilen hücresel savunma sisteminde anahtar rol oynadığını ileri sürmektedir. Peroksidaz aktivitesinin pek çok bitki türündeki bakır (Mocquot ve diğ., 1996; Mazhoudi ve diğ., 1997) ve çinko (Weckx ve Clijsters, 1997) düzeylerindeki artış ile paralellik gösterdiği kanıtlanmıştır. Sonuç olarak; askorbat-glutasyon döngüsünün önemli enzimleri olan APX, GPX ve GuPX (Noctor ve Foyer, 1998), bitkilerin strese direncinde kilit rollere sahiptir ve bakır uygulamalarına bağlı olarak çeşitli değişimler göstermektedir. Bunlardan bir diğeri olan GuPX enziminin de bitkilerin ağır metallere karşı savunmasında önemli fizyolojik ve antioksidan işlevleri bulunmaktadır.

GuPX aktivitesinin indüksiyonu yüksek bitkilerde aşırı metal miktarlarına karşı geliştirilen önemli yanıtlardan birisidir (Diaz ve diğ., 2001; Chen ve diğ., 2002) ve APX enzimi ile birlikte hücrelerdeki  $H_2O_2$ 'in temizlenmesinde rol aldıkları bilinmektedir (Çakmak ve diğ., 1994; Lepeduš ve diğ., 2004). Bakıra dirençli bitki türlerinde GuPX aktivitesinin bitkinin kendini oksidan stresten korumasını sağlayacak ölçüde arttığı (Yamasaki ve diğ., 1997; Bishop, 2002), buna karşın ağır metallere duyarlı bitkilerde bu yüksek aktivitenin görülmediği (Weckx ve Clijsters, 1996) ileri sürülmektedir.

Farklı miktarlardaki bakır uygulamalarına maruz bırakılan 15 günlük mısır bitkisinin çeşitli kısımları incelendiğinde; artan Cu konsantrasyonlarının kök, gövde ve yapraklardaki GuPX aktivitelerini belirgin bir şekilde indüklediği görülmektedir (Tablo 4.20, Şekil 4.23). 50, 100, 250, 500, 1000 ve 1500  $\mu M$  Cu içeren besi çözeltilerinde yetiştirilen fidelerin köklerindeki GuPX aktivitelerinin kontrole göre sırasıyla %26, %91, %111, %146, %181 ve %207 düzeylerinde artış gösterdiği saptanırken; gövde kısımlarındaki enzim aktivitelerinde sırasıyla %6.5, %52, %176, %241, %276 ve %317 lik yükselmelerin meydana geldiği belirlenmiştir (Tablo 4.20, Şekil 4.23). Yapraklarda ise artan Cu konsantrasyonlarına bağlı olarak GuPX aktivitelerinin kontrol ile karşılaştırıldığında sırasıyla %7.7, %44, %83, %90, %97 ve %111 oranlarında teşvik edildiği açığa çıkarılmıştır (Tablo 4.20, Şekil 4.23). İncelenen bitki kısımları arasında kontrolde en yüksek GuPX aktivitesinin yapraklarda bulunmasına karşın; bakır uygulamaları sonucunda en fazla enzim etkinliğinin, %317 lik artışla gövdede meydana geldiği ve bunu %207 ile köklerin, %111 lik yükselme ile de yaprakların izlediği tespit edilmiştir (Tablo 4.20, Şekil 4.23). Bu bulgular, başta ağır metaller olmak üzere çeşitli stres etmenlerine maruz kalmış diğer bitkilerle yapılan çalışmalarla da desteklenmektedir. Jouili ve El Ferjani (2003), bakıra maruz kalan ayçiçeğinin köklerinde GuPX aktivitelerinin teşvik edildiğini saptamışlardır. Benzer sonuçlar, Mazhoudi ve diğ. (1997) ile Chen ve diğ. (2002) tarafından da gösterilmiştir. Bishop (2002), buğday yaprak kınında strese bağlı vakuolar peroksidaz gen ekspresyonunun arttığını belirtmektedir. Chen ve diğ. (2002), *Raphanus sativus* bitkisinde bakırın peroksidaz aktivitesini teşvik ederek lignin içeriğinde önemli artışlara neden olduğunu kaydetmiştir. Sanchez ve diğ. (1995) ise, hipokotil büyümesinde hücre çeperine bağlı peroksidaz aktivitesindeki değişimlerin arttığını rapor etmiştir.

Peroksidaz aktivitesinin uyarılması ile ağır metallerin hücre çeperi ya da vakuoldeki birikiminin teşvik edildiği, ancak bu durumun büyümenin inhibisyonu gibi bazı sekonder etkilere de sebep olabildiği belirtilmektedir (Sato ve diğ., 1993; Olmos ve diğ., 1997; Diaz ve diğ., 2001). POD izoenzimlerinin; lignifikasyon, hücre çeperi polisakaritlerinin çapraz bağlanması, indol-3-asetik asitin ve fenollerin oksidasyonu ile hücre uzamasının düzenlenmesi gibi büyümenin indirgenmesi ile ilgili pek çok olayda fizyolojik rollere sahip oldukları bilinmektedir (Fielding ve Hall, 1978; Bunkelmann ve Trelease, 1996; De Gara ve diğ., 1996; Laloue ve diğ., 1997; Morales ve Barcelo, 1997; Fang ve Kao, 2000; Chen ve diğ., 2002). POD enziminin hücre çeperindeki lignifikasyonu teşvik etmesinin; kök ve gövde büyümesindeki düşüş ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Diaz ve diğ., 2001; Dehon ve diğ., 2002). Buna göre, GuPX aktivitesindeki artışın kök ve gövde uzaması ve taze kuru ağırlık gibi büyüme olaylarında gerilemeye neden olduğu ileri sürülmektedir (Lepeduš ve diğ., 2004). Sonuç olarak, APX ve GuPX enzimlerinin lignin sentezini arttırarak çeperin plastisitesini azalttıkları ve böylece hücre uzamasını yavaşlatarak stres koşullarında bitkiye mekaniksel destek sağladıkları ileri sürülmektedir (Sanchez ve diğ., 1995).

Elde edilen bu verilerin ışığında; toksik konsantrasyonlardaki bakır serilerine maruz bırakılmış mısır fidelerinin kök ve gövde uzunluğundaki azalışın; artan GuPX aktivitesine bağlı olarak özellikle kök hücre çeperlerindeki lignin birikiminden kaynaklandığı ileri sürülebilir. Bu sonuçlar ilgili kısımlardan alınan enine kesitlerin elektron mikroskopu fotoğrafları ile de desteklenmektedir (Şekil 4.36). Bu şekiller incelendiğinde özellikle kök hücre çeperlerinin oldukça kalınlaşmış olduğu ve bol miktarda lignin içerdiği görülmektedir. Bakır stresine bağlı olarak artış gösteren  $H_2O_2$  ve diğer oksijen türlerinin düzeyleri de bu hipotezi kanıtlar niteliktedir. Buna göre,  $OH^\cdot$  gibi serbest radikal bileşiklerinin güçlü oksidan etkileri ile polisakarit yıkımını teşvik ettiği; böylece hücre çeperinin gevşemesini sağladığı;  $H_2O_2$ 'e bağlı peroksidaz aktivitesinin artmasının ise çeperin yapısında yer alan hemiseluloz, pektinler ve monolignoller ile yapısal proteinler olan ekstensinler arasındaki kovalent çapraz bağların oluşumunu desteklediği kaydedilmiştir (Nishizono, 1987; Morales ve Barcelo, 1997; Chen ve diğ., 2000). Ayrıca,  $OH^\cdot$ 'in;  $Ca^{+2}$  kanallarının hiperpolarizasyonunu aktive ettiği ve böylece kök tüyü oluşumu sırasında hücre büyümesinden sorumlu olduğu ileri sürülmektedir (Peng ve diğ., 2006; Sgherri ve diğ., 2007).

$H_2O_2$ 'in hücrelerde bir sinyal molekülü olarak da iş gördüğü (Chen ve diğ., 2000, 2002; Shao ve diğ., 2005) ve çeperlerde sekonder kalınlaşmanın artması ile lignin birikiminin teşvikinde peroksidaz izoenzimleri ile birlikte rol aldıkları (Sato ve diğ., 1993; Diaz ve diğ., 2001; Dehon ve diğ., 2002) ileri sürülmektedir. Diaz ve diğ. (2001), biber bitkisinde bakır stresinin lignifikasyonu teşvik ederek şikimat dehidrogenaz ve peroksidaz enzimlerinin aktivitesini arttırdığını saptamıştır. Gülen ve Eriş (2004) ise, GuPX aktivitesindeki değişimlerin bitkilerde serbest oksijen radikallerine karşı geliştirilen önemli bir antioksidan yanıt olduğunu ileri sürmektedir.

Oksidan stres sonucunda, GuPX aktivitesinin indüklenmesi bitkilerde görülen tipik bir antioksidan tepkimedir (Diaz ve diğ., 2001; Lepeduš ve diğ., 2004). Vakuolde depo edilen fenolik bileşikler; burada bulunan ya da stres koşullarında miktarı artarak hücrenin diğer kısımlarından difüzyonla vakuole taşınan  $H_2O_2$ 'in detoksifikasyonunda elektron vericileri olarak GuPX enzimi ile birlikte görev yapmaktadırlar (Yamasaki ve diğ., 1997; Takahama ve Oniki, 2000; Takahama, 2004). GuPX enziminin elektron vericisi olarak fenolik bileşikleri askorbata tercih ettiği de bildirilmiştir (Yamasaki ve diğ., 1997; Takahama ve Oniki, 2000; Takahama, 2004).

GuPX aktivitesindeki artış, çeşitli stres etmenlerine karşı ilk olarak gelişen bir yanıt olmasının yanı sıra; kök, gövde ve yapraklardaki fenolik bileşiklerin sentezini de teşvik etmektedir (Takahama ve Oniki, 1992; Takahama, 1994; Yamasaki ve diğ., 1997; Ali ve diğ., 2006; Brown ve Kelly, 2007). Bu duruma göre, GuPX enzimi ve antosiyaninlerin strese bağlı zararların önlenmesinde birlikte çalıştığı ileri sürülebilir (Yamasaki ve diğ., 1997; Chalker-Scott, 1999; Winkel-Shirley, 2002; Wang ve diğ., 2004; Brown ve Kelly, 2007). GuPX aktivitesindeki artış, antosiyaninler ve fenolik maddelerin birikimi ile paralellik göstermektedir (Wang ve diğ., 2004). Bu çalışmada da artan konsantrasyonlardaki bakır uygulamalarının; mısır bitkisinin kök, gövde ve yapraklarında aşırı miktarlarda  $H_2O_2$  üretimine neden olduğu (Tablo 4.9, Şekil 4.12) saptanmıştır. İlgili bitkinin kök, yaprak kını ve ilk yapraklarındaki antosiyanin (Tablo 4.14, Şekil 4.17) ve total fenolik bileşiklerin içeriklerinde (Tablo 4.15, Şekil 4.18) artışlar meydana gelirken; kök, gövde ve yapraklardaki GuPX enzimi aktivitelerinin de (Tablo 4.20, Şekil 4.23) teşvik edildiği belirlenmiştir.

Elde edilen bu sonuçlar, çeşitli stres koşullarında miktarı artan  $H_2O_2$ 'in uzaklaştırılması için CAT, APX ve mevcut diğer antioksidan sistemin yetersiz kaldığı durumlarda, peroksidazların glutatyon ya da fenolik bileşikleri de substrat olarak kullanabileceğini göstermektedir. Bakır konsantrasyonu ve uygulama süresi arttıkça yüksek düzeylerde üretilen  $H_2O_2$ ; difüzyonla başta hücre çeperleri ve vakuol olmak üzere hücrenin diğer kısımlarına taşınmaktadır. Vakuolde lokalize olan fenolik bileşiklerin burada bulunan GuPX enziminin elektron vericisi olarak rol aldıkları ve  $H_2O_2$ 'in detoksifikasyonunda birlikte çalıştıkları ileri sürülmektedir (Yamasaki ve diğ., 1997). Mısırdaki flavonoidlerin vakuole taşınmasını sağlayan genin eksik olduğu *bronze-2* mutantları kullanılarak; flavonoidlerin aşırı  $H_2O_2$ 'i detoksifiye etmek üzere peroksidazlarla birlikte çalışma mekanizmasının açıklığa kavuşturulabileceği ileri sürülmektedir (Winkel-Shirley, 1998). Olmos ve diğ. (1997) de yaptıkları çalışmada peroksidaz izoenzimlerinin hücre içi yerleşimlerinin oksidan stresin önlenmesindeki rollerini ortaya koymuştur. *Mahonia repens* bitkisinde de aşırı ışığın neden olduğu fotoinhibisyonun engellenmesinde ise fenolik bileşiklerden birisi olan klorojenik asitin; hidrojen verici özellikleri ile ROS'in temizlenmesi ve oksidan stresin etkilerinin azaltılmasında, GuPX için en uygun substrat olduğu saptanmıştır (Grace ve Logan, 2000).

Bitkilerde aşırı bakırın neden olduğu fizyolojik, biyokimyasal ve yapısal etkiler ile ilgili bu bulgular Fernandes ve Henriques'in (1991) araştırmalarından elde edilen veriler ile benzer yönler taşımaktadır. Elde edilen bu sonuçlar, serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmasını sağlamak üzere bitkilerdeki antioksidan savunma sisteminin aktivitesini arttırarak bakıra karşı direnci arttırdığını ortaya koymaktadır. Antioksidan aktivitede rol alan bir diğer önemli enzim ise glutatyon redüktaz (GR) dır.

GR; başta  $H_2O_2$  olmak üzere aktif oksijen türlerinin detoksifikasyonunda diğer antioksidan bileşik ve enzimlerle birlikte görev almaktadır. Bu işlemler sırasında okside olan glutatyonun (GSSG), redüklenmiş glutatyon (GSH) indirgenmesini NADPH'a bağlı olarak katalize eden GR enzimi; askorbat-glutatyon çemberinin önemli bir bileşenidir. Bu şekilde GR; GSH/GSSG oranının yüksek tutulmasını sağlayarak başta kloroplastlar olmak üzere hücre ve organellerin oksidan stresin zararlı etkilerinden korunmasında önemli rol oynamaktadır (Foyer ve Halliwell, 1976; Noctor ve Foyer, 1998; Asada, 2006; Halliwell, 2006).



Kontrol ve 50, 100, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  serilerine maruz bırakılan 15 günlük mısır fidelerinin kök, gövde ve yapraklarındaki GR enzimi aktiviteleri tayin edilmiş ve artan Cu miktarlarına bağlı olarak ilgili bitki kısımlarındaki GR aktivitelerinin farklı şekillerde etkilendiği ortaya konulmuştur (Tablo 4.21, Şekil 4.24).

Buna göre, Cu uygulamalarının kök ve yapraklardaki GR aktivitelerinde belirgin düşümlere yol açarken; bunun aksine gövdede kontrole göre önemli yükselmelere neden olduğu kaydedilmiştir. En toksik konsantrasyon olan 1500  $\mu\text{M}$  daki fidelerin GR aktivitelerinde kontrol ile kıyaslandığında köklerde %80 azalma görülürken; gövdede %71 lik artış; yapraklarda ise %69 oranında düşüş meydana geldiği saptanmıştır (Tablo 4.21, Şekil 4.24). Bu bulgular, Zhang ve diğ.'in (2007) yaptığı benzer bir çalışmadan elde edilen verilerle desteklenmekte olup; GR aktivitesinde tespit edilen bu indirgenmeler kök ve yaprakların bakır toksisitesine bağlı oksidan stres sonucunda gördükleri zararın bir kanıtı olmaktadır.

Bazı araştırmacılar ise, bakır uygulanan fidelerin kök, gövde ve yapraklarındaki GR aktivitesinin belirgin bir şekilde arttığını bildirmektedir (Peng ve diğ., 2006; Tanyolaç ve diğ., 2007). Bu sonuçlar Baccouch ve diğ.'in (1998), nikel uygulanmış mısır fideleri ile yaptıkları çalışma ile de benzerlikler göstermektedir. Buna göre, artan GR aktivitesi hücre içi  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in kontrolünde önemli rol oynamaktadır ve bitkinin antioksidan etkinliğinin bir göstergesi olarak ifade edilmektedir. Peng ve diğ. (2006), 50  $\mu\text{M}$  Cu daki bitkilerin yapraklarındaki yüksek GSH içeriğine paralel olarak GR aktivitesinin de arttığına dikkat çekmektedir. Gallego ve diğ. (1996) ise, kadmiyuma maruz bırakılmış ayçiçeği fidelerinde hem GSH hem de GR aktivitesinin düşüş gösterdiğini tespit etmiştir. Bu bulgular, çeşitli bakır serilerinde yetiştirilmiş mısır bitkisi ile yapılan bu çalışmadaki verileri desteklemektedir.

Bu tez çalışmasından elde edilen bulguların, mısırın bakır stresi altındaki çimlenme, büyüme, oransal su içeriği ve elektrolit sızması gibi fizyolojik yanıtlarının yanı sıra; lipid peroksidasyonu,  $\text{H}_2\text{O}_2$  içeriği, prolin, protein, askorbat ve glutatyon sentezi, pigment birikimi ile çeşitli antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki biyokimyasal değişimlerin tespit edilmesine ve bunların birbirleri ile olan ilişkilerinin saptanmasına katkı sağlaması amaçlanmıştır.

Artan konsantrasyonlarda bakıra maruz bırakılan mısır bitkisinin çimlenme ve büyüme gibi fizyolojik aktivitelerinde 50 ve 100  $\mu\text{M}$  Cu uygulamalarının önemli gerilemelere neden olmadığı saptanmıştır. İlgili konsantrasyonların pek çok kültür bitkisi için toksik hatta letal etkilere sahip olduğu düşünüldüğünde; mısırın bakıra dirençli bir bitki olduğu ileri sürülmüş ve günümüzde çevrenin temizlenmesinde oldukça ilgi gören fitoremediyasyon çalışmalarında kullanılması hedeflenmiştir.

Yapılan biyokimyasal deneyler sonucunda artan bakır uygulamalarının mısırın çeşitli kısımlarındaki enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan aktivitelerinde artışa neden olduğu saptanmıştır. Elde edilen bulgular bu bitkinin oldukça yüksek antioksidan özelliklere sahip olduğunu kanıtlamaktadır. Bu verilerin ışığında mısırdaki antioksidan metabolizmanın daha ileri analizler kullanılarak tespit edilmesi; böylece literatürde bu konu ile ilgili açığın kapatılması ve yapılacak olan diğer araştırmalar için bu çalışmanın bir temel oluşturması amaçlanmıştır.

Mısırdaki bakır stresi sonucunda indüklenen sekonder metabolizma bu tez çalışmasının en özgün kısmını oluşturmaktadır. Antosiyaninler ve fenolik bileşiklerin antioksidan ve antiradikal etkilerinin yanı sıra ağır metalleri kelatlayıcı özellikleri mısır bitkisinde ilk defa incelenmiştir. Bu konudaki mevcut araştırmaların azlığı da dikkate alındığında; ilgili verilerin bu alandaki bilgilere katkı sağlaması ve yeni incelemelerin yapılmasına yön vermesi ümit edilmektedir.

Elde edilen anatomik bulgularda ise, aşırı bakırın mısır bitkisinin çeşitli kısımlarında neden olduğu yapısal değişimler ve oksidan stresin neden olduğu kahverengi madde birikimi ile lignin sentezinin artışı gibi bazı oluşumlar özellikle dikkat çekmektedir.

Bu sonuçlar, mısır bitkisinin yüksek miktarlardaki bakır iyonlarını biriktirme özelliğinde olup; bitkide strese bağlı olarak oluşan fizyolojik, biyokimyasal ve yapısal zararları sahip olduğu güçlü antioksidan sistem tarafından etkisiz hale getirebilme yeteneğinde olduğunu ortaya koymaktadır.

## KAYNAKLAR

ADHIKARI, D.P., FRANCIS, J.A., SCHUTZKI, R.E., CHANDRA, A. ve NAIR, M.G., 2005, Quantification and characterization of cyclooxygenase and lipid peroxidation inhibitory anthocyanins in fruits of *Amelanchier*, *Photochemical Analysis*, 16, 175-180.

AFANAS'EV, I.B., 1989, *Superoxide Ion: Chemistry and Biological Implications*, CRC Press, Boca Raton FL, 084935451X.

AGRAWAL, S.B. ve AGRAWAL, M., 1999, *Environmental Pollution and Plant Responses*, CRC Press, Boca Raton FL, 1566703417.

AGUIAR, A. ve FERRAZ, A., 2007, Fe<sup>3+</sup>- and Cu<sup>2+</sup>- reduction by phenol derivatives associated with Azure B degradation in Fenton-like reactions, *Chemosphere*, 66 (5), 947-954.

AHSAN, N., LEE, D.-G., LEE, S.-H., KANG, K.Y., LEE, J.J., KIM, P.J., YOON, J.-S. ve LEE, B.-H., 2007, Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds, *Chemosphere*, 67, 1182-1193.

AKKUŞ İ., 1995, Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, *Mimosa Yayınları*, 38 (5), 42-45.

ALIA, P. ve SARADHI, P., 1991, Proline accumulation under heavy metal stress, *J. Plant Physiol.*, 138, 554-558.

ALI, G., SRIVASTAVA, P.S. ve IQBAL, M., 1998, Morphogenic response and proline content in *Bacopa monniera* culture grown under copper stress, *Plant Sci.*, 138, 191-195.

ALI, M.B., SINGH, N., SHOHAEL, A.M., HAHN, E.J. ve PAEK, K.-Y., 2006, Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress, *Plant Sci.*, 171 (1), 147-154.

ALSCHER, R.G., DONAHUE, J.L. ve CRAMER, C.L., 1997, Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells, *Physiol. Plant.*, 100, 224-233.

AN, Y.-J., KIM, Y.-M., KWON, T.-I. ve JEONG, S.-W., 2004, Combined effect of copper, cadmium, and lead upon *Cucumis sativus* growth and bioaccumulation, *Science of The Total Environment*, 326 (1-3), 85-93.

APEL, K., 2004, Singlet oxygen and the activation of genetically controlled stress programs in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol.*, 45, 1–11.

APEL, K. ve HIRT, H., 2004, Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction, *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.

ARNON, D.I., 1949, Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, *Plant Physiol.*, 24, 1-4.

ARRIGONI O., DE GARA L., TOMMASI F., LISO R., 1992, Changes in the ascorbate system during seed development of *Vicia faba* L., *Plant Physiology*, 99, 235–238.

ARRIGONI, O., 1994, Ascorbate system in plant development, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 26, 407–419.

ASADA, K., 1984, Chloroplasts: formation of active oxygen and its scavenging, *Methods Enzymol.*, 10, 422–429.

ASADA, K., 2006, Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions, *Plant Physiol.*, 141, 391-396.

AUST, S.D., MAREHOUSE, C.E. ve THOMAS, C.E., 1985, Role of metals in oxygen radical reactions, *Journal of Free Radical and Biological Medicine* 1, 1-3.

AZEVEDO, M.-M., CARVALHO, A., PASCOAL, C., RORIGUES, F. ve CÁSSIO, F., 2007, Responses of antioxidant defenses to Cu and Zn stress in two aquatic fungi, *Science of the Total Environment*, 377, 233-243.

BACCOUCH, S., CHAOUI, A. ve EL FERJANI, E., 1998, Nickel induced oxidative damage and antioxidative responses in *Zea mays* shoots, *Plant Physiol. Biochem.*, 36, 689-694.

BAČKOR, M. ve VACZI, P., 2001, Copper tolerance in the lichen photobiont *Trebouxia erici* (Chlorophyta), *Environ. Exp. Bot.* 48, 11-20.

BAČKOR, M., FAHSELT, D. ve WU, C.T., 2004, Free proline content is positively correlated with copper tolerance of the lichen photobiont *Trebouxia erici* (Chlorophyta), *Plant Sci.*, 167 (1), 151-157.

BAILLY, C., 2004, Active oxygen species and antioxidants in seed biology, *Seed Sci. Res.*, 14, 93–107.

BAKER, A.J.M. ve WALKER, P.L., 1990, Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants, In: SHAW, A.J., Ed., *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*, CRC Press, Boca Raton FL, 0849368523.

BANCROFT, J.D. ve STEVENS, A., 1990, *Theory and Practice of Histological Techniques*, (3<sup>rd</sup> Ed.), Churchill Livingstone, Edinburgh.

- BARCELÓ, J. ve POSCHENRIEDER, C., 1990, Plant water relations as effected by heavy metal stress, *J. of Plant Nut.*, 13 (1), 1-37.
- BARR, H.D. ve WEATHERLEY, P.E., 1962, A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves, *Aust. J. Biol. Sci.*, 15, 413-428.
- BARYLA, A., LABORDE, C., MONTILLET, J.-L., TRIANTAPHYLIDÉS, C. ve CHAGVARDIEFF, P., 2000, Evaluation of lipid peroxidation as a toxicity bioassay for plants exposed to copper, *Environmental Pollution.*, 109 (1), 131-135.
- BASAK, M., SHARMA, M. ve CHAKRABORTY, U., 2001, Biochemical responses of *Camellia sinensis* (L.) to heavy metal stress, *J. Environ. Biol.*, 22, 37-41.
- BASKIN, S.I. ve SALEM, H., 1997, *Oxidants, Antioxidants, and Free Radicals*, CRC Press, Boca Raton FL, 1560326441.
- BASSI, R. ve SHARMA, S.S., 1993a, Changes in proline content accompanying the uptake of zinc and copper by *Lemna minor*, *Ann. Bot.*, 72, 151-154.
- BASZYNSKI, T., TUKENDROF, M. ve RUSZKOWSKA, M., 1988, Characteristics of the photosynthetic apparatus of copper non-tolerant spinach exposed to excess copper, *J. Plant Physiol.*, 132, 708-713.
- BATES, L.S., WALDREN, R.P. ve TEARE, I.D., 1973, Rapid determination of free proline for water-stress studies, *Plant Soil*, 39, 205-207.
- BAUMHARDT, G.R. ve WELCH, L.F., 1972, Lead uptake and corn growth with soil applied lead, *J. Env. Qual.*, 1 (1), 92-94.
- BAYÇU, G., 1995, *Ailanthus altissima*'da Kadmiyum Toleransı ve Fitokelatin Oluşumu, Doktora Tezi, İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- BEAUCHAMP, C.O. ve FRIDOVICH, I., 1971, Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels, *Annals of Biochemistry*, 44, 276-287.
- BEERS, R. ve SIZER, I., 1952, A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase, *J. Biol. Chem.*, 195, 133-140.
- BEGGS, C.J. ve WELLMANN, 1985, Analysis of light controlled anthocyanin synthesis in coleoptiles of *Zea mays* L. The role of UV-B blue and far red light, *Photochem. Photobiol.*, 41, 401-406.
- BEINERT, H., 1991, *Copper in biological systems. A report from the 6th Manziiana conference, 23-27 September*, *J. Inorg. Biochem.*, 44, 173-218.
- BELL, J.N.B. ve TRESHOW, M., 2002, *Air Pollution and Plant Life* (2<sup>nd</sup> Ed.), John Wiley & Sons, 0471490911.

- BENBELKACEM, A., 1996, Adaptation of cereal cultivars to extreme agroecologic environments of North Africa, *Field Crops Research*, 45 (1-3), 49-55.
- BENNET, R.J., BREEN, C.M. ve BANDU, V., 1985, Aluminium toxicity and regeneration of the root Cap: preliminary evidence for a golgi apparatus derived morphogen in the primary root of *Zea mays*, *S. Afr. J. Bot.*, 51, 363-370.
- BERGLUND, A.H., QUARTACCI, M.F., CALUCCI, L., NAVARI-IZZO, F., CALOGERO, P. ve LILJENBERG, C., 2002, Alterations of wheat root plasma membrane lipid composition induced by copper stress result in changed physicochemical properties of plasma membrane lipid vesicles, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1564 (2), 466-472.
- BEYER, W.F. ve FRIDOVICH, I., 1987, Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions, *Analytical Biochemistry*, 161, 559-566.
- BISHOP, D.L., 2002, Gene expression of vacuolar peroxidase with stress-induced pathogenesis in wheat sheaths, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 61, 65-71.
- BLOKHINA, O., VIROLAINEN, E. ve FAGERSTEDT, K.V., 2003, Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review, *Ann. Bot.*, 91, 179-194.
- BODANNES, R. ve CHAN, P., 1979, Ascorbic acid as a scavenger of singlet oxygen, *FEBS Letters*, 105, 2.
- BOGOEVA, I., 1998, Pigment content in cereal crops growth on copper polluted soil, *Bulg. J. Agr. Sci.*, 4 (6), 767-772.
- BOOJAR, M.M.A. ve GOODARZI, F., 2007, The copper tolerance strategies and the role of antioxidative enzymes in three plant species grown on copper mine, *Chemosphere*, 67 (11), 2138-2147.
- BORRACCINO G., MASTROPASQUA L., DE LEONARDIS S., DIPIERRO S., 1994, The role of the ascorbic acid system in delaying the senescence of oat (*Avena sativa* L.) leaf segments, *Journal of Plant Physiology*, 144, 161-166.
- BORS, W., HELLER, W., MICHEL, C. ve SARAN, M., 1990, Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies, *Methods in Enzymology* 186, 343-355.
- BORS, W., MICHEL, C. ve STETTMAIER, K., 2001, Structure-activity relationships governing antioxidant capacities of plant polyphenols, In: PACKER, L., Editor, *Flavonoids and Other Polyphenols, Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA.
- BOWLER, C., MONTAGU, M.V. ve INZE, D., 1992, Superoxide dismutase and stress tolerance, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43, 83-116.

- BRADFORD, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72, 248–254.
- BROWN, J.E. ve KELLY, M.F., 2007, Inhibition of lipid peroxidation by anthocyanins, anthocyanidins and their phenolic degradation products, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 109, 66-71.
- BUETTNER, G.R., 1993, The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha tocopherol, and ascorbate, *Arc. Biochem. Biophys.*, 300 (2), 535-543.
- BUNKELMANN, J.R. ve TRELEASE, R.N., 1996, Ascorbate peroxidase: a prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes, *Plant Physiol.*, 110, 589–598.
- BURKITT, M.J. ve GILBERT, B.C., 1990, Model studies of the iron-catalysed Haber-Weiss cycle and the ascorbate-driven Fenton reaction, *Free Radic. Res. Commun.*, 10, 265-280.
- BURZYNSKI, M., 1987, The influence of lead and calcium on the absorption and distribution of potassium, calcium, magnesium and iron in cucumber seedlings, *Acta Physiol. Plant.*, 9, 229-238.
- CAILLET, S., YU, H., LESSARD, S., LAMOUREUX, G., AJDUKOVIC, D. ve LACROIX, M., 2007, Fenton reaction applied for screening natural antioxidants, *Food Chemistry*, 100, 542-552.
- CAKMAK, I. ve HORST, W.J., 1991, Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*), *Physiol. Plant.*, 83, 463–468.
- CAKMAK, I., STRBAC, D. ve MARSCHNER, H., 1993, Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds, *J. Exp. Bot.*, 44, 127–132.
- CAKMAK, I., 1994, Activity of ascorbate-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-scavenging enzymes and leaf chlorosis are enhanced in magnesium and potassium deficient leaves, but not in phosphorus deficient leaves, *J. Exp. Bot.*, 45, 1259-1266.
- CALZONI, G.L., ANTOGNONI, F., PARI, E., FONTI, P., GNES, A. ve SPERANZA, A., 2007, Active biomonitoring of heavy metal pollution using *Rosa rugosa* plants, *Environ. Pollut.*, 149 (2), 239-245.
- CASANO, L.M., LASCANO, H.R. ve TRIPPI, V.S., 1994, Hydroxyl radicals and a thylakoid-bound endopeptidases are involved in light and oxygen-induced proteolysis in oat chloroplasts, *Plant Cell Physiol.*, 35, 145-152.
- CHALKER-SCOTT, L., 1999, Environmental significance of anthocyanins in plant stress response, *Photochem. Photobiol.*, 70, 1-9.

- CHANCE, B. ve MAEHLY, A.C., 1955, Assay of catalases and peroxidases, *Methods. Enzymol.*, 2, 764–775.
- CHAOUI, A. ve EL FERJANI, E., 2005, Effects of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings, *C.R. Biologies*, 328, 23-31.
- CHEN, J. ve GOLDSBROUGH, P.B., 1994, Increased activity of  $\gamma$ -Glutamyl cysteine synthetase in tomato cells selected for cadmium tolerance, *Plant Physiol.*, 106, 233-239.
- CHEN, L.-M., LIN, C.C. ve KAO, C.H., 2000, Copper toxicity in rice seedlings: changes in antioxidative enzyme activities, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level, and cell wall peroxidase activity in oats, *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 41, 99-103.
- CHEN, E.-L., CHEN, Y.-A., CHEN, L.-M. ve LIU, Z.-H., 2002, Effect of copper on peroxidase activity and lignin content in *Raphanus sativus*, *Plant Physiol. Biochem.*, 40, 439-444.
- CHETTRI, M.K., COOK, C.M., VARDAKA, E., SAWIDES, T. ve LANARAS, T., 1998, The effect of Cu, Zn and Pb on the chlorophyll content of the lichens: *Cladonia convoluta* and *Cladonia rangiformis*, *Environ. Exp. Bot.*, 39, 1-10.
- CHIMI, H., CILLARD, J., CILLARD, P., ve RAHMANI, M., 1991, Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants, *Journal of American Oil Society*, 68, 307-312.
- CLIJSTERS, H. ve VAN ASSCHE, F., 1985, Inhibition of photosynthesis by heavy metals, *Photosynth. Res.*, 7, 31-40.
- COBBETT, C.S., 2000, Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification, *Plant Physiol.*, 123, 825–832.
- COLEY, P.D. ve KUSAR, T.A., 1996, Anti-herbivore defenses of young tropical tradeoffs. In: MULKEY, S.S., SHAZDON, R.L. ve SMITH, A.P., Editor, *Tropical Forest Plant Ecophysiology*, Chapman and Hall, New York.
- COLTON, C.A., 1999, *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach*, Netlibrary, Incorporated, 0585313075.
- COTTON, F.A. ve WILKINSON, G., 1988, *Advanced Inorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, 0471027758.
- CROSS, C.E., HALLIWELL, B., BORISH, E.T., PRYOR, W.A., AMES, B.N., SAUL, R.L., MCCORD, J.M., HARMAN, D., 1987, Oxygene radicals and human disease, *Ann. Intern. Med.* 107, 526-545.
- CUYPERS, A., VANGRONVELD, J. ve CLIJSTERS, H., 2000, Biphasic effect of copper on the ascorbate–glutathione pathway in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* seedlings during the early stages of metal assimilation, *Physiol. Plant.*, 110, 512–517.



CUYPERS, A., VANGRONSVELD, J. ve CLIJSTERS, H., 2001, The redox status of plant cells (AsA and GSH) is sensitive to zinc imposed oxidative stress in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris*, *Plant Physiol. Biochem.*, 39 (7-8), 657-664.

CUYPERS, A., KOISTINEN, K.M., KOKKO, H., KÄRENLAMPI, S., AURIOLA, S. ve VANGRONSVELD, J., 2005, Analysis of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins affected by copper stress, *Journal of Plant Physiology*, 162, 383-392.

DA SILVA, E.L., PISKULA, M.K., YAMAMOTO, N., MOON, J.H. ve TERAQ, J., 1998, Quercetin metabolites inhibit copper ion-induced lipid peroxidation in rat plasma. *FEBS Lett.*, 430, 405-408.

DAI, L.-P., XIONG, Z.-T., HUANG, Y. ve LI, M.-J., 2006, Cadmium-induced changes in pigments, total phenolics, and phenylalanine ammonia-lyase activity in fronds of *Azolla imbricata*, *Environmental Toxicology*, 21, 505-512.

DALTON, D.A., RUSSELL, S.A., HANUS, F.J., PASCOE, G.A. ve EVANS, H.J., 1986, Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 3811-3815.

DAS, K.C. ve DAS, C.K., 2000, Thioredoxin, a singlet oxygen quencher and hydroxyl radical scavenger: redox independent functions, *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 277 (2), 443-447.

DAT, J., VANDENBEELE, S., VRANOVA, E., VAN MONTAGU, M., INZE, D. ve VAN BREUSEGM, F., 2000, Dual action of the active oxygen species during plant stress responses, *Cell Mol. Life Sci.*, 57, 779-795.

DAVIES, K.J.A., 1987, Protein damage and degradation by oxygen radicals, *J. Biol. Chem.*, 292, 9895-9901.

DE FILIPPIS, L.F., 1979, The effect of heavy metal compounds on the permeability of *Chlorella* cells, *Z. Pflanzenphysiol.*, 92, 39-49.

DE GARA L., DE PINTO M.C., PACIOLLA C., CAPPETTI V., ARRIGONI O.. 1996, Is ascorbate peroxidase only a scavenger of hydrogen peroxide? In: OBINGER C., BURNER O., EDERMAN R., PENEL C., GREPPEN H., eds., *Plant peroxidases: biochemistry and physiology*, Geneve: University of Geneve.

DE GARA L., DE PINTO M.C., ARRIGONI O., 1997, Ascorbate synthesis and ascorbate peroxidase activity during the early stage of wheat germination, *Physiologia Plantarum*, 100, 894-900.

DE GARA, L.D., PACIOLLA, C., TULLIO, M.C., MOTTO, M. ve ARRIGONI, O., 2000, Ascorbate-dependent hydrogen peroxide detoxification and ascorbate regeneration during germination of a highly productive maize hybrid: evidence of an improved detoxification mechanism against reactive oxygen species, *Physiol. Plant.*, 109, 7-13.

DEHON, L., MACHEIX, J.J. ve DURAND, M., 2002, Involvement of peroxidases in the formation of the brown coloration of heartwood in *Juglans nigra*, *J. Exp. Bot.*, 53, 303–311.

DEL MAESTRO, R., 1979, *The influence of oxygen derived free radicals on in vitro and in vivo model systems: interactions of superoxide anion radical, hydrogen peroxide and hydroxyl radical*, Thesis (PhD), Uppsala University.

DEMIREVSKA-KEPOVA, K., SIMIVA-STOILOVA, L., STOYANOVA, Z., HÖLZER, R. ve FELLER, U., 2004, Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese, *Env. and Exp. Bot.*, 52 (3), 253-266.

DEVI, S.R. ve PRASAD, M.N.V., 1998, Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: Responses of antioxidant enzymes and antioxidants, *Plant Sci.*, 138, 157-165.

DE VOS, C.H.R., VOOIJS, R., SCHAT, H. ve ERNST, W.H.O., 1989, Copper-induced damage to the permeability barrier in roots of *Silene cucubalus*, *J. Plant Physiol.*, 135, 165-169.

DE VOS, C.H.R. ve SCHAT, H., 1991, Free radical and heavy metal tolerance, In: ROZEMA, J. ve VERKLEJI, J.A.C., Editors, *Ecological Response to Environmental Stress*, Kluwer, Dordrecht.

DHINDSA, R., PLUMB-DHINDSA, P. ve THORPE, T., 1981, Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase, *J. Exp. Bot.*, 32, 93–101.

DIAZ, J., BERNAL, A., POMAR, F. ve MERINO, F., 2001, Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification, *Plant Sci.*, 161, 179-188.

DI PALMA, L. ve MECOZZI, R., 2007, Heavy metals mobilization from harbour sediments using EDTA and citric acid as chelating agents, *Journal of Hazardous Materials*, 147 (3), 768-775.

DIXON, R.A. ve PAIVA, N.L., 1995, Stress-induced phenylpropanoid metabolism, *Plant Cell*, 7, 1085-1097.

DOULIS, A.G., DEBIAN, N., KINGSTON-SMITH, A.H. ve FOYER, C.H., 1997, Differential localization of antioxidants in maize, *Plant Physiol.*, 114, 1031–1037.

DREOSTI, I.E., 1991, *Trace Elements, Micronutrients, and Free Radicals*, Humana Press, 0896031888.

DUČIĆ, T. ve POLLE, A., 2005, Transport and detoxification of manganese and copper in plants, *Braz. J. Plant Physiol.*, 17, 103–112.

- EAPEN, S., SINGH, S. ve D'SOUZA, S.F., 2007, Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants, *Biotechnology Advances*, 25 (5), 442-451.
- EDGE, R., MCGARVEY, D.J. ve TRUSCOTT, T.G., 1997, The carotenoids as anti-oxidant – a review, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 41, 189-200.
- EDREVA, A., GÜREL, A., GESHEVA, E. ve HAKERLERLER, H., 2002, Reddening of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaves, *Biol. Plant.*, 45, 303-306.
- EDREVA, A., 2005, The importance of non-photosynthetic pigments and cinnamic acid derivatives in photoprotection, *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 106, 135-146.
- ELHABIRI, M., FIGUEIREDO, P., TOKI, K., SAITO, N. ve BROUILLARD, R., 1997, Anthocyanin-aluminum and –gallium complexes in aqueous solution, *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.*, 2, 355-362.
- EL-SHORA, H.M., 2002, Properties of phenylalanine ammonia-lyase from marrow cotyledons, *Plant Sci.*, 162 (1), 1-7.
- ELSTNER, E. F., 1982, Oxygen activation and oxygen toxicity, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 33, 73–96.
- ELSTNER, E.F., WAGNER, G.A. ve SCHÜTZ, W., 1988, Activated oxygen in green plants in relation to stress situation, *Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.*, 7, 159–187.
- ERDEI, S., HEGEDÜS, A., HAUPTMANN, G., SZALAI J. ve HORVÁTH, G., 2002, Heavy metal induced physiological changes in the antioxidative response system, *Acta Biol Szeged*, 46 (3–4), 89–90.
- ESCRIBANO, J., PEDREÑO, M.A., GARCÍA-CARMONA, F. ve MUÑOZ, R., 1998, Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. roots, *Phytochemical Analysis*, 9, 124-127.
- ESPARZA, I., SALINAS, Í., CABALLERO, I., SANTAMARÍA, C., CALVO, I., GARCÍA-MINA, J.M. ve FERNÁNDEZ, J.M., 2004, Evolution of metal and polyphenol content over a 1-year period of vinification: Sample fractionation and correlation between metals and anthocyanins, *Analytica Chimica Acta*, 524, 215-224.
- ESPARZA, I., SALINAS, Í., SANTAMARÍA, C., GARCÍA-MINA, J.M. ve FERNÁNDEZ, J.M., 2005, Electrochemical and theoretical complexation studies for Zn and Cu with individual polyphenols, *Analytica Chimica Acta*, 543, 267-274.
- ES-SAFI, N.-E., KOLLMANN, A., KHLIFI, S. ve DUCROT, P.-H., 2007, Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum* L. structure–activity relationship, *LWT - Food Science and Technology*, 40 (7), 1246-1252.

- EYÜBOĞLU, F., KURUCU, N. ve TALAZ, S., 1998, *Türkiye topraklarının bitkiye yarayışlı bazı mikroelementler (Fe, Cu, Zn, Mn) bakımından genel durumu*, Köy Hizmetleri Genel Müd. Top. ve Güb. Araş. Müd., Ankara.
- FANG, W.-C. ve KAO, C.H., 2000, Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc, *Plant Sci.*, 158, 71-76.
- FARMER, M.A., 1997, *Managing Environmental Pollution*, Environmental Studies, CRC Press, Boca Raton FL.
- FATIMA, R.A. ve AHMAD, M., 2004, Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater, *Sci. Total Environ.*, 346, 256–273.
- FEDTKE, C., 1982, *Biochemistry and Physiology of Herbicide Action*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- FERNANDES, J.C. ve HENRIQUES, F.S., 1991, Biochemical, physiological and structural effects of excess copper in plants, *Bot. Rev.*, 57, 246-273.
- FERNANDEZ, M.T., MIRA, M.L., FLORENCIO, M.H. ve JENNINGS, K.R., 2002, Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 92 (2), 105-111.
- FERREIRA, I.C.F.R., BARROS, L., SOARES, M.E., BASTOS, M.L. ve PEREIRA, J.A., 2007, Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations, *Food Chemistry*, 103 (1), 188-195.
- FIELDING, J.L. ve HALL, J.L., 1978, A biochemical and cytological study of peroxidase activity in roots of *Pisum sativum*, *J. Exp. Bot.*, 29, 969–981.
- FOOTE, C.S., 1995, *Active Oxygen in Chemistry*, Springer, Science, 0412034417.
- FOYER, C.H. ve HALLIWELL, B., 1976, The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplast: a proposed role in ascorbic acid metabolism, *Planta*, 133, 21-25.
- FRANKART, C., EULLAFFROY, P. ve VERNET, G., 2002, Photosynthetic responses of *Lemna minor* exposed to xenobiotics, copper, and their combinations, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 53, 439–445.
- FRIDOVICH, I., 1983, Superoxide radical: An endogenous toxicant, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 23, 239-257.
- FRIDOVICH, I., 1993, Superoxide and superoxide dismutases, *Free Rad. Biol. and Med.* 15 (5), 472.

- GABRIELSKA, J., OSZMIANSKI, J., KOMOROWSKA, M. ve LANGNER, M., 1999, Anthocyanin extracts with antioxidant radical scavenging effect, *Zeitschrift für Naturforschung* 54, 314-324.
- GALLEGO, S.M., BENAVIDES, M.P. ve TOMARO, M.L., 1996, Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress *Plant Sci.*, 121 (2), 151-159.
- GAPPER, C. ve DOLAN, L., 2006, Control of plant development by reactive oxygen species, *Plant Physiol.*, 141, 341-345.
- GARNCZARSKA, M. ve RATAJCZAK, L., 2000, Metabolic responses of *Lemna minor* to lead ions I. Growth, chlorophyll level and activity of fermentative enzymes, *Acta Physiol. Plant.*, 22 (4), 423-427.
- GAŚCIOROWSKI, K., SZYBA, K., BROKOS, B., KOŁACZYŃSKA, B., JANKOWIAK-WŁODARCZYK, M. ve OSZMIANŃSKI, J., 1997, Antimutagenic activity of anthocyanins isolated from *Aronia melanocarpa* fruits, *Cancer Lett.* 119, 37-46.
- GECHEV, T.S., VAN BREUSEGEM, F., STONE, J.M., DENEV, I. ve LALOI, C., 2006, Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death, *BioEssays*, 28, 1091-1101.
- GEKELER, W., GRILL, E., WINNACKER, E.L. ve ZENK, M.H., 1988, Algae sequester heavy-metals via synthesis of phytochelatin complexes, *Arch. Microbiol.*, 150, 197-202.
- GENESTRA, M., 2007, Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants, *Cellular Signalling*, 19 (9) 1807-1819.
- GETOFF, N., 2007, Anti-aging and aging factors in life. The role of free radicals, *Radiation Physics and Chemistry*, 76 (10), 1577-1586.
- GIANNOPOLITIS, C.N. ve RIES, S.K., 1977, Superoxide dismutases. I. occurrence in higher plants, *Plant Physiol.*, 59, 309-314.
- GIROTTI, A.W., 1985, Mechanisms of lipid peroxidation, *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, 1 (2), 87-95.
- GLIŃSKA, S., BARTCZAK, M., OLEKSIK, S., WOLSKA, A., GABARA, B., POSMYK, M. ve JANAS, K., 2007, Effects of anthocyanin-rich extract from red cabbage leaves on meristematic cells of *Allium cepa* L. roots treated with heavy metals, *Ecotoxicol. Environ. Safety*,
- GOSSETT, D.R., MILLHOLON, P. ve LUCAS, C., 1994, Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton, *Crop Sci.*, 34, 706-714.

- GOULD, K.S., MARKHAM, K.R., SMITH, R.H. ve GORIS, J.J., 2000, Functional role of anthocyanins in the leaves of *Quintinia serrata* A, *Cunn. J. Exp. Bot.*, 51, 1107-1115.
- GOULD, K.S., McKELVIE, J. ve MARKHAM, K.R., 2002, Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in red and green leaves after mechanical injury, *Plant Cell Environ.*, 25, 1261-1269.
- GRACE, S.G. ve LOGAN, B.A., 2000, Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 335, 1499-1510.
- GRENE, R., 2002, Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants, *The Arabidopsis Book, American Society of Plant Biologists*, 1-20.
- GROTEWOLD, E., 2006, The genetics and biochemistry of floral pigments, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 761-780.
- GROTZ, V. ve GUERINOT, M.L., 2006, Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants, *Biochim. Biophys. Acta*, 1763, 595-608.
- GUO, T.R., ZHANG, G.P. ve ZHANG, Y.H., 2007, Physiological changes in barley plants under combined toxicity of aluminum, copper and cadmium, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 57 (2), 182-188.
- GUPTA, M., SINHA, S. ve CHANDRA, P., 1996, Copper-induced toxicity in aquatic macrophyte *Hydrilla verticillata*: effect of pH, *Ecotoxicology*, 5, 23-33.
- GUPTA, M., CUYPERS, A., VANGRONSVELD, J. ve CLIJSTERS, H., 1999, Copper affects the enzymes of the ascorbate-glutathione cycle and its related metabolites in the roots of *Phaseolus vulgaris*, *Physiol. Plant.*, 106, 262-267.
- GUPTA, A.K. ve SINHA, S., 2007, Phytoextraction capacity of the plants growing on tannery sludge dumping sites, *Bioresource Technology*, 98 (9), 1788-1794.
- GUTTERIDGE, J.M., 1995, Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage, *Clin. Chem.*, 41, 1819-1828.
- GÜLEN, H. ve ERİŞ, A., 2004, Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants, *Plant Sci.*, 166, 739-744.
- GÜRER, H. ve ERCAL, N., 2000, Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Rad. Biol. & Medi.*, 29 (10), 927-945.
- HALE, K.L., McGRATH, S.P., LOMBI, E., STACK, S.M., TERRY, N., PICKERING, I.J., GEORGE, G.N. ve PILON-SMITS, E.A.H., 2001, Molybdenum sequestration in *Brassica* species. A role for anthocyanins? *Plant Physiol.*, 126, 1391-1402.
- HALBWIRTH, H., MARTENS, S., WIENAND, U., FORKMANN, G. ve STICH, K., 2003, Biochemical formation of anthocyanins in silk tissue of *Zea mays*, *Plant Sci.*, 164 (4), 489-495.

- HALL, J.L. ve SEXTON, R., 1972, Cytochemical localization of peroxidase activity in root cells, *Planta*, 108, 103–120.
- HALLIWELL, B. ve GUTTERIDGE, J.M.G., 1984, Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochem. J.*, 219, 1-14.
- HALLIWELL, B., 1987, Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts, *Chemistry and Physics of Lipids*, 44 (2-49), 327-340.
- HALLIWELL, B. ve GUTTERIDGE, J.M.C., 1998, Mechanisms of damage to cellular targets by oxidative stress: lipid peroxidation, In: HALLIWELL, B. ve GUTTERIDGE, J.M.C., Editors, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford Science Publication.
- HALLIWELL, B. ve GUTTERIDGE, J.M.C., 1999, *Free Radicals in Biology and Medicine* (3rd ed.), Oxford University Press, New York.
- HALLIWELL, B., 2006, Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life, *Plant Physiol.*, 141, 312-322.
- HARBORNE, J.B. ve WILLIAMS, C.A., 2000, Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, 55, 481-504.
- HÄRTLING, S. ve SCHULTZ, H., 1998, Biochemical parameters as biomarkers for the early recognition of environmental pollution in Scottish pine trees. I. Phenolic compounds, *Z. Naturforsch.*, 53 c, 331–340.
- HAUSLADEN, A. ve ALSCHER, R.G., 1993, Glutathione. In: ALSCHER, R.G. ve HESS, J., Eds., *Antioxidants in Higher Plants*, CRC Press, Boca Raton, FL.
- HAYAT, M.A., 2000, *Principles and Techniques of Electron Microscopy, Biological Applications*, (4<sup>th</sup> Ed.), Cambridge University Press, Cambridge.
- HAYAT, S., IQBAL, A. ve PICHTEL, J., 2005, *Heavy Metal Contamination of Soil*, Science Publishers, Technology & Industrial Arts, 1578083850.
- HEALE, E.L. ve ORMROD, D.P., 1982, Effects of nickel and copper on *Acer rubrum*, *Cornus stolonifera*, *Lonicera tatarica* and *Pinus resinosa*, *Can. J. Bot.*, 60, 2674.
- HEATH, R.L. ve PACKER, L., 1968, Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation, *Arch. Biochem. Biophys.*, 125, 189–198.
- HEATH, S.M., SOUTHWORTHE, D. ve D'ALLURA, J.A., 1997, Localization of nickel in epidermal subsidiary cells of leaves of *Thlaspi montanum* var *sikiyouense* (Brassicaceae) using energy-dispersive X-ray microanalysis, *Int. J. Plant Sci.*, 158, 184-188.

- HE, Z.L., YANG, X.E. ve STOFFELLA, P.J., 2005, Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19 (2-3), 125-140.
- HEGEDUS, A., ERDEI S. ve HORVATH, G., 2001, Comparative studies of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress, *Plant Sci.*, 160, 1085–1093.
- HEMEDA, H.M. ve KLEIN, B.P., 1990, Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts, *J. Food Sci.*, 55, 184–185.
- HERNANDEZ-JIMENEZ, M.J., LUCAS, M.M. ve ROSARIO, M.F., 2002, Antioxidant defence and damage in senescing lupin nodules, *Plant Physiol. Biochem.*, 40, 645–657.
- HILL, M.K., 1997, *Understanding Environmental Pollution*, Cambridge University Press, 0521566800.
- HIMELBLAU, E. ve AMASINO, R.M., 2000, Delivering copper within plant cells, *Current Opinion in Plant Biology*, 3 (3), 205-210.
- HIRAYAMA, O., NAKAMURA, K., HAMADA, S. ve KOBAYASHI, Y., 1994, Singlet oxygen quenching ability of naturally occurring carotenoids, *Lipids*, 29, 149-150.
- HOAGLAND, D.R. ve ARNON, D.I., 1950, The water-culture method for growing plants without soil, *Calif. Agric. Exp. Station Circ.*, 347, 1–32.
- HODGES, D.M., DELONG, J.M., FORNEY, C.F. ve PRANGE, R.K., 1999, Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds, *Planta*, 207, 604–611.
- HOSHI, T. ve HEINEMANN, 2001, Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction, *J. Physiol.*, 531, 1-11.
- HOWE, G. ve MERCHANT, S., 1992, Heavy metal-activated synthesis of peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.*, 98, 127–136.
- HRAZDINA, G., 1982, Anthocyanins, In: Harborne, J.B., MABRY, T.J., Editors, *The Flavonoids: Advances in Research*, John Wiley & Sons, Chichester.
- HUNTER ve WELKIE, 1977, Growth of copper-treated corn roots as affected by EDTA, IAA, succinic acid-2,2-dimethyl hydrazide, vitamins and potassium, *Environmental and Experimental Botany*, 17 (1), 19-26.



HUTZLER, P., FISHBACH, R., HELLER, W., JUNGBLUT, T.P., REUBER, S., SCHMITZ, R., VEIT, M., WEISSENBOCK, G. ve SCHNITZLER, J.P., 1998, Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy, *J. Exp. Bot.*, 49: 953-965.

ISHIKAWA, S. ve WAGATSUMA, T., 1998, Plasma membrane permeability of root-tip cells following temporary exposure to Al ions is a rapid measure of Al tolerance among plant species, *Plant Cell Physiol.*, 39, 516–525.

ITO, M., MURAKAMI, K. ve YOSHINO, M., 2005, Antioxidant action of eugenol compounds: Role of metal ion in the lipid peroxidation, *Food and Chemical Toxicology*, 43, 461-466.

IWASHINA, T., 2000, The structure and distribution of the flavonoids in plants, *J. Plant Res.*, 113, 287-299.

JIANG, Y., 2000, Role of anthocyanins, polyphenol oxidase and phenols in lychee pericarp browning, *J. Sci. Food Agric.*, 80, 305-310.

JIANG, Y.-M. ve JOYCE, D.C., 2003, ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit, *Plant Growth Regul.*, 39, 171-174.

JIE, L., ZHITING, X., TIANYU, L. ve HE, H., 2004, Bioaccumulation and ecophysiological responses to copper stress in two populations of *Rumex dentatus* L. from Cu contaminated and non-contaminated sites, *Environ. Exp. Bot.*, 52, 43–51.

JOHANSSON, L., XYDAS, C., MESSIOS, N., STOLTS, E. ve GREGER, M., 2005, Growth and Cu accumulation by plants grown on Cu containing mine tailing in Cyprus, *Appl. Geochem.*, 20, 101–107.

JOUILI, H. ve EL FERJANI, E., 2003, Changes in antioxidant and lignifying enzyme activities in sunflower roots (*Helianthus annuus* L.) stressed with copper excess, *C. R. Biologies*, 326, 639-644.

JOVANOVIC, S.V., STEENKEN, S., SIMIC, M.G. ve HARA, Y., 1997, Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. In: RICE-EVANS, C.A. ve PACKER, L., Editors, *Flavonoids in Health and Disease*, Marcel Dekker, New York.

KABATA-PENDIAS, A., 1995, Agricultural problems related to excessive trace metals contents of soil, In: SALMONS, W. ve FORSTHER, U., Editors, *Concerning Heavy Metals: Problems and Solutions/Salmons*, Springer-Verlag, Berlin.

KÄHKONEN, M.P. ve HEINONEN, M., 2003, Antioxidant activity of antosiyanins and their aglycons, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 628-633.

KALEFETOĞLU, T. ve EKMEKÇİ, Y., 2005, The effects of drought on plants and tolerance mechanisms, *G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 18 (4), 723-740.

- KE, W., XIONG, Z.-T., CHEN, S. ve 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*, (1), 59-67.
- KEHRER, J.P., 2000, The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity, *Toxicology*, 149, 43-50.
- KIM, M.-Y., IWAI, K., ONODERA, A. ve MATSUE, H., 2003, Identification and antiradical properties of anthocyanins in fruits of *Viburnum dilatatum* Thunb, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 6173-6177.
- KINDL, H., 1993, Fatty acid degradation in plant peroxisomes: Function and biosynthesis of the enzymes involved, *Biochimie*, 75 (3-4), 225-230.
- KIRAN, Y. ve MUNZUROĞLU, Ö., 2004, Mercimek (*Lens culinaris* Medik.) tohumlarının çimlenmesi ve fide büyümesi üzerine kurşunun etkileri, *F.Ü. Fen ve Müh. Bil. Dergisi*, 16 (1), 1-9.
- KIRBAĞ-ZENGİN, F. ve MUNZUROĞLU, Ö., 2004, Effects of lead (Pb<sup>++</sup>) and copper (Cu<sup>++</sup>) on the growth of root, shoot and leaf of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings, *G.Ü., Fen Bilimleri Dergisi*, 17 (3), 1-10.
- KIRBAĞ-ZENGİN, F. ve MUNZUROĞLU, Ö., 2005, Fasulye fidelerinin (*Phaseolus vulgaris* L. Strike) klorofil ve karotinoid miktarı üzerine bazı ağır metallerin (Ni<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>, Cr<sup>+3</sup>, Zn<sup>+2</sup>) etkileri, *F.Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 17 (1), 164-172.
- KLAPER, R., FRANKEL, S. ve BARENBAUM, M.R., 1996, Anthocyanin content and UVB sensitivity in *Brassica rapa*, *Photochem. Photobiol.*, 63, 811-813.
- KLAPHECK, S., ZIMMER, I. ve COSSE, H., 1990, Scavenging of hydrogen peroxide in the endosperm of *Ricinus communis* by ascorbate peroxidase, *Plant Cell Physiol.*, 31, 1005-1013.
- KOCAER, F.O. ve BAŞKAYA, H.S., 2003, Metallerle kirlenmiş toprakların temizlenmesinde uygulanan teknolojiler, *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 8 (1), 12-16.
- KOMÁREK, M., TLUSTOŠ, P., SZÁKOVÁ, J., CHRASTNÝ, V. ve ETTLER, V., 2007, The use of maize and poplar in chelant-enhanced phytoextraction of lead from contaminated agricultural soils, *Chemosphere*, 67 (4), 640-651.
- KRUPA, Z., BARANOWSKA, M. ve ORZOL, D., 1996, Can anthocyanins be considered as heavy metal indicator in higher plants? *Acta Physiologica Plant.*, 18 (2), 147-151.
- KUKKOLA, E., RAUTIO, P. ve HUTTUNEN, S., 2000, Stress indicators in copper- and nickel- exposed scots pine seedlings, *Environ. Exp. Bot.*, 43, 197-210.

KUPPER, H., KUPPER, F. ve SPILLER, M., 1996, Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants, *J. Exp. Bot.*, 47, 259-266.

KÜPPER, H., ZHAO, F. ve McGRATH, S.P., 1999, Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *Plant Physiol.*, 119, 305-311

KVESITADZE, G., 2006, *Biochemical Mechanisms of Detoxification in Higher Plants*, Springer, 3540289968.

KWON, Y.W., MASUTANI, H., NAKAMURA, H., ISHII, Y. ve YODOI, J., 2003, Redox regulation of cell growth and cell death. *Biol. Chem.*, 384, 991-996.

ŁABIENIEC, M. ve GABRYELAK, T., 2006, Oxidatively modified proteins and DNA in digestive gland cells of the fresh-water mussel *Unio tumidus* in the presence of tannic acid and its derivatives, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 603 (1), 48-55.

LALOUE, H., WEBER-LOFTI, F., LUCAU-DANILA, A. ve GUILLEMAT, P., 1997, Identification of ascorbate and guaiacol peroxidase in needle chloroplasts of spruce trees, *Plant Physiol. Biochem.*, 35, 341-346.

LAMB, A. ve TOLLEFSON, E.L., 1973, Toxic effects of cupric, chromate and chromic ions on biological oxidation, *Water Research*, 7 (4), 599-604.

LANE, N., 2003, *Oxygen: The Molecule that Made the World*, Oxford University Press.

LAVID, N., SCHWARTZ, A., YARDEN, O. ve TEL-OR, E., 2001, The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae), *Planta*, 212, 323-331.

LAZZÉ, M.C., PIZZALA, R., SAVIO, M., STIVALA, L.A., PROSPERI, E., BIANCHI, L., 2003, Anthocyanins protect against DNA damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat smooth muscle and hepatoma cells, *Mutat. Res.*, 535, 103-155.

LE FAUCHEUR, S., SCHILDKNECHT, F., BEHRA, R. ve SIGG, L., 2006, Thiols in *Scenedesmus vacuolatus* upon exposure to metals and metalloids, *Aquat. Toxicol.*, 80, 355-361.

LEE, K.M. ve JOHNSTON, E.L., 2007, Low levels of copper reduce the reproductive success of a mobile invertebrate predator, *Mar. Environ. Res.*, 64 (3), 336-346.

LEFEBVRE, C. ve VERNET, P., 1990, Microevolutionary process on contaminated deposits, In: SHAW, J., Editor, *Heavy Metal Tolerance in Plants. Evolutionary Aspects*, CRC Press, Boca-Raton FL.

LEOPOLD, I., GÜNTHER, D., SCHMIDT, J. ve NEUMANN, D., 1999, Phytochelatin and heavy metal tolerance, *Phytochemistry*, 50 (8), 1323-1328.

- LEPEDUŠ, H., CESAR, V. ve KRSNIK-RASOL, M., 2004, Guaiacol peroxidases in carrot (*Daucus carota* L.) root, *Food Technol. Biotechnol.*, 42 (1), 33–36.
- LERCHE, I. ve GLAESSER, W., 2006, *Environmental Risk Assessment: Quantitative Measures, Anthropogenic Influences, Human Impact*, Environmental Studies, Springer, 3540262490.
- LESHEM, Y.Y., 1988, Plant senescence processes and free radicals *Free Radical Biology and Medicine*, 5 (1), 39-49.
- LICHTENTHALER, H.K., 1987, Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes, *Meth. Enzymol.*, 148, 350–383.
- LIDON, F.C. ve HENRIQUES, F.S., 1993a, Effects of copper toxicity on growth and the uptake and translocation of metals in rice plants, *Journal of Plant Nutrition*, 16, 1449-1464.
- LIDON, F.C. ve HENRIQUES, F.S., 1993b, Oxygen metabolism in higher plant chloroplasts, *Photosynth.*, 29, 249–279.
- LIDON, F.C. ve HENRIQUES, F.S., 1994, Subcellular localisation of copper and partial isolation of copper proteins in roots from rice plants exposed to excess copper, *Australian Journal of Plant Physiology*, 21, 427-436.
- LIDON, F.C. ve HENRIQUES, F.S., 1998, Role of rice shoots vacuoles in copper toxicity regulation, *Environ. Exp. Bot.*, 39, 197-202.
- LI, M., HU, C., ZHU, Q., CHEN, L., KONG, Z. ve LIU, Z., 2006, Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae), *Chemosphere*, 62 (4), 565-572.
- LIN, Z.F., LI, S.S. ve LIN, G.Z., 1988, Senescing leaves and chloroplasts in relation to lipid peroxidation, *Acta Phytophysiol. Sin.*, 14, 16–22.
- LIN, J., JIANG, W. ve LIU, D., 2003, Accumulation of copper by roots, hypocotyls, cotyledons and leaves of sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Bioresource Technology*, 86, 151-155.
- LIN, A.-J., ZHANG, X.-H., CHEN, M.-M. ve CAO, Q., 2007, Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation, *Journal of Environmental Sciences*, 19 (5), 596-602.
- LIOCHEV, S.I. ve FRIDOVICH, I., 2007, The effects of superoxide dismutase on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation, *Free Radical Biology and Medicine*, 42 (10), 1465-1469.
- LIU, D. ve KOTTKE, I., 2004, Subcellular localization of copper in the root cells of *Allium sativum* by electron energy loss spectroscopy (EELS), *Bioresource Technology*, 94 (2), 153-158.

- LIU, J., XIONG, Z., LI, T. ve HUANG, H., 2004, Bioaccumulation and ecophysiological responses to copper stress in two populations of *Rumex dentatus* L. from Cu contaminated and non-contaminated sites, *Environ. and Exp. Bot.*, 52, 43-51.
- LOMBARDI, L. ve SEBASTIANI, L., 2005, Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of *in vitro* grown plants, *Plant Sci.*, 168, 797-802.
- LONERAGAN, J., F., 1981, Distribution and movement of Cu in plants, In: LONERAGAN, J.F., ROBSON, A.D. ve GRAHAM, R.D., Eds., *Copper in Soils and Plants*, Academic Press, Sydney.
- LOOMIS, W. D. ve BATTLE, J., 1966, Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes, *Phytochemistry*, 5 (3), 423-438.
- LOU, L.-Q., SHEN, Z.-G ve LI, X.-D., 2004, The copper tolerance mechanisms of *Elsholtzia haichowensis*, a plant from copper-enriched soils, *Environmental and Experimental Botany*, 51 (2), 111-120.
- LUNA, C.M., GONZALEZ, C.A. ve TRIPPI, V.S., 1994, Oxidative damage caused by excess of copper in oat leaves, *Plant Cell Physiol.*, 35, 11-15.
- MAILLARD, M.-N., BILLAUD, C., CHOW, Y.-N., ORDONAUD, C. ve NICOLAS, J., 2007, Free radical scavenging, inhibition of polyphenoloxidase activity and copper chelating properties of Model Maillard Systems, *LWT*, 40, 1434-1444.
- MAKSYMIEC, W., 1997, Effect of copper on cellular processes in higher plants, *Photosynthetica*, 34, 321-342.
- MANCINELLI, A.L., 1990, Interaction between light quality and light quantity in the photoregulation of anthocyanin production, *Plant Physiol.*, 92, 1191-1195.
- MARCHIOL, L., FELLET, G., PEROSA, D. ve ZERBI, G., 2007, Removal of trace metals by *Sorghum bicolor* and *Helianthus annuus* in a site polluted by industrial wastes: A field experience, *Plant Physiology and Biochemistry*, 45 (5), 379-387.
- MARRS, K.A., ALFENITO, M.R., LLOYD, A.M. ve WALBOT, V., 1995, A glutathione-S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*, *Nature*, 375, 397-400.
- MATSUMOTO, H., HIRASAWA, E., TORIKA, H. ve TAKAHASHI, E., 1976, Localization of absorbed aluminium in pea root and its binding to nucleic acids, *Plant Cell Physiol.*, 17, 127-137.
- MAY, M.J., VERNOUX, T., LEAVER, C., VAN MONTAGU, M. ve INZE, D., 1998a, Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development, *J. Exp. Bot.*, 49, 649-667.

- MAZHOUDI, S., CHAOUI, A., GHORBAL, M.H. ve EL FERJANI, E., 1997, Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.), *Plant Sci.*, 127, 129-137.
- MC CORD, J.M. ve FRIDOVICH, I., 1968, The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase, *J. Biol. Chem.*, 243 (21), 5753-5760.
- MC CORD, J.M. ve FRIDOVICH, I., 1969, Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein), *J. Biol. Chem.*, 244, 6049-6055.
- MCCUE, P., ZHENG, Z., JENNIFER, L. P. ve KALIDAS, S., 2000, A model for enhanced pea seedling vigour following low pH and salicylic acid treatments, *Process Biochem.*, 35, 603-613.
- MCGRATH, S.P., ZHAO, F.J. ve LOMBI, E., 2001, Plant and rhizosphere process involved in phytoremediation of metal-contaminated soils, *Plant Soil*, 232, 207-214.
- MCKERSIE, B.D. ve LESHEM, Y.Y. , 1994, *Stress and Stress Coping in Cultivated Plants*, Kluwer Academic Publishes.
- MEHLHORN, H., LELANDAIS, M., KORTH, H.G. ve FOYER, C.H., 1996, Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases, *FEBS Lett.*, 378, 203-206.
- MEISTER, A., 1981, Metabolism and functions of glutathione, *Trends Biochem. Sci.*, 6, 231-234.
- MESSERSCHMIDT, A., 1997, *Multi-Copper Oxidases*, World Scientific, 9810227116.
- MERCAN, U., 2004, Toksikolojide serbest radikallerin önemi, *YYU Vet. Fak. Derg.*, 15 (1-2), 91-96.
- MILLER, E. ve SCHREIER, P., 1985, Studies on flavonol degradation by peroxidase (Donor: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oxidoreductase, E.C.1.11.1.7.), *Food Chemistry*, 17, 143-154.
- MILOSEVIC, N. ve SLUSARENKO, A.J., 1996, Active oxygen metabolism and lignification in the hypersensitive response in bean, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 49, 143-158.
- MITTLER, R., 2002, Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends Plant Sci.*, 7, 405-410.
- MITTLER, R., 2006, Abiotic stress, the field environment and stress combination, *Trends Plant Sci.*, 11, 15-19.
- MOCQUOT, B., VANGROSVELD, J., CLIJSTERS, H.M.M. ve MENCH, M., 1996, Copper toxicity in young maize (*Zea mays* L.) plants: Effects on growth, mineral and chlorophyll contents and enzyme activities, *Plant Soil*, 182, 287-300.

- MOL, J., JENKINS, G., SCHÄFER, E. ve WEISS, D., 1996, Signal perception, transduction, and gene expression involved in anthocyanin biosynthesis, *Crit. Rev. Plant Sci.*, 15, 525-557.
- MOL, J., GROTEWOLD, E. ve KOES, R., 1998, How genes paint flowers and seeds, *Trends Plant Sci.*, 3, 212-217.
- MONNI, S., UHLIG, C., HANSEN, E. ve MAGEL, E., 2001, Ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to heavy metal pollution, *Environ. Pollut.*, 112, 121-129.
- MORALES, M. ve BARCELO, A.R., 1997, A basic peroxidase isoenzyme from vacuoles and cell walls of *Vitis vinifera*, *Phytochemistry*, 45, 229-232.
- MORELLI, E. ve SCARANO, G., 2004, Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*, *Plant Science*, 167 (2), 289-296.
- MULLIGAN, C.N., YONG, R.N. ve GIBBS, B.F., 2001, Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation, *Eng. Geol.*, 60, 193-207.
- MULLINEAUX, P.L., BALL, C., ESCOBAR, B., KARPINSKA, B., CREISSEN ve KARPINSKI, S., 2000, Are diverse signalling pathways integrated in the regulation of arabidopsis antioxidant defence gene expression in response to excess excitation energy?, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 355 (1402), 1531-1540.
- MUNNÉ-BOSCH, S., 2007,  $\alpha$ -Tocopherol: A multifaceted molecule in plants, *Vitamins & Hormones*, 76, 375-392.
- MUNZUROĞLU, Ö. ve GEÇGİL, H., 2002, Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*, *Environ. Cont. and Toxi.*, 43, 203-213.
- MYLONA, P., POLIDOROS, N. ve SCANDALIOS, J.G., 1998, Modulation of antioxidant responses by arsenic in maize, *Free Radical Biology & Medicine*, 25, 576-585.
- NAGALAKSHMI, N. ve PRASAD, M.N.V., 1998, Copper induced oxidative stress in *Scenedesmus bijugatus*: Protective role of free radical scavengers, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 61, 623-628.
- NAGATA, T., TODORIKI, S., MASUMIZU, T., SUDA, I., FURUTA, S., DU, Z. ve KIKUCHI, S., 2003, Levels of active oxygen species are controlled by ascorbic acid and anthocyanin in *Arabidopsis*, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2992-2999.
- NAKANO, Y. ve ASADA, K., 1981, Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant Cell Physiol.*, 22, 867-880.

NEILL, S.O. ve GOULD, K.S., 2003, Anthocyanins in leaves: Light attenuators or antioxidants? *Funct. Plant Biol.*, 30, 865-873.

NELLESSEN, J.E., ve FLETCHER, J.S., 1993, Assessment of published literature on the uptake, accumulation, and translocation of heavy metals by vascular plants, *Chemosphere*, 27 (9), 1669-1680.

NISHIKAWA, K., YAMAKOSHI, Y., UEMURA, I. ve TOMINAGA, N., 2003, Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 44, 253-259.

NISHIZONO, H., 1987, The role of the root cell wall in the heavy metal tolerance of *Athyrium yokoscense*, *Plant Soil*, 101, 15-20.

NIYOGI, K.K., 1999, Photoprotection revisited: genetic and molecular approach, *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, 50, 333-359.

NOBEL, P.S., 1974, *Introduction to Biophysical Plant Physiology*, Kennedy, D. ve Park, R.B. (eds.), Freeman and Company, San Fransisco.

NOCTOR, G. ve FOYER, C.H., 1998, Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 49, 249-279.

NRIAGU, J.O. ve PACYNA, J.M., 1988, Quantative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals, *Nature* 333, 134-139.

OGRA, Y., AOYAMA, M. ve SUZUKI, K.T., 2006, Protective role of metallothionein against copper depletion, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 451 (2), 112-118.

OKATAN, Y., KAHANAK, G.M. ve NOODEN, L.D., 1981, Characterization and kinetics of soybean maturation and monocarpic senescence, *Physiol. Plant.*, 52, 330-338.

OLMOS, E., PIQUERAS, A., MARTÍNEZ-SOLANO, J.R. ve HELLÍN, E., 1997, The subcellular localization of peroxidase and the implication of oxidative stress in hyperhydric leaves of regenerated carnation plants, *Plant Sci.*, 130, 97-105.

OTTE, M.L., 2001, What is stress to a wetland plant? *Env. Exp. Bot.*, 46 (3), 195-202.

OUZOUNIDOU, G., SYMEONIDIS, L., BABALONAS, D. ve KARATAGLIS, S., 1994, Comparative responses of a copper-tolerant and a copper-sensitive population of *Minuartia hirsuta* to copper toxicity, *J. Plant Physiol.*, 144, 109-115.

OUZOUNIDOU, G., ČIAMPOROVÁ, M., MOUSTAKAS, M. ve KARATAGLIS, S., 1995, Responses of maize (*Zea mays* L.) plants to copper stress- I. Growth, mineral content and ultrastructure of roots, *Env. Exp. Bot.*, 35, 167-176.

PAIVÖKE, A., 1983, Anatomical response of the roots of pea seedlings to lead and arsenate ions, *Ann. Bot. Fenn.*, 20, 307-315.



- PALMA, J.M., GÓMEZ, M. ve del RÍO, J.L.A., 1987, Increased levels of peroxisomal active oxygen-related enzymes in copper tolerant pea plants, *Plant Physiol.*, 85, 570-574.
- PALMA, J.M., SANDALINO, L.M., CORPAS, F.J., ROMERO-PUERTAS, M.C., McCARTHY, I., ve del RIO, L.A., 2002, Plant proteases, protein degradation and oxidative stress: role of peroxisomes, *Plant Physiol. Biochem.*, 40, 521-530.
- PANDIT, B.R. ve PRASANNAKUMAR, P.G., 1999, Effects of metals on jowar (*Sorghum bicolor* L.) seedling growth-I germination, seedling growth and absorption of elements, *Pollut. Research.*, 18, 459-466.
- PANOU-FILOTHEOU, H. ve BOSABALIDIS, A.M., 2004, Root structural aspects associated with copper toxicity in oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*), *Plant Science*, 166 (6), 1497-1504.
- PARSONS, T.R. ve STRICKLAND, J.D.H., 1963, Discussion of spectrophotometric determination of marine pigments with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids, *Journal of Marine Research*, 21, 115-163.
- PEER, W.A., BAXTER, I.R., RICHARDS, E.L., FREEMAN, J.L. ve MURPHY, A.S., 2005, Phytoremediation and hyperaccumulator plants, *Molecular biology of metal homeostasis and detoxification, Topics in Current Genetics*, Springer-Verlag, Berlin.
- PENG, H.-Y., YANG, X.-E., YANG, M.-J. ve TIAN, S.-K., 2006, Responses of antioxidant enzyme system to copper toxicity and copper detoxification in the leaves of *Elsholtzia splendens*, *J.Plant Nutrition* 29, 1619-1635.
- PERALES-VELA, H.V., GONZÁLEZ-MORENO, S., MONTES-HORCASITAS, C. ve CAÑIZARES-VILLANUEVA, R.O., 2007, Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrasatulus* (Chlorophyceae), *Chemosphere*, 67 (11), 2274-2281.
- PHALSSON, A.M.B., 1989, Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants, *Water, Air, Soil Pollut.*, 47, 287-319.
- PIETRINI, F., IANELLI, M.A. ve MASSACCI, A., 2002, Anthocyanin accumulation in the illuminated surface of maize leaves enhances protection from photo-inhibitory risks at low temperature without further limitation to photosynthesis, *Plant Cell Environ.*, 25, 1251-1259.
- PILON, M., ABDEL-GHANY, S.E., COHU, C.M., GOGOLIN, K.A. ve YE, H., 2006, Copper cofactor delivery in plant cells, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9 (3), 256-263.
- POMPELLA, A., 1997, Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 67, 289-297.
- POOAVIAH, B.W. ve LEOPOLD, A.C., 1976, Effects of inorganic salts on tissue permeability, *Plant Physiol.*, 58, 182-185.

POURCEL, L., ROUTABOUL, J.-M., CHEYNIER, V., LEPINIEC, L. ve DEBEAUJON, I., 2007, Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions, *Trends in Plant Science*, 12 (1), 29-36.

PRAKASH, D., SINGH, B.N. VE UPADHYAY, G., 2007, Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (*Allium cepa*), *Food Chemistry*, 102 (4), 1389-1393.

PRASAD, D.D.K ve PRASAD, A.R.K., 1987, Effect of lead and mercury on chlorophyll synthesis in mung bean seedlings, *Phytochemistry*, 26, 881-884.

PRASAD, M.N.V., 2004, *Heavy Metal Stress in Plants, from Biomolecules to Ecosystems* (2<sup>nd</sup> Ed.), Springer, Berlin, 3540401318.

PROCHAZKOVA, D., SAIRAM, R.K., SRIVASTAVA, G.C. ve SINGH, D.V., 2001, Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves, *Plant Sci.*, 161 (4), 765-771.

PRYOR, W.A., 1982, *Free Radicals in Biology*, Academic Press, 0125665059.

PUNTARULO, S., GALLEANO, M., SANCHEZ, R.A. ve BOVERIS, A., 1991, Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination, *Biochim. Biophys. Acta*, 1047, 277-283.

QUINTANILHA, A.T., 1988, *Reactive Oxygen Species in Chemistry, Biology and Medicine*, Plenum Press, 0306428083.

RAMIREZ-TORTOSA, C., ANDERSEN, O.M., GARDNER, P.T., MORRICE, P.C., WOOD, S.G., DUTHE, S.J., COLLINS, A.R. ve DUTHE, G.G., 2001, Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats, *Free Rad. Biol. Med.*, 31, 1033-1037.

RAUSER, W.E., 1999, Structure and function of metal chelators produced by plants, *Cell Biochem. Biophys.*, 31, 19-48.

REDDY, B.V.S., SANJANA REDDY, P., BIDINGER, F. ve BLÜMMEL, M., 2003, Crop management factors influencing yield and quality of crop residues, *Field Crops Research.*, 84 (1-2), 57-77.

REEVES, R. ve BAKER, A., 2000, Metal accumulating plants, In: RASKIN, I. ve ENSLEY, B., Editors, *Phytoremediation of Toxic Metals-Using Plants to Clean Up the Environment*, John Wiley and Sons, New York.

RENNENBERG, H., 1982, Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants, *Phytochemistry*, 21, 2771-2781.

RENNENBERG, H. ve LAMOUREUX, G.L., 1990, Physiological processes that modulate the concentration of GSH in plants, In: RENNENBERG, H., Editor, *Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation*, SPB Academic Publishing, The Hague.

- RICE-EVANS, C., 1995, Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants? *Biochem. Soc. Symp.*, 61, 103-116.
- RICE-EVANS, C., MILLER, N.J. ve PAGANGA, G., 1996, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.
- RICE-EVANS, C., MILLER, N.J. ve PAGANGA, G., 1997, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends Plant Sci.*, 2, 152-159.
- RICE-EVANS, C., 2001, Flavonoid antioxidants, *Curr. Med. Chem.*, 8, 797-807.
- ROBERFROID, M.B., 1995, *Free Radicals and Oxidation Phenomena in Biological Systems*, CRC Press, Boca Raton FL, 0824795873.
- ROSS, M.S., 1994, Sources and form of potentially toxic metals in soil-plant systems, In: ROSS, M.S., Editor, *Toxic Metals in Soil-Plant Systems*, John Wiley, Chichester.
- ROUT, G.R. ve DAS, P., 2003, Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc, *Agronomie*, 23, 3-11.
- SAHI, S.V., ISRAR, M., SRIVASTAVA, A.K., GARDEA-TORRESDEY, J.L. ve PARSONS, J.G., 2007, Accumulation, speciation and cellular localization of copper in *Sesbania drummondii*, *Chemosphere*, 67 (11), 2257-2266.
- SAKIHAMA, Y., MANO, J., SANO, S., ASADA, K. ve YAMASAKI, H., 2000, Reduction of phenoxyl radicals mediated by monodehydroascorbate reductase, *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 279, 949-954.
- SAKIHAMA, Y., MICHAEL, F.C., STEPHEN, C.G. ve YAMASAKI, H., 2002, Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants, *Toxicology*, 177, 67-80.
- SALIN M.L., 1988, Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast, *Physiologia Plantarum*, 72, 681-689.
- SALT, D.E., BLAYLOCK, M., KUMAR, N.P.B.A. ve DUSHENKOV, V., 1995, Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants, *Biotechnology*, 13, 468-474.
- SANCHEZ, M., REVILLA, G. ve ZARRA, I., 1995, Changes in peroxidase activity associated with cell walls during pine hypocotyl growth, *Ann. Bot.* 75, 415-419.
- SANTIAGO, L.J.M., LOURO, R.P. ve DE OLIVEIRA, D.E., 2000, Compartmentation of phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase in leaves of *Phyllanthus tenellus* Roxb. and their induction by copper sulphate, *Annals of Botany*, 86, 1023-1032.
- SARMA, A.D., SREELAKSHMI, Y. ve SHARMA, R., 1997, Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation, *Phytochemistry*, 45 (4), 671-674.

- SARMA, A.D. ve SHARMA, R., 1997, Anthocyanin–DNA copigmentation complex: mutual protection against oxidative damage, *Phytochemistry* 52, 1313-1318.
- SATO, Y., SUGIYAMA, M., GORECKI, R.J., FUKUDA, H. ve KOMAMINE, A., 1993, Interrelationship between lignin deposition and the activities of peroxidase isoenzymes in differentiating tracheary elements of *Zinnia*. Analysis using L-aminooxy-b-phenylpropionic acid and 2-aminoindan-2-phosphonic acid, *Planta*, 189, 584-589.
- SAUNDERS, J.A. ve MCCLURE, J.W., 1975, Phytochrome controlled phenylalanine ammonia lyase activity in *Hordeum vulgare* plastids, *Phytochemistry*, 14, 1285-1289.
- SCANDALIOS, G.D., 1994, Regulation and properties of plant catalases. In: FOYER, C.H. VE MULLINEAUX, P.M., Editors, *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants*, CRC Press, Boca Raton FL.
- SCHÜTZENDÜBEL, A. ve POLLE, A., 2002, Plant responses to abiotic stress. Heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization, *J. Exp. Bot.*, 372, 1351–1365.
- SCHWINN, K.E. ve DAVIES, K.M., 2004, Flavonoids, In: DAVIES, K.M., Editor, *Plant Pigments and their Manipulation*, Blackwell Publishing.
- SGHERRI, C., QUARTACCI, M.F. ve NAVARI-IZZO, F., 2007, Early production of activated oxygen species in root apoplast of wheat following copper excess, *Journal of Plant Physiology*, 164 (9), 1152-1160.
- SHAO, H.B., LIANG, Z.S. ve SHAO, M.A., 2005, Adaptation of higher plants to environmental stresses and stress signal transduction, *Acta Ecol. Sin.*, 25 (7), 1871–1882.
- SHARMA, S.S. ve DIETZ, K.J., 2006, The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptations to heavy metal stress, *J. Exp. Bot.*, 57, 711–726.
- SHETTY, K., 2004, Role of proline-linked pentose phosphate pathway in biosynthesis of plant phenolics for functional food and environmental applications: a review, *Process Biochem.*, 39, 789–804.
- SHIH, M.-K. ve HU, M.-L., 1999, Relative roles of metal ions and singlet oxygen in UVA-induced liposomal lipid peroxidation, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 77 (3-4), 225-230.
- SIES, H., 1991, *Oxidative Stress: Oxidant and Antioxidants*, Academic Press, London.
- SIES, H. ve STAHL, W., 1995, Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants, *Americ. J. Clin. Nutr.*, 62, 1315-1321.
- SIGEL, H. ve SIGEL, A., 1999, *Interrelations Between Free Radicals and Metal Ions in Life Processes*, CRC Press, Boca Raton, FL.

- SINGH, A., SELVI, M.T. ve SHARMA, R., 1999, Sunlight-induced anthocyanin pigmentation in maize vegetative tissues, *J. Exp. Bot.*, 50 (339), 1619-1625.
- SKELLY, J.M., 2003, Native plants as bioindicators of air pollutants: contributed papers to symposium held in conjunction with the 34<sup>th</sup> air pollution workshop, *Environ. Pollut.*, 125, 1-2.
- SMIRNOFF, N. ve CUMBES, Q.J., 1989, Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes, *Phytochemistry*, 28, 1057–1060.
- SMIRNOFF, N., 2005, *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*, Blackwell Publishing, Oxford.
- SON, S. ve LEWIS, B.A., 2002, Free radical scavenging and antioxidant activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationships, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 468-472.
- SONG, J., ZHAO, F.-J., LUO, Y.-M., McGRATH, S.P. ve ZHANG, H., 2004, Copper uptake by *Elsholtzia splendens* and *Silene vulgaris* and assessment of copper phytoavailability in contaminated soils, *Environ. Pollut.*, 128 (3), 307-315.
- SOBRATTEE, M.A., NEERGHEEN, V.S., LUXIMON-RAMMA, A., ARUOMA, O.I. ve BAHORUN, T., 2005, Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions, *Mutation Research*, 579, 200-213.
- SOUZA, J.F. ve RAUSER, W.E., 2003, Maize and radish sequester excess cadmium and zinc in different ways, *Plant Sci.*, 165 (5), 1009-1022.
- SPENCER, J.P.E., KUHNLE, G.G.C., WILLIAMS, R.J. ve RICE-EVANS, C., 2003, Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its *in vivo* metabolites, *Biochem. J.*, 373, 173-181.
- SRIVASTAVA, S., MISHRA, S., TRIPATHI, R.D., DWIVEDI, S. ve GUPTA, K., 2006, Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatins in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle, *Aquatic Toxicology*, 80, 405-415.
- STADTMAN, E.R. ve OLIVER, C.N., 1991, Metal-catalyzed oxidation of proteins, *J. Biol. Chem.*, 266, 2005–2008.
- STADTMAN, E.R., 1992, Protein oxidation and aging, *Science*, 257, 220–1224.
- STAPLETON, A.E. ve WALBOT, V., 1994, Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage, *Plant Physiol.*, 105, 881-889.
- STEFFENS, J.C., 1990, The heavy-metal binding peptides of plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 41, 553–575.

- STEYN, W.J., WAND, S.J.E., HOLCROFT, D.M. ve JACOBS, J., 2002, Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection, *New Phytol.*, 155, 349-351.
- STIBOROVÁ, M., DOUBRAVOVÁ, M., BREZINOVÁ, A. ve FRIEDRICH, A., 1986, Effect of heavy metal ions on growth and biochemical characteristics of photosynthesis of barley *Hordeum vulgare* L., *Photosynthetica*, 20, 418-425.
- STINTZING, F.C., STINTZING, A.S., CARLE, R., FREI, B. ve WROLSTAD, R.E., 2002, Color and antioxidant properties of cyanidin-based antocyanin pigments, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6172-6181.
- STOCHS S.J. ve BAGACHI, D., 1995, Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions, *Free Rad. Biol. Med.*, 18, 321-336.
- SULLIVAN, J., 1998, Anthocyanins, *Science*, 1, 1-3.
- SUMMER, J.B. ve DOUNCE, A.L., 1937, Crystalline catalase, *J. Biol. Chem.*, 121, 417.
- SÜZER, S., 2004, Mısır Tarımı, *Trakya Tarımsal Enstitüsü Yayınları*.
- SYNGE, R. L. M., 1975, Reactions of plant proteins with oxidation products of polyphenols, *Phytochemistry*, 14 (3), 859.
- TAKAHAMA, U. ve ONIKI, T., 1992, Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics in the apoplast of spinach leaves by ascorbate, *Plant Cell Physiol.*, 33 379-387.
- TAKAHAMA, U. ve ONIKI, T., 2000, Flavonoids and some other phenolics as substrates of peroxidase: physiological significance of the redox reactions, *J. Plant Res.*, 113, 310-309.
- TAKAHAMA, U., 2004, Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: physiological significance of the oxidation reactions, *Phytochem. Rev.*, 3, 207-219.
- TAKEDA, K., YANAGISAWA, M., KIFUNE, T., KINOSHITA, T. ve TIMBERLAKE, C.F., 1994, A blue pigment complex in flowers of *Salvia patens*, *Phytochemistry*, 35, 1167-1174.
- TANI, F.H. ve BARRINGTON, S., 2005, Zinc and copper uptake by plants under two transpiration rates. Part I. Wheat (*Triticum aestivum* L.), *Environ. Pollut.*, 138 (3), 538-547.
- TANYOLAÇ, D., EKMEKÇİ, Y. ve ÜNALAN, S., 2007, Changes in photochemical and antioxidant enzyme activities in maize (*Zea mays* L.) leaves exposed to excess copper, *Chemosphere*, 67, 89-98.

- THOMÉ, O.W., 1885, Image of *Zea mays* (Gramineae), [online], Gera, Germany, [www.plant-pictures.de](http://www.plant-pictures.de) [Ziyaret tarihi: 16 Mayıs 2007].
- TOMSETT A.B. ve THURMAN D.A., 1988, Molecular biology of metal tolerances of plants, *Plant, Cell and Environment*, 11, 383–394.
- TREUTTER, D., 2006, Significance of flavonoids in plant resistance: a review, *Environ. Chem. Lett.*, 4, 147–157.
- TSUDA, T., SHIGA, K., OHSHIMA, K., KAWAKISHI, S. ve OSAWA, T., 1996, Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L., *Biochemical Pharmacology*, 52, 1033-1039.
- TUKENDORF, A., 1987, Copper binding in roots by cytosol proteins *in vitro*, *J. Plant Physiol.*, 130, 201-209.
- URIU-ADAMS, J.Y., ve KEEN, C.L., 2005, Copper, oxidative stress, and human health, *Molecular Aspects of Medicine*, 26 (4-5), 268-298.
- VAKNIN, H., BAR-AKIVA, A., OVADIA, R., NISSIM-LEVI, A., FORER, I, WEISS, D ve OREN-SHAMIR, M., 2005, Active anthocyanin degradation in *Brunfelsia calycina* (yesterday-today-tomorrow) flowers, *Planta*, 222, 19–26.
- VALKO, M., RHODES, C.J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M. VE MAZUR, M., 2006, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemico-Biological Interactions*, 160 (1), 1-40.
- VAN ASSCHE, F. ve CLIJSTERS, H.M.M., 1990, Effects of metals on enzyme activity in plants, *Plant Cell Environ.*, 13, 195-206.
- VAN MONTAGUE, M. ve INZE, D., 2002, *Oxidative Stress in Plants*, CRC Press, Boca Raton FL, 0415272149.
- VASSILEV, A., 1997, Analysis of the growth and photosynthetic activity in winter barley (*H. vulgare* L.) in condition of toxicity of Cd, PhD thesis, Inst. of Plant Physiol., Sofia.
- VAZQUEZ, M.D., POSCHENRIEDER, Ch., ve BARCELO, J., 1987, Chromium VI induced structural and ultrastructural changes in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.), *Ann. Bot.*, 59, 427-438.
- VELIKOVA, V., YORDANOV, I. ve EDREVA, A., 2000, Oxidative stress and some antioxidant system in acid treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines, *Plant Sci.*, 151, 59-66.
- VERKLEIJ, J.A.C. ve SCHAT, H., 1990, Mechanisms of metal tolerance in higher plants, In: SHAW, A.J., Editor, *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*, CRC Press, Boca Raton FL.

- VINIT-DUNAND, F., EPRON, D., ALAOUI-SOSSE, B. ve BADOT, P.M., 2002, Effects of copper on growth and on photosynthesis of mature and expanding leaves in cucumber plants, *Plant Sci.*, 163, 53–58.
- WANG, H., CAO, G. ve PRIOR, R.L., 1997, Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 304-309.
- WANG, S.-H., YANG, Z.-M., YANG, H., LU, B., LI, S.-Q. ve LU, Y.P., 2004, Copper-induced stress and antioxidative responses in roots of *Brassica juncea* L., *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45, 203-212.
- WARE, G.W., 2000, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Springer Publishing, 0387950133.
- WECKX, J.E.J. ve CLIJSTERS, H.M.M., 1996, Oxidative damage and defense mechanism in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as a result of root assimilation of toxicity amounts of copper, *Physiol. Plant.*, 96, 506-512.
- WIERZBICKA, M., 1999, The effect of lead on the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* L., *Protoplasma*, 207, 186-194.
- WILLEKENS, H., CHAMNONGPOL, S., DAVEY, M., SCHRAUDNER, M., LANGEBARTELS, C., MONTAGU, M.V., INZÉ D. ve CAMP, W.V., 1997, Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C<sub>3</sub> plants, *EMBO J.*, 16, 4806–4816.
- WILLIAMS, R.J., SPENCER, J.P.E. ve RICE-EVANS, C., 2004, Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology & Medicine*, 36, 838-849.
- WINKEL-SHIRLEY, B., 1998, Flavonoid in seeds and grains: physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis, *Seed Science Research*, 8, 415-422.
- WINKEL-SHIRLEY, B., 2001, Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology, *Plant Physiol.*, 126, 485-493.
- WINKEL-SHIRLEY, B., 2002, Biosynthesis of flavonoids and effects of stress, *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 218-223.
- WINKEL-SHIRLEY, B.S.J., 2006, The biosynthesis of flavonoids. In: GROTEWOLD, E., Editor, *The Science of Flavonoids*, Springer Publishing.
- WISNIEWSKI, L. ve DICKINSON, N.M., 2003, Toxicity of copper to *Quercus robur* (English Oak) seedlings from a copper-rich soil, *Environ. and Exp. Bot.*, 50, 99-107.
- WOHLRAB, H. ve JACOBS, E.E., 1967, Copper-deficient mitochondria electron transport and oxidative phosphorylation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 28 (6), 998-1002.



WU, J.T., HSIEH, M.T. ve KOW, L.C., 1998, Role of proline accumulation in response to toxic copper in *Chlorella* sp. (Chlorophyceae) cells, *J. Phycol.*, 34, 113-117.

XIONG, Z.-T., LIU, C. ve GENG, B., 2006, Phytotoxic effects of copper on nitrogen metabolism and plant growth in *Brassica pekinensis* Rupr., *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64 (3), 273-280.

YAĞMUR, B., HAKERLERLER, H., GÜREL, A. ve EDREVA, A., 2003, Reddening of cotton in aegean region, Turkey, *J. Balk. Ecol.*, 6, 147-156.

YAMAKAWA, T., KATO, S., ISHIDA, K., KODAMA, T. ve MONODA, Y., 1983, Production of anthocyanins by *Vitis* cells in suspension culture, *Agric. Biol. Chem.*, 47, 2185-2191.

YAMAMOTO, Y., HACHIA, A., ve MATSUMOTO, H., 1997, Oxidative damage to membrane by a combination of aluminum and iron in suspension-cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol.*, 38, 1333-1339.

YAMAMOTO, Y., HACHIA, A., HAMADA, H. ve MATSUMOTO, H., 1998, Phenylpropanoids as a protectant of aluminum toxicity in cultured tobacco cells, *Plant Cell Physiol.*, 39, 950-957.

YAMAMOTO, N., MOON, J.H., TSUSHIDA, T., NAGAO, A. ve TERAU, J., 1999, Inhibitory effect of quercetin metabolites and their related derivatives on copper ion-induced lipid peroxidation in human low-density lipoprotein. *Arch. Biochem. Biophys.*, 372, 347-354.

YAMASAKI, H., 1997, A function of color, *Trends Plant Sci.*, 2, 7-8.

YAMASAKI, H., SAKIHAMA, Y. ve IKEHARA, N., 1997, Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *Plant Physiol.*, 115, 1405-1412.

YAMASAKI, H. ve GRACE, S.C., 1998, EPR detection of phytophenoxyl radicals stabilized by zinc ions: evidence for the redox coupling of plant phenolics with ascorbate in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-peroxidase system, *FEBS Letters*, 422 (3), 377-380.

YAN, B., DAI, Q., LIU, X., HUANG, S. ve WANG, Z., 1996, Flooding-induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves, *Plant Soil*, 179, 261-268.

YENTÜR, S., 2003, *Bitki Anatomisi*, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İstanbul, 975-404-351-5.

YOUNG, A.J. ve BRITTON, G., 1993, *Carotenoids and Photosynthesis*, Chapman and Hall, London.

YRUELA, I., 2005, Copper in plants, *Braz. J. Plant Physiol.*, 17, 145-156.

ZANCANI, M. ve NAGY, G., 2000, Phenol-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> breakdown by soybean root plasma membrane-bound peroxidase is regulated by ascorbate and thiols, *J. Plant Physiol.*, 156, 295-299.

ZHANG, Z.Q., PANG, X.Q., JI, Z.L. ve JIANG, Y.M., 2001, Role of anthocyanin degradation in litchi pericarp browning, *Food Chemistry*, 75, 217–221.

ZHANG, F.-Q., WANG, Y.-S., ZHI-PING LOU, Z.-P. ve DONG, J.-D., 2007, Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*), *Chemosphere*, 67 (1), 44-50.

ZENK, M.H., 1996, Heavy metal detoxification in higher plants—a review, *Gene*, 179, 21–30.

ZIELINSKI, H. ve KOZLOWSKA, H., 2000, Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2008-2016.

## ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Tokat'ta doğdum. İlk ve orta öğrenimimi 1988 yılında Tokat Cumhuriyet İlkokulu, 1995 yılında İstanbul Kartal Burak Bora Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 1995-1996 öğretim yılında başladığım İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'ndeki lisans eğitiminden 1999 yılında mezun oldum. 2000 yılında İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Bitki Fizyolojisi Programında, Prof.Dr. Semahat Yentür danışmanlığında "Yüksek Bitkilerde Tuz Stresi ile Antosiyan İçeriği Arasındaki İlişkiler" konulu yüksek lisans tezime başladım ve 2003 yılında tamamladım. Aynı yıl İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Bitki Fizyolojisi Programında doktora eğitimime başladım ve 2005 yılında girdiğim doktora yeterlilik sınavında başarılı olup, Prof.Dr. Semahat Yentür danışmanlığında "Bakır (Cu) Uygulanmış Mısır (*Zea mays* L.) Fidelerindeki Antioksidan Aktivitelerin Fizyolojik ve Anatomik Yönden İncelenmesi" konulu doktora tezime başladım.

1999 yılında İ.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandım ve halen görevime devam etmekteyim.

1999 yılından itibaren Lisans düzeyinde "Genel Biyoloji I ve II", "Genel Botanik", "Bitki Morfolojisi ve Sistematiği", "Bitki Embriyolojisi", "Bitki Anatomisi", "Bitki Fizyolojisi", "Bitki Hormonları" ve Genetik I Laboratuvarlarının uygulamalarında görev almaktayım.

Federation of European Societies of Plant Physiology (FESPP) üyesiyim. 2005 yılında Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi "Başarılı Araştırmacı Belgesi" ödülü aldım.