

*Brassica oleracea* L. var. *acephala* ve *Silene vulgaris*  
(Moench) Garcke var. *vulgaris* BİTKİLERİNE  
BAKIR VE KADMIYUMUN ETKİLERİ

EMEL DEMİR

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Doktora Tez Çalışması Ondokuz Mayıs Üniversitesi 1904.09-003' nolu Proje ile Desteklenmiştir.

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Brassica oleracea* L. var. *acephala*

VE

*Silene vulgaris* (Moench) Garcke var. *vulgaris*

BİTKİLERİNE BAKIR VE KADMIYUMUN ETKİLERİ

EMEL DEMİR

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AKADEMİK DANIŞMAN

Doç. Dr. Yasemin ÖZDENER

SAMSUN - 2011

**T.C.**  
**ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Bu çalışma jürimiz tarafından 14/10/2011 tarihinde yapılan sınav ile Biyoloji Anabilim Dalı'nda DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Hamdi Güray KUTBAY

Üye : Prof. Dr. Gülcan ŞENEL

Üye : Doç. Dr. Yasemin ÖZDENER

Üye : Doç. Dr. Fatma AYGÜN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Birsen AYDIN

ONAY :

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

..../..../2011

Prof. Dr. Ümit SERDAR  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

***Brassica oleracea* L. var. *acephala* ve *Silene vulgaris* (Moench) Garcke var. *vulgaris*  
BİTKİLERİNE BAKIR VE KADMIYUMUN ETKİLERİ**

**ÖZ**

Bu çalışmada, *Brassica oleracea* var. *acephala* ve *Silene vulgaris* var. *vulgaris* bakır ve kadmiyumun farklı derişimlerinin (100, 200 ve 400 µg gr<sup>-1</sup>) etkisinde 15 gün süreyle bırakılmıştır. Uygulama sonunda bakır (Cu) ve kadmiyumun(Cd) yapraklardaki pigment ve protein içeriğine, lipit peroksidasyonuna, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidantlara etkisi araştırılmış ve ayrıca kök ve yapraklardaki Cu ve Cd içerikleri belirlenmiştir.

Cu ve Cd uygulamaları pigment ve karotenoid içeriğinde değişikliğe neden olmamıştır. Her iki bitkide de kök ve yapraklardaki Cu içeriği artmış, bu artışın köklerde daha fazla olduğu görülmüştür. *Brassica oleracea* var. *acephala*'da Cd içeriği köklerde yapraklara göre daha yüksektir. Bununla birlikte, *Silene vulgaris* var. *vulgaris*'de kök ve yapraklardaki Cd içeriği birbirine yakın bulunmuştur.

Tüm uygulamalar yapraklarda lipit peroksidasyon ürününün (malondialdehit) artmasına neden olmuştur. Her iki bitkide de 400 µg gr<sup>-1</sup> Cu ve Cd derişiminde malondialdehit seviyesi önemli ölçüde artmıştır.

*Brassica oleracea* var. *acephala*'da prolin içeriği Cu ve Cd uygulamasında azalırken, *Silene vulgaris* var. *vulgaris*'de 100 µg gr<sup>-1</sup> Cu ve 200 µg gr<sup>-1</sup> Cd'de artış gözlenmiştir. Protein olmayan –SH gruplarının içeriği yalnızca Cd uygulaması sonucunda *Brassica oleracea* var. *acephala*'da artmıştır. Toplam askorbat içeriği, *Brassica oleracea* var. *acephala*'da Cd uygulaması sonucu artarken, 100 ve 200 µg g<sup>-1</sup> Cu derişimlerinde önemli derecede azalmıştır. *Silene vulgaris* var. *vulgaris*'de en önemli artış 400 µg g<sup>-1</sup> Cd ve Cu derişimlerinde görülmüştür.

Cu ve Cd stresi antioksidant enzimlerin aktivitelerinde değişikliklere neden olmuştur. Tüm bu uygulamalar derişime bağlı olarak süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinde azalma, guaiacol peroksidaz (GPOX) aktivitesinde artışa neden olmuştur. Bununla birlikte, katalaz (CAT) aktivitesinde bir değişiklik görülmemiştir. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi *Silene vulgaris* var. *vulgaris*'e Cu ve Cd uygulamasında artmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Brassica oleracea* L. var. *acephala*, *Silene vulgaris* (Moench) Garcke var. *vulgaris*, bakır, kadmiyum.



## THE COPPER AND CADMIUM EFFECTS ON *Brassica oleracea* L. var. *acephala* AND *Silene vulgaris* (Moench) Garcke var. *vulgaris* PLANTS

### ABSTRACT

In this study, *Brassica oleracea* L. var. *acephala* and *Silene vulgaris* (Moench) Garcke var. *vulgaris* were treated with different cadmium (Cd) and copper (Cu) concentrations (100, 200 ve 400  $\mu\text{g gr}^{-1}$ ) for 15 days. At the end of the treatment, the effects of Cu and Cd pigment and protein content, lipid peroxidation, enzymatic and nonenzymatic antioxidants were investigated in leaves and also determined Cu and Cd contents in theirs leaves and roots.

The pigment and carotenoid contents did not vary in Cu and Cd treatments. The Cu content increased in the roots and leaves in both plants and a marked increased in roots was seen. The Cd content in roots in *Brassica oleracea* var. *acephala* was higher compared with leaves. However, Cd content in roots and leaves in *Silene vulgaris* var. *vulgaris* were found similar.

All treatments caused an increase in the lipid peroxidation product (malondialdehyde) in leaves. In both plants, malondialdehyde content increased significantly at 400  $\mu\text{g gr}^{-1}$  Cu and Cd treatments.

While proline content was decreasing in Cu and Cd treatments in *Brassica oleracea* var. *acephala*, increased at 100  $\mu\text{g gr}^{-1}$  Cu ve 200  $\mu\text{g gr}^{-1}$  Cd in *Silene vulgaris* var. *vulgaris*. Non-protein –SH groups content only enhanced in Cd treatment in *Brassica oleracea* var. *acephala*. Total ascorbate content was increasing as a result of Cd treatment, it decreased significantly at 100 and 200  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cu concentrations in *Brassica oleracea* var. *acephala*. The most significant increase 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cd ve Cu treatments was seen in *Silene vulgaris* var. *vulgaris*.

Cu and Cd stress caused changes in antioxidant enzymes activities. All these treatments depend on concentration caused decrease in superoxide dismutase (SOD) activity, increase in guaiacol peroxidase(GPOX) activity. However, there was no significant change in catalase (CAT) activity. Ascorbate peroxidase (APX) activity increased in Cu and Cd treatments in *Silene vulgaris* var. *vulgaris*.

**Key words:** *Brassica oleracea* L. var. *acephala*, *Silene vulgaris* (Moench) Garcke var. *vulgaris*, copper, cadmium.

## TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım süresince yakın ilgi, özveri ve desteklerini gördüğüm fikir ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocam sayın Doç. Dr. Yasemin ÖZDENER'e,

Çalışmalarım süresince yardımlarını benden esirgemeyen bölüm hocalarıma,

Birçok sıkıntıyı beraber paylaştığım ve çalışmalarım süresince hiçbir konuda yardımlarını benden esirgemeyen tüm bölüm arkadaşlarıma,

Çalışmalarım boyunca tüm sıkıntılarımı, heyecan ve mutluluğumu benimle paylaşan, yardım ve desteğini esirgemeyen eşim Murat DEMİR ve oğlum Kaan DEMİR'e,

Maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim başta annem ve babam olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**İÇİNDEKİLER**

|  |    |
|--|----|
| 1. GİRİŞ.....  | 1  |
| 2. GENEL BİLGİLER.....   | 4  |
| 2.1. Ağır Metaller .....   | 4  |
| 2.2. Ağır Metal Toksisitesi.....                                   | 4  |
| 2.3. Ağır Metallerin Bitkiler Tarafından Alınması .....            | 8  |
| 2.3.1. Köklerle Alınım .....                                       | 8  |
| 2.3.2. Ağır Metallerin Taşınımı.....                               | 9  |
| 2.3.3. Ağır Metale Dayanıklılık.....                               | 9  |
| 2.4. Kadmiyum.....   | 10 |
| 2.4.1 Bitkilerde Kadmiyum Toksisitesinin Etkileri.....             | 11 |
| 2.4.2. Hüresel Düzeyde Kadmiyum Stresine Cevap Mekanizmaları ..... | 12 |
| 2.4.2.1. İmmobilizasyon.....                                       | 12 |
| 2.4.2.2. Hücre içine alınmama.....                                 | 13 |
| 2.4.2.3. Fitoşelatinler .....                                      | 13 |
| 2.4.2.4. Belli Bölgelerde Tutma .....                              | 14 |
| 2.4.2.5. Metalotiyoneinler .....                                   | 15 |
| 2.4.2.6. Stres Proteinleri.....                                    | 15 |
| 2.4.2.7. Etilen Sentezi .....                                      | 15 |
| 2.5. Bakır.....  | 16 |
| 2.5.1. Biyokimyasal Fonksiyonları.....                             | 17 |
| 2.5.2. Bitkilerde Bakır Eksikliği.....                             | 19 |
| 2.5.3. Bakırın Bitkilere Toksik Etkileri .....                     | 20 |
| 2.6. Oksijen ve Oksidatif Stres.....                               | 22 |
| 2.6.1. Serbest Radikaller .....                                    | 23 |
| 2.6.2. Reaktif Oksijen Türleri (ROT) .....                         | 24 |
| 2.6.2.1. Süperoksit Radikalleri ( $O_2^-$ ) .....                  | 25 |
| 2.6.2.2. Singlet Oksijen ( $^1O_2$ ).....                          | 26 |
| 2.6.2.3. Hidrojen Peroksit ( $H_2O_2$ ).....                       | 27 |
| 2.6.2.4. Hidroksil Radikali (OH) .....                             | 28 |
| 2.6.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Üretimi.....                     | 29 |
| 2.6.3.1. Kloroplastlarda Reaktif Oksijen Üretimi.....              | 29 |

|   |    |
|---|----|
| 2.6.3.2. Peroksizomlarda Reaktif Oksijen Üretimi.....                 | 31 |
| 2.6.3.3. Mitokondrilerde Reaktif Oksijen Üretimi .....                | 32 |
| 2.6.3.4. Diğer Reaktif Oksijen Üretim Kaynakları.....                 | 33 |
| 2.6.4. Oksidatif Stres ve Hücre Biyokimyası.....                      | 34 |
| 2.6.4.1. Lipit Peroksidasyonu (LPO).....                              | 34 |
| 2.6.4.2. Protein Oksidasyonu.....                                     | 37 |
| 2.6.4.3. DNA Oksidasyonu .....  | 37 |
| 2.6.5. Bitkilerde Antioksidant Savunma Sistemleri .....               | 38 |
| 2.6.5.1. Enzimatik Antioksidantlar .....                              | 39 |
| 2.6.5.1. Enzimatik Olmayan Antioksidantlar .....                      | 42 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....   | 48 |
| 3.1. Materyal .....   | 48 |
| 3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....                             | 48 |
| 3.1.2. Kullanılan Cihazlar .....                                      | 50 |
| 3.1.3. Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Ağır Metal Uygulanması.....       | 51 |
| 3.2. Yöntemler.....   | 51 |
| 3.2.1. Pigmentlerin Belirlenmesi.....                                 | 52 |
| 3.2.2. Cd ve Cu İçeriğinin Belirlenmesi .....                         | 52 |
| 3.2.3. Lipit Peroksidasyonu.....                                      | 53 |
| 3.2.4. Prolinin Belirlenmesi .....                                    | 54 |
| 3.2.5. Protein Olmayan Tiyol (–SH) Gruplarının Belirlenmesi .....     | 54 |
| 3.2.6. Askorbik Asit Analizi .....                                    | 54 |
| 3.2.7. Enzim Aktiviteleri İçin Ekstraksiyon.....                      | 55 |
| 3.2.8. Protein Tayini .....   | 56 |
| 3.2.9. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi .....                       | 58 |
| 3.2.9.1. Katalaz Aktivite Tayini .....                                | 58 |
| 3.2.9.2. Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini .....                    | 59 |
| 3.2.9.3. Guaiacol Peroksidaz Aktivite Tayini .....                    | 60 |
| 3.2.9.4. Askorbat Peroksidaz Aktivite Tayini .....                    | 61 |
| 3.2.10. Native Page Yöntemi ile SOD İzoenzimlerinin Belirlenmesi..... | 62 |
| 3.2.11. İstatistiksel Analizler.....                                  | 62 |

|  |     |
|--|-----|
| 4. BULGULAR.....   | 63  |
| 4.1. <i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i> .....             | 63  |
| 4.1.1. Kadmiyumun Etkileri.....                                      | 63  |
| 4.1.1.1. Pigment İçeriği.....  | 63  |
| 4.1.1.2. Cd İçeriği .....  | 65  |
| 4.1.1.3. Lipit Peroksidasyonu.....                                   | 66  |
| 4.1.1.4. Protein İçeriği.....  | 67  |
| 4.1.1.5. Prolin İçeriği .....  | 68  |
| 4.1.1.6. Protein Olmayan –SH Grupları.....                           | 69  |
| 4.1.1.7. Askorbat.....   | 70  |
| 4.1.1.8. Antioksidant Enzim Aktivitesi.....                          | 71  |
| 4.1.2. Bakırın Etkileri .....  | 75  |
| 4.1.2.1. Pigment İçeriği.....  | 75  |
| 4.1.2.2. Cu İçeriği .....  | 76  |
| 4.1.2.3. Lipit Peroksidasyonu.....                                   | 77  |
| 4.1.2.4. Protein İçeriği.....  | 78  |
| 4.1.2.5. Prolin İçeriği .....  | 79  |
| 4.1.2.6. Protein Olmayan –SH Grupları.....                           | 80  |
| 4.1.2.7. Askorbat.....   | 81  |
| 4.1.2.8. Antioksidant Enzim Aktivitesi.....                          | 83  |
| 4.1.3. Native Page Yöntemiyle SOD İzoenzimlerinin Belirlenmesi ..... | 87  |
| 4.2. <i>Silene vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i> .....               | 88  |
| 4.2.1. Kadmiyumun Etkileri.....                                      | 88  |
| 4.2.1.1. Pigment İçeriği.....  | 88  |
| 4.2.1.2. Cd İçeriği .....  | 90  |
| 4.2.1.3. Lipit Peroksidasyonu.....                                   | 91  |
| 4.2.1.4. Protein İçeriği.....  | 92  |
| 4.2.1.5. Prolin İçeriği .....  | 93  |
| 4.2.1.6. Protein Olmayan –SH Grupları.....                           | 94  |
| 4.2.1.7. Askorbat.....   | 95  |
| 4.2.1.8. Antioksidant Enzim Aktiviteleri .....                       | 96  |
| 4.2.2. Bakırın Etkieri .....   | 100 |
| 4.2.2.1. Pigment İçeriği.....  | 100 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.2.2.2. Cu İçeriği .....   | 101 |
| 4.2.2.3. Lipit Peroksidasyonu.....                                  | 102 |
| 4.2.2.4. Protein İçeriği.....                                       | 103 |
| 4.2.2.5. Prolin İçeriği .....                                       | 104 |
| 4.2.2.6. Protein Olmayan –SH Grupları.....                          | 105 |
| 4.2.2.7. Askorbat.....  | 106 |
| 4.2.2.8. Antioksidant Enzim Aktiviteleri.....                       | 107 |
| 4.2.3. Native Page Yöntemiyle SOD İzoenzimlerinin Belirlenmesi..... | 111 |
| 5. TARTIŞMA .....   | 112 |
| 5.1. Pigment İçeriği .....  | 112 |
| 5.2. Cd ve Cu İçeriği.....  | 113 |
| 5.3. Lipit Peroksidasyonu .....                                     | 114 |
| 5.4. Protein İçeriği.....   | 115 |
| 5.5. Prolin İçeriği.....  | 116 |
| 5.6. Protein Olmayan –SH Grupları .....                             | 117 |
| 5.7. Askorbat .....   | 118 |
| 5.8. Antioksidant Enzim Aktiviteleri.....                           | 119 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....   | 124 |
| 7. KAYNAKLAR .....  | 128 |
| ÖZGEÇMİŞ .....  | 141 |

**SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ****Simgeler**

|                               |                           |
|-------------------------------|---------------------------|
| Ag                            | : Gümüş                   |
| As                            | : Arsenik                 |
| B                             | : Bor                     |
| Ca                            | : Kalsiyum                |
| Cd                            | : Kadmiyum                |
| Co                            | : Kobalt                  |
| Cr                            | : Krom                    |
| Cu                            | : Bakır                   |
| Fe                            | : Demir                   |
| g                             | : Gram                    |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | : Hidrojen peroksit       |
| Hg                            | : Civa                    |
| K                             | : Potasyum                |
| Li                            | : Lityum                  |
| mL                            | : Mililitre               |
| Mn                            | : Mangan                  |
| Mo                            | : Molibden                |
| mV                            | : Milivolt                |
| Ni                            | : Nikel                   |
| O <sub>2</sub>                | : Moleküler oksijen       |
| O <sub>2</sub> <sup>-</sup>   | : Süperoksit              |
| <sup>1</sup> O <sub>2</sub>   | : Singlet oksijen         |
| OH <sup>·</sup>               | : Hidroksil radikali      |
| Pb                            | : Kurşun                  |
| R <sup>·</sup>                | : Lipit alkil radikali    |
| RO <sup>·</sup>               | : Alkoksil radikali       |
| ROO <sup>·</sup>              | : Lipit peroksil radikali |
| ROOR                          | : Peroksit dimeri         |
| U                             | : Uranyum                 |

|               |               |
|---------------|---------------|
| V             | : Volt        |
| Zn            | : Çinko       |
| $\mu\text{g}$ | : Mikrogram   |
| $\mu\text{M}$ | : Mikromolar  |
| $\mu\text{s}$ | : Mikrosaniye |

### **Kısaltmalar**

|       |   |
|-------|---|
| A     | : Absorbans                             |
| AA    | : Askorbik asit                         |
| APX   | : Askorbat peroksidaz                   |
| AsA   | : Askorbat                              |
| CAT   | : Katalaz                               |
| Cys   | : Sistein                               |
| D     | : Dalga boyu                            |
| dak   | : Dakika                                |
| DHA   | : Dehidroaskorbat                       |
| DHAR  | : Dehidroaskorbat redüktaz              |
| DNA   | : Deoksiribonükleotit asit              |
| DTNB  | : 5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik Asit) |
| DTT   | : Ditiyotreitol                         |
| EDTA  | : Etilendiamin tetraasetik asit         |
| FŞ    | : Fitoşelatin                           |
| Glu   | : Glutamin                              |
| Gly   | : Glisin                                |
| GPOX  | : Guaiacol peroksidaz                   |
| GR    | : Glutasyon redüktaz                    |
| GSH   | : Glutasyon                             |
| K.A.  | : Kuru ağırlık                          |
| kDA   | : Kilodalton                            |
| MDA   | : Malondialdehit                        |
| MDHA  | : Monodehidroaskorbat                   |
| MDHAR | : Monodehidroaskorbat redüktaz          |
| MT    | : Metalotiyonein                        |



|       |   |
|-------|---|
| NADH  | : Nikotinamid adenin dinükleotid                |
| NADPH | : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat         |
| NBT   | : Nitro blue tetrazolyum klorür                 |
| NEM   | : N-Etilmalaimid                                |
| MDA   | : Malondialdehit                                |
| PAGE  | : Poliakrilamid jel elektroforezi               |
| ppm   | : Milyonda bir kısım çözelti (Part per million) |
| PSI   | : Fotosistem I                                  |
| PSII  | : Fotosistem II                                 |
| PUFA  | : Çoklu doymamış yağ asiti                      |
| PVPP  | : Polivinilpolipirolidon                        |
| RNA   | : Ribonükleotit asit                            |
| ROT   | : Reaktif oksijen türleri                       |
| -SH   | : Sülfidril grubu                               |
| SOD   | : Süperoksit dismutaz                           |
| T.A.  | : Taze ağırlık                                  |
| TEMED | : Tetra metil etilen diamin                     |
| Tyr   | : Tirozin                                       |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|  |    |
|--|----|
| Şekil 2.1. Metallerin kaynakları.....  | 5  |
| Şekil 2.2. Ağır metale bağlı olarak meydana gelen başlıca mekanizmalar.....                | 7  |
| Şekil 2.3. Kadmiyumun şelatlanması ve vakuolde kompartimentalizasyonunun.....              | 14 |
| mekanizmaları  |    |
| Şekil 2.4. Bitki hücrelerinde Cu için tanımlanan taşınım yolları.....                      | 16 |
| Şekil 2.5. Bitki hücrelerinde bakırın içinde bulunduğu biyokimyasal süreçler.....          | 18 |
| Şekil 2.6. Bitkilerde fotosistem II'de Cu toksisitesinin etkilediği alanlar.....           | 21 |
| Şekil 2.7. Farklı reaktif oksijen türlerinin enerji transferi yoluyla oluşumu.....         | 24 |
| Şekil 2.8. Bitki hücrelerinde ROT oluşum alanları ve kaynakları.....                       | 29 |
| Şekil 2.9. Yüksek ışık yoğunluğunda kloroplastlarda ve peroksizomlarda.....                | 30 |
| ROT'ların üretilmesine neden olan fotosentetik elektron taşınmasının başlıca özellikleri   |    |
| Şekil 2.10. Hücrenin farklı bölümlerinde ROT oluşum oranları.....                          | 33 |
| Şekil 2.11. Lipit peroksidasyonunun mekanizması.....                                       | 36 |
| Şekil 2.12. Protein oksidasyonu.....   | 37 |
| Şekil 2.13. ROT ve antioksidant savunma mekanizması.....                                   | 38 |
| Şekil 2. 14. Askorbat-glutasyon döngüsü.....   | 42 |
| Şekil 2.15. Askorbik asidin yapısı ve oksidasyon ürünleri.....                             | 43 |
| Şekil 2.16. a) L-prolin ve b) hidroksiprolinin yapısı.....                                 | 46 |
| Şekil 2.17. Bitkilerde prolinin biyosentetik yolu.....                                     | 46 |
| Şekil 2.18. Bitkilerde prolinin farklı fonksiyonları.....                                  | 47 |
| Şekil 3.1. MDA standart grafiği.....   | 53 |
| Şekil 3.2. BSA standart grafiği.....   | 57 |
| Şekil 4.1. Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> ..... | 64 |
| var. <i>acephala</i> yapraklarında klorofil-a, klorofil-b ve karotenoid içeriği            |    |
| Şekil 4.2. Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> ..... | 65 |
| var. <i>acephala</i> 'nın kök ve yapraklarındaki Cd içeriği                                |    |
| Şekil 4.3 Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....  | 66 |
| var. <i>acephala</i> yapraklarında lipit peroksidasyonu                                    |    |
| Şekil 4.4. Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> ..... | 67 |
| var. <i>acephala</i> yapraklarında protein içeriği   |    |

|   |  |
|---|--|
| <b>Şekil 4.5.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....68<br>var. <i>acephala</i> yapraklarında prolin içeriği  |  |
| <b>Şekil 4.6.</b> Cd 'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....69<br>var. <i>acephala</i> yapraklarında -SH grupları   |  |
| <b>Şekil 4.7.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....70<br>var. <i>acephala</i> yapraklarında dehidroaskorbat (DAsA), askorbat (AsA) ve toplam askorbat (AsA+DAsA) içerikleri |  |
| <b>Şekil 4.8.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....71<br>var. <i>acephala</i> yapraklarında CAT aktivitesi  |  |
| <b>Şekil 4.9.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....72<br>var. <i>acephala</i> yapraklarında SOD aktivitesi  |  |
| <b>Şekil 4.10.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....73<br>var. <i>acephala</i> yapraklarında APX aktivitesi   |  |
| <b>Şekil 4.11.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....74<br>var. <i>acephala</i> yapraklarında GPOX aktivitesi  |  |
| <b>Şekil 4.12.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....75<br>var. <i>acephala</i> yapraklarında klorofil-a, klorofil-b, k1a/k1b ve karotenoid içeriği                          |  |
| <b>Şekil 4.13.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....76<br>var. <i>acephala</i> kök ve yapraklardaki Cu içeriği  |  |
| <b>Şekil 4.14.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....77<br>var. <i>acephala</i> yapraklarında lipit peroksidasyonu   |  |
| <b>Şekil 4.15.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....78<br>var. <i>acephala</i> yapraklarında protein içeriği  |  |
| <b>Şekil 4.16.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....79<br>var. <i>acephala</i> yapraklarında prolin içeriği   |  |
| <b>Şekil 4.17.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....80<br>var. <i>acephala</i> yapraklarında –SH grupları   |  |
| <b>Şekil 4.18.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....82<br>var. <i>acephala</i> 'nın dehidroaskorbat (DAsA), askorbat(AsA) ve toplam askorbat (AsA+DAsA) içerikleri          |  |
| <b>Şekil 4.19.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....83<br>var. <i>acephala</i> yapraklarında CAT aktivitesi   |  |

|  |  |
|--|--|
| <b>Şekil 4.20.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....84<br>var. <i>acephala</i> yapraklarında SOD aktivitesi  |  |
| <b>Şekil 4.21.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....85<br>var. <i>acephala</i> yapraklarında APX aktivitesi  |  |
| <b>Şekil 4.22.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....86<br>var. <i>acephala</i> yapraklarında GPOX aktivitesi   |  |
| <b>Şekil 4.23. A)</b> Cd ve <b>B)</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde.....87<br>bırakılan <i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i> yapraklarında SOD izoenzimleri<br>(1) kontrol (2) 100 µg g <sup>-1</sup> (3) 200µg g <sup>-1</sup> (4) 400 µg g <sup>-1</sup> |  |
| <b>Şekil 4.24.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Silene vulgaris</i> .....89<br>var. <i>vulgaris</i> yapraklarında klorofil-a, klorofil-b ve karotenoid içeriği  |  |
| <b>Şekil 4.25.</b> Cd'nin farklı konsantrasyonlarının etkisinde bırakılan.....90<br><i>Silene vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i> kök ve yapraklarında Cd içeriği  |  |
| <b>Şekil 4.26.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Silene vulgaris</i> .....91<br>var. <i>vulgaris</i> yapraklarında lipit peroksidasyonu  |  |
| <b>Şekil 4.27.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Silene vulgaris</i> .....92<br>var. <i>vulgaris</i> yapraklarında protein içeriği   |  |
| <b>Şekil 4.28.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Silene vulgaris</i> .....93<br>var. <i>vulgaris</i> yapraklarında prolin içeriği  |  |
| <b>Şekil 4.29.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Silene vulgaris</i> .....94<br>var. <i>vulgaris</i> yapraklarında –SH grupları  |  |
| <b>Şekil 4.30.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Silene vulgaris</i> .....95<br>var. <i>vulgaris</i> dehidroaskorbat (DAsA), askorbat (AsA) ve toplam askorbat<br>(AsA+DAsA) içerikleri  |  |
| <b>Şekil 4.31.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Silene vulgaris</i> .....96<br>var. <i>vulgaris</i> yapraklarında CAT aktivitesi  |  |
| <b>Şekil 4.32.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Silene vulgaris</i> .....97<br>var. <i>vulgaris</i> yapraklarında SOD aktivitesi  |  |
| <b>Şekil 4.33.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Silene vulgaris</i> .....98<br>var. <i>vulgaris</i> yapraklarında APX aktivitesi  |  |
| <b>Şekil 4.34.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Silene vulgaris</i> .....99<br>var. <i>vulgaris</i> yapraklarında GPOX aktivitesi   |  |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Şekil 4.35.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Silene vulgaris</i> .....  | 100 |
| var. <i>vulgaris</i> yapraklarında klorofil-a, klorofil-b ve karotenoid içeriği   |     |
| <b>Şekil 4.36.</b> Cu'nun farklı konsantrasyonlarının etkisinde bırakılan.....  | 101 |
| <i>Silene vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i> kök ve yapraklarında Cu içeriği   |     |
| <b>Şekil 4.37.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Silene vulgaris</i> .....  | 102 |
| var. <i>vulgaris</i> yapraklarında lipit peroksidasyonu   |     |
| <b>Şekil 4.38.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Silene vulgaris</i> .....  | 103 |
| var. <i>vulgaris</i> yapraklarında protein içeriği  |     |
| <b>Şekil 4.39.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Silene vulgaris</i> .....  | 104 |
| var. <i>vulgaris</i> yapraklarında prolin içeriği   |     |
| <b>Şekil 4.40.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Silene vulgaris</i> .....  | 105 |
| var. <i>vulgaris</i> yapraklarında –SH grupları   |     |
| <b>Şekil 4.41.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Silene vulgaris</i> .....  | 106 |
| var. <i>vulgaris</i> dehidroaskorbat (DAsA), askorbat(AsA) ve toplam askorbat<br>(AsA+DAsA) içerikleri  |     |
| <b>Şekil 4.42.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Silene vulgaris</i> .....  | 107 |
| var. <i>vulgaris</i> yapraklarında CAT aktivitesi   |     |
| <b>Şekil 4.43.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Silene vulgaris</i> .....  | 108 |
| var. <i>vulgaris</i> yapraklarında SOD aktivitesi   |     |
| <b>Şekil 4.44.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Silene vulgaris</i> .....  | 109 |
| var. <i>vulgaris</i> yapraklarında APX aktivitesi   |     |
| <b>Şekil 4.45.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Silene vulgaris</i> .....  | 110 |
| var. <i>vulgaris</i> yapraklarında GPOX aktivitesi  |     |
| <b>Şekil 4.46. A) Cd ve B)Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan.....</b>   | 111 |
| <i>Silene vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i> yapraklarında SOD izoenzimleri (1) kontrol<br>(2) 100 µg g <sup>-1</sup> (3) 200µg g <sup>-1</sup> (4) 400 µg g <sup>-1</sup> |     |

## ÇİZELGELER LİSTESİ

|  |    |
|--|----|
| <b>Çizelge 2.1.</b> Bitki dokularındaki önemli ROT molekülleri ve temel özellikleri.....                           | 25 |
| <b>Çizelge 2.2.</b> ROT'ları süpüren temel antioksidant enzimler.....  | 39 |
| <b>Çizelge 2.3.</b> Farklı SOD izoenzimleri ve organellerdeki lokalizasyonu.....                                   | 40 |
| <b>Çizelge 4.1.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....                | 64 |
| var. <i>acephala</i> yapraklarında klorofil-a, klorofil-b, kla/klb ve karotenoid içeriği                           |    |
| <b>Çizelge 4.2.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....                | 65 |
| var. <i>acephala</i> 'nın kök ve yapraklarındaki Cd içeriği  |    |
| <b>Çizelge 4.3.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....                | 66 |
| var. <i>acephala</i> yapraklarında lipit peroksidasyonu  |    |
| <b>Çizelge 4.4.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....                | 67 |
| var. <i>acephala</i> yapraklarında protein içeriği   |    |
| <b>Çizelge 4.5</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....                 | 68 |
| var. <i>acephala</i> yapraklarında prolin içeriği  |    |
| <b>Çizelge 4.6.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....                | 69 |
| var. <i>acephala</i> yapraklarında –SH grupları  |    |
| <b>Çizelge 4.7.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....                | 70 |
| var. <i>acephala</i> yapraklarında dehidroaskorbat (DAsA), askorbat (AsA) ve toplam askorbat (AsA+DAsA) içerikleri |    |
| <b>Çizelge 4.8.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....                | 71 |
| var. <i>acephala</i> yapraklarında CAT aktivitesi  |    |
| <b>Çizelge 4.9.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....                | 72 |
| var. <i>acephala</i> yapraklarında SOD aktivitesi  |    |
| <b>Çizelge 4.10.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....               | 73 |
| var. <i>acephala</i> yapraklarında APX aktivitesi  |    |
| <b>Çizelge 4.11.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....               | 74 |
| var. <i>acephala</i> yapraklarında GPOX aktivitesi   |    |
| <b>Çizelge 4.12.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....               | 75 |
| var. <i>acephala</i> yapraklarında klorofil-a, klorofil-b, kla/klb ve karotenoid içeriği                           |    |
| <b>Çizelge 4.13.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....               | 76 |
| var. <i>acephala</i> kök ve yapraklardaki Cu içeriği   |    |

|   |    |
|---|----|
| <b>Çizelge 4.14.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....77<br>var. <i>acephala</i> yapraklarında lipit peroksidasyonu   | 77 |
| <b>Çizelge 4.15.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....78<br>var. <i>acephala</i> yapraklarında protein içeriği  | 78 |
| <b>Çizelge 4.16.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....79<br>var. <i>acephala</i> yapraklarında prolin içeriği   | 79 |
| <b>Çizelge 4.17.</b> Cu 'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....80<br>var. <i>acephala</i> yapraklarında –SH grupları  | 80 |
| <b>Çizelge 4.18.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....81<br>var. <i>acephala</i> 'nın dehidroaskorbat (DAsA), askorbat(AsA) ve toplam askorbat<br>(AsA+DAsA) içerikleri | 81 |
| <b>Çizelge 4.19.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....83<br>var. <i>acephala</i> yapraklarında CAT aktivitesi   | 83 |
| <b>Çizelge 4.20.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....84<br>var. <i>acephala</i> yapraklarında SOD aktivitesi   | 84 |
| <b>Çizelge 4.21.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....85<br>var. <i>acephala</i> yapraklarında APX aktivitesi   | 85 |
| <b>Çizelge 4.22.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Brassica oleracea</i> .....86<br>var. <i>acephala</i> yapraklarında GPOX aktivitesi  | 86 |
| <b>Çizelge 4.23.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Silene vulgaris</i> .....88<br>var. <i>vulgaris</i> yapraklarında klorofil-a, klorofil-b, kila/kilb ve karotenoid içeriği                    | 88 |
| <b>Çizelge 4.24.</b> Cd'nin farklı konsantrasyonlarının etkisinde bırakılan.....90<br><i>Silene vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i> kök ve yapraklarında Cd içeriği   | 90 |
| <b>Çizelge 4.25.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan.....91<br><i>Silene vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i> yapraklarında lipit peroksidasyonu  | 91 |
| <b>Çizelge 4.26.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan.....92<br><i>Silene vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i> yapraklarında protein içeriği   | 92 |
| <b>Çizelge 4.27.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan.....93<br><i>Silene vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i> yapraklarında prolin içeriği  | 93 |
| <b>Çizelge 4.28.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan.....94<br><i>Silene vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i> yapraklarında –SH grupları  | 94 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Çizelge 4.29.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan.....   | 95  |
| <i>Silene vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i> dehidroaskorbat (DAsA), askorbat(AsA)<br>ve toplam askorbat (AsA+DAsA) içerikleri  |     |
| <b>Çizelge 4.30.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan.....   | 96  |
| <i>Silene vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i> yapraklarında CAT aktivitesi   |     |
| <b>Çizelge 4.31.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan.....   | 97  |
| <i>Silene vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i> yapraklarında SOD aktivitesi   |     |
| <b>Çizelge 4.32.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan.....   | 98  |
| <i>Silene vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i> yapraklarında APX aktivitesi   |     |
| <b>Çizelge 4.33.</b> Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan.....   | 99  |
| <i>Silene vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i> yapraklarında GPOX aktivitesi  |     |
| <b>Çizelge 4.34.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan <i>Silene vulgaris</i> .....                             | 100 |
| var. <i>vulgaris</i> yapraklarında klorofil-a, klorofil-b, kila/klb ve karotenoid içeriği                                      |     |
| <b>Çizelge 4.35.</b> Cu'nun farklı konsantrasyonlarının etkisinde bırakılan.....   | 101 |
| <i>Silene vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i> kök ve yapraklarında Cu içeriği  |     |
| <b>Çizelge 4.36.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan.....   | 102 |
| <i>Silene vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i> yapraklarında lipit peroksidasyonu   |     |
| <b>Çizelge 4.37.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan.....   | 103 |
| <i>Silene vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i> yapraklarında protein içeriği  |     |
| <b>Çizelge 4.38.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan.....   | 104 |
| <i>Silene vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i> yapraklarında prolin içeriği   |     |
| <b>Çizelge 4.39.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan.....   | 105 |
| <i>Silene vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i> yapraklarında –SH grupları   |     |
| <b>Çizelge 4.40.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan.....   | 106 |
| <i>Silene vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i> dehidroaskorbat (DAsA), askorbat (AsA)<br>ve toplam askorbat (AsA+DAsA) içerikleri |     |
| <b>Çizelge 4.41.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan.....   | 107 |
| <i>Silene vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i> yapraklarında CAT aktivitesi   |     |
| <b>Çizelge 4.42.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan.....   | 108 |
| <i>Silene vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i> yapraklarında SOD aktivitesi   |     |
| <b>Çizelge 4.43.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan.....   | 109 |
| <i>Silene vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i> yapraklarında APX aktivitesi   |     |



|  |     |
|--|-----|
| <b>Çizelge 4.44.</b> Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan..... | 110 |
| <i>Silene vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i> yapraklarında GPOX aktivitesi  |     |

## 1. GİRİŞ

Günümüzde dünya, çok önemli problemlerden biri olan çevresel kirlilikle yüz yüzedir. Dünyanın birçok yerinde tarımsal topraklar Cd, Cu, Zn, Ni, Co, Cr, Pb ve As gibi ağır metaller yoluyla yavaş yavaş kirlenmektedir (Yadav, 2010). Endüstrileşme ile birlikte insan kaynaklı aktiviteler sonucu oluşan ağır metal ve pestisit gibi toksik maddeler, doğrudan doğruya deniz, nehir ve toprağa karışarak çevre kirlenmesine sebep olmaktadır (Buendia-Gonzalez ve ark., 2010).

Ağır metal toksisitesi bitki gelişimini etkileyen önemli problemlerden biridir. Doğal flora ağır metal tolerans kapasitesi bakımından farklılıklar göstermektedir. Bazı bitki türleri diğer bitkiler için toksik olan yüksek derişimli metal içeren topraklarda büyüyüp yaşamlarını sürdürebilirken bazıları büyüyemez (Yadav, 2010).

Bitkiler buldukları çevreye bağımlı organizmalardır. Bu nedenle değişen çevre koşullarına uyum sağlamak ve ayrıca stresten kaçınmak için sınırlı mekanizmalara sahiptirler. Bir bitkinin korunma sınırını öğrenip geliştirmemiz için stres toleransına katkıda bulunan mekanizmaları anlamamız oldukça önemlidir (Schützendübel ve Polle, 2002).

Bitkilerdeki metal toksisitesi ve toleransı son 30 yılda geniş ölçüde araştırılan bir konu haline gelmiştir (Benavides ve ark., 2005). Bu çalışmalarda ağır metalin çevredeki ve bitkideki birikim oranı ve bitkinin türü önemlidir. Bitkilerin ortamdaki elementlere seçici davrandığı, ağır metal eşik doz değerinin bitki türüne ve ağır metal çeşidine göre değiştığı iyi bilinmektedir. Özellikle bitkilerin çevresel stres faktörlerine farklı mekanizmalar geliştirmesi bu tip çalışmaların çok sayıda farklı tür üzerinde yapılmasını gerekli kılmaktadır (Kıran ve Şahin, 2005).

Son on yılda yapılan çalışmalar, ağır metallerin organizmalar ve hücresel sistemlerde özellikle, fotosentez, transpirasyon, su alımı, klorofil sentezi gibi metabolik faaliyetleri yavaşlattığı, lipid peroksidasyonu ve oksidatif stresi arttırdığı ortaya konmuştur (Zengin ve Munzuroğlu, 2004; Cargnelutti ve ark., 2006). Bitkiler üzerinde ağır metallerin en olumsuz etkileri özellikle kloroplast pigmentlerine, membranlara ve nükleik asitlere zarar veren reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumundaki artıştır (Maksymiec ve ark., 2007; Yadav, 2010).

Kadmiyum (Cd) toksik metallerden biridir. Esansiyel olmayan bu element çeşitli tarımsal, madencilik, endüstriyel aktivitelerden ve ayrıca otomobillerden salınan egzoz

gazları sonucu metal kirliliğine neden olmaktadır. Kadmiyum sudaki yüksek çözünürlüğünden ve yüksek toksisitesinden dolayı oldukça önemli bir kirletici olarak bilinir. Kadmiyum bitkiler tarafından yüksek seviyelerde biriktirelebilmektedir. Bu metal sülfidril gruplarına özel bir eğilim gösterir ve ayrıca azot içeren bileşikler ve hidroksil gruplarıyla tepkimeye girerler.

Kadmiyuma maruz bırakılan bitkilerde fotosentez, solunum ve transpirasyonu kapsayan birçok fizyolojik süreç inhibe olmaktadır. Ayrıca, kadmiyum uygulanan bitkiler yaprak epinastisi, klorozis, bodur büyüme gibi çeşitli semptomlar göstermektedir (Verma ve ark., 2008). Kadmiyum hücresele seviyede membran hasarı, elektron taşınmasının aksaması, enzimlerin inhibisyonu ya da aktivasyonu ve nükleik asitlerle etkileşimi gibi olayları etkilemektedir. Özet olarak, kadmiyumun yüksek konsantrasyonları hücresele (membran hasarı, elektron taşınmasının bozulması gibi) ve fizyolojik (büyüme, fotosentez gibi) süreçleri oksidatif stresi indükleyerek ciddi şekilde hasara uğratmaktadır (Smeets ve ark., 2005).

Bitkiler için esansiyel bir element olan bakır (Cu) elektron taşınması ve redoks reaksiyonlarındaki enzim ve proteinlerle ilişkilidir. Aşırı miktarda bakır bitkiler için toksiktir ve fotosentez, pigment sentezi, azot ve protein metabolizması, DNA ve membran geçirgenliği ve mineral alımı gibi geniş oranda biyokimyasal ve fizyolojik süreçleri etkilemektedir (Lombardi ve Sebastiani, 2005; Srivastava ve ark., 2006).

Bakır toksisitesi reaktif oksijen türleri tarafından meydana getirilen oksidatif stresi uyarmaktadır. Redoks aktif metal olan  $Cu^{+}$  süperoksit anyon oluşumunu katalizleyebilir ve sonradan Fenton tipi reaksiyonlar yoluyla hidrojen peroksit ve hidroksil radikali üretimine neden olabilir. Bu reaktif oksijen türleri lipitler, proteinler, pigmentler ve nükleik asitlerle tepkimeye girerler ve bu da lipit peroksidasyonuna, membran hasarı ve enzimlerin inaktivasyonuna neden olur. Sonuç olarak, aşırı miktarda bakır lipit peroksidasyonunu ve ROT birikimini artırır (Zhang ve ark., 2008).

Kadmiyum ve bakıra maruz bırakılan bitkilerde genellikle büyümede azalma gözlenmiştir. Bu toksik kirleticiler bitki hücrelerinde birçok değişikliğe neden olabilirler. Ancak, stresin fizyolojisi hakkında genel bir mekanizma çizmek zordur. Çünkü, metal toksisitesi birkaç metabolik yolla metal iyonlarının kompleks etkileşimi sonucu olmaktadır. Bununla birlikte, bitkilerin bakır ve kadmiyuma maruz bırakılmasının ardından doku hasarının nedenlerinden biri oksidatif stresle ilişkili reaktif oksijen türlerinin artan birikimidir (Chaoui ve El Ferjani, 2005).

Bitkilerde ağır metaller yoluyla uyarılan oksidatif stres, süperoksit radikalleri ( $O_2^-$ ), moleküler oksijen ( $O_2$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikalleri ( $OH$ ) gibi reaktif oksijen türlerinin oluşması yoluyla meydana gelmektedir. Bu oksijen türleri lipid peroksidasyonu, enzim inaktivasyonu/aktivasyonu ve DNA hasarına sebep olurken, büyüme ve verimin dramatik bir şekilde düşmesine sonuçta bitkinin ölümüne yol açmaktadır (Sun ve ark., 2007; Guo ve ark., 2007).

Reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerini azaltmak ve elimine etmek için bitkiler enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalarla donatılmıştır. Antioksidant sistem, katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), guaiacol peroksidaz (GPOX) ve askorbat peroksidaz (APX) gibi enzimlerden oluşmaktadır. Oluşan süperoksit radikalleri SOD tarafından  $H_2O_2$ 'ye dönüştürülmektedir ve  $H_2O_2$ 'nin birikimi APX, CAT ve GPOX enzimlerinin aktiviteleri yoluyla engellenmektedir. Bu yüzden, ROT oluşumu ve onların yok edilmesi arasındaki denge sistemin hayatta kalmasını belirler (Khatun ve ark., 2008).

Oksidatif strese karşı antioksidatif yanıtlar ve tolerans bitki türlerine ve çevresel koşullara göre değişmektedir. Son yıllarda, ağır metallerin bitkiler üzerindeki toksik etkileri yanında özellikle, indikatör ve biriktirme yeteneğine sahip toleranslı bitkilerin kirlenmeyi doğal olarak giderilmesine yönelik çalışmalar da hızla artmaktadır (Uysal, 2007).

Bu çalışmada, *Brassica oleracea* L. var. *acephala* ve *Silene vulgaris* (Moench) Garcke var. *vulgaris* bitkilerine bakır (Cu) ve kadmiyum (Cd) metallerinin fizyolojik etkilerinin yanı sıra, bu metallerin meydana getireceği oksidatif stresin giderilmesinde ya da azaltılmasında görev alan antioksidatif savunma mekanizmasındaki değişiklikler tanımlanarak, bu bitkilerin bakır ve kadmiyuma karşı toleranslı olup olmadığı belirlenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

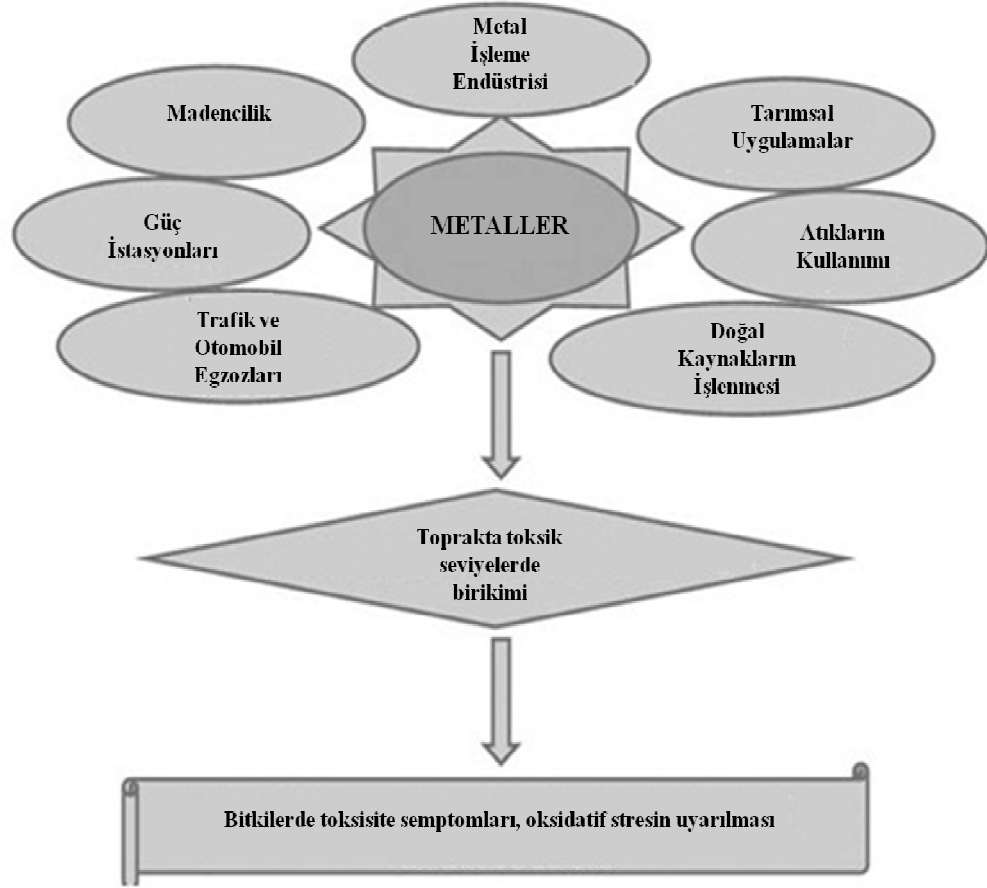
### 2.1. Ağır Metaller

Ağır metaller yoğunluğu  $5 \text{ g cm}^{-3}$ 'ün üzerinde olan ve nispi atom ağırlıkları 40'in üzerindeki elementlerdir ve nispeten geniş bir grup oluştururlar (Seregin ve Ivanov, 2001). Doğal olarak meydana gelen 90 tane elementin 53'ü ağır metaldir, ancak hepsinin biyolojik önemi yoktur. Metallerin fizyolojik koşullardaki çözünürlüğü temel alınarak, bunlardan 17 tanesinin canlı hücreler, organizma ve ekosistemler için önemli olduğu belirlenmiştir. Bu metaller arasında Mn, Cu, Zn, Mo ve Ni yüksek yapılı bitkiler için gerekli ve faydalı mikro besinlerdir. As, Hg, Ag, Sb, Cd, Pb ve U'nun besin elementi olarak fonksiyonları bilinmemektedir (Schützendübel ve Polle, 2002).

Karasal ekosistemlerde, ağır metallerin ana materyal ve atmosfer olmak üzere iki ana kaynağı vardır (Schützendübel ve Polle, 2002). Doğal kayalardan oluşan ağır metaller toprak, nehir, göl, deniz ve deniz dibindeki sedimentlerde çözülmüş formda ya da partikül halinde meydana gelerek geniş bir çevreye yayılırlar. Bunlara ek olarak, ağır metallerin çevreye yayılmasına neden olan etmenlerin arasında endüstriyel faaliyetler, motorlu taşıtların egzoz atıkları, maden yatakları ve işletmeleri, volkanik faaliyetler, tarımda kullanılan gübre ve ilaçlar ile kentsel atıklar gelmektedir (Stresty ve Madhava Rao, 1999; Babula ve ark, 2008).

### 2.2. Ağır Metal Toksisitesi

Bitkilerdeki metal toksisitesi, metalin bitki kökleriyle topraktan alınarak bitkinin diğer kısımlarına taşınması ve depo edilmesi sonucunda meydana gelir (Şekil 2.1) (Verma ve Dubey, 2003; Dubey, 2011). Bu metallerin bitkiler tarafından alınması sonucunda dokularda çeşitli belirtiler meydana gelir. Bu belirtiler klorozis, nekrozis, yaprak kıvrılması, kök büyümesinin inhibisyonu, bitki büyümesinde gerileme, membran fonksiyonlarında değişiklikler, su potansiyelinin azalması ve çeşitli anahtar enzimlerin aktivitelerinde değişiklikleri kapsamaktadır (Sharma ve Dubey, 2007).



**Şekil 2.1.** Metallerin kaynakları. Çeşitli antropojenik aktiviteler metallerin birikmesine neden olur. Bunların topraktan kökler yoluyla alınması sonucunda bitki dokularında metal toksisite semptomları ve oksidatif stres gözlenir (Dubey, 2011)

Ağır metal toksisitesinin nedenini anlamak için, metallerin kimyasal özelliklerini göz önünde bulundurmak gerekir. Ağır metallerin çoğu fizyolojik koşullar altında tamamıyla dolu olmayan  $\delta$ -orbitallerine sahip katyonlar olarak mevcut olan geçiş metalleridir. Hücrelerdeki redoks oranı  $-420$  mV ile  $+800$  mV arasında geniş bir alana yayılır. Bu yüzden, biyolojik önemi olan ağır metaller, redoks aktif (Fe, Cu, Cr, Co) ve redoks aktif olmayan metaller (Cd, Pb, Zn, Ni, Al) olarak iki gruba ayrılabilir. Biyolojik moleküllerden daha düşük redoks potansiyelli metaller biyolojik olarak redoks reaksiyonlarında yer almayabilirler (Schützendübel ve Polle, 2002). Redoks aktif metaller (örneğin  $Fe^{++}$  ve  $Cu^+$ ), redoks aktif olmayan metallerden farklı olarak Haber Weiss ve Fenton- reaksiyonları yoluyla hücrede direk olarak  $H_2O_2$ 'den  $OH^-$  oluştururlar. Fenton ve otooksidasyon yoluyla reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi tipik olarak Fe ve Cu gibi geçiş metalleri içindir. Bu nedenle, geçiş metalleri bitki dokularında direk olarak oksidatif strese neden olurken, redoks aktif olmayan metaller

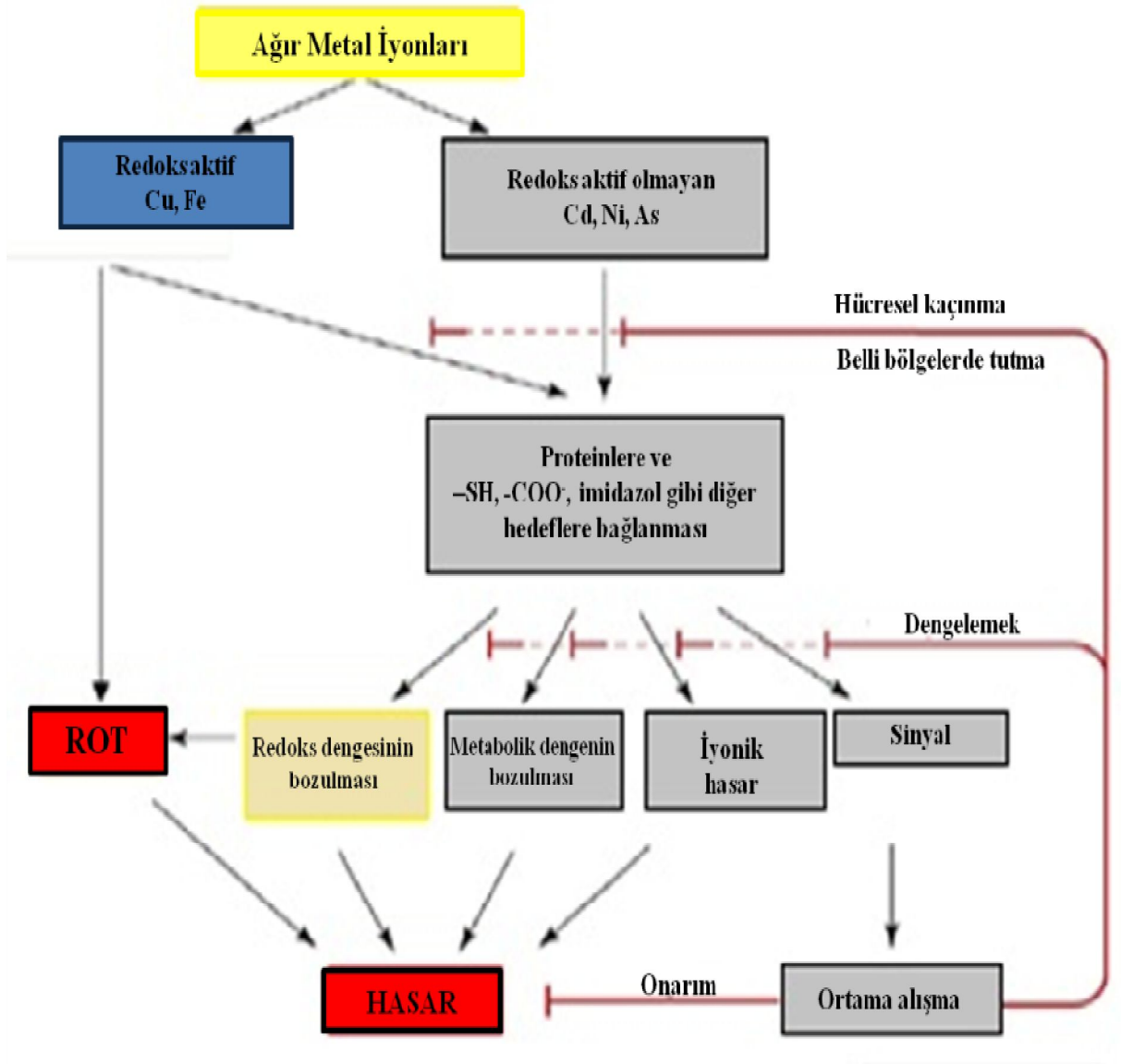
ise lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu gibi reaksiyonlar yoluyla dolaylı olarak oksidatif hasara neden olurlar (Sharma ve Dietz, 2008).

Ağır metal toksisitesinin diğer önemli bir mekanizması metallerin oksijen, azot ve sülfür atomlarına güçlü bir şekilde bağlanabilme kabiliyetidir (Schützendübel ve Polle, 2002).

Metallerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre, metal toksisitesi üç farklı moleküler mekanizma ile ayırt edilebilir (Şekil 2.2):

- i) Metallerin –tiyol, -histidil ve –karboksil gruplarına bağlanma eğilimleri nedeniyle proteinlerle direk olarak etkileşerek hücrenin yapısını, katalitik ve taşıma bölgesinin değişmesine neden olması.
- ii) Otooksidasyon ve Fenton reaksiyonları yoluyla reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu.
- iii) Biyomoleküllerdeki esas katyonların yerlerini alarak fonksiyonlarının bozulmasına neden olması. Örneğin, fotosistem II reaksiyon merkezinde,  $Cd^{++}$   $Ca^{++}$  'nın yerini alır ve PSII fotoaktivasyonunun inhibisyonuna neden olur.

Bununla birlikte, metallerin kimyasal özellikleri ve biyolojik sistemlerdeki farklı davranışları karşısında, yalnızca bu üç mekanizma toksisitenin nedenlerini açıklamayabilir (Sharma ve Dietz, 2008).



**Şekil 2.2.** Ağır metale bağı olarak meydana gelen başlıca mekanizmalar (Sharma ve Dietz, 2008).



### 2.3. Ağır Metallerin Bitkiler Tarafından Alınması

Bitkilerin metallere biyolojik olarak faydalanabilmeleri için bu metallerin toprak ya da suda bulunmaları, toprak ya da suyun pH'sı, oksijen içeriği, organik ve inorganik bileşiklerin varlığı ya da yokluğu önemli faktörlerdir. Bazı ağır metallerin toprak partiküllerine tutunması ve çözünmemesi bitkiler tarafından alınımını zorlaştırır. Bununla birlikte, metallerin toprak ve suda bulunan bileşiklerle kompleks oluşturma yeteneği, bunların bitkiler tarafından alınmasını ve kullanılmasını arttırmada önemli rol oynamaktadır (Shenker ve ark., 2001).

Genel olarak, bitkiler tarafından metallerin alınması bitki türüne bağlı olarak değişmekle beraber, en önemli toprak faktörleri olan pH, su rejimi, organik madde içeriği, katyon değişim kapasitesi, besin dengesi ve diğer elementlerin derişimi bu alımı etkilemektedir.

Bitkilerde ağır metal alınım biyolojisi üç ana bölüme ayrılabilir:

1. Köklerle alınım
2. Ağır metallerin taşınması
3. Ağır metale dayanıklılık

#### 2.3.1. Köklerle Alınım

Metallerin kökler tarafından alınımı hem pasif hem de aktif olabilir. Pasif alınım, iyonların difüzyon ile dıştaki çözüldüden kök endodermisine alınmasıdır. Aktif alınım enerji gerektirir ve bir kimyasal gradiyente karşı meydana gelir. Alınımın mekanizması verilen metale bağlı olarak farklılıklar gösterebilir. Pb ve Ni genellikle pasif olarak alınırken, Cu, Mo ve Zn aktif olarak alınır. Kök hücrelerinin biyolojik ve yapısal özellikleri değiştiğinde ancak tüm metaller pasif bir şekilde alınır (Kabata-Pendias ve Pendias, 2001).

Bitkilerin topraktaki metalleri alabilmeleri için onları hareketli forma geçirmeleri gerekir. Kökler tarafından metallerin alınmasında birkaç yol vardır:

1. Şelatlama ajanları ya da diğer taşıyıcılar tarafından hücre içerisine taşınması
2. Rizosfer etkileri
3. Kökler tarafından katyon değişikliği

İlk olarak, metal şelatlandırıcı moleküller (fitosideroforez) toprağa bağlı olan metalleri topraktan çözmek için rizosfere salınır. Örneğin, mugineik asit ve avenik asit

Graminae türlerinin fitosideroforezi olarak görev yaparlar Bu fitosideroforezler Fe ve Zn eksikliğinde serbest bırakılırlar ve Cu, Zn ve Mn'ın toprakta hareketini sağlarlar. İkinci olarak, kökler spesifik plazma membranına bağlı metal redüktazlar ile metal iyonlarını azaltabilirler. Üçüncü olarak da bitki kökleri saldıkları protonlar ile toprak ortamını asitleştirerek ağır metalleri çözebilirler. Köklerin çevresindeki katyon oksidasyon durumu bu süreçte oldukça önemlidir. Düşük pH toprak içindeki bağlı metal iyonlarının serbest kalmasına neden olur. Kök içine intraselüler veya ekstraselüler yollarla giren metal iyonları spesifik veya genel iyon taşıyıcıları vasıtasıyla ya da kanallarla bitki hücrelerine girerler. Bitki için gerekli olmayan ağır metaller de aynı transmembran taşıyıcılarını kullandıklarından aralarında rekabet ederler (Salt ve ark., 1995).

### **2.3.2. Ağır Metallerin Taşınımı**

Metal iyonları köke girdiğinde ya biriktirilirlir ya da sürgünlere taşınırlar. Metal iyonlarının sürgünlere taşınması ksilemde olabildiği gibi floem yoluyla da olabilmektedir. Metal iyonlarının ksilem yoluyla taşınabilmesi için kaspari şeridini geçmesi gerekmektedir. Kaspari şeridi nedeniyle ekstraselüler geçiş bloke edildiğinden suyun hareketi engellenir ve metal iyonları intraselüler olarak hareket ederler (Salt ve ark., 1995).

Bitkilerde metal taşınmasının kontrolünde, şelatlayıcı bileşiklerin yanı sıra pH, oksidasyon-redüksiyon durumu, hidroliz, polimerizasyon ve çözünemeyen tuzların oluşumu (fosfat, okzalit gibi) çok önemlidir. Genellikle, Ag, B, Li, Mo ve Se bitkinin diğer kısımlarına kolaylıkla taşınırken, Mn, Ni, Cd ve Zn orta derecede taşınırlar. Co, Cu, Cr, Pb, Hg ve Fe kök hücrelerine güçlü bir şekilde bağlanarak çok zor taşınırlar (Kabata- Pendias ve Pendias, 2001).

### **2.3.3. Ağır Metale Dayanıklılık**

Ağır metallere dayanıklı olan bir bitki ya hücreye giren ağır metalleri detoksifiye etmelidir ya da hücreye alınımını sınırlı tutmalıdır. Ağır metallerle kirlenmiş

topraklardaki bazı endemik bitki ekotiplerinin hücre duvarları asit fosfatazlar gibi ağır metale dirençli enzim içerdiği görülmüştür. Ağır metaller hücre içinde biriktirildiklerinde detoksifiye edilmeleri gerekir. Bu da metale bağlı olan şelatlanma, alınımın sınırlanması ve çöktürme şeklinde olabilmektedir (Benavides ve ark., 2005). Kurşun etkisinde bırakılan *Brassica juncea*'nın köklerinde de fitoşelatinlerin üretildiği ve böylece fitoşelatinlerin kurşun detoksifikasyonu ile ilişkisi olduğu ortaya konulmuştur (Salt ve ark., 1995).

#### 2.4. Kadmiyum

Kadmiyum (yoğunluğu  $8.6 \text{ g cm}^{-3}$ ), doğada oldukça hareketli bir elementtir ve bu nedenle düşük konsantrasyonlarda bile bitkiyi etkileyebilmektedir. Kadmiyum ısıtma sistemleri, trafik, güç istasyonları, metal işleyen endüstriler, çimento fabrikaları gibi çeşitli kaynaklardan çevreye salınırlar. İnsan faaliyetlerinin az olduğu alanlardaki kadmiyumun kaynaklarını ise kayaların mineralizasyonu meydana getirmektedir. Wagner (1993)'in ölçümlerine göre kirlenmemiş toprakların kadmiyum derişimi  $0.04\text{-}0.32 \text{ }\mu\text{M}$  arasında değişmektedir.  $0.32\text{-}1.0 \text{ }\mu\text{M}$  sahip topraklar ise orta derecede kirlenmiş sayılmaktadır (Sanita di toppi ve Gabrielli, 1999).

Bitkilerde metal iyonlarının farklı taşınımına rağmen, genellikle köklerde diğer organlara göre metal içeriği daha fazladır. Kadmiyum bitkiye ilk olarak köklerden girerek diğer organlara da kolaylıkla taşınabilmektedir. Apoplastik ve simplastik olarak kök korteksi vasıtasıyla merkezi silindire, buradan da ksilem aracılığı ile sürgünlere taşınır (Pál ve ark., 2006).

Yüksek yapılı bitkiler kadmiyumu ortamdaki metalin derişimine bağlı olarak almaktadırlar. Metalin bitkiler tarafından alınımı ortamdaki diğer elementlerin derişimine, pH, redoks potansiyeli, sıcaklık ve ortamdaki organik maddelere bağlıdır. Genellikle kadmiyum, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn ve Ni gibi besin elementlerinin kullandığı trans-membran taşıyıcıları için bu elementler ile rekabet eder (Sandalio ve ark., 2001).

### 2.4.1 Bitkilerde Kadmiyum Toksisitesinin Etkileri

Kadmiyum bitki büyüme ve gelişimini olumsuz yönde etkiler. Suda çözünebilirliği ve yüksek toksisitesinden dolayı kadmiyum önemli bir çevre kirleticisi olarak tanımlanır (Pinto ve ark., 2004).

Birçok araştırmacı, kadmiyumun biyolojik sistemler üzerindeki toksik etkileri ile ilgili bulgular elde etmiş olmalarına rağmen kadmiyumun toksisite mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Benavides ve ark., 2005).

Bitkilerde kadmiyum toksisitesinin gözlenebilen belirtileri; büyümeyi geciktirmesi, kök hasarı, yapraklarda klorozis, yaprak kenarlarında ya da damarlarında kırmızı-kahverengi renklenme sayılabilir. Klorozis, toksik metallerin etkileşimi ve Fe eksikliğinden dolayı ortaya çıkar. Araştırmacılar, kadmiyumun sebep olduğu klorozisin, Fe: Zn oranındaki değişimden, fosfor eksikliği ya da mangan taşınmasında meydana gelen problemlerden kaynaklandığını belirtmişlerdir (Root ve ark.,1975; Goldbold ve Hutterman, 1985).

Kadmiyumun hücrel etkileri çeşitli seviyelerde olabilmektedir. Örneğin, RNA sentezini değiştirebilir ve ribonükleaz aktivitesini inhibe edebilir (Shah ve Dubey, 1997). Kadmiyum ayrıca sürgünlerde nitrat redüktaz aktivitesinin inhibisyonuna neden olarak sürgünlere azot taşınmasını engeller (Hernandez ve ark., 1996). Buna ek olarak, Fe(III) redüktazın inhibisyonu sonucu Fe(II) eksikliği ortaya çıkar ve sonuç olarak bu da fotosentezi olumsuz etkiler (Alcantara ve ark., 1994).

Kadmiyum toksisitesi bitki su kütlesinin bozulmasına yol açar (Costa ve Morel, 1994). Genelde fotosistem I ve fotosistem II'nin fotosentetik birimlerine zarar verir (Siedlecka ve Krupa, 1996).

*Brassica napus* bitkilerine kadmiyum uygulanması, toplam klorofil ve karoten miktarını azaltmıştır (Larsson ve ark., 1998). Bundan başka kadmiyum konsantrasyonunun hücrel düzeyde artması sonucu mitokondri iç zarlarının  $H^+$  geçirgenliği artar ve oksidatif fosforilasyon inhibe olur (Kessler ve Brand, 1995).

Ayrıca kadmiyum, stomanın açılmasını engeller, ancak bunu nasıl yaptığı henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Muhtemelen stoma hareketlerinin direkt olarak kadmiyumdan etkilenmediği, fakat bekçi hücrelerindeki absisik asit,  $K^+$ ,  $Ca^{++}$  'nın hareketleri ile kadmiyumun oldukça güçlü bir ilişkisi olduğu düşünülmektedir (Barcelo ve Poschenrieder, 1990).

Kadmiyum, lipit kompozisyonunu ve H<sup>+</sup>-ATPaz gibi membranla ilişkili enzimatik aktiviteleri etkileyerek membran fonksiyonlarının bozulmasına neden olur. (Sandalio ve ark., 2001). Kadmiyumun reaktif oksijen türlerinin oluşumunu uyararak ya da lipoksigenaz aktivitesini uyararak farklı bitki türlerinde lipit peroksidasyonunu arttırdığı bulunmuştur (Sandalio ve ark., 2001; Schützendübel ve ark., 2001; Beckhaldi ve ark., 2010). Kadmiyumun oksidatif strese neden olduğu belirlenmiştir. Redoks aktif metallere (Cu, Fe gibi) benzemeyen kadmiyum Fenton benzeri bir reaksiyon yoluyla reaktif oksijen türlerinin üretimini indükleyememektedir. Kadmiyum lipit peroksidasyonunun indüklenmesi, elektron taşıma zincirinin aksaması gibi dolaylı mekanizmalar yoluyla oksidatif strese neden olmaktadır (Smeets ve ark., 2005).

#### **2.4.2. Hücresel Düzeyde Kadmiyum Stresine Cevap Mekanizmaları**

Bitki hücreleri kadmiyum stresine cevapta (1) immobilizasyon (durağanlaştırma), (2) hücre içine alınmama (3) fitoşelatinlerin sentezi, (4) belli bölgelerde tutma, (5) metalotiyoneinlerin sentezi, (6) stres proteinlerin sentezi ve (7) etilenin üretimi gibi çeşitli savunma yollarına başvurabilir.

##### **2.4.2.1. İmmobilizasyon**

Kök düzeyinde kadmiyum stresine karşı ilk engel hücre duvarına bağlanma yoluyla kadmiyumun immobilizasyonu ve ekstraselüler (hücre dışı) karbohidratlar (Verkleij ve Schat, 1990) olabilir. Kadmiyum iyonları örneğin çalı fasulyesinin (*Phaseolus vulgaris*) kök ve yapraklarında çoğunlukla pektik yapılar ve hücre duvarının histidil grupları tarafından bağlanmıştır (Leita ve ark., 1991). Bu mekanizma ortamdaki kadmiyum derişimi ve bitki türüne göre değişiklik gösterebilir. *Silene cucubalus*'da hücre duvarlarında kadmiyum birikimi rapor edilmiştir. Fakat tolerant ve tolerant olmayan bitki türleri arasında hücre duvarına bağlanma ile ilgili bir farklılık gözlenmemiştir (Verkleij ve ark., 1990).

#### 2.4.2.2. Hücre içine alınmama

Plazma membranın etkisiyle kadmiyum iyonlarının sitoplazmaya girişinin engellenmesi teorik olarak en etkili savunma mekanizması olarak belirtilmektedir. *Raphanus sativus* tohumlarının çimlenmesinin erken dönemlerinde Cd'nin plazma zarındaki Ca kanalları boyunca hücre içine girdiği rapor edilmiştir (Rivetta ve ark., 1997).

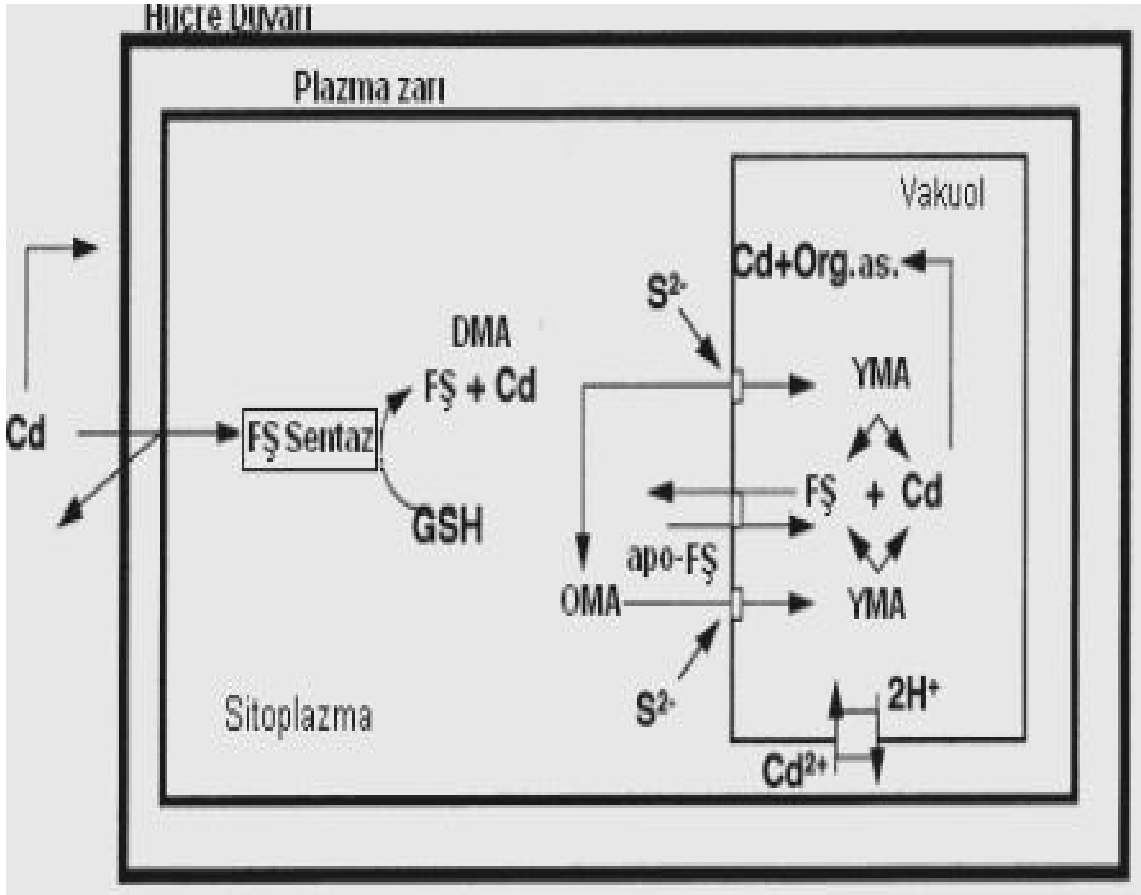
#### 2.4.2.3. Fitoşelatinler

Fitoşelatinler spesifik bir -glutamil sistein dipeptidil transpeptidaz tarafından fitoşelatin sentez yolu ile glutatyondan sentezlenirler. Kadmiyum uygulamasının birkaç dakika sonrasında inaktif olan fitoşelatin sentaz aktive edilerek fitoşelatin sentezlenir ve ortamdaki serbest kadmiyum şelatlanmaya başlar. Serbest kadmiyum oranı azaldığında bu enzim inaktive edilir. Fitoşelatin üretim kapasitesi yüksek olan bitkilerde kadmiyumun şelatlanması detoksifikasyonun önemli bir mekanizmasıdır. Kadmiyum toksisitesine karşı bitkilerin toleransında biyo-indikatör olarak fitoşelatinlerin kullanılması Keltjens ve Van Beusichem (1998) tarafından önerilmiştir.

Genelde kadmiyum kükürt metabolizmasının farklı basamaklarına karşı yüksek eğilim gösterir. İlk etkilerini ATP-sülfürilaz (De Knecht ve ark, 1995) ve adenozin 5-fosfosülfat sülfotransferaz üzerine gösterir (Nussbaum ve ark, 1988). Kadmiyum hücre sitoplazmasına girdiğinde kükürt metabolizmasıyla ilişkili bir mekanizma olan fitoşelatin sentezi önemli oranda artmaktadır. Ağır metaller arasında özellikle kadmiyumun fitoşelatin ( $\gamma$ -Glu-Cys)<sub>n</sub>-Gly (n=2-11) sentezini aktive ettiği kesin olarak bilinmektedir. Böylece kadmiyumun sitoplazmada serbest olarak dolaşımını engelleyen kompleksler (moleküler ağırlığı 2500 ya da 3600 Dalton) oluştururlar (Grill ve ark., 1985).

#### 2.4.2.4. Belli Bölgelerde Tutma

Kadmiyum detoksifikasyonundaki önemli yollardan biri de metalin vakuolde tutularak sitoplazmada serbest olarak dolaşımının engellenmesidir (Şekil 2.3). Kadmiyum uygulaması fitoşelatin sentaz enzimini aktive etmekte ve düşük moleküler ağırlıklı fitoşelatin kompleksi kadmiyumu bağlamaktadır (Vögeli-Lange ve Wagner, 1996). Serbest Cd iyonları  $Cd^{++}/2H^{+}$  antiport yoluyla da vakuol içine alınırlar. Vakuol pH'sı asidik olduğu için yüksek moleküler ağırlıklı kompleksler parçalanır ve kadmiyum vakuoler organik asitlerle (okzalal, malat ve sitrat) ve aminoasitlerle bileşik oluşturabilir. Apo-fitoşelatinler vakuoler hidrolazlar tarafından parçalanabilir ve/veya stoplazmaya tekrar dönebilirler (Sanita di Toppi ve Gabbrielli, 1999).



**Şekil 2.3.** Kadmiyumun şelatlanması ve vakuolde kompartimentalizasyonunun mekanizmaları Şekilde FŞ fitoşelatini, GSH redükte glutatyonu, DMA düşük moleküler ağırlıklı bileşiği, OMA orta moleküler ağırlıklı bileşiği, YMA yüksek moleküler ağırlıklı bileşiği ve Org. as. Organik asitleri ifade eder (Sanita di Toppi ve Gabbrielli,1999).

#### 2.4.2.5. Metalotiyoneinler

Hayvanlar, mavi-yeşil algler ve mantarlarda da kadmiyum ve diğer ağır metalleri sisteince zengin ve aromatik aminoasit içermeyen metalotiyoneinler yoluyla kompleksleştirilir ve detoksifiye edilebilirler (Kagi, 1991). Bitki metalotiyoneinlerinde sistein kalıntıları Cys-x-Cys, Cys-x-x-Cys (yapıdaki x, sisteinden farklı bir aminoasittir) ya da Cys-Cys şeklinde bulunur. Ancak mevcut çalışmalar ışığında yüksek bitkilerde kadmiyum tarafından indüklenmiş metalotiyoneinlerin kesin kanıtlarına ulaşamamıştır. Bu nedenle metalotiyoneinlerin kadmiyum detoksifikasyonundaki rolleri fitoşelatinler ve stres proteinlerine kıyasla ikincildir ( Sanita di Toppi ve Gabrielli, 1999).

#### 2.4.2.6. Stres Proteinleri

Yüksek sıcaklık, ağır metal, tuzluluk ve kuraklık gibi stres koşulları altında bitki hücreleri farklı stres proteinleri sentezledikleri bilinmektedir ( Sanita di Toppi ve Gabrielli, 1999). Bitkilerde sıcak şok proteinlerinin (SŞP) birçok türü bulunmuştur. Örneğin, Sabehat ve ark. (1998) yaptıkları çalışmada domates bitkilerinde soğuk stresi nedeniyle meydana gelen yaralanmalara karşı sıcak şok proteinlerin rolü olduğunu bulmuşlardır.

#### 2.4.2.7. Etilen Sentezi

Yapılan bir çalışmada kadmiyum etkisinde bırakılan *P. vulgaris* bitkilerinde çözülebilir ve çözülemez fenoliklerin birikmiş olduğu belirlenmiştir. Ayrıca etilen üretimi guajakol peroksidaz aktivitesini de artırmıştır. Aynı bitki türü ile yapılan diğer bir araştırmada Cd etkisindeki bitkinin köklerinde etilen üretimi sürgünlerden daha fazla olduğu bulunmuştur. Şimdiye kadar yapılan çalışmaların azlığı nedeniyle Cd stresi ve etilen biyosentezi arasındaki ilişkinin (moleküler/hücreseel düzeyde) tam olarak açıklanmasının mümkün olmadığı belirtilmiştir (Sanita di Toppi ve Gabrielli, 1999).



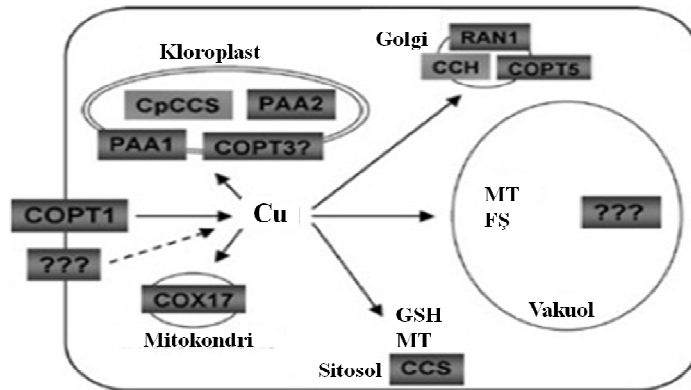
## 2.5. Bakır

Bakır (Cu), bitkilerin büyüme ve gelişmesi için gerekli olan esansiyel bir elementtir., Bakır, fizyolojik koşullar altında hücre içerisinde  $\text{Cu}^{++}$  ve  $\text{Cu}^+$  olmak üzere iki oksidasyon durumunda bulunabilir. Bu nedenle, bitkilerde birçok fizyolojik süreçte yer almaktadır.  $\text{Cu}^{++}$  çoğunlukla histidinin yan zincirlerindeki azota bağlanırken,  $\text{Cu}^+$  sistein ya da methionindeki sülfüre bağlanmayı tercih etmektedir (Pilon ve ark., 2006). Bitkiler tarafından bakır büyük oranda  $\text{Cu}^{++}$  şeklinde alınır (Maksymiec, 1997).

Bakır oldukça az taşınabilen bir metal olmasına rağmen, tüm toprak tiplerinde serbest ve kompleksleşmiş iyon olarak bol bulunur. Topraktaki bakır konsantrasyonları genellikle 2-250 ppm arasında değişir (Khatun ve ark., 2008).

Kökte, bakır tamamıyla bileşik formdadır. Bununla birlikte, kök hücresine bakır çoğunlukla ayrılmış formda girer. Farklı araştırmaların sonuçları karşılaştırıldığında köklerdeki bakır absorpsiyonunun fizyolojik konsantrasyon oranı ( $0.01\text{-}20\mu\text{M}$  Cu) piko-ile mikromol arasında  $\text{hr}^{-1} \text{g}^{-1}$  değişmekle beraber esansiyel elementler arasında en düşük olduğu sonucuna varılmıştır (Kabata- Pendias ve Pendias, 2001).

Bitkilerde hücre içersine bakır alınımı ve taşınmasıyla ilişkili olarak çok az bilgi vardır. Bununla birlikte, son zamanlarda yapılan çalışmalar sonucunda bakırın taşınmasını sağlayan birkaç taşıyıcı belirlenmiştir. Bunlar, i) P-tipi ATPaz Cu-taşıyıcıları ii) COPT bakır taşıyıcıları iii) Bakır şaperonlarıdır (Şekil 2.4) (Markossian ve Kurganov, 2003).



**Şekil 2.4.** Bitki hücrelerinde Cu için tanımlanan taşınım yolları. Hücre membranı taşıyıcıları (COPT1, COPT3, COPT5, COX17, PAA1, PAA2, RAN1), bakır şaperonlar (CCH, CCS, CpCCS) ve detoksifikasyon faktörleri (metalotiyoneinler (MT), fitoşelatinler (FŞ) ya da glutatyon (GSH) gösterilmektedir.

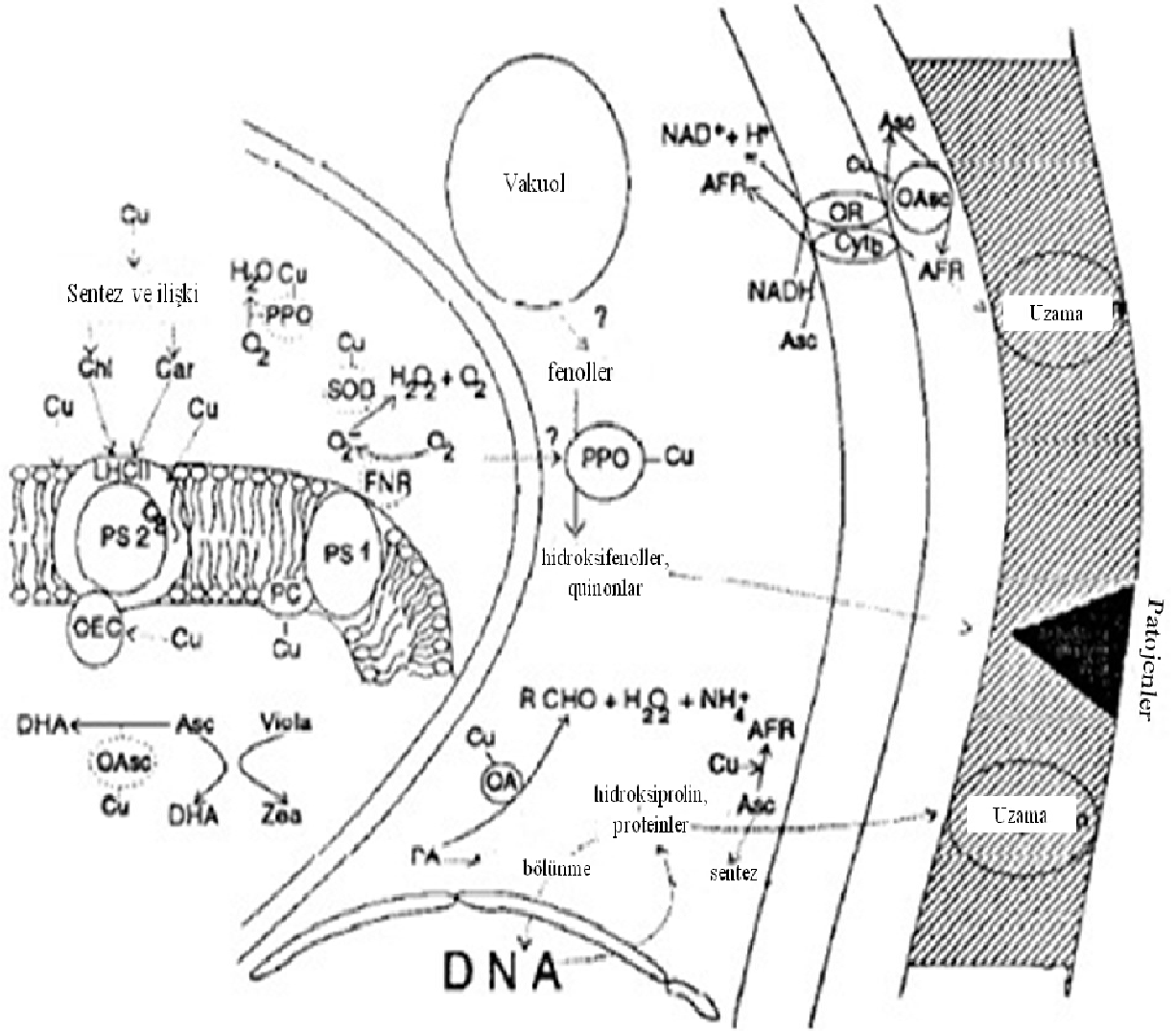
Bitki dokularındaki bakır taşınımı, mevcut bakırın seviyesiyle ve azot (N) taşınımıyla kuvvetli bir şekilde ilişkilidir. *Zea mays*, *Bromus inermis*, *Trifolium repens* ve *Lolium perenne* ile yapılan çalışmalar sonucu yapraklardaki bakır içeriği ile azot arasında önemli bir ilişki olduğu ortaya konmuştur (Fernandes ve Henriques, 1991).

Bitkiler içerisindeki bakırın dağılımı oldukça değişkendir. Bakırın toprak kolloidlerine ve diğer organik maddelere güçlü bir şekilde bağlanması nedeniyle taşınması büyük oranda kısıtlanır ve bitki için uygun olan bakır alımı bu nedenle genellikle düşük seviyededir. Bununla birlikte, bakır bitkideki diğer elementlere göre nispeten daha düşük oranda taşınır. Bitkiler tarafından absorbe edilen bakırın büyük bir kısmı kökte taşınmadan kalırken, yapraklarda yaşlanana kadar kalır. Sadece küçük miktarlarda bakır genç organlara taşınabilir. Bu nedenle, bakır eksikliğinde gelişim belirtilerinin görüldüğü ilk yerler genellikle genç organlardır (Kabata- Pendias ve Pendias, 2001).

### 2.5.1. Biyokimyasal Fonksiyonları

Bir geçiş metali olan bakır, mitokondri ve kloroplastlardaki redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzim ve proteinlerin fonksiyonel bir bileşenidir. Bakır, düzenleyici proteinlerde yapısal bir element olarak görev yaparken, oksidatif strese cevap, mitokondriyal solunum, hücre duvarı metabolizmasını içine alan birçok olaya katılmaktadır. Bakır iyonları Cu/Zn süperoksit düsmutaz (SOD), sitokrom c oksidaz, amino oksidaz, lakkaz, plastosiyanin ve polifenol oksidaz gibi birçok enzimin kofaktörüdür. Hücresel seviyede, bakır ayrıca transkripsiyon, protein metabolizması, oksidatif fosforilasyon ve demirin taşınmasında önemli bir role sahiptir. Bu nedenle, bitkiler normal büyüme ve gelişimleri için bir besin elementi olan bakıra ihtiyaç duyarlar (Yruela, 2005). Ayrıca bakır, hastalıklara karşı direnç mekanizmalarında da görev alır. Bitkilerin fungal hastalıklara karşı direnci yeterli miktarda mevcut bulunan bakırla yakından ilişkilidir (Kabata- Pendias ve Pendias, 2001).

Bakırın biyokimyasal fonksiyonları Şekil 2.5' de gösterilmektedir.



**Şekil 2.5.** Bitki hücrelerinde bakırın içinde bulunduğu biyokimyasal süreçler. PPO- polifenol oksidaz, OAsc- askorbat peroksidaz, OA- amin oksidaz, SOD- süperoksit dismutaz Cu/Zn, OR- oksidoredüktaz NADH/AFR, Asc ve DHA, indirgenmiş ve yükseltgenmiş askorbat formları, AFR- askorbat serbest radikal, PA- poliaminler, Viola- violaksantin, Zea- zeaksantin, FNR- redüktaz ferrodoksin/NADP (Maksymiec, 1997)

Bitkinin büyümesi ve gelişimi için bakırın mutlaka alınması, taşınması, bitki içerisinde dağıtılması ve farklı dokular içerisinde tutulması gerekmektedir. Hücre ve organellerdeki bakır içeriği dikkatli bir şekilde düzenlenmelidir. Bu amaçla, bitkiler esaslı metal iyonlarının uygun olan derişimlerini koruyabilmek için homeostatik mekanizmalara sahiptirler. Membran taşıma sistemleri bu süreçte merkezi bir rol oynar (Yruela, 2005).

### 2.5.2. Bitkilerde Bakır Eksikliği

Bakır bitkilerin büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan esasi bir besin elementidir. Bitkiler normal büyüme ve gelişmeleri için yaklaşık olarak 5-30 ppm bakıra ihtiyaç duyarlar (Zhang ve ark., 2008). Bakır eksikliği genellikle bakır konsantrasyonu 2 ppm'den az olduğunda meydana gelir (Kabata- Pendias ve Pendias, 2001).

Bakır eksikliği birçok fizyolojik süreci etkilemektedir. Bakır eksikliğinin tipik belirtileri ilk olarak genç yaprakların uçlarında ve sonra yaprak kenarları boyunca uzanır. Bununla birlikte, yaprakların bükülüp şekli bozulabilir ve hatta klorozis, nekrozis görülebilir.

Bakır plastosiyaninin bir bileşeni olarak fotosistem II ve fotosistem I arasındaki elektron taşınmasında farklı bir düzenleyici role sahiptir. Plastokinon bölgesindeki Cu değerinin düşmesi bunun sonucu olarak da plastosiyanin oluşumunun azalması nedeniyle fotosistem II ve I'deki elektron transferi inhibe olur (Shikanai ve ark., 2003).

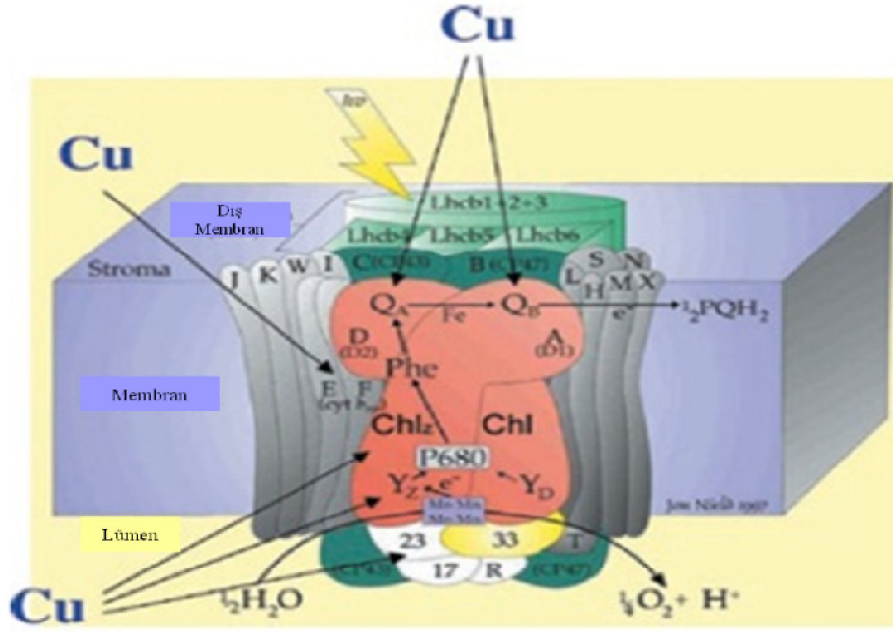
Bakır eksikliği ayrıca kloroplastları da etkiler. Bakır-eksik bitkilerde tilakoid membranların belirli açıl lipitlerinin doymuşluk derecesi değişerek membran yapısının bozulmasına neden olur. Ayrıca, bu koşullarda plastokinon sentezinin ve pigment içeriğinin (klorofil ve karotenoid) azaldığı belirlenmiştir (Barón ve ark., 1992). Bu olaylar bitki tarafından eksikliğin algılanmasıyla başlayarak genlerin düzenlenmesini sağlayan bir seri moleküler mekanizmaları kapsar. Bitki tarafından algılanan sinyal, bitki vasküler sistemi içerisinde transdüksiyon yolları boyunca aktarılır. Sinyaller bitkinin apikal meristemi kapsayan kısımları ve kökler arasında spesifik genlerin ekspresyonunu etkileyerek transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna ya da inaktivasyonuna neden olurlar. Bakır eksikliği bilinmesine ve yaygın olmasına rağmen, eksikliğin tanımlanması ve doğrulanması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Yruela, 2005).

### 2.5.3. Bakırın Bitkilere Toksik Etkileri

Bakır bitkilerde esasi bir element olmasına rağmen, aşırı miktarı toksisiteye neden olmaktadır. Aşırı miktarda bakır bitkilerde büyümeyi engellerken, fotosentez, pigment sentezi, azot ve protein metabolizması, membran geçirgenliği ve mineral alımı gibi biyokimyasal ve fizyolojik süreçleri geniş oranda etkiler (Demirevska-Kepova ve ark., 2004).

Bakır toksisitesi sonucu bitkilerde görülen en yaygın belirtiler, biyokütlede azalma (genellikle kök biyokütlesinde) ve klorozistir. Yapılan çalışmalarda yapraklarda daha az miktarda klorofil, tilakoid membranların lipit-protein kompozisyonunda ve kloroplast yapısında değişiklikler gözlenmiştir (Maksymiec, 1997). Özellikle, grana yığınlarının ve stroma lamellerinin bozulması, plastoglobulinin büyüklüğü ve sayısında artış ve intratilakoidal inklüzyonların belirmesi gibi değişikliklere neden olur (Yruela, 2005). Bu modifikasyonların bir sonucu olarak fotosistem II'nin membran akışkanlığının değiştiğini görmüşlerdir (Quartacci ve ark., 2000).

Bakır toksisitesinin elektron taşımaya etkisi ayrıntılı bir şekilde çalışılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda fotosistem II'nin (PS II) fotosistem I'den (PS I) daha hassas olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 2.6). PS II'nin hem akseptör hem de donör kısımlarının bakır toksisitesinin ana hedefleri olduğu ileri sürülmüştür. PS II indirgenme bölgesinde  $Q_B$  bağlanma tarafı ve Pheo-Fe- $Q_A$  bölgesi bakır toksisitesi için en hassas bölge olarak rapor edilmiştir (Yruela, 2005).



**Şekil 2.6.** Bitkilerde fotosistem II’de Cu toksisitesinin etkilediği alanlar (Yruela, 2005).

Bazı araştırmacılar toksik seviyedeki bakırın Tyr<sub>z</sub> ‘den P680<sup>+</sup> ‘ne doğru olan elektron akışını inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır. Bakır toksisitesinin donördeki etkilerine ek olarak, oksijen içeren komplekse ait proteinleri, Mn-kümelerini, akseptör bölgesini, hem grubu içermeyen Fe<sup>++</sup> ‘yi ‘ve sitokrom b<sub>559</sub> ‘yi etkilediği rapor edilmiştir (Bernal ve ark., 2004).

Bakır iyonları bitki hücrelerinde dolaylı yoldan bazı enzimatik yolları etkileyebilir. Aşırı bakır uygulamasından sonra etilen üretiminin artması büyük olasılıkla fotosistemlerin bloke olmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, lipoksigenaz aktivitesinin artması lipidlerin yapısının bozulmasına sonuç olarak da lipid peroksidasyonunun artmasına neden olmaktadır (Maksymiec, 1997).

Bakır toksisitesi reaktif oksijen türlerinin üretilmesi yoluyla oksidatif strese neden olabilir. Redoks aktif metal olan bakır Fenton tipi reaksiyonlar yoluyla reaktif oksijen türlerinin (ROT) etkili bir üreticisidir. Aşırı miktarda meydana getirilen ROT metabolik yolların bozulmasına ve makromoleküllerin hasar görmesine neden olmaktadır (Boojar ve Goodarzi, 2007).

Aşırı miktarda alınan  $\text{Cu}^{++}$  ve  $\text{Cu}^+$  iyonlarının bitkilere olan etkileri aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- 1- Doku hasarı ve kök hücrelerinin uzaması
- 2- Membran geçirgenliğinin değişmesi sonucunda kökten iyonların ( $\text{K}^+$ ,  $\text{PO}_4^{---}$ ) sızması
- 3- Kloroplast membran lipitlerinin peroksidasyonu ve elektron taşınmasının inhibisyonu
- 4- Hücre duvarları ve vakuollerdeki bakırın immobilizasyonu ve diffüz edilemeyen bakır-protein bileşiklerinin oluşumu
- 5- DNA hasarı ve sonuç olarak fotosentetik süreçlerin inhibisyonu (Kabata-Pendias ve Pendias, 2001).

## 2.6. Oksijen ve Oksidatif Stres

Moleküler oksijenle tanışmamız yaklaşık 2.7 milyon yıl önce çevremizdeki fotosentetik organizmalar aracılığıyla olmuştur ve ROT'lar oksijenli yaşamın davet edilmeyen elemanları olmuşlardır. Oksijenin esas toksik etkisi reaktif türevlerini kullanmasıyla oluşmaktadır (Gill ve Tuteja, 2010).

Oksijen molekülü eşleşmemiş iki elektrona sahiptir ve bu yüzden radikal olarak nitelendirilir (Halliwell, 2006). Bu elektronlar spinleri aynı yönde ve farklı orbitallerde iken minimum enerji seviyesindedirler. Radikal tanımına göre oksijen “diradikal” yapıya sahip bir moleküldür. Oysa oksijenin reaktivitesi beklenilenin aksine çok düşüktür. Diradikal yapıya sahip olan oksijenin her hangi bir molekülle tepkimeye girebilmesi için gireceği molekülün de benzer yapıya (farklı orbitallerde spinleri aynı yönde elektron içermesi) sahip olması gerekir. Oysa başta organik moleküller olmak üzere, atom ve moleküller orbitallerinde elektronları antiparalel ve eşleşmiş olarak içerir veya paylaşılmamış elektronlar kovalent bağlara katılmışlardır. Bunun sonucunda oksijenin diğer moleküllerle olan reaktivitesi son derece kısıtlanmıştır. Bu kısıtlama “spin kısıtlaması” olarak bilinir Bunun için moleküler oksijen fiziksel ve kimyasal olarak aktiveştirilmelidir (Perl-Treves ve Perl, 2002).

Fiziksel aktifleşme, uyarılmış bir klorofil molekülü gibi aktifleşmiş bir pigmentten uyarma enerjisinin moleküler oksijene transferi ile meydana gelir ve yeterli enerjiyi absorblayan oksijenin elektronlarından birisinin dönmesi tersine çevrilir. Bu durumda iki elektron birbirine karşıt dönmelere sahip olur. İlk oluşan etkili ve reaktif bir tür olan oksijenin singlet ( $^1O_2$ ) durumudur.  $O_2$  oldukça yüksek düzeyde dağılma özelliğine sahiptir ve organik moleküllerle tepkimeye girebilir. Organik moleküllerde eşleşmiş elektronlar yaygın olduğu için  $^1O_2$  organik moleküllere karşı triplet durumundan daha fazla reaktiftir (Perl-Treves ve Perl, 2002).

Kimyasal aktifleşme, dönme sınırlamasının olmadığı bir mekanizmadır. Moleküler oksijenin birer elektronlarının indirgenmesi ile meydana gelir. Moleküler oksijenin tümüyle suya indirgenmesi için 4 elektron (ve 4 proton) gereklidir. Tek değerli indirgenmenin üç ara ürünü; sırasıyla süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) dir. Bir organik moleküle çarpan reaktif oksijen türleri, ondan bir elektron çıkararak peroksil ( $ROO^{\cdot}$ ) ve alkoksil ( $RO^{\cdot}$ ) radikali gibi zincir reaksiyonlar oluşturabilen bir radikale geri verir (Perl-Treves ve Perl, 2002).

Farklı stres faktörleri bitki dokularında reaktif oksijen türlerinin üretilmesini arttırarak oksidatif hasara neden olurlar. Reaktif oksijen türleri aynı zamanda bitki hücrelerinin kloroplast, mitokondri ve peroksizom gibi farklı hücresel kısımlarında lokalize olmuş solunum ve fotosentez gibi normal metabolik süreçlerde de sürekli olarak meydana getirilirler Bunlardan bazılarının önemli sinyal molekülleri olarak fonksiyonu olmasına rağmen, tüm reaktif oksijen türleri yüksek konsantrasyonlarda organizmalar için oldukça zararlıdır (Gill ve Tuteja, 2010).

### 2.6.1. Serbest Radikaller

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest radikal, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan bağımsız olarak bulunabilme yeteneğine sahip atom veya moleküllerdir. Bu tanım, hidrojen atomunu, pek çok geçiş metalini ve oksijenin kendisini de içine alır. Elektronlar, orbital olarak bilinen potansiyel alanları işgal eden negatif yüklü parçacıklardır. Her orbital, maksimum iki elektron taşır Elektronlar orbitallerde çiftleştiklerinde daha kararlıdır.



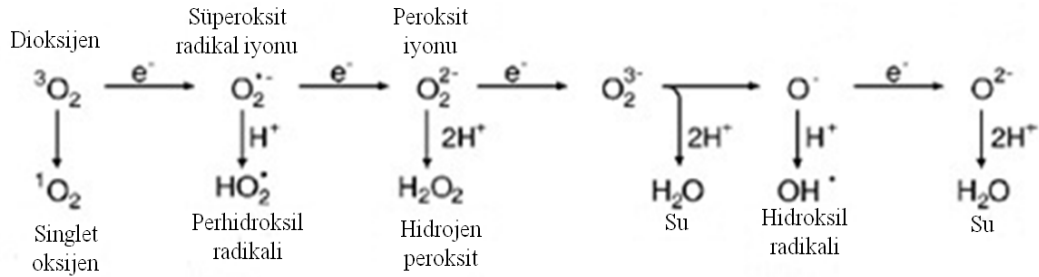
Bu kararlı yapı eşleşmemiş elektron bulunduğunda bozular (Halliwell ve Gutteridge, 1984).

Radikaller, reaktif doğaları yüzünden in vivo da kısa ömürlüdür. Çünkü oluşur oluşmaz çevrelerindeki diğer moleküllerle etkileşirler. Başka radikalleri oluşturarak zincir reaksiyonlarına neden olurlar. Yüksek konsantrasyonda lipit peroksidasyonunu indükleyerek, proteinleri modifiye ederek ve DNA fragmentasyonuna neden olarak biyolojik bileşikleri yıkarlar (Halliwell, 2006).

### 2.6.2. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

ROT, bitkilerde oluşan radikal türlerin en önemli sınıfını teşkil eder. ROT' lar oksijen merkezli radikaller ve oksijen merkezli radikal olmayanlar olarak sınıflandırılabilir. Oksijen merkezli radikaller, süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil radikali ( $\cdot OH$ ), alkoksil radikali ( $RO\cdot$ ) ve peroksil radikali ( $ROO\cdot$ ) dir. Oksijen merkezli radikal olmayanlar, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve singlet oksijendir (Halliwell, 2006).

ROT' lar moleküler oksijenin ardışık olarak indirgenmesi sonucu oluşan kimyasal olarak reaktif olan moleküllerdir. Oksijenin bir elektronunun indirgenmesi ile kararlı ara ürünler oluşur. Oksijenin bir elektron indirgenme ürünü olan süperoksit anyonu, pek çok ROT'un öncülüdür ve oksidatif zincir reaksiyonlarının bir aracıdır. Süperoksitin dismutasyonu ile hidrojen peroksit oluşur. Hidrojen peroksit daha sonra tamamen suya veya kısmen hidroksil radikaline, hidroksil radikali ise tekrar süperoksite indirgenebilir (Şekil 2.7) (Apel ve Hirt, 2004).



**Şekil 2.7.** Farklı reaktif oksijen türlerinin enerji transferi yoluyla oluşumu (Apel ve Hirt, 2004).

Çizelge 2.1’de bitki dokularında bulunan önemli reaktif oksijen türleri ve onların temel özellikleri verilmektedir (Varnova ve ark., 2002).

**Çizelge 2.1.** Bitki dokularındaki önemli ROT molekülleri ve temel özellikleri

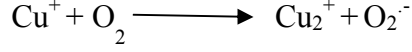
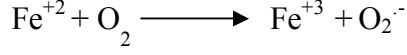
| ROT  | Yarı ömrü   | Göç kapasitesi | Reaksiyona girdiği bileşikler |                         |               |
|--|-------------|----------------|-------------------------------|-------------------------|---------------|
|  |             |                | DNA                           | Protein                 | Lipit         |
| <b>Süperoksit (<math>O_2^-</math>)</b>           | 1-4 $\mu$ s | 30 nm          | –                             | Fe-S merkezi            | Nadiren       |
| <b>Hidrojen peroksit (<math>H_2O_2</math>)</b>   | 1 ms        | 1 $\mu$ m      | –                             | Sistein                 | Nadiren       |
| <b>Hidroksil radikali (<math>OH\cdot</math>)</b> | 1 $\mu$ s   | 1 nm           | Hızlı şekilde                 | Hızlı şekilde           | Hızlı şekilde |
| <b>Singlet oksijen (<math>^1O_2</math>)</b>      | 1 $\mu$ s   | 30 nm          | Guanin                        | Trp, His, Tyr, Met, Cys | PUFA          |

### 2.6.2.1. Süperoksit Radikalleri ( $O_2^-$ )

ROT’ lar  $O_2$ ’nin kısmen indirgenmesiyle ya da enerji transferi yoluyla kloroplastlarda fotosentez süresince sürekli olarak meydana getirilirler.  $O_2^-$  üretiminin ana sahası tilakoid membrana bağlı PS I’in elektron akseptörüdür.  $O_2^-$  genellikle ilk oluşturulan reaktif oksijen türüdür. Bitki dokularında  $O_2$  tüketiminin yaklaşık olarak %1-2 ‘si  $O_2^-$  oluşumuna neden olur.  $O_2^-$  kloroplastlarda döngüsel olmayan elektron taşıma sisteminde ve bitki hücresinin diğer bölümlerinde elektron taşınması sırasında  $O_2$ ’nin indirgenmesiyle üretilmektedir (Gill ve Tuteja, 2010).

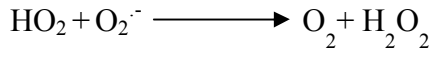
Terminal oksidazlardan sitokrom oksidaz  $O_2$  ile reaksiyona girer, dört elektron taşınır ve su açığa çıkar. Bununla birlikte,  $O_2$  bazen elektron taşıma sisteminin diğer bileşikleriyle de reaksiyona girebilir. Ancak, burada sadece bir elektron taşınır ve sonuç olarak yarı ömrü yaklaşık olarak 2-4  $\mu$ s olan reaktif oksijen türü  $O_2^-$  meydana gelir (Halliwell, 2006).

İndirgenmiş geçiş metallere otoksidasyonu da süperoksit meydana getirebilir. Bu reaksiyonlar geri dönüşümlüdür. Bu yüzden, geçiş metalleri iyonlarının oksijenle reaksiyonları geri dönüşümlü redoks reaksiyonları olarak düşünülebilir (Akkuş, 1995).



$\text{O}_2^{\cdot-}$  serbest bir radikal olmakla birlikte kendisi direk olarak zarar vermez. Asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarını indirgeyici olmasıdır. Bununla beraber, protonlanmış, perhidroksil radikali ( $\text{HO}_2$ ) ( $\text{pKa} = 4.8$ ) daha çok reaktiftir ve lipid peroksidasyonunu başlatabilir.

Süperoksit ile perhidroksil radikali birbirleriyle reaksiyona girince biri okside olur diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir.



### 2.6.2.2. Singlet Oksijen ( $^1\text{O}_2$ )

Singlet oksijen, moleküler oksijenin yüksek enerji ile uyarılmış formudur. Oksijenin enerjetik olarak uyarılan bu formunun reaktivitesi çok yüksektir. Singlet oksijen molekül yapısında iki adet çiftlenmemiş elektron taşır. İhtiva ettiği yüksek enerjiyi çevreye dalga enerjisi şeklinde vererek yeniden oksijene dönüşebilir veya kovalent tepkimelere girer (Halliwell, 2006).

Yüksek enerji ve dönme durumundan dolayı  $^1\text{O}_2$ 'nin organik moleküllere karşı reaktivliği moleküler oksijenden çok daha fazladır.  $^1\text{O}_2$  nükleofiliktir ve sıklıkla diğerk molekülleri divalent olarak oksitler, hidroperoksit ve endoperoksit şekillerine çift bağlar ekler, proteinleri oksitleyerek zarar verir.  $^1\text{O}_2$  bir radikal olmadığı için bu reaksiyonlar radikal üretmez ve doğrudan zincir reaksiyonlar başlatmaz. Bununla beraber, peroksitlerin indirgenmesi durumunda oldukça reaktif alkoksil radikaller meydana gelir. Bunlardan özellikle çoklu doymamış yağ asitlerinden meydana gelen peroksil radikali yarı ömrü uzun olan bir radikaldir.

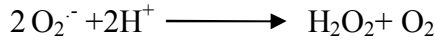
Singlet oksijen sıra dışı bir reaktif oksijen türüdür. Çünkü  $\text{O}_2$  'ye elektron taşınmasıyla ilişkili değildir. Fotosentez süresince yetersiz enerji dağılımı klorofilin triplet durumunun oluşumuna neden olabilir. Triplet klorofil ( $^3\text{Chl}^*$ ) ile  $^3\text{O}_2$  reaksiyona girer ve onu daha çok reaktif olan  $^1\text{O}_2$  'ye dönüştürür. Bu durum fotosistem I ve II kadar

fotosentetik aygıtta da güçlü bir şekilde zarar verir. En çok etkili  $^1\text{O}_2$  temizleyen molekül  $\beta$ -karotendir.  $\beta$ -karoten doğrudan  $^1\text{O}_2$  ile tepkimeye girer ve ısı olarak uyarılma enerjisini dağıtır. Bunun yanında triplet klorofil ( $^3\text{Chl}^*$ ) ile reaksiyona girer ve onu  $^1\text{Chl}$ 'ye dönüştürür. Böylece  $^1\text{O}_2$  oluşması önlenmiş olur. Tilakoit membranların çift lipit tabakalarında bulunan  $\alpha$ -tokoferol de  $^1\text{O}_2$ 'leri temizler. AA ve GSH da milimolar düzeyde olduklarında  $^1\text{O}_2$  toplayabilirler (Gill ve Tuteja, 2010).

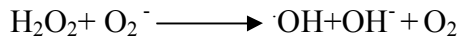
### 2.6.2.3. Hidrojen Peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

Hidrojen peroksit süper oksitin bir elektron alması sonucu oluşur.  $\text{H}_2\text{O}_2$  membranlardan kolayca geçebilen, diğer reaktif oksijen türlerine göre uzun ömürlü (1 ms) bir oksidanttır. Yapısında eşlenmemiş elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz (Gill ve Tuteja, 2010).

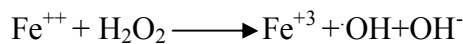
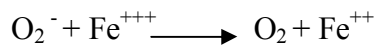
$\text{H}_2\text{O}_2$  'nin biyolojik sistemlerdeki asıl üretimi süperoksitin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar. Bu dismutasyon reaksiyonu etkili bir şekilde süperoksit dismutaz tarafından katalizlenir.



Hidrojen peroksit Cu ve Fe elementlerinin varlığında süperoksit radikali ile reaksiyona girebilir ve daha reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali ( $\text{OH}^\cdot$ ) oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir.



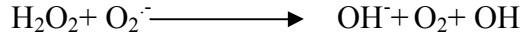
Bu reaksiyona “Haber- Weiss” reaksiyonu adı verilir. Haber-Weiss reaksiyonu ya katalizör varlığında ya da katalizörsüz gerçekleşebilir. Fakat, katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Demirle katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır. Bu reaksiyonda önce ferri demir ( $\text{Fe}^{+++}$ ) süperoksit tarafından ferro demire ( $\text{Fe}^{++}$ ) indirgenir. Sonra bu ferro demir kullanılarak “Fenton reaksiyonu” ile hidrojen peroksitten  $\text{OH}^\cdot$  ve  $\text{OH}^-$  üretilir. Reaksiyon mekanizması aşağıdaki şekildedir (Akkuş, 1995).



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bitkilerde çift role sahiptir: Düşük konsantrasyonlarda, çeşitli abiyotik ve biyotik stres karşısında sinyalin başlamasını tetikleyen bir sinyal molekülü gibi davranırken, yüksek konsantrasyonlarda programlanmış hücre ölümüne neden olur (Quan ve ark., 2008). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin ayrıca senesens, fotorespirasyon ve fotosentez, hücre döngüsü, büyüme ve gelişim gibi birçok fizyolojik süreçte düzenleyici anahtar bir rol üstlendiği ortaya konmuştur. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nispeten küçük olması, membranlardan kolay bir şekilde geçmesi ve uzun ömürlü olmasından dolayı bir sinyal molekülü olarak kabul edilmektedir (Gill ve Tuteja, 2010).

#### 2.6.2.4. Hidroksil Radikali (OH<sup>•</sup>)

Hidroksil radikali, hidrojen peroksitten bakır ve demir gibi geçiş metallerinin varlığında Haber- Weiss ya da Fenton reaksiyonları yoluyla meydana gelirler. Hidroksil radikali son derece reaktif olan bir oksidan radikalidir. Yarılanma ömrü (1 µs) çok kısadır. Oluştığı yerde büyük hasara neden olur (Gill ve Tuteja, 2010).

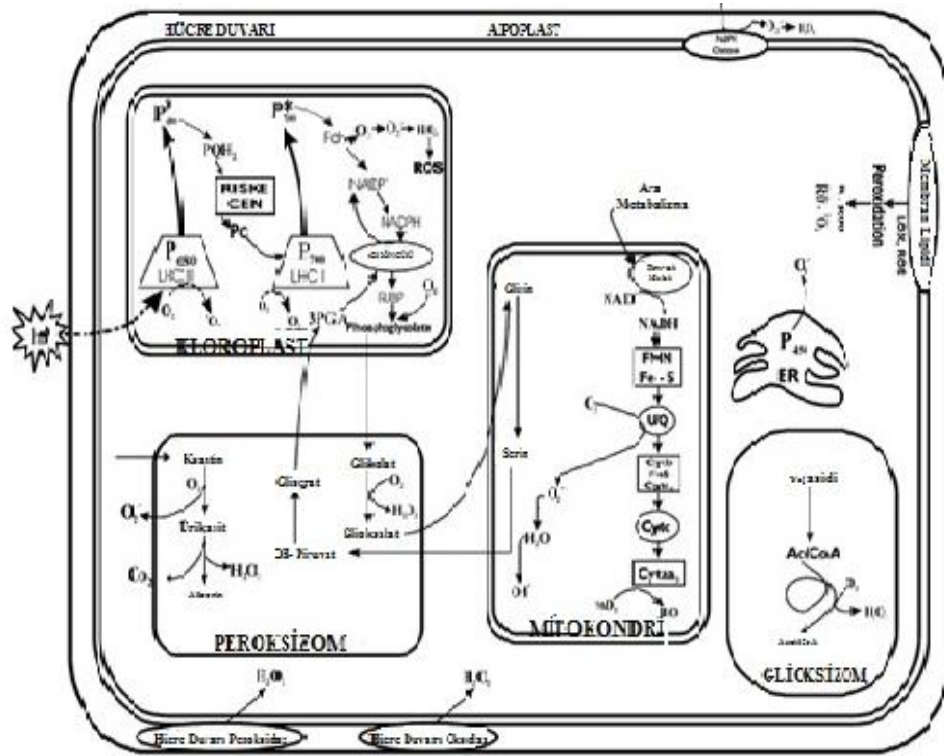


Yüksek oksitleyici gücünden dolayı HO<sup>•</sup> organik ve inorganik moleküllerle hidrojen çıkarma veya elektron transferi yoluyla reaksiyona girer. Reaksiyon aynı zamanda genellikle HO<sup>•</sup>'dan daha uzun ömürlü ve daha az reaktif olan radikaller de üretir. Böyle uzun ömürlü radikaller O<sub>2</sub> ile tepkimeye girdiklerinde radikal zincir reaksiyonları oluşturulur (Perl-Treves ve Perl, 2002).

HO<sup>•</sup> üretildiği yerin yakınındaki çoğu moleküllerle seçici davranmadan tepkimeye girer. Böylece uzak mesafelere dağılamaz. Başka bir deyişle OH için spesifik tutucular yoktur. HO<sup>•</sup> toksisitesinden hücrelerin etkili şekilde korunması ancak O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve geçiş metal iyonlarının düşük düzeyde tutulmasıyla olur. Hücrelerde meydana geldiği anda HO<sup>•</sup> bir reaksiyon kümesi ile temizlenirler. Her hücre bölümünde bol miktarda bulunan indirgenler olan askorbat ve glutatyon, OH<sup>•</sup> üretildiği yerde bulduklarında ilk savunular olarak hareket ederler. Su stresi sırasında mannitol ve trehaloz gibi bazı uygun bileşiklerin HO<sup>•</sup> temizledikleri ve stres toleransına katkıda buldukları işaret edilmiştir (Smirnoff, 1993).

### 2.6.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Üretimi

Birçok hücreyel bileşen ROT'ları oluşturma ve biriktirme potansiyelindedir. (Şekil 2.8). Bununla birlikte, bitkilerde ROT'lar çoğunlukla kloroplast, mitokondri ve peroksizomlarda üretilmektedirler (Apel ve Hirt, 2004; Bhattacharjee, 2005). Işıқта kloroplastlar ve peroksizomlar ROT oluşumunun ana kaynağıdır. Karanlıkta ise ana ROT üreticileri mitokondrilerdir (Foyer ve Noctor, 2003). Kloroplastlarda fotosentezin Z-şeması içerisinde hem  $O_2^-$  hem de  $^1O_2$  üretilirken, mitokondride elektron taşıma zincirinde kompleks I ve III'te  $O_2^-$  üretilir (Millar ve Leaver, 2000).

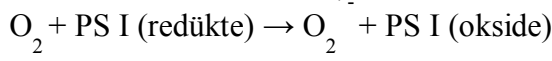


Şekil 2.8. Bitki hücrelerinde ROS oluşum alanları ve kaynakları (Bhattacharjee, 2005)

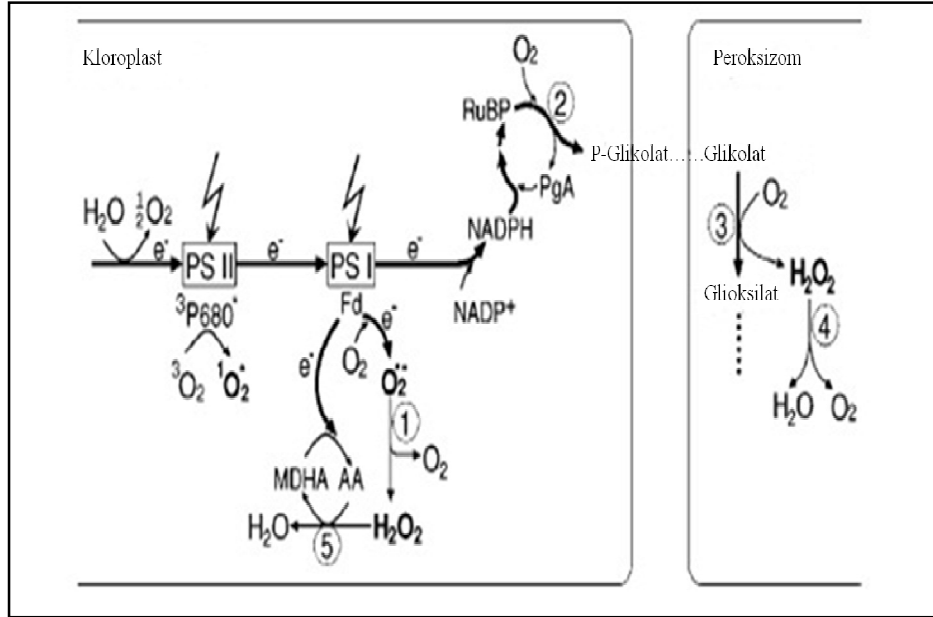
#### 2.6.3.1. Kloroplastlarda Reaktif Oksijen Üretimi

Oksijen fotosentezde elektron taşınması süresince sürekli olarak üretilmektedir. Fotosistem I (PS I)'le ilişkili olan elektron taşıma bileşiklerinin indirgenmesi ve Rubiskoyu'da içine alan fotorespirasyonla ilişkili reaksiyonlar  $O_2$  'nin süperoksit

radikaline fotoredüksiyonuna neden olur. Bunun sonucunda da reaktif oksijen türleri meydana gelir. Kloroplastlarda reaktif oksijen türlerinin iki oluşum yeri bulunur. Birincisi fotosistem I'in diğeri fotosistem II'nin indirgen bölgesidir. Fotosistem I'in ucundaki FeS merkezlerinin redoks potansiyeli oksijenden tek değerli  $O_2^-$  radikali üretecek kadar düşüktür.



Bitkiler yüksek yoğunlukta ışığa maruz kaldıklarında, yüksek oranda  $CO_2$  asimilasyonunun olması ve elektron taşıma zincirinin indirgenmesi fotosistem II'nin inaktivasyonuna ve fotosentezin inhibisyonuna neden olur. Bitkiler fotosentetik aygıtı fotoinhibisyona karşı korumak için iki strateji kullanabilirler. İlk olarak, PS II 'de aşırı uyarılma enerjisinin ısı olarak dağılımı (fotokimyasal olmayan yol) ve ikinci olarak, çeşitli akseptörlerden gelen elektronların PS II'ye taşınma kabiliyetidir (fotokimyasal yol) (Şekil 2.9) (Apel ve Hirt, 2004).

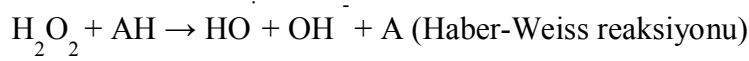


**Şekil 2.9.** Yüksek ışık yoğunluğunda kloroplastlarda ve peroksizomlarda ROT'ların üretilmesine neden olan fotosentetik elektron taşınmasının başlıca özellikleri. Koyu oklar elektron taşınmasının ana rotasını göstermektedir. Şekildeki anahtar enzimler daire içine alınmış sayılarla gösterilmektedir: 1) süperoksit dismutaz, 2) Rubisko, 3) gliksilat oksidaz 4) katalaz ve 5) askorbat peroksidaz (Apel ve Hirt, 2004)

Aşırı ışık, kuraklık, tuz stresi gibi çeşitli abiyotik stres altında kloroplastlarda reaktif oksijen üretimi artar. Normalde, elektron akışı fotosistem merkezlerinden  $NADP^+$ 'ya doğrudur ve  $NADP^+$   $NADPH$ 'ya indirgenir. Sonra Kalvin döngüsüne girer ve

en son elektron alıcısı olan CO<sub>2</sub>'ye gider (Gill ve Tuteja, 2010). Kalvin döngüsünün aktivasyonunun düzenlenmesi ve fotosentezde Z-şemasındaki elektron akışının kontrolü bitki hücrelerinin redoks durumunun belirlenmesindeki önemli faktörlerdir. Hücre içerisinde üretilen süperoksit radikallerinin (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) çoğunluğu ferrodoksenden O<sub>2</sub>'ye doğru olan elektron sarması sonucu oluştuğu düşünülmektedir. PS I' de Mehler reaksiyonu yoluyla moleküler oksijenin bir elektron almasıyla oluşturulan süperoksit radikalleri kloroplastik Cu-Zn süperoksit dismutaz tarafından hızlı bir şekilde hidrojen peroksit'e dönüştürülür (Bhattajharjee, 2005). Yüksek ışık yoğunluğunda Mehler askorbat peroksidaz yolu ile O<sub>2</sub>'nin suya fotoredüksiyonunun toplam elektron taşınmasının %30'unu oluşturduğu ileri sürülmektedir (Apel ve Hirt, 2004).

İndirgenler ve uygun bir katalizör (geçiş metal iyonları, kinonlar ve Fd) (Jakob ve Heber, 1996) sağlandığı zaman H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oldukça toksik hidroksil radikal (OH<sup>·</sup>) şekline dönüşür.



AA, GSH ve O<sub>2</sub><sup>-</sup> bu reaksiyonda indirgen olabilirler. Katalizör olarak PS I'in reaksiyon merkez kompleksindeki FeS merkezleri (Sonoike, 1996) de OH<sup>·</sup> üretebilir. Fe, Cu ve Mn geçiş metal iyonları olarak etkili katalizörlerdir. OH<sup>·</sup> oldukça yüksek oksitleyici güce sahiptir ve organik molekülleri devamlı olarak 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> de oksitler, bundan dolayı reaktif oksijen türleri arasında en fazla toksik olan moleküldür (Halliwell ve Gutteridge, 1989).

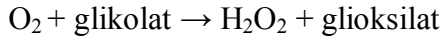
### 2.6.3.2. Peroksizomlarda Reaktif Oksijen Üretimi

Peroksizomlar küçük ve tek bir lipid tabakasına bağlı olan genellikle küresel şekilli mikrocisimciklerdir. Bunlar subsellüler organeller olup hücrelerarası ROT üretiminin ana merkezleridir. Peroksizomlarda kloroplast ve mitokondri gibi O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikallerini normal metabolizmalarının bir sonucu olarak üretirler. Burada O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikallerinin meydana geldiği iki alan vardır. İlk olarak, organel matriksinde ksantin oksidaz tarafından katalizlenen ksantin ve hipoksantin üreye oksidasyonunda, ikinci



olarakta peroksizom membranlarında bileşeni NAD(P)H olan (moleküler ağırlığı 32 kDa olan ferrisiyanit redüktaz ve sitokrom b) küçük bir elektron taşıma zincirinin kullanılması yoluyla üretilmektedirler. Monodehidroaskorbat redüktazda peroksizom membranlarında  $O_2^-$  üretimine katılmaktadır (Del Rio ve ark., 2002).

Reaktif oksijen türlerinin en büyük üretim reaksiyonları yalnızca kloroplastlardaki oksijenin oksijene univalent indirgenmesi değil aynı zamanda kloroplast dışındaki kısımlarda da  $O_2$ 'nin  $H_2O_2$ 'ye divalent indirgenmesi reaksiyonlarında da oluşurlar. Peroksizomlar divalent reaksiyonlar için oksidazlar içerirler ve ışık ortamdaki solunum ve lipidlerin  $\beta$ - oksidasyonu gibi oksidatif metabolizma ile beraber  $H_2O_2$  üretirler. C3 bitkilerindeki  $H_2O_2$ 'nin önemli miktarı peroksizomal glikolat oksidaz yoluyla fotorespirasyon sırasında üretilir (Perl-Treves ve Perl, 2002).



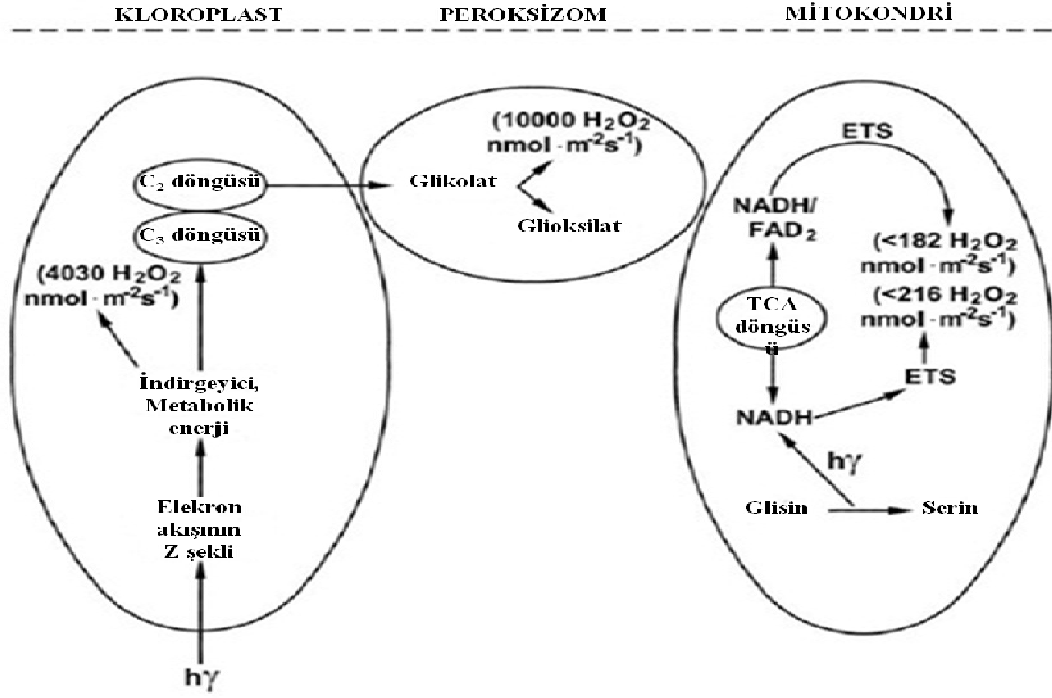
Peroksizomlarda  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$  üretiminin artması oksidatif hasara ve muhtemelen hücre ölümüne neden olur, fakat diğer taraftan küçük miktarlardaki  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$  bitkilerde patojenlerin uyardığı programlanmış hücre ölümünde sinyal molekülleri olarak görev yaptıkları ortaya konmuştur (Gill ve Tuteja, 2010).

### 2.6.3.3. Mitokondrilerde Reaktif Oksijen Üretimi

Mitokondriyal elektron taşıma sistemi (kompleks I ve III) ROT'ların potansiyel kaynaklarıdır (Varnavo ve ark., 2002; Gill ve Tuteja, 2010). Bitki mitokondrileri hayvanlardaki mitokondrilere karşılık elektron taşıma zincirindeki belirli bileşikler ve fotorespirasyon gibi süreçlerdeki fonksiyonları açısından önemli derecede farklılık göstermektedir. Fotosentez sonucu meydana gelen  $O_2$  ve karbohidratlar nedeniyle bitki mitokondrisinin hücresel çevresi oldukça farklıdır (Gill ve Tuteja, 2010).

$O_2$ 'nin direk olarak  $O_2^-$  indirgenmesi solunum zincirinde NADH dehidrogenazın flavoprotein bölgesinde meydana gelmektedir. Mitokondriyal elektron taşınması boyunca oksijen radikali ubikinondan sonra elektron akışını bloke eden antimisin A'nın varlığında önemli bir şekilde artar (Maxwell ve ark., 2002).

ROT oluşumundaki nispi oranlar Şekil 2.10'da gösterilmektedir (Gupta, 2009).



Şekil 2.10. Hücrenin farklı bölümlerinde ROT oluşum oranları (Gupta, 2009)

#### 2.6.3.4. Diğer Reaktif Oksijen Üretim Kaynakları

Bitkilerde ROT üretiminin diğer önemli kaynakları endoplazmik retikulum ve stoplazmada sitokrom P450 tarafından katalizlenen detoksifikasyon reaksiyonlarıdır. ROT'lar genellikle plazma membranında ya da ekstrasellüler olarak bitkilerin apoplastında oluşturulur. pH-bağlı hücre duvar-peroksidazları, oksalat oksidazlar ve amino oksidazlar bitki hücrelerinin apoplastında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin bir kaynağı olarak saptanmıştır. pH-bağlı hücre duvar-peroksidazları indirgeyici bir üretici olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin varlığında alkali pH tarafından aktive edilmektedir. Bu yol biyotik stres süresince ROT'ların üretilmesinde alternatif bir yoldur (Gill ve Tuteja, 2010).

#### 2.6.4. Oksidatif Stres ve Hücre Biyokimyası

Normal büyüme koşullarında hücrelerde ROT üretim seviyesi düşüktür, fakat stres koşullarında hücrel homeostasinin zarar görmesi sonucu ROT seviyesi artmaktadır. Cd, Pb, Fe, Ni, Cu, As ve Al gibi metal toksisitesi nedeniyle ROT üretiminin artışı birçok bitki türünde gözlenmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda ROT, lipitleri, proteinleri ve nükleik asitleri içeren hücrel yapılara zarar verebilirler (Verma ve Dubey, 2003; Sharma ve Dubey, 2007; Sharma ve Dietz, 2008; Sandalio ve ark., 2009).

Bitkilerde ağır metaller yoluyla uyarılan oksidatif stres, süperoksit radikalleri ( $O_2^-$ ), tek oksijen ( $O_2$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikalleri ( $OH^\cdot$ ) gibi reaktif oksijen türlerinin oluşması sonucu meydana gelmektedir. Bu oksijen türleri lipit peroksidasyonu, enzim inaktivasyonu/aktivasyonu ve DNA hasarına sebep olurken, büyüme ve verimin dramatik bir şekilde düşmesine sonuçta bitkinin ölümüne yol açmaktadır (Guo ve ark., 2007; Sun ve ark., 2007).

##### 2.6.4.1. Lipit Peroksidasyonu (LPO)

Lipit, hücreleri ve hücrel organelleri çevreleyen membranın önemli bir bileşenidir. Oksidatif hasarın indikatörü olarak görülen lipit peroksidasyonu hücre membranındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) serbest radikallerle etkileşerek bir seri reaksiyon sonucu bozulmaları ve lipit hidroperoksidlerin oluşmasıdır (Sharma ve Dubey, 2005).

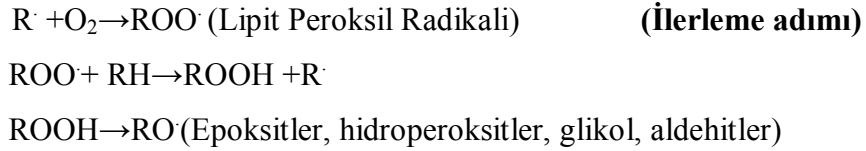
Peroksidasyon sonucunda lipit hidroperoksidler, lipit epoksidler, epoksi alkoller ve malondialdehit (MDA), etan, pentan gibi kısa zincirli bileşikler ile 4-hidroksi-nonenal (4-HNE) oluşur. MDA ve 4-HNE gibi aldehitlerin biyolojik aktiviteleri DNA ve proteinlerle çapraz bağlanarak moleküllerin işlev/faaliyetini değiştirmeleri şeklindedir. Biyolojik sistemlerde MDA üreten tek mekanizma lipit peroksidasyonudur. Malondialdehit lipit peroksidasyonunun ana ürünü değildir, ancak tipik parçalanma ürünüdür ve lipit peroksidasyonunun belirlenmesinde yaygın olarak kullanılır (Gill ve Tuteja, 2010).

Lipit peroksidasyonu başlama, ilerleme ve sonlanma basamakları olmak üzere üç aşamada yürür (Şekil 2.11) (Södergren, 2000).

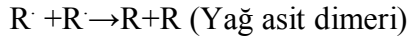
**1. Başlama:** Başlama adımı özellikle Fe ve Cu gibi geçiş metal bileşiklerini gerektirmektedir. Başlangıçta bu metaller Fenton reaksiyonları yoluyla O-O bağlarını yıkararak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi OH dönüştürürler (Halliwell, 2006). Hidroksil radikalının oksitleyici bir radikal türün çoklu doymamış yağ asitlerinden bir hidrojen atomu ayırması ile lipit peroksidasyonu başlar. PUFA yağ asitlerinden hidrojenin ayrılması ile lipit radikali (R<sup>•</sup>) oluşur.



**2. İlerleme:** Lipit radikali oksijen ile reaksiyona girer ve lipit peroksil radikali (ROO<sup>•</sup>) oluşur. Lipit peroksil radikali başka bir lipit molekülünden bir hidrojen molekülünü ayırır. Böylece lipit hidroperoksit (ROOH) ve ikinci bir lipit radikali oluşur. Lipit peroksil radikali başka bir lipit molekülünden bir hidrojen atomu ayırma yeteneğindedir. Bu lipit peroksidasyonunun zincirleme olarak ilerlemesine neden olur. Oluşan karbon radikali başka bir peroksil radikali oluşturmak üzere ileri oksijen eklenme reaksiyonu geçirebilir ve böylece lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonları şeklinde devam eder. Lipit peroksil radikali hidrojen atomu ile birleşerek bir ROOH oluşturur.



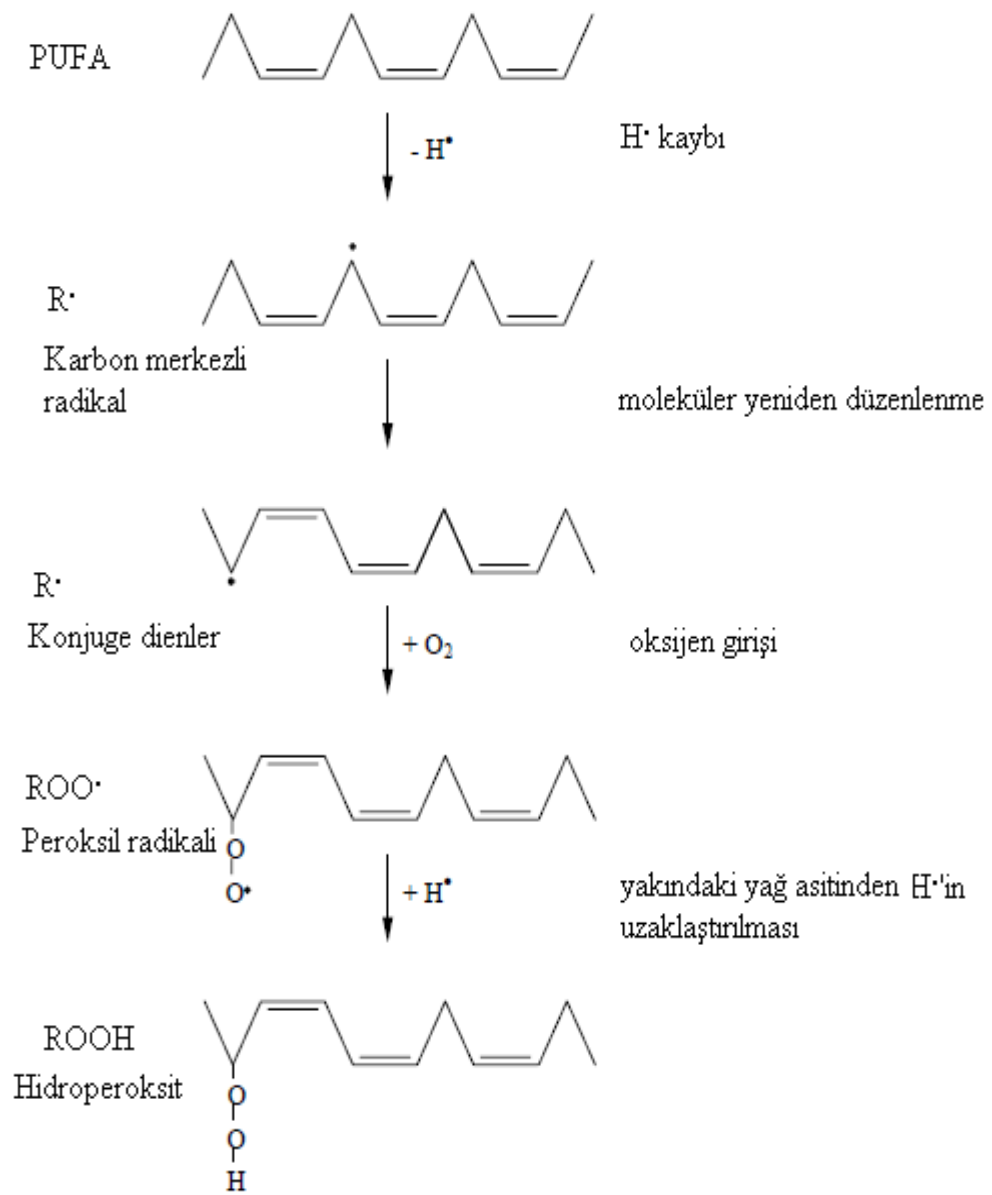
**3. Sonlanma:** Başka bir radikal, protein ya da serbest radikal yakalama yeteneğindeki bileşik ile reaksiyon sonucu sonlanma meydana gelir ve stabil son ürün oluşur. Oluşan hidroperoksit lipid peroksidasyon işlemi bitirmek üzere farklı reaksiyonlar geçirebilir. Bir hidroksi yağ asidine indirgenebilir ya da siklik endoperoksitleri oluşturmak üzere siklizasyon geçirebilir. Son ürünlerin oluşumu lipit peroksidasyonunun sonlanma aşamasını oluşturur. Radikaller, aldehitler ve lipit peroksidasyonunun diğer ürünleri arasındaki kompleks reaksiyonlar membran proteinlerinde önemli zararlara neden olabilir (Gill ve Tuteja, 2010).



**(Sonlanma adımı)**



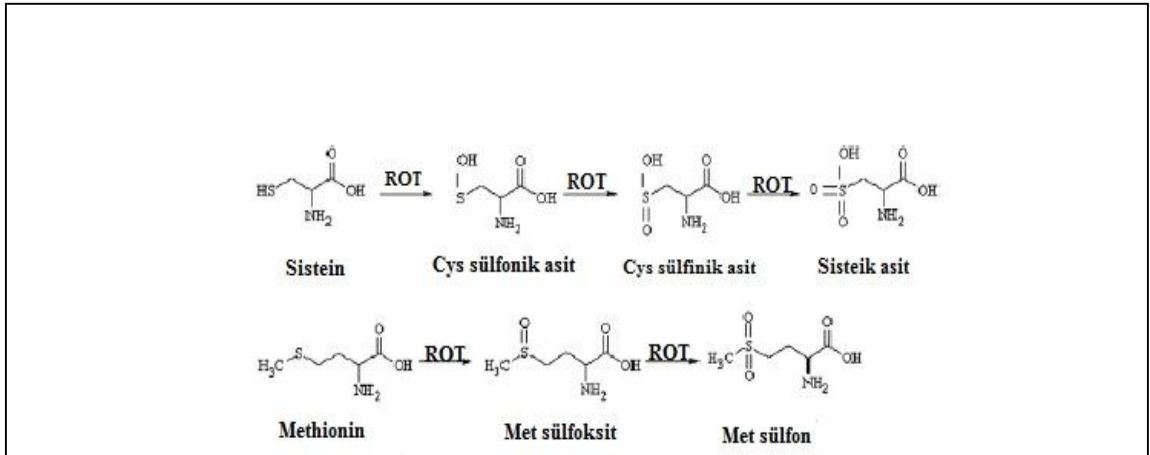
Lipit peroksidasyonu, membran akışkanlığını azaltır, iyonların spesifik olmayan permeabilitesini artırır ve membrana bağlı enzimleri inaktive eder (Halliwell, 2006).



**Şekil 2.11.** Lipit peroksidasyonunun mekanizması (Söregren, 2000)

### 2.6.4.2. Protein Oksidasyonu

Protein oksidasyonu ROT ya da oksitatif stres yoluyla uyarılan bir proteinin ortak modifikasyonu olarak tanımlanır. Sülfür içeren bazı aminoasitlerin oksidasyonu geri dönüşümlüdür, bu oksidasyonların çoğu temelinde geri dönüşümsüzdür. Protein karbonilleme yaygın bir şekilde protein oksidasyonunun markırı olarak kullanılmaktadır. Amino asitlerin bir proteinin oksidasyon sayısı özellikle Arjinin, Histidin, Lizin, Prolin, Threonin ve Triptofan başta olmak üzere onların aktivitelerini değiştiren ya da inhibe edebilen karbonil gruplarına göre verilir. Protein karbonilleme amino asit yan zincirlerinin direk oksidasyonu sonucunda da meydana gelebilir (Şekil 2.12). Amino asit yan zincirlerinin oksidasyonuna, protein-protein çapraz bağlanmaları ve protein fragmentasyonuna yol açan protein modifikasyonları, hidroksil radikalleri tarafından başlatılır. ROT sentezi ve etki konumu ne olursa olsun sülfür içeren aminoasitler ve tiyol grupları muhtemel hedefidir (Gill ve Tuteja, 2010).



Şekil 2.12. Protein oksidasyonu (Gill ve Tuteja, 2010).

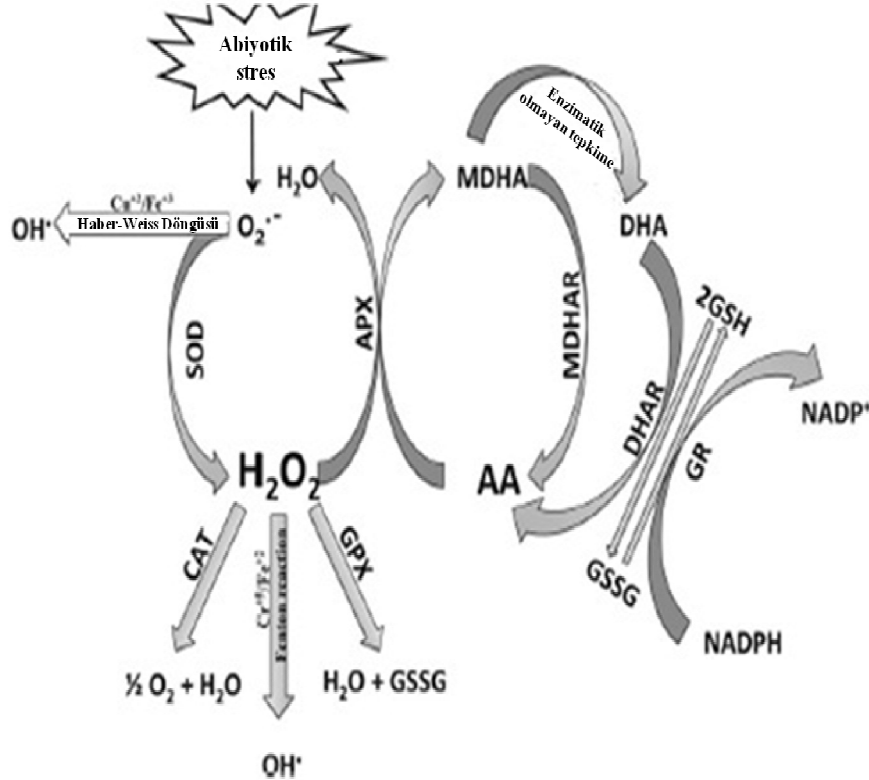
### 2.6.4.3. DNA Oksidasyonu

Bitki genomu çok sağlam olmasına rağmen biyotik ve abiyotik stres altında DNA'nın hasar görmesine neden olabilir. ROT' ların aşırı üretimi sonucu uyarılan programlanmış hücre ölümü nükleik asitlere hasar veren oksidatif süreçten kaynaklanmaktadır (Mittler, 2002). DNA hasarı tüm organizmanın büyüme ve gelişimini

etkileyen fotosentetik proteinlerin hasarı, hücre membranının yıkımı, protein sentezinin azalması gibi değişik fizyolojik etkilerle sonuçlanır (Gill ve Tuteja, 2010).

### 2.6.5. Bitkilerde Antioksidant Savunma Sistemleri

Antioksidant savunma sistemleri aşırı ROT üretiminin neden olduğu oksidatif hasarı önlemek için, ROT' ların oluşumu ile uzaklaştırılması arasındaki dengenin sürdürülmesinde ve oluşturulan ROT' ların düşük seviyede tutulmasında çok önemli bir role sahiptir (Sharma ve Dubey, 2007). Bitkilerde antioksidant savunma sistemi enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidantlardan oluşmaktadır (Şekil 2.13) . Enzimatik antioksidantlar SOD, CAT, APX, MDHAR, DHAR ve GR (Çizelge 2.2), enzimatik olmayan antioksidantlar glutatyon (GSH), askorbik asit (AA) (her ikisi de suda çözünür), karotenoitler ve tokoferoller (yağda çözünenler) dir (Gill ve Tuteja, 2010).



Şekil 2.13. ROT ve antioksidant savunma mekanizması (Gill ve Tuteja, 2010).

### 2.6.5.1. Enzimatik Antioksidantlar

Enzim yapısında olan antioksidant savunma sistemleri oksijen ara ürünlerini ve serbest radikalleri toplama, nötralize etme ve ortamdan uzaklaştırabilme işlevlerini yaparlar. Enzim yapısında olan antioksidant savunma sistemleri kloroplast ve mitokondrilerdeki  $H_2O_2$ 'i süpürdüğü kabul edilen askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon redüktaz (GR)'dır.  $H_2O_2$  yi etkili bir şekilde ortamdan uzaklaştıran CAT ve peroksidazlar,  $O_2^{\cdot-}$  anyonunu süpüren SOD'dır. CAT ve SOD en etkili antioksidant enzimlerdir. İki enzimin kombine çalışması, potansiyel tehlike olan  $O_2^{\cdot-}$  ve  $H_2O_2$ 'i suya ( $H_2O$ ) ve moleküler oksijene ( $O_2$ ) indirgeyerek hücrel hasarı önler (Halliwell, 2006). ROT' ları süpüren temel antioksidant ezimler ve katalizlediği reaksiyonlar Çizelgede 2.2' de verilmektedir.

**Çizelge 2.2.** ROT'ları süpüren temel antioksidant enzimler (Gill ve Tuteja, 2010).

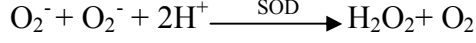
| Enzimatik antioksidantlar             | Enzim kodu     | Katalizlediği reaksiyonlar   |
|---------------------------------------|----------------|--|
| Süperoksit dismutaz (SOD)             | E.C. 1.15.1.1  | $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \longrightarrow 2H_2O_2 + O_2$ |
| Katalaz (CAT)                         | E.C. 1.11.1.6  | $H_2O_2 \longrightarrow H_2O + 1/2O_2$                             |
| Askorbat peroksidaz (APX)             | E.C. 1.11.1.11 | $H_2O_2 + AA \longrightarrow H_2O + MDHA$                          |
| Guaiacol peroksidaz (GPOX)            | E.C. 1.11.1.7  | $Donör + H_2O_2 \longrightarrow Okside edilmiş donör + 2H_2O$      |
| Moneodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) | E.C. 1.6.5.4   | $MDHA + NAD(P)H \longrightarrow AA + NAD(P)^+$                     |
| Dehidroaskorbat redüktaz (DHAR)       | E.C. 1.8.5.1   | $DHA + 2GSH \longrightarrow AA + GSSG$                             |
| Glutatyon redüktaz (GR)               | E.C. 1.6.4.2   | $GSSG + NAD(P)H \longrightarrow 2GSG + NAD(P)$                     |

#### Süperoksit Dismutaz (SOD)

En etkili hücrelerarası enzimatik antioksidantlardan biri olan SOD (E.C.1.15.1.1), tüm aerobik organizmalarda ve tüm subsellüler bölümlerde yaygın olarak bulunmaktadır. SOD'un bitki stres toleransında çok önemli bir enzim olduğu öngörülmektedir. Artan ROT seviyesinin toksik etkilerine karşı organizmadaki ilk savunma SOD enzimiyle gerçekleşir. SOD, süperoksitin  $H_2O_2$  ve  $O_2$ 'e dismutasyonunu katalizler (Çizelge 2.) SOD'un ürünü  $H_2O_2$  dir.  $H_2O_2$ , toksiktir ve hızlı bir şekilde uzaklaştırılır. Süperoksit radikalleri kendiliğinden dismutasyona uğrayabilirler. SOD



enzimi dismutasyon hızını 10 kat artırır. Böylece oksijenin başka substratlarla reaksiyona girmesi ve daha toksik etkili hidroksil radikallerinin oluşumu SOD tarafından engellenir.



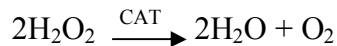
SOD'un bilinen üç formu vardır: bakır/çinko (Cu/Zn-SOD), mangan (Mn-SOD) ve demir (Fe-SOD) dur. Bunların sınıflandırılması bu izoenzimlerin metal kofaktörlerine, hücresel lokalizasyonlarına ve KCN ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e göre yapılmaktadır. Cu/Zn-SOD siyanüre (KCN) ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e ye duyarlı iken Mn-SOD bu ajanlara karşı dirençlidir. Fe-SOD ise KCN'e dirençli iken, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e ye duyarlıdır. Bu izoenzimlerin subsellüler dağılımı oldukça ayırt edicidir. Mn-SOD ökaryotik hücrelerin mitokondrilerinde ve peroksizomlarda bulunmaktadır. Bazı Cu/Zn SOD izoenzimleri sitozolik kısımlarda ve ayrıca yüksek bitkilerde kloroplastlarda bulunmaktadır. Bitkilerde yaygın olarak görülmeyen Fe-SOD izoenzimleri ise bulduklarında genellikle kloroplastın kısımları ile yakın ilişkiindedir (Çizelge 2.3). Prokaryotik Mn-SOD ve Fe-SOD, ökaryotik Cu/Zn-SOD dimerdir, oysa mitokondrideki Mn-SOD tetramer yapıdadır (Gill ve Tuteja, 2010).

**Çizelge 2.3.** Farklı SOD izoenzimleri ve organellerdeki lokalizasyonu

| SOD izoenzimleri | Lokalizasyon                | Direnç                               | Duyarlılık                           |
|------------------|-----------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Fe-SOD           | Kloroplast                  | KCN                                  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        |
| Mn-SOD           | Mitokondri ve peroksizomlar | KCN ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | -                                    |
| Cu/Zn-SOD        | Kloroplast ve sitosol       | -                                    | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve KCN |

### **Katalaz (CAT)**

Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in suya ve oksijene dismutasyonunu katalizleyen tetramerik yapıda hem-içerikli bir enzimdir. Stres koşullarında ROT detoksifikasyonu için zorunlu bir enzimdir (Mittler, 2002). Bu enzim bütün aerobik ökaryotlarda bulunur ve peroksizomlarda yağ asitlerinin β- oksidasyonu, fotorespirasyon süresince ve purin katabolizması sırasında meydana getirilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'nin uzaklaştırılmasında önemlidir (Verma ve Dubey, 2003).



### Askorbat Peroksidaz (APX)

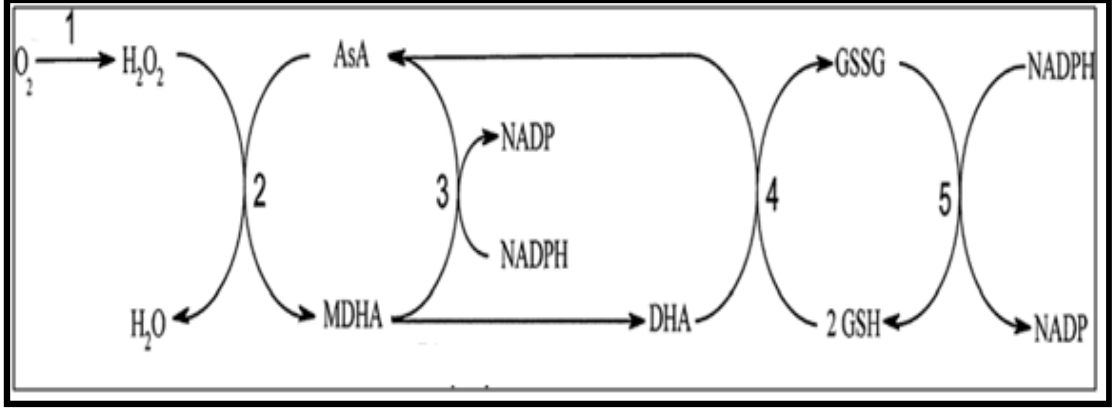
Peroksidazlar, hem içerikli proteinler olup çeşitli organik ve inorganik substratları kullanarak bitkilerde bulunan aktif oksijen türlerine karşı savunma sisteminin ikinci sınıf enzimlerini oluştururlar (Asada, 1992). Bitkilerde hidrojen peroksidin detoksifikasyonu, hücre korunması ve hücre sinyali için önemlidir (Apel ve Hirt, 2004). APX' ler (EC 1.11.1.11) bitkilerin sitosol ve kloroplastlarında, alg ve bazı siyanobakterilerde askorbat-glutatyon ve su-su döngüleri yoluyla zararlı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i yıkarlar. APX, kloroplastlarda stroma (sAPX), tilakoid membranı (tAPX), mikrocisimciklerde (mAPX) ve sitosolde (cAPX) olmak üzere en azından hücrenin dört farklı kısmına dağılmış durumdadır (Song ve ark., 2005). APX'in antioksidant ve patojen savunmasında özelleşmiş anahtar bir role sahip olduğunu ve farklı şekillerde düzenlenmiş izoformları, transkripsiyonel ve translasyonel seviyede ışık, oksidatif stres ve patojen saldırılarına cevap verebilmektedir.

Askorbat peroksidaz, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> için CAT ve POD'dan daha yüksek bir affiniteye sahiptir. Bu nedenle APX stres süresince ROT'ların uzaklaştırılmasında çok önemli bir role sahiptir (Gill ve Tuteja, 2010).

Askorbat peroksidaz bitki hücrelerinin hemen hemen tüm bölümlerinde bulunmaktadır ve askorbat-glutatyon yoluna katılarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in uzaklaştırılmasında özellikle fotosentetik dokularda oksidatif strese karşı korunmayı birbirine bağlı redoks reaksiyonları ile sağlar. Bunun yanında mitokondri ve peroksizomlarda da APX oksidasyon-redüksiyon reaksiyonunda bir elektron donörü olarak askorbatı (AA) kullanarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i yıkar ve ardından askorbat, MDHA'a oksitlenir (Jimenez ve ark., 1997).



AA kloroplast membranında Fd tarafından yeniden MDHA'dan (Miyake ve Asada, 1992) ya da NADPH harcanarak stromada monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) ile yeniden oluşturulur. MDHA aynı zamanda kendiliğinden askorbata ve dehidroaskorbata (DHA) ayrışır. DHA, dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) tarafından yeniden indirgenir. DHAR, elektron donörü olarak, GSH kullanır. Oluşan okside glutatyon (GSSG) NADPH tüketen glutatyon redüktaz (GR) ile yeniden kullanılacak hale dönüştürülür (Şekil 2.14) (Hancock ve Viola, 2005).



**Şekil 2. 14.** Askorbat-glutasyon döngüsü. 1. Süperoksit dismutaz 2. Askorbat peroksidaz 3. Monodehidroaskorbat redüktaz 4. Dehidroaskorbat redüktaz 5. Glutasyon redüktaz (Hancock ve Viola,2005)

### Guaiacol Peroksidaz (GPOX)

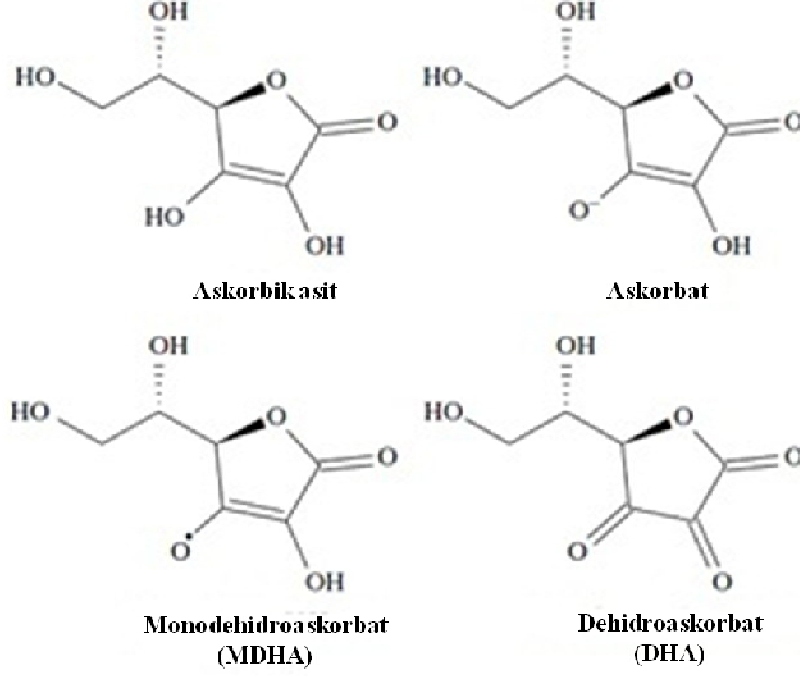
Peroksidazlar(POX) (E.C.1.111.7.), aromatik bileşikleri substrat olarak kullanarak metabolizma esnasında ortaya çıkan  $H_2O_2$ 'i etkisiz hale getirirler (Gill ve Tuteja, 2010) ve genellikle hücre duvarında lokalize olmuşlardır (Polle ve ark., 1994). Guaiacol (o-metoksi fenol) GPOX aktivitesinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir substrattır. Guaiacolün GPOX tarafından oksidasyonu sonucu fenoksi radikalleri oluşmaktadır (Hiraga ve ark., 2001). Bitkilerden izole edilen guaiacol peroksidaz fizyolojik fonksiyonları ve sekanslarındaki farklılıklar açısından APX' den ayırt edilebilmektedir. GPOX indol-3-asetik asite parçalanır ve lignin biyosentezinde ve abiyotik strese karşı  $H_2O_2$ 'nin yıkılması yoluyla savunmada önemli bir role sahiptir GPOX' un aktivitesi bitki türüne ve stres koşullarına bağlı olarak oldukça değişken olabilmektedir (Gill ve Tuteja, 2010).

#### 2.6.5.1. Enzimatik Olmayan Antioksidantlar

##### Askorbik Asit (Vitamin C)

Askorbik asit (AA) kuru tohumlar hariç hemen hemen tüm bitki dokularında meydana gelmektedir. AA köklerden çok yapraklarda birikme eğilimindedir. Askorbik asidin olgun yaprakların gelişmiş kloroplastlarında ve yüksek oranda klorofillerde

bulunduğu kaydedilmiştir. Askorbik asidin yapısı ve oksidasyon ürünleri Şekil 2.15’de gösterilmektedir (Davey ve ark., 2000).



**Şekil 2.15.** Askorbik asidin yapısı ve oksidasyon ürünleri (Davey ve ark., 2000).

Askorbik asit fizyolojik pH’da baskın bir şekilde askorbat anyonu olarak bulunmaktadır. Bunun ardından monodehidroaskorbat (MDHA) radikalini üretmek için hızlı bir şekilde enediol grubundan bir elektron kaybeder. Son olarak, oksidasyon sonucunda dehidroaskorbik asit olarak ifade edilen yüksüz dehidroaskorbik asit (DHA) meydana gelir. DHA kısa yarı ömre sahiptir (Smirnoff, 2002). Dehidroaskorbik asit pH 7.0’ın üstündeki düzeylerde sabit değildir. Dolayısıyla DHA lipid kayıplarını önlemek için toplam askorbat havuzunu indirgenmiş durumunda koruması gerekir. Normal koşullarda askorbat havuzunun % 90 kadarı indirgenmiş durumdadır (Foyer, 1993). Bu duruma iki enzim aracılığıyla ulaşılır: (1) NAD(P)H’ı indirgeyici olarak kullanan monodehidroaskorbat redüktaz (MDAR) ve (2) glutasyonu indirgeyici olarak kullanan dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) bitki hücrelerinde askorbatı diğer bir çözülebilir antioksidant olan glutatyonla bağlar. Bu reaksiyonlar birlikte askorbat-glutatyon döngüsünü oluşturur (Halliwell-Foyer-Asada) (Foyer, 1993). Askorbik asit oksidasyonunu iki enzim katalizler. Bunlar askorbat oksidaz ve askorbat peroksidazdır (Asada, 2006).

Bitkilerde askorbik asit üretiminin, GDP-mannoz ve L-galaktoz yoluyla meydana geldiği saptanmıştır (Smirnoff ve Wheeler, 2000; Ishikawa ve ark., 2006).

Askorbik asidin fonksiyonları genel olarak dört kategoriye ayrılır:

**1) Antioksidant:** Askorbik asit, hızlı bir şekilde süperoksit, moleküler oksijen, ozon ve hidrojen peroksit ile reaksiyona girebilmektedir. Bu nedenle askorbik asit bazı çevre kirleticilerine ve herbisitlere maruz kalma süresince ve aerobik metabolizma sürecinde oluşturulan bu reaktif oksijen türlerinin taşınmasında yer almaktadır. MDHA ve DHA askorbat-glutasyon döngüsü yoluyla askorbata indirgenmektedir.

**2)Enzim kofaktörü:** Askorbik asit bir dizi hidroksilaz enzimi için örneğin prolil ve lizin hidroksilazlar gibi hidroksiprolin (HP) ve hidroksilizin sentezlerinde kullanılan enzimler için kofaktördür, Askorbik aside ayrıca in vitroda etilen oluşturan enzim tarafından da ihtiyaç duyulmaktadır.

**3)Fotosentez:** Askorbik asit, hem fotosentetik hem de mitokondriyal elektron taşınmasında in vitroda elektron vericisi olarak görev yapar. Son bulgular, MDHA'nın in vivo da PS II'den elektron alıcısı olarak iş yaptığını göstermektedir ve transmembran elektron transportunda hem elektron alan hem de elektron veren olarak davranmaktadır.

**4)Okzalit ve tartarat sentezi:** Askorbik asit, okzalit ve tartarat biyosentezi için substrat olarak kullanılmaktadır (Smirnoff, 1996; Davey ve ark., 2000).

### **Karotenoitler**

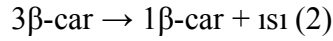
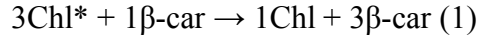
Bitkiler fotosentetik membranlardaki aşırı enerjinin dağıtılmasını sağlayan bazı izoprenoit bileşiklerini kapsayan çeşitli mekanizmalara sahiptirler. Tüm fotosentetik organizmalarda karotenoitler ( $\beta$ -karoten ve zeaksantin) ve tokoferoller aşırı enerjinin dağıtılması ya da ROT'ların süpürülmesi ve lipid peroksidasyonunun bastırılması yoluyla önemli ışık koruyucu role sahiptirler (Gill ve Tuteja, 2010).

Karotenoitler bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunan pigmentlerdir. Doğada 600'ün üstünde karotenoit meydana gelir. Karotenoitler yağda çözünebilen antioksidantlardır ve bitki metabolizmasında oksidatif stres toleransında önemli fonksiyonlara sahiptirler. Hem fotosentetik hem de fotosentetik olmayan dokularda

bulunan karotenoitler kloroplastlarda ışık toplama özelliği olan yardımcı pigment olarak görev yaparlar. Karotenoitler bitkilerde üç ana fonksiyonu yerine getirirler. İlk olarak, 400-550 nm dalga boyu arasındaki ışığı absorbe ederler ve klorofile aktarırlar. Uyarılmış bir karoten molekülü enerjiyi antenlerdeki diğer pigmentlere ya transfer ederek ya da ısı olarak dağıtarak tekrar temel durumuna dönebilir (ışık koruyucu rolü) (Collins, 2001).

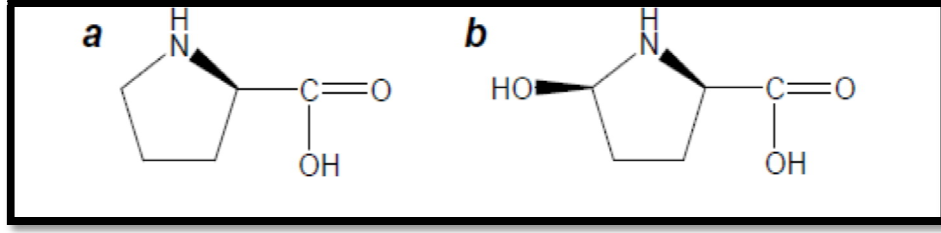
Antioksidant özellikleriyle ilgili olarak karotenoitler dört yoldan birisiyle fotosistemleri koruyabilirler. Lipit peroksidasyon ürünleri ile tepkime vererek zincirleme reaksiyonları bitirirler.  $^1O_2$ 'i toplar ve ısı olarak enerjiyi dağıtır;  $^3Chl^*$  veya uyarılmış klorofil molekülleri ile tepkime verip,  $^1O_2$ 'in oluşmasını önler ya da ksantofil çevrimi sırasında oluşan fazla uyarma enerjisini dağıtarak fotosistemleri korurlar (Gill ve Tuteja, 2010).

Fotosentetik dokularda  $\beta$ -karotenin asıl koruyucu rolü  $^3Chl^*$ 'i doğrudan temizlemesi ve bunun sonucu olarak  $^1O_2$ 'in oluşmasını önlemesidir, böylece oksidatif stresten tamamen sakınılmış olunur. 1 ve 2 deki denklemlerdeki reaksiyonlarda enerji klorofilden bir karotenoite aktarılır ve sonuç olarak karotenoit enerjiyi ısı şeklinde dağıtır (Mc Kersie ve Leshem, 1994).



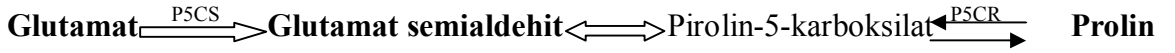
### **Prolin (Pro)**

Bitkiler stres koşullarında serbest amino asit toplamının %5'inden daha azını prolin tarafından sağlamaktadırlar. Prolin (L- piroldin 2-karboksi asit,  $C_5H_9NO_2$ , şekil 2.16) yüksek oranda çözünebilen, toksik olmayan ve düşük moleküler ağırlıklı bir aminoasittir. (Ashraf ve Foolad, 2007). Prolin çevresel strese yanıt olarak bitkilerde normal seviyesinden 100 kat daha fazla birikmektedir. Prolinin osmotik düzenlemedeki rolüne ilave olarak, NAD/NADH oranının düzenlemesine, subsellüler yapıların (protein ve membranlar gibi) stabilize edilmesinde, serbest radikallerin süpürülmesinde ve sitosolik pH' nın düzenlenmesinde de rol oynamaktadır (Matysik ve ark., 2002; Sharma ve Dietz, 2006; Ashraf ve Foolad, 2007).



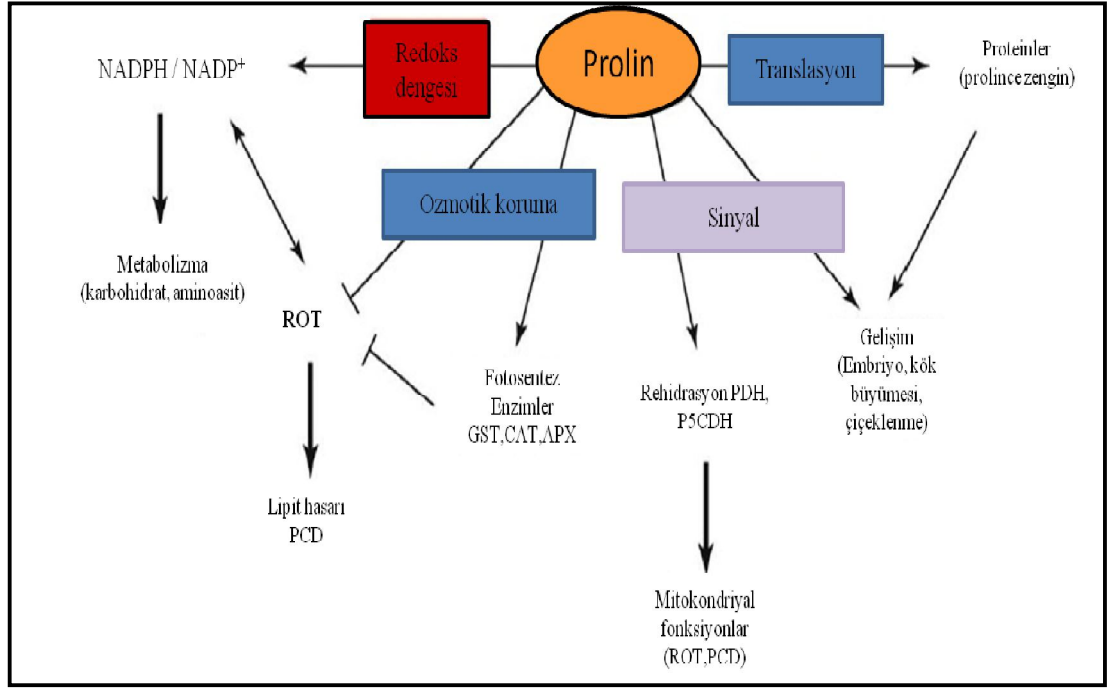
**Şekil 2.16.** a) L-prolin ve b) hidroksiprolinin yapısı

Bitkilerde L-Prolin sentezi L-glutamik asitten D1-pirolin-5-karboksilat (P5C) aracılığıyla D1-pirolin-5-karboksilat sentetaz (P5CS) ve D1-pirolin-5-karboksilat redüktaz (P5CR) enzimlerinin aktiviteleriyle katalizlenmektedir. Diğer taraftan, mitokondriyal enzimler Pro dehidrogenaz (oksidaz) (ProDH) ve P5C dehidrogenaz (P5CDH) enzimleri L-Glutamik asidi P5C aracılığıyla L-Proline metabolize etmektedir (Şekil 2.17 ) (Ashraf ve Foolad, 2007).



**Şekil 2.17.** Bitkilerde prolinin biyosentetik yolu.

Kuraklık ve metal stresi prolin sentezinin artması ya da yıkımının azalması yoluyla çarpıcı bir şekilde prolin birikimine neden olduğu yapılan araştırmalarda ortaya konmuştur. Sorbitol, mannitol, myo-inositol ve prolin için OH<sup>-</sup> süpürme kapasitesi testi yapılmıştır. Bu test sonucunda en etkili OH<sup>-</sup> süpürücü prolin bulunmuştur (Şekil 2.18) (Szabados ve Savoure, 2009; Gill ve Tuteja, 2010).



**Şekil 2.18.** Bitkilerde prolinin farklı fonksiyonları (Szabados ve Savoure, 2009)



### 3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

| <u>Kullanılan Kimyasal Maddeler</u>   | <u>Kimyasal Formülü</u>   | <u>Marka</u>        |
|---------------------------------------|---|---------------------|
| Amonyum per sülfat                    | $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$   | Sigma               |
| Aseton                                | $\text{CH}_3\text{COCH}_3$  | Merck               |
| Askorbik asit                         | $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$  | Sigma               |
| Bakır Sülfat                          | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$   | Carlo Erba Reagents |
| 2,2- Bipiridin                        | $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2$   | Fluka               |
| Borik asit                            | $\text{H}_3\text{BO}_3$   | Sigma               |
| Dipotasyum Hidrojen Fosfat            | $\text{K}_2\text{HPO}_4$  | Carlo Erba Reagents |
| 5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik Asit) | $[-\text{SC}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)\text{CO}_2\text{H}]_2$                          | Sigma               |
| Ditiyotreitöl                         | $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$   | Sigma               |
| Demir -3- Klorür                      | $\text{FeCl}_3$   | Sigma               |
| Etilendiamin Tetraasetik Asit         | $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | Sigma               |
| Folin Ayıracı                         |   | Sigma               |
| Kadmiyum Sülfat                       | $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  | Carlo Erba Reagents |
| Glasiyal asetik asit                  | $\text{CH}_3\text{COOH}$  | Carlo Erba Reagents |
| Guaiacol                              | $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$  | Sigma               |
| Hidrojen Peroksit                     | $\text{H}_2\text{O}_2$  | J.T.Baker           |
| Meta-fosforik Asit                    | $\text{HPO}_3$  | Merck               |

|                              |                                 |                     |
|------------------------------|---------------------------------|---------------------|
| Metiyonin                    | $C_5H_{11}NO_2S$                | Sigma               |
| N-bütanol                    | $C_4H_{10}O$                    | Atabay Kimya        |
| N-Etilmalaimid               | $C_6H_7NO_2$                    | Fluka               |
| Ninhidrin                    | $C_9H_6H_4$                     | <b>Merck</b>        |
| Nitroblue Tetrazolium Klorid | $C_{40}H_{30}N_{10}O_6Cl_2$     | Bend                |
| Nitrik asit                  | $HN_3$                          | Carlo Erba          |
| Orto-fosforik asit           | $H_3PO_4$                       | Akkimya             |
| Perklorik asit               | $HClO_4$                        | Merck               |
| Polivinil piridin            | $C_6H_9NO$                      | Sigma               |
| Potasyum Dihidrojen Fosfat   | $KH_2PO_4$                      | Carlo Erba Reagents |
| Riboflavin                   | $C_{17}H_{20}N_4O_6$            | Acros Organics      |
| Sığır Serum Albümin (BSA)    |                                 | Merck               |
| Sodyum Dihidrojen Fosfat     | $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$         | Carlo Erba Reagents |
| Sodyum Hidroksit             | $NaOH$                          | Carlo Erba Reagents |
| Sodyum Karbonat              | $Na_2CO_3$                      | Merck               |
| Potasyum Sodyum Tartarat     | $COOK(CHOH)_2COON$<br>$a.4H_2O$ | Carlo Erba Reagents |
| Sülfosalisilik Asit          | $C_7H_6O_6S$                    | Sigma               |
| Tetra metil etilen diamin    | $C_6H_{16}N_2$                  | Sigma               |
| 1,1,3,3 tetrametoksipropan   | $C_{11}H_{24}O_4$               | Sigma               |
| 2-Tiyobarbitürik Asit        | $C_4H_4N_2O_2S$                 | Merck               |
| Triklor asetik asit          | $CCl_3COOH$                     | Merck               |
| Trizma                       | $C_4H_{11}NO_3$                 | Sigma               |

### 3.1.2. Kullanılan Cihazlar

#### Kullanılan Cihazlar

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. Hassas terazi                          | Ohaus                   |
| 2. Derin dondurucu                        | Sanyo Ultra Low         |
| 3. Soğutmalı Santrifüj                    | Kubota                  |
| 4. Spektrofotometre                       | T70 UV_VIS 500          |
| 5. Su Banyosu                             | Elektro-mag             |
| 6. Buz Makinesi                           | Scotsman AF-20          |
| 7. Distile Su Cihazı                      | Autostill 8000X Jencons |
| 8. Otomatik Pipetler                      | Nichiryo                |
| 9. pH metre                               | WTW pH315i/SET          |
| 10. Buzdolabı                             | Arçelik                 |
| 11. Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı        | Stuart CB162            |
| 12. Vorteks                               | Nüvemix                 |
| 13. Elektroförez                          | Thermo                  |
| 14. Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi | UNICAM 929              |

### 3.1.3. Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Ağır Metal Uygulanması

*Brassica oleracea* var. *acephala* ve *Silene vulgaris* var. *vulgaris* bitkilerine ait tohumlar toprak ile doldurulmuş 6 cm derinliğindeki 45'lik viyollere ekilerek sera koşullarında çimlenmeye bırakılmıştır. Bitkiler 2-3 yapraklı hale geldikten sonra yeniden içerisinde toprak bulunan 9 cm derinliğindeki 28'lik viyollere aktarılmış ve gün aşırı olmak üzere sürekli olarak saf su ile sulanmıştır. Bütün deney bitkilerinin yetiştirilmesinde aynı ticari çiçek toprağı kullanılmıştır.

Ağır metal uygulanmasında bitkilerdeki yaprak sayısı göz önünde bulundurulmuştur. Bitki 3-4 yapraklı aşamaya ulaştığında ağır metal uygulanmasına başlanmıştır. Ağır metal olarak uygulanan Cu,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ve Cd ise  $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  olarak hazırlanmıştır. Bakır ve kadmiyum çözeltilerinin derişimleri 100, 200 ve 400  $\mu\text{g gr}^{-1}$  kuru toprak olarak hazırlanmıştır. Bu derişimlerin seçilmesine bu konu ile ilgili yapılmış olan daha önceki çalışmalar ve ön denemeler sonucunda karar verilmiştir.

Bitkiler ağır metal uygulamasından 15 gün sonra hasat edilmiş ve dikkatli bir biçimde yüzeye tutunan ağır metalleri uzaklaştırmak için distile su ile yıkanmış ve bitki kısımları birbirinden ayrılmıştır. Uygulama periyodu sonunda Cd ve Cu içeriğinin belirlenmesi için kök ve yapraklar 80 °C'de iki gün süreyle kurutulmuştur.

Ağır metal uygulamasının sonunda biyokimyasal analizler için kullanılacak olan yapraklar belirli ağırlıklarda tartılmış ve sıvı azotta dondurularak -80 °C'de saklanmıştır.

### 3.2. Yöntemler

Bu araştırmada, pigment ve metal içerikleri, lipit peroksidasyonu, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidant aktivitelerindeki değışimler tayin edilmiştir. Bütün analizler üç bağımsız deneyde üçer tekrar ile yapılmıştır.

### 3.2.1. Pigmentlerin Belirlenmesi

Fidelerin klorofil a, klorofil b ve karotenoid miktarları Arnon (1949)'a göre belirlenmiştir. 0,1 g bitki örneği alınarak 1-2 mL % 80'lik asetonda havanda ezilmiştir. Ekstrakt filtre kağıdından süzülüp son hacim %80'lik asetonla 10 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra UV-VIS spektrofotometrede klorofil a için 663 nm, klorofil b için 645 nm ve karotenoid için 440 nm dalga boylarında ayrı ayrı absorbansları kör ile karşılaştırmalı olarak (%80'lik aseton) okunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri Witham ve ark. (1971)'na göre aşağıdaki formüller kullanılarak klorofil a, klorofil b ve karotenoid miktarları belirlenmiştir.

$$\text{Klorofil a (mg/g)} = [12,7 (D663) - 2,69 (D645)] \times 10/1000 \times \text{g T.A.}$$

$$\text{Klorofil b (mg/g)} = [22,9 (D645) - 4,68 (D663)] \times 10/1000 \times \text{g T.A.}$$

$$\text{Karotenoid (mg/g)} = [4,69 (D440) - (\text{klorofil a} + \text{klorofil b}) \times 0,286] \times 10/1000 \times \text{g T.A.}$$

### 3.2.2. Cd ve Cu İçeriğinin Belirlenmesi

Uygulama sonunda bitkilerden alınan kök ve yapraklardaki kadmiyum ve bakır içeriğinin belirlenmesi için yaş yakma metodu kullanılmıştır. Kurutularak öğütülmüş örnekler tartılarak 50 mL'lik erlenlere konulmuştur. Bitki dokularının ağırlıklarına uygun olarak üzerlerine HNO<sub>3</sub> ve HClO<sub>4</sub> (5:1) ilave edilmiştir. Isısı ayarlanabilen hot plate üzerinde renkli buharlar kayboluncaya kadar ısıtılmıştır. Örneklerin tümü buharlaştıktan sonra erlenlerin üzeri saf su ile sulandırılmıştır. Sulandırılan örnekler atomik absorpsiyon spektrometresinde okunmuştur (Demirevska-Kepova ve ark., 2004).

Dokulardaki element içeriğini hesaplamak için elementlerin standartları ile absorbansları arasındaki doğrusal ilişkiyi gösteren regresyon eğrisi kullanılmıştır.

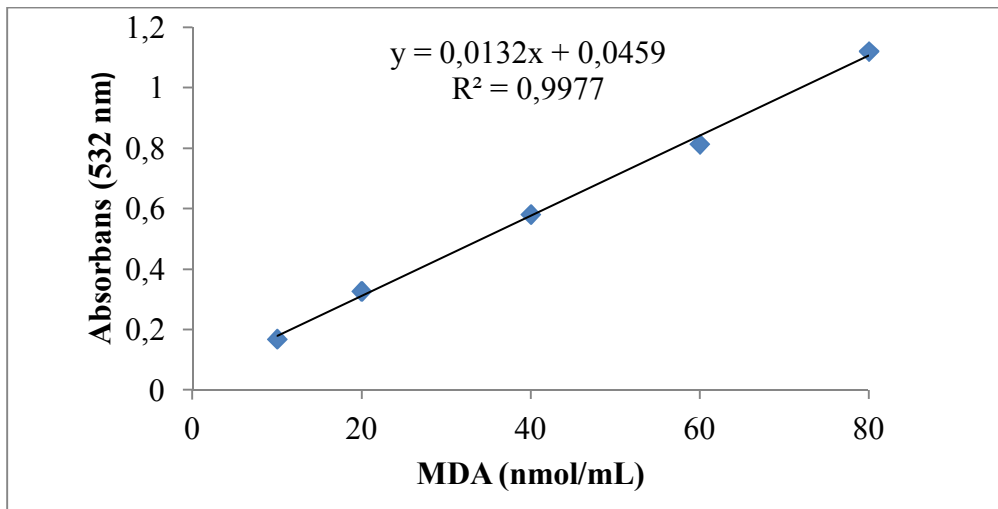
### 3.2.3. Lipit Peroksidasyonu

Lipit peroksidasyon, membran lipitlerinin oksidasyon ürünü malondialdehit seviyesi ölçülerek (Heath ve Packer, 1968) belirlenmiştir. Deneyin prensibi çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan son ürünlerden biri olan MDA'nın sıcak ortamda TBA ile oluşturduğu bileşiğin pembe-kırmızı renginin 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

0,2 g yaprak sıvı azotun içinde cam tozu ve %0,25 tiyobarbütirik asit (TBA) içeren 2 mL %10 triklor asetik asit (TCA) çözeltisinde homojenize edilmiştir. Bu karışım 30 dakika 95 °C'de ısıtıldıktan sonra buz banyosunda hızlıca soğutulup ve 15 dakika 15000 g'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantın absorbansı 532 nm'de okunmuştur. Regresyon analizinde saptanan formül kullanılarak lipit peroksidasyon ürünleri  $\text{nmol g}^{-1}$  taze ağırlık şeklinde ifade edilmiştir.

#### MDA Standardının Hazırlanması ve Standart Grafiğinin Çizilmesi

Standart olarak 1,1,3,3 tetrametoksiopropan kullanılmıştır. 400 nmol/mL stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu stok çözeltiden 10, 20, 40, 60 ve 80 nmol/mL derişimlerde seyreltmeler yapılmıştır. Bunlar çalışma standartlarının hazırlanmasında kullanılmıştır. Standart grafik için MDA miktarının ölçülmesinde uygulanan yöntem kullanılmıştır. Her bir standart iki kez çalışılarak, derişim-absorbans grafiği çizilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. MDA standart grafiği

### 3.2.4. Prolinin Belirlenmesi

0,2 g taze yaprak örneği cam tozu yardımıyla %3'lük 4 mL sülfosalisilik asit çözeltisi ile homojenize edilip iki tabaka cam pamuğundan süzölmüştür. Filtratın 1 mL'si 1mL asit-ninhidrin, 1 mL glasiyal asetik asitle test tüpünde karıştırılmıştır. Bu karışım 100 °C'de 1 saat su banyosunda bekletilmiştir. Bu süre sonunda tüpler alınarak buz içerisine konulmuş ve reaksiyon sonlandırılmıştır. Örneklerin absorbansı 546 nm dalga boyunda okunmuştur. Bitki dokularındaki prolin miktarı  $\mu\text{mol g}^{-1}$  taze ağırlık şeklinde hesaplanmıştır (Claussen, 2005).

### 3.2.5. Protein Olmayan Tiyol (-SH) Gruplarının Belirlenmesi

0,2 g taze yaprak örneği cam tozu yardımıyla 2 mL %5'lik meta-fosforik asit ile homojenize edilip 10000 g'de 10 dakika santrifüje tabi tutulmuştur. SH-grubu konsantrasyonunu belirlemek için süpernatanttan 140  $\mu\text{l}$  alınmış, üzerine 5 mM Na-EDTA içeren 700  $\mu\text{l}$  150 mM'lık fosfat tamponu (pH 7,4) ve son olarak yine fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış 140  $\mu\text{l}$  DTNB (5-5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit) ilave edilerek 20 dakika sonra 412 nm' de absorbansı okunmuştur (Çakmak ve Marschner, 1992).

### 3.2.6. Askorbik Asit Analizi

Askorbik asit tayini Çakmak ve Marschner (1992)'e göre yapılmıştır. 0,2 g taze yaprak örneği cam tozu yardımıyla 2 mL %5'lik meta-fosforik asit ile ezildikten sonra 10000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatanttan 100  $\mu\text{l}$  alınmış ve üzerine 250  $\mu\text{l}$  fosfat tamponu (pH 7,4) eklenmiştir. Bundan sonraki işlemler 2 bağımsız deney ve 3 tekrarlı olarak yürütölmüştür.

Toplam askorbat için işlemler aşağıdaki gibi yapılmıştır:

- Hazırlanan örneğin üzerine 50  $\mu\text{l}$  DTT eklenmiş ve 10 dakika bekletilmiştir.
- Bunun üstüne 50  $\mu\text{l}$  NEM eklenmiştir.
- 200  $\mu\text{l}$  %10'luk TCA eklenmiştir.

-Üzerine 200 µl % 44'lük orto-fosforik asit eklenmiştir.

-200 µl %4'lük 2,2 bipiridin eklenmiştir.

-Son olarak 100 µl %3'lük FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O eklenerek 40 dakika 40 °C 'de inkübasyona bırakılmıştır.

Redükte askorbat için işlemler aşağıdaki gibi yapılmıştır:

- Hazırlanan örneğin üzerine 100 µl saf su eklenmiştir.

-200 µl %10'luk TCA eklenmiştir.

-Üzerine 200 µl % 44'lük orto-fosforik asit eklenmiştir.

-200 µl %4'lük 2,2 bipiridin eklenmiştir.

-Son olarak 100 µl %3'lük FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O eklenerek 40 dakika 40 °C 'de inkübasyona bırakılmıştır.

Sıcak su banyosundan çıkarılan örnekler karıştırılarak absorbansı 525 nm'de okunmuştur. Standartlar L-askorbik asitle hazırlanmıştır.

### **3.2.7. Enzim Aktiviteleri İçin Ekstraksiyon**

0,2 g yaprak örneği sıvı azot ve cam tozu yardımıyla %0,1 (w/v) çözünmez polivinilpolipirrolidon (PVPP) ve 1 mM etilendiamintetraasetik asit(EDTA) içeren 2 mL 50 mM fosfat tamponunda (pH 7,0) ezilmiştir. Ekstrakt 20 dak. 15000 g ve +4 °C'de santrifüj edilmiş ve süpernatant -20 °C'de saklanarak enzim ve protein analizlerinde kullanılmıştır (Drazkiewicz ve ark., 2004).



### 3.2.8. Protein Tayini

Total protein tayini, Lowry metoduna (Lowry ve ark., 1951) göre yapılmıştır. Alkali ortamda bakır iyonları peptid bağları ile kompleks oluşturur. Bakır-peptid komplekslerinin Folin ayırıcı ile oluşturduğu mavi-mor renk 695 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Örnek üzerine 2,5 mL A çözeltisi eklenmiş ve ardından vortekslenmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra 250 µL B çözeltisi eklenerek iki kere vortekslenmiştir. 45 dakika karanlıkta bekletilmiştir. 695 nm dalga boyunda köre karşı absorbansları okunmuştur. Total protein miktarı, oluşan ürünün 695 nm dalga boyundaki molar absorbans değerleri kullanılarak standart grafiğinden hesaplanmıştır.

#### A Çözeltisi:

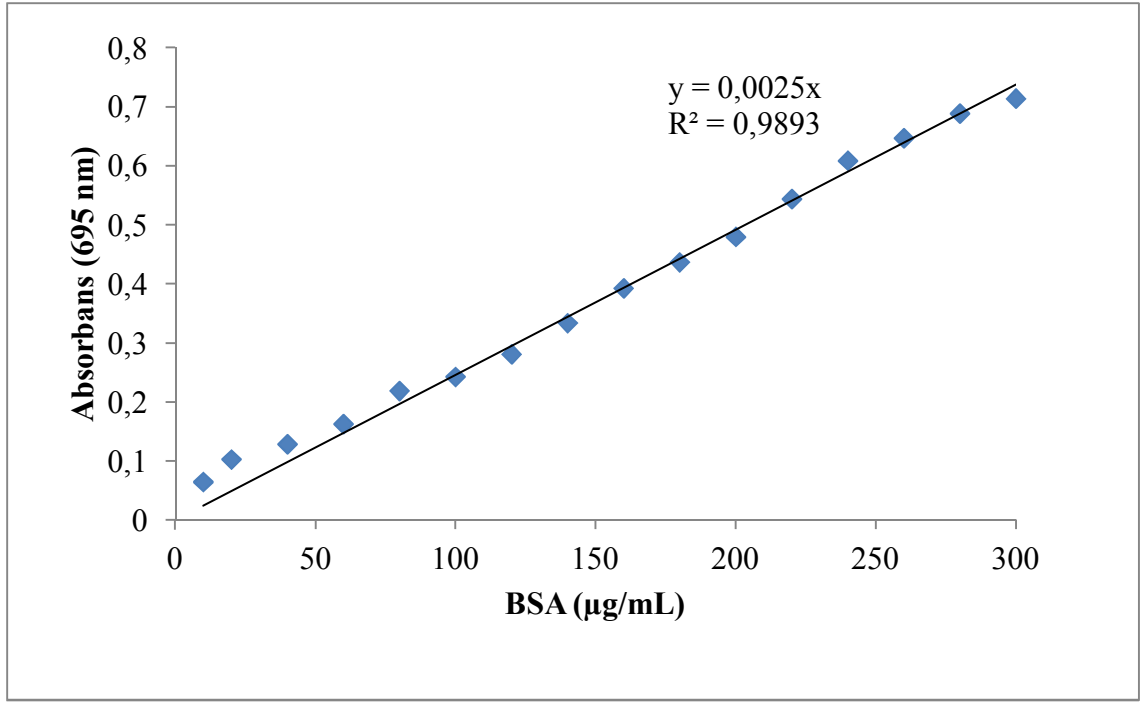
- 1 mL %1'lik (w/v)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 1 mL %2'lik (w/v)  $\text{COOK}(\text{CHOH})_2\text{COONa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 98 mL %2'lik (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

karıştırıldı ve oda sıcaklığında korundu.

#### B Çözeltisi:

- 2 N folin ayırıcı 1/1 (v/v) oranında distile su ile sulandırılmıştır. Deney öncesi taze olarak hazırlanıp, karanlıkta saklanmıştır.

|  | <b>Kör</b> | <b>Standart</b> | <b>Örnek</b> |
|--|------------|-----------------|--------------|
| <b>Standart</b>  | -          | 1 mL            | -            |
| <b>Örnek</b>   | -          | -               | 50 µL        |
| <b>Distile su</b>  | 1 mL       | -               | 950 µL       |
| <b>A Çözültisi</b>   | 2,5 mL     | 2,5 mL          | 2,5 mL       |
| <b>Vortekslendi, 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.</b>  |            |                 |              |
| <b>B Çözültisi</b>   | 250 µL     | 250 µL          | 250 µL       |
| <b>2 kere vortekslendi, 45 dakika karanlıkta bekletilmiştir.</b> |            |                 |              |
| <b>695 nm dalga boyunda absorbands okunmuştur.</b>               |            |                 |              |



Şekil 3.2. BSA standart grafiği.

### 3.2.9. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

#### 3.2.9.1. Katalaz Aktivite Tayini

Katalaz aktivitesi, (Aebi,1984). metoduna göre yapılmıştır. Hidrojen peroksidin CAT tarafından parçalanması temeline dayalı UV spektrofotometrik yöntem ile CAT aktivitesi tayini yapılmıştır. CAT katalitik aktivitesiyle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i yıkarak su ve oksijene dönüştürmektedir.

Katalaz (CAT, E.C. 1.11.1.6) aktivitesi %30 (m/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren 50 mM K-fosfat tamponun (pH 7,0)'dan oluşan bir reaksiyon karışımında spektrofotometrik olarak 240 nm'de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin bozulmasına bağlı olarak okunmuştur. Enzim spesifik aktivitesi okside  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ dk}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  protein olarak ifade edilmiştir.

#### CAT Aktivitesinin Hesaplanması

$$\text{CAT Aktivitesi} = \frac{\Delta A \times V_t \times S_f}{39,4 \times t \times V_0}$$

$\Delta A$ = Örnek  $\Delta A$ -Blank  $\Delta A$ = Zamana göre absorbans değişimi

$t$ = zaman (dakika)

$V_t$ = Toplam reaksiyon hacmi

$V_0$ = Reaksiyon içindeki örnek hacmi

$S_f$ = Sulandırma faktörü

$39,4$ = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> için ekstinksiyon katsayısı ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )

### 3.2.9.2. Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini

Süperoksit dismutaz aktivitesi, nitroblue tetrazolyum klorür ışık altında O<sub>2</sub> tarafından indirgenmesi yöntemine göre ölçülmüştür.

Süperoksit dismutaz (SOD, E.C. 1.15.1.1) aktivitesi için 0,1 mM EDTA, 13 mM methionin, 2 µM riboflavin, 75 µM nitroblue tetrazolyum klorür (NBT) ve enzim ekstraktı içeren 50 mM K-fosfat tamponu (pH 7,8) kullanılmıştır. Reaksiyon oda sıcaklığında ışık kaynağının açılmasıyla başlamış ve ışığın kapanmasıyla reaksiyon son bulmuştur. Çözeltinin absorbansı 560 nm de ölçülmüştür. Işık görmeyen karışım kontrol olarak kullanılmıştır. Işıқта riboflavin varlığında 560 nm’de azalan NBT’ nin % 50’sinin inhibisyonuna neden olan enzim miktarı SOD ünitesi olarak belirlenmiştir (Beauchamp ve Fridovich, 1971).

#### SOD Aktivitesinin Hesaplanması

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Blank A} - \text{Örnek A}}{\text{Blank A}} \times 100$$

$$\text{Aktivite (U/mL)} = \frac{\% \text{ inhibisyon}}{50 \times 0,1}$$

$$\text{Aktivite (U/mL)} = \frac{\text{Blank A} - \text{Örnek A}}{\text{Blank A}} \times 20$$

### 3.2.9.3. Guaiacol Peroksidaz Aktivite Tayini

Guaiacol peroksidaz (GPOX, E.C. 1.11.1.7) guaiacolün oksidasyona bağlı olarak 470 nm'de absorpsiyon değisimi takip edilerek belirlenmiştir. Aktivite, 100 mM K-fosfat tampon (pH 7,0), 20 mM guaiacol, 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve enzim ekstraktı içeren reaksiyon çözeltisinde analiz edilmiştir. Enzim spesifik aktivitesi redükte  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ dk}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  protein olarak ifade edilmiştir.

#### GPOX Aktivitesinin Hesaplanması

$$\text{GPOX Aktivitesi} = \frac{\Delta A \times V_t \times S_f}{25,5 \times t \times V_0}$$

$\Delta A$ = Örnek  $\Delta A$ -Blank  $\Delta A$ = Zamana göre absorbans değişimi

$t$ = zaman (dakika)

$V_t$ = Toplam reaksiyon hacmi

$V_0$ = Reaksiyon içindeki örnek hacmi

$S_f$ = Sulandırma faktörü

**26,6**= Guaiacol için ekstinksiyon katsayısı ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )

### 3.2.9.4. Askorbat Peroksidaz Aktivite Tayini

Askorbat peroksidaz (APX, E.C. 1.11.1.11) tayini bazı küçük değişiklikler yapılarak Nakona ve Asada (1991)'nin metoduna göre belirlenmiştir. Aktiviteye spektrofotometrik olarak 0,2 mM askorbik asit, 0,2 mM EDTA, 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve enzim ekstraktı içeren 50 mM K-fosfat tampon (pH 7,0) reaksiyon karışımında bakılmıştır. Askorbatın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bağlı oksidasyonundaki azalma 290 nm' de ölçülmüştür. Enzimin spesifik aktivitesi µmol okside askorbat mg<sup>-1</sup> protein olarak tanımlanmıştır.

#### APX Aktivitesinin Hesaplanması

$$\text{APX Aktivitesi} = \frac{\Delta A \times V_t \times S_f}{2,8 \times t \times V_0}$$

$\Delta A$ = Örnek  $\Delta A$ -Blank  $\Delta A$ = Zamana göre absorbans değişimi

$t$ = zaman (dakika)

$V_t$ = Toplam reaksiyon hacmi

$V_0$ = Reaksiyon içindeki örnek hacmi

$S_f$  = Sulandırma faktörü

$2,8$ = Askorbat için ekstinksiyon katsayısı (M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)

### 3.2.10. Native Page Yöntemi ile SOD İzoenzimlerinin Belirlenmesi

Homojenize edilen her bir örnek (50 µl) 2x örnek tamponu (Gliserol+ Bromfenol blue) ile 1:1 oranında karıştırılmıştır. Native poliakrilamid jeller, %12'lik ayırma jeli ve %5'lik yükleme jeli olarak hazırlanmıştır (Ardıç ve ark., 2009). Elektrot tampon çözeltisi 0,025 M tris, 0,192 M glisin (pH 8,3) olacak şekilde hazırlanmıştır (Laemmli, 1970). Jele her bir örnekten 20 µl yüklenmiştir. Jele sabit 120 V/cm sabit voltaj uygulanmıştır. SOD aktivitesi Beauchamp ve Fridovich (1971) tarafından tanımlanan prosedüre göre belirlenmiştir. Jel ilk önce 2,5 mM NBT içeren 50 mM Na-fosfat tamponunda (pH 7,8) 30 dakika inkübe edilmiştir. Bunun ardından içerisinde  $2,8 \times 10^{-5}$  M riboflavin, 0,028 M N,N,N',N'-tetrametiletilediamin (TEMED) içeren 50 mM Na-fosfat tamponu (pH 7,8) içerisinde 30 dk. süresince karanlıkta bekletilmiştir. SOD izoenzimlerinin seçici inhibisyonu 3mM KCN ya da 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltilerinin kullanılması yoluyla sağlanmıştır

### 3.2.11. İstatistiksel Analizler

Çalışmada elde edilen tüm verilerin istatistiksel analizleri SPSS 15.00 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Verilen bakır ve kadmiyuma bağlı olarak, bitki türlerinin yapraklarındaki pigment içeriği, kök ve yapraklardaki Cu ve Cd içeriği, protein ve lipit içeriği, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidant aktivitelerindeki değişimlerin değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Uygulanan derişimler arasında farklılığın sebeplerini tespit etmek için Tukey Honestly Significant Differently (HSD) testi uygulanmıştır. Ortalamalar %5 önem seviyesinde karşılaştırılmıştır. Çizelgelerde aynı harf ile gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak aynı grup içerisinde dir.

## 4. BULGULAR

Bu çalışmada, *Brassica oleracea* var. *acephala* ve *Silene vulgaris* var. *vulgaris* 'e 100, 200 ve 400 µg gr<sup>-1</sup> derişimlerinde bakır ve kadmiyum çözeltileri uygulanmıştır. Uygulama sonucunda yapraklarda yapılan fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerdeki değişimin sonuçları aşağıda verilmiştir. Bitkinin kök kısımları sadece metal birikiminin belirlenmesinde kullanılmıştır. Deneyler sonucunda ortaya çıkan değerlerin istatistiksel analizleri yapılarak  $p \leq 0,05$ 'e göre önem dereceleri belirlenmiştir.

### 4.1. *Brassica oleracea* var. *acephala*

#### 4.1.1. Kadmiyumun Etkileri

##### 4.1.1.1. Pigment İçeriği

*Brassica oleracea* var. *acephala* bitkisine kadmiyum uygulanması sonucunda elde edilen klorofil a, klorofil b, klorofil a/b ve karotenoid sonuçları Çizelge 4.1 Şekil 4.1'de verilmiştir.

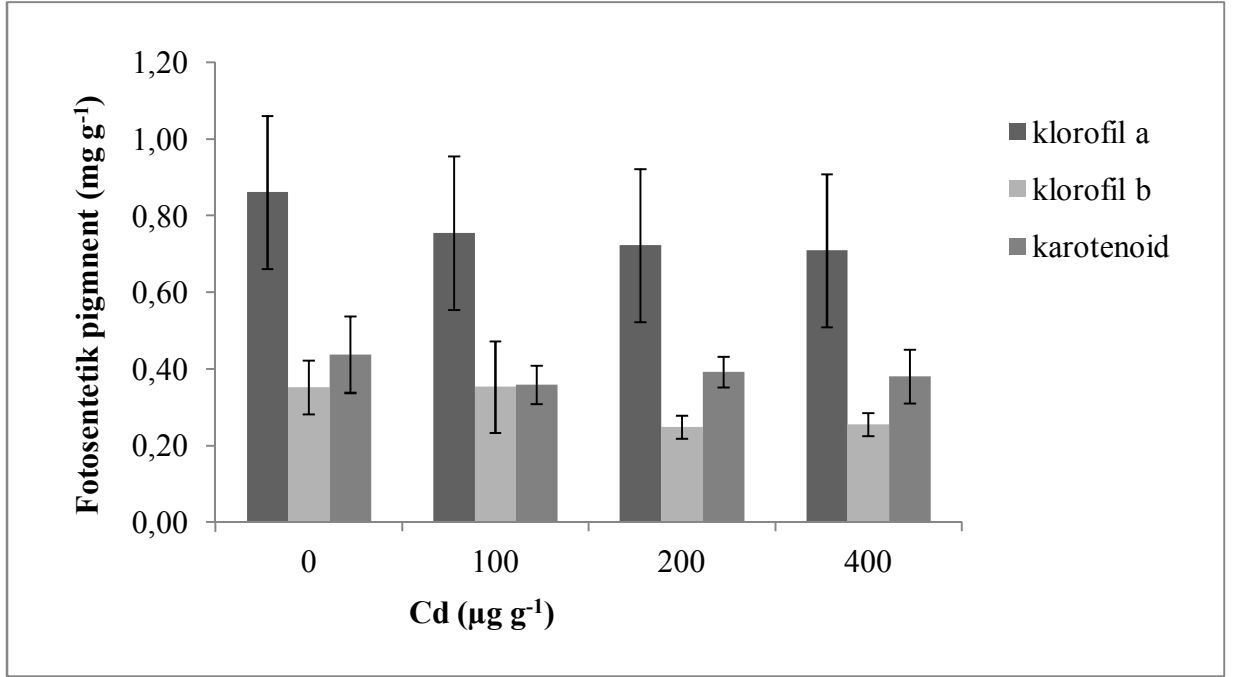
Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi kadmiyum uygulanan deney grubunda derişimdeki artışa bağlı olarak kl-a, kl-b ve kl a/b miktarında bir azalma görölürken, karotenoid miktarında ise bir artış görölmüştür. Ancak uygulanan derişimlerdeki kadmiyumun klorofil a, klorofil b, klorofil a/b ve karotenoid miktarı üzerindeki etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir.



**Çizelge 4.1.** Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında klorofil-a, klorofil-b, kla/klb ve karotenoid içeriği

| Derişim ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | Klorofil ( $\text{mg g}^{-1}$ T.A.) |                   |                   |                   |
|----------------------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                  | Kl-a                                | Kl-b              | Kla/b             | Karotenoid        |
| <b>Kontrol</b>                   | 0.86 $\pm$ 0.22 a                   | 0.35 $\pm$ 0.07 a | 0.44 $\pm$ 0.10 a | 2.45 $\pm$ 0.33 a |
| <b>100</b>                       | 0.75 $\pm$ 0.14 a                   | 0.35 $\pm$ 0.12 a | 0.36 $\pm$ 0.05 a | 2.38 $\pm$ 0.39 a |
| <b>200</b>                       | 0.72 $\pm$ 0.10 a                   | 0.25 $\pm$ 0.03 a | 0.39 $\pm$ 0.04 a | 2.91 $\pm$ 0.05 a |
| <b>400</b>                       | 0.71 $\pm$ 0.09 a                   | 0.25 $\pm$ 0.03 a | 0.38 $\pm$ 0.07 a | 2.79 $\pm$ 0.06 a |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sştunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.1.** Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında klorofil-a, klorofil-b ve karotenoid içeriği

#### 4.1.1.2. Cd İçeriği

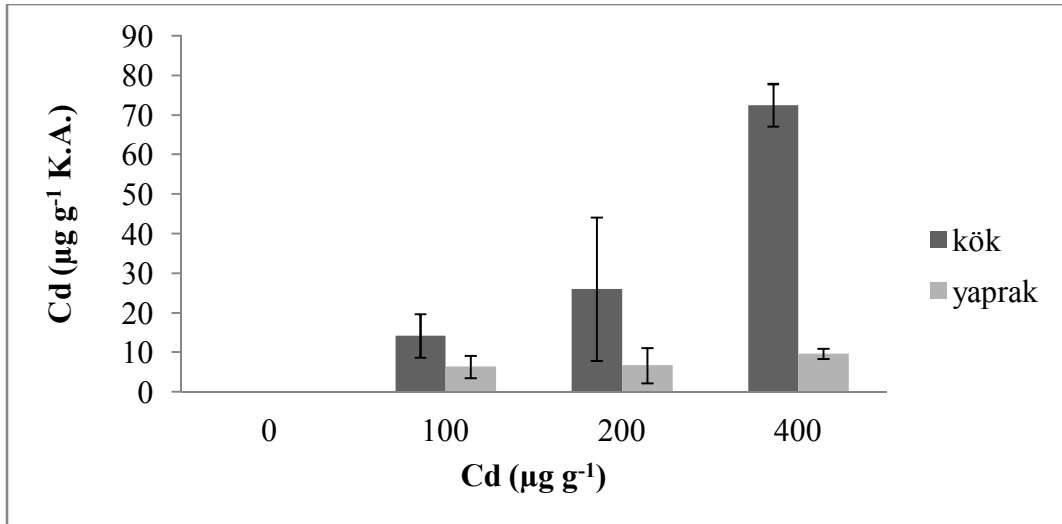
*Brassica oleracea* var. *acephala* bitkisine kadmiyum uygulanması sonucunda elde edilen kök ve yapraklardaki Cd içeriği Çizelge 4.2 Şekil 4.2’de verilmiştir.

Kontrol grubu ile kadmiyum uygulanan gruplar karşılaştırıldığında  $400 \mu\text{g g}^{-1}$  Cd uygulanan gruptaki bitkilerin köklerinde  $72.51 \mu\text{g g}^{-1}$  Cd birikirken yapraklara köklerdekinin 1/8’i kadar Cd taşındığı görülmüştür.

**Çizelge 4.2.** Cd’nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala*’nın kök ve yapraklarındaki Cd içeriği

| Derişim ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | Cd ( $\mu\text{g g}^{-1}$ K.A.) |             |
|----------------------------------|---------------------------------|-------------|
|                                  | Kök                             | Yaprak      |
| <b>Kontrol</b>                   | 0.00±0.00 a                     | 0.00±0.00 a |
| <b>100</b>                       | 14.18±5.48 a                    | 6.36±2.79 a |
| <b>200</b>                       | 26.00±18.07 a                   | 6.74±4.45 a |
| <b>400</b>                       | 72.51±5.37 b                    | 9.73±1.30 a |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.2.** Cd’nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala*’nın kök ve yapraklarındaki Cd içeriği

#### 4.1.1.3. Lipit Peroksidasyonu

Yapraklarda meydana gelen lipit peroksidasyonunun derecesinin belirlenmesi için peroksidasyonun son ürünü olan malondialdehitin seviyesi ölçülmüştür.

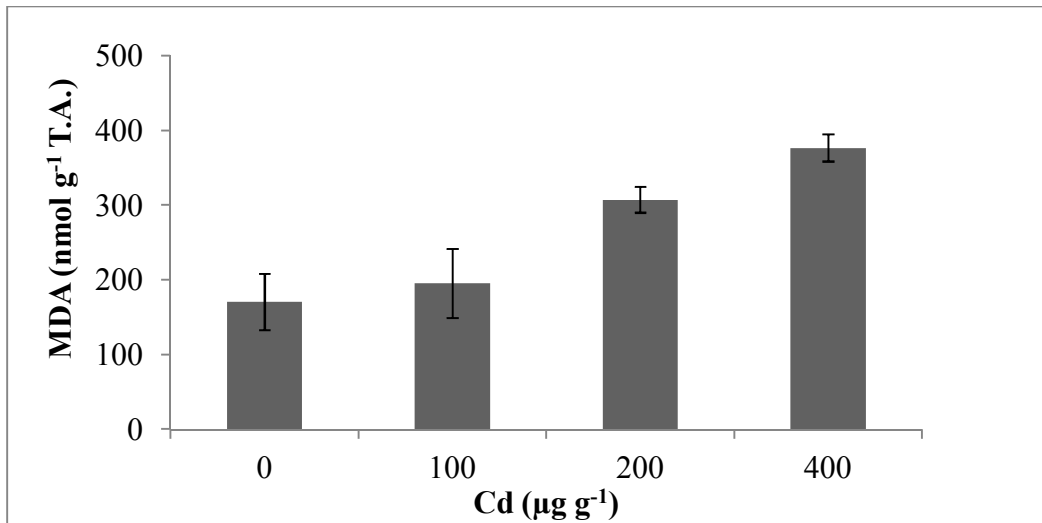
*Brassica oleracea* var. *acephala* bitkisine kadmiyum uygulanması sonucunda elde edilen lipit peroksidasyon sonuçları Çizelge 4.3 ve Şekil 4.3’de verilmiştir.

Kadmiyumun farklı derişimlerinin etkisindeki lipit peroksidasyon miktarı kontrol grubuna göre belirgin derecede artmıştır. Özellikle 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cd uygulanan gruptaki bitkilerin yapraklarında lipit peroksidasyonunun kontrole göre 2 kat arttığı belirlenmiş olup bu artış istatistiki olarak önemlidir.

**Çizelge 4.3.** Cd’nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında lipit peroksidasyonu

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | MDA<br>( $\text{nmol g}^{-1}$ T.A.) |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Kontrol</b>                      | 170.45±37.58 a                      |
| <b>100</b>                          | 195.12±46.19 a                      |
| <b>200</b>                          | 306.92±17.16 ab                     |
| <b>400</b>                          | 376.55±18.30 b                      |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.3** Cd’nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında lipit peroksidasyonu

#### 4.1.1.4. Protein İçeriği

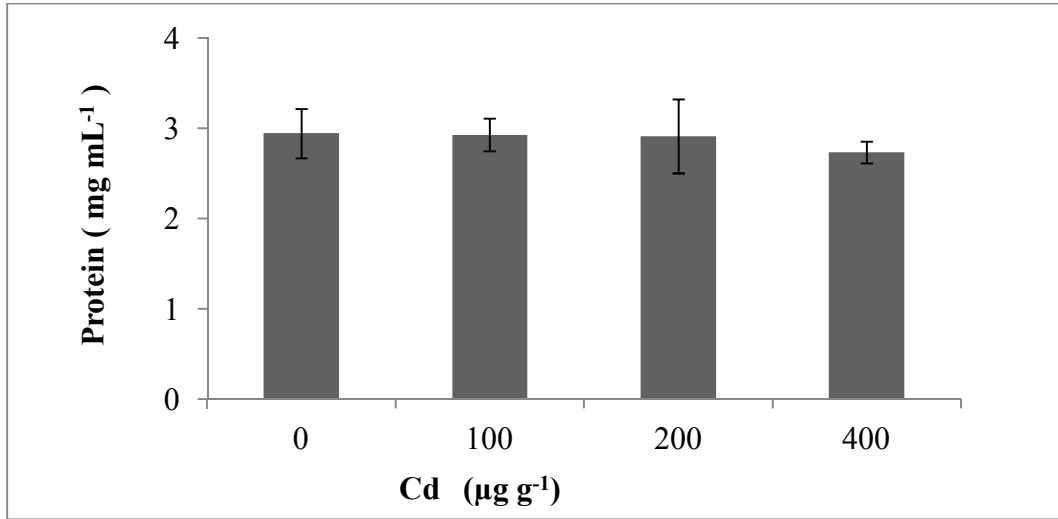
*Brassica oleracea* var. *acephala* bitkisine uygulanan kadmiyum derişimleri ile protein miktarı arasındaki ilişki Çizelge 4.4 ve Şekil 4.4’de verilmiştir.

Farklı derişimlerde uygulanan kadmiyumun protein içeriğinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir.

**Çizelge 4.4.** Cd’nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında protein içeriği

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | Protein<br>( $\text{mg mL}^{-1}$ ) |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| <b>Kontrol</b>                      | 2.94 $\pm$ 0.27 a                  |
| <b>100</b>                          | 2.93 $\pm$ 0.18 a                  |
| <b>200</b>                          | 2.91 $\pm$ 0.41 a                  |
| <b>400</b>                          | 2.73 $\pm$ 0.12 a                  |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.4.** Cd’nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında protein içeriği

#### 4.1.1.5. Prolin İçeriği

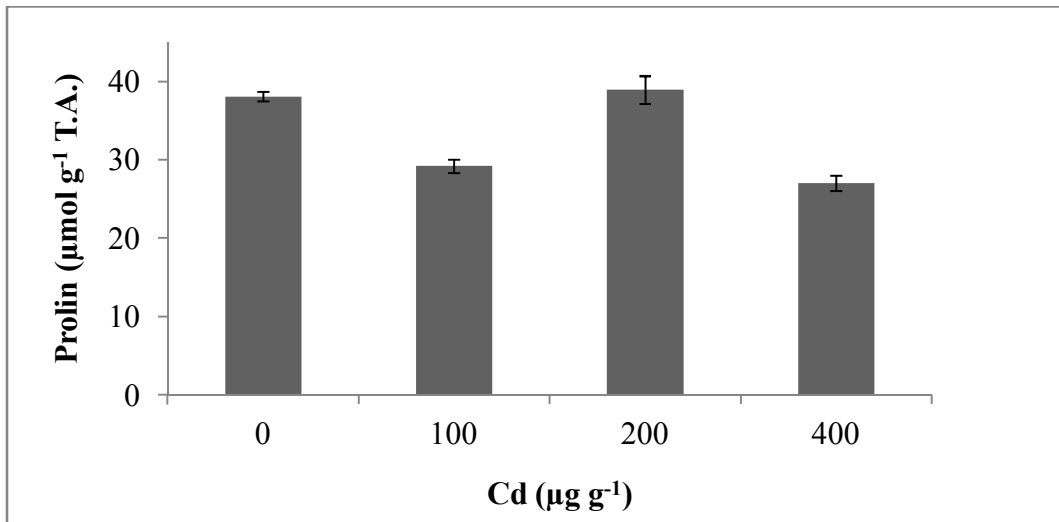
*Brassica oleracea* var. *acephala* bitkisine kadmiyum uygulanması sonucunda elde edilen prolin miktarı Çizelge 4.5 ve Şekil 4.5’de verilmiştir.

*Brassica oleracea* var. *acephala* bitkisine uygulanan kadmiyum derişimleri ile prolin miktarı arasındaki farkın istatistiki açıdan önemli olduğu bulunmuştur. Kadmiyum uygulaması sonucunda, gruplar arasında 100 ve 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cd derişimlerinde prolin miktarının kontrole göre önemli oranda azaldığı görülmüştür.

**Çizelge 4.5** Cd’nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleraceae* var. *acephala* yapraklarında prolin içeriği

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | Prolin<br>( $\mu\text{mol g}^{-1}$ T.A.) |
|-------------------------------------|--|
| <b>Kontrol</b>                      | 38.09±0.59 a                             |
| <b>100</b>                          | 29.19±0.87 b                             |
| <b>200</b>                          | 38.93±1.76 a                             |
| <b>400</b>                          | 27.01±0.95 b                             |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.5.** Cd’nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleraceae* var. *acephala* yapraklarında prolin içeriği

#### 4.1.1.6. Protein Olmayan –SH Grupları

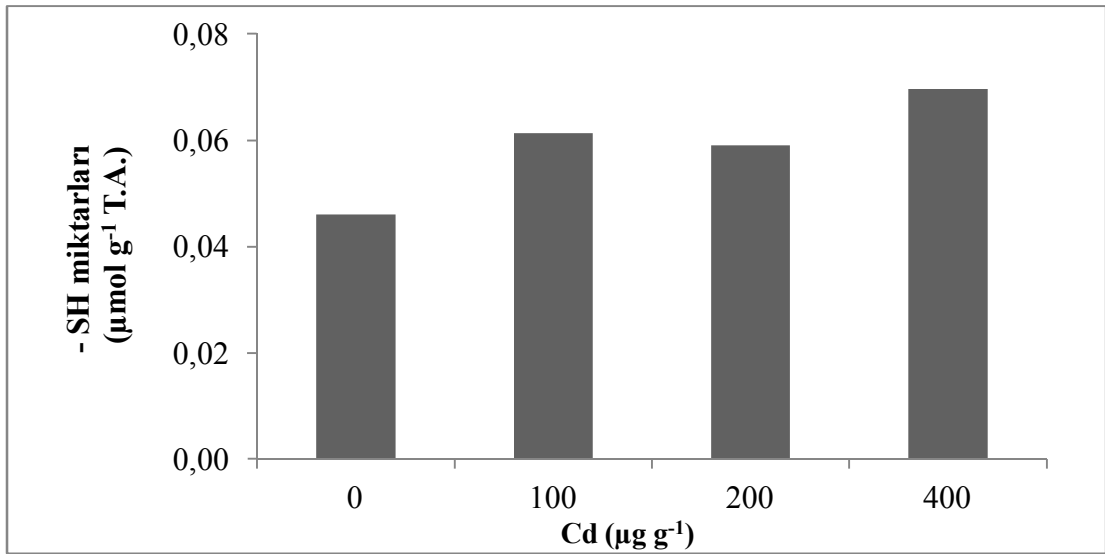
Kadmiyumun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala*'nın –SH grup miktarı ve istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 4.6 ve Şekil 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi kadmiyumun farklı derişimlerinin etkisiyle yapraklardaki –SH miktarının önemli oranda arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir.

**Çizelge 4.6.** Cd 'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında protein olmayan –SH grupları

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | -SH grup miktarı<br>( $\mu\text{mol g}^{-1}$ T.A.) |
|-------------------------------------|--|
| <b>Kontrol</b>                      | 0.05±0.00 b  |
| <b>100</b>                          | 0.06±0.00 a  |
| <b>200</b>                          | 0.06±0.00 a  |
| <b>400</b>                          | 0.07±0.00 a  |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.6.** Cd 'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında protein olmayan -SH grupları

#### 4.1.1.7. Askorbat

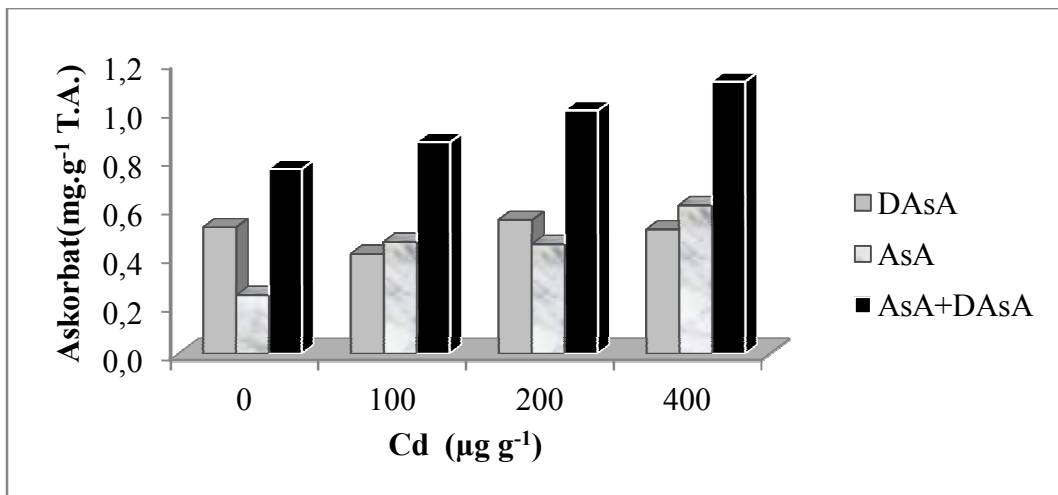
*Brassica oleracea* var. *acephala* bitkisine kadmiyum uygulanması sonucunda elde edilen dehidroaskorbat (DAsA), askorbat (AsA) ve toplam askorbat (AsA+DAsA) içerikleri Çizelge 4.7 ve Şekil 4.7’de verilmiştir.

Kadmiyum uygulaması sonucunda dehidroaskorbat miktarında belirgin bir değişiklik olmamasına rağmen, askorbat ve toplam askorbat miktarında ise belirgin bir artış görülmüştür ve bu değerler istatistiki olarak önemli bulunmuştur.

**Çizelge 4.7.** Cd’nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında dehidroaskorbat (DAsA), askorbat (AsA) ve toplam askorbat (AsA+DAsA) içerikleri

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | ASKORBAT<br>( $\text{mg g}^{-1}$ T.A.) |             |              |
|-------------------------------------|--|-------------|--------------|
|                                     | DAsA                                   | AsA         | AsA+DAsA     |
| <b>Kontrol</b>                      | 0.52±0.03 a                            | 0.24±0.02 a | 0.76±0.02 a  |
| <b>100</b>                          | 0.41±0.04 a                            | 0.46±0.01 b | 0.87±0.02 ab |
| <b>200</b>                          | 0.55±0.01 a                            | 0.45±0.00 b | 1.00±0.02 bc |
| <b>400</b>                          | 0.51±0.06 a                            | 0.61±0.01 c | 1.13±0.05 c  |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.7.** Cd’nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında dehidroaskorbat (DAsA), askorbat (AsA) ve toplam askorbat (AsA+DAsA) içerikleri

#### 4.1.1.8. Antioksidant Enzim Aktivitesi

##### Katalaz Aktivitesi

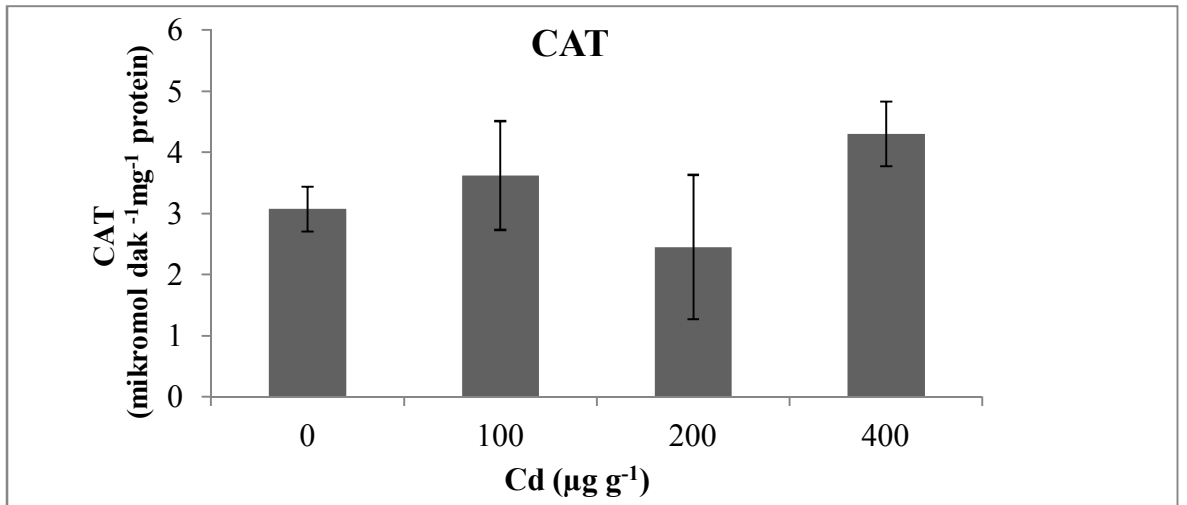
Kadmiyumun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleraceae* var. *acephala* yapraklarında CAT aktivitesindeki değişimler Çizelge 4.8 ve Şekil 4.8'de verilmiştir.

*Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cd uygulaması sonucu CAT aktivitesi bir miktar artmakla birlikte bu artış istatistiki olarak önemli değildir.

**Çizelge 4.8.** Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleraceae* var. *acephala* yapraklarında CAT aktivitesi

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | CAT<br>(mikromol $\text{dak}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$ ) |
|-------------------------------------|--|
| <b>Kontrol</b>                      | 3.07 $\pm$ 0.37 a  |
| <b>100</b>                          | 3.62 $\pm$ 0.89 a  |
| <b>200</b>                          | 2.45 $\pm$ 1.18 a  |
| <b>400</b>                          | 4.30 $\pm$ 0.53 a  |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.8.** Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında CAT aktivitesi



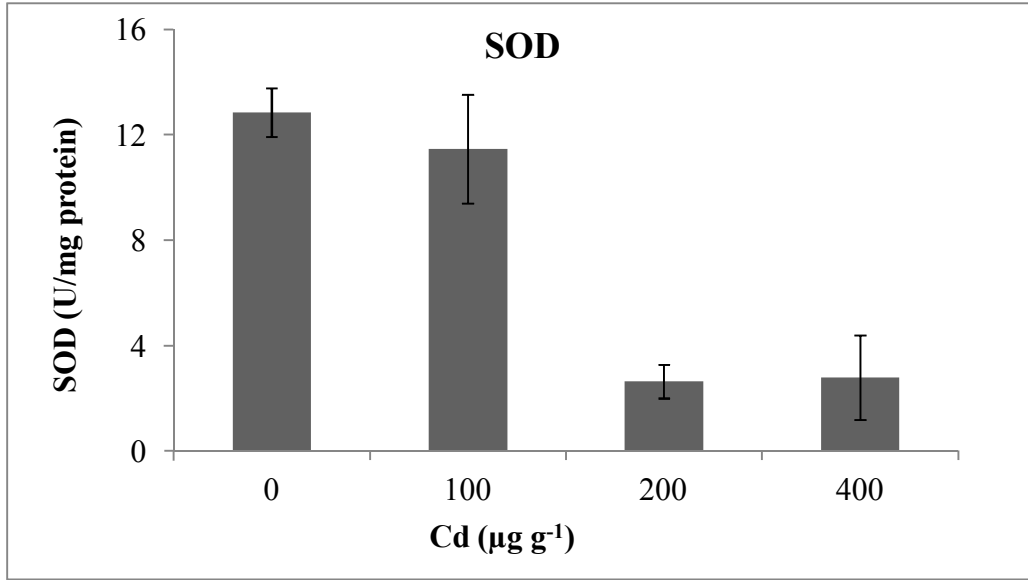
### Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

Kadmiyumun farklı derişimlerine maruz bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında 200 ve 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cd derişimlerinde SOD aktivitesinin kontrole göre 1/6 oranında azaldığı gözlenmiştir (Çizelge 4.9, Şekil 4.9).

**Çizelge 4.9.** Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında SOD aktivitesi

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | SOD<br>(U/mg protein) |
|-------------------------------------|-----------------------|
| <b>Kontrol</b>                      | 12.86±0.92 a          |
| <b>100</b>                          | 11.47±2.06 a          |
| <b>200</b>                          | 2.65±0.64 b           |
| <b>400</b>                          | 2.80±1.61 b           |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.9.** Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında SOD aktivitesi

### Askorbat Peroksidaz Aktivitesi

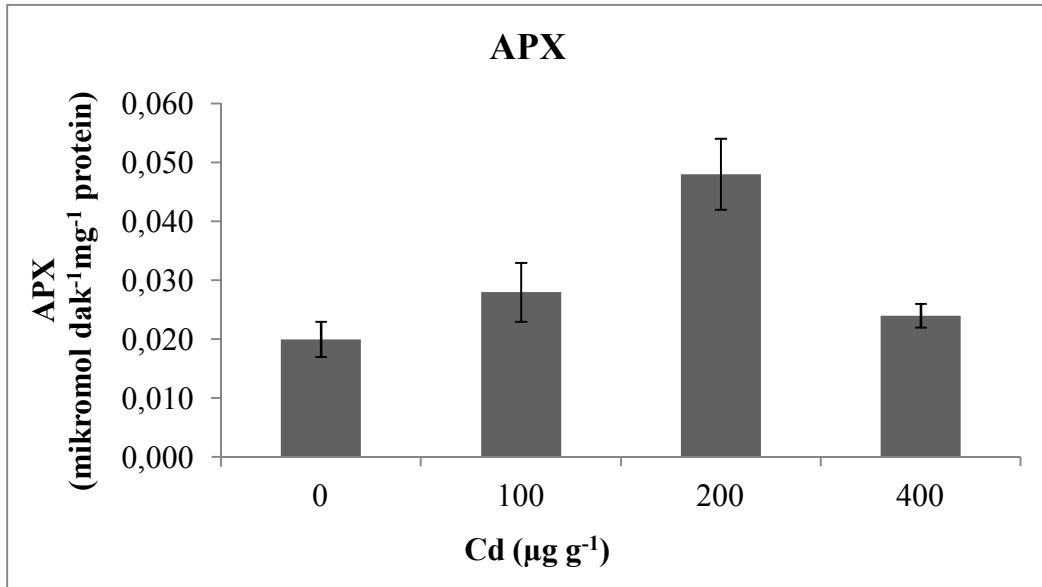
Kadmiyumun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında APX aktivitesi değişimleri ve istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 4.10 ve Şekil 4.10'da verilmiştir.

*Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında farklı derişimlerdeki Cd uygulamalarına bağlı olarak APX aktivitesindeki en önemli artışın 200  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cd derişiminde meydana geldiği görülmektedir.

**Çizelge 4.10.** Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında APX aktivitesi

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | APX<br>(mikromol $\text{dak}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$ ) |
|-------------------------------------|--|
| <b>Kontrol</b>                      | 0.020 $\pm$ 0.003 a  |
| <b>100</b>                          | 0.028 $\pm$ 0.005 ab   |
| <b>200</b>                          | 0.048 $\pm$ 0.006 b  |
| <b>400</b>                          | 0.024 $\pm$ 0.002 a  |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p\leq 0.05$ ).



**Şekil 4.10.** Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında APX aktivitesi

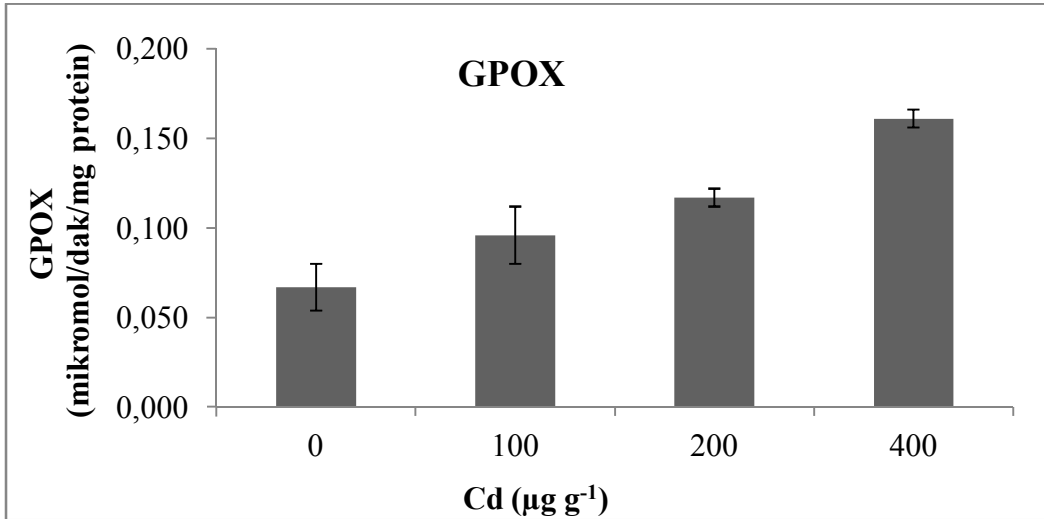
### Guaiacol Peroksidaz Aktivitesi

*Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında, 100, 200 ve 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  kadmiyum uygulaması sonucunda GPOX aktivitesinde belirgin bir artış olduğu, kadmiyum uygulanan gruplar ve kontrol grubu karşılaştırıldığında GPOX aktivitesindeki en önemli artışın 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cd derişiminde gerçekleştiği görülmüştür (Çizelge 4.11, Şekil 4.11).

**Çizelge 4.11.** Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında GPOX aktivitesi

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | GPOX<br>(mikromol $\text{dak}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$ ) |
|-------------------------------------|---|
| Kontrol                             | 0.067±0.013 a   |
| 100                                 | 0.096±0.016 a   |
| 200                                 | 0.117 ±0.005 ab   |
| 400                                 | 0.161 ±0.005 b  |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.11.** Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında GPOX aktivitesi

#### 4.1.2. Bakırın Etkileri

##### 4.1.2.1. Pigment İçeriği

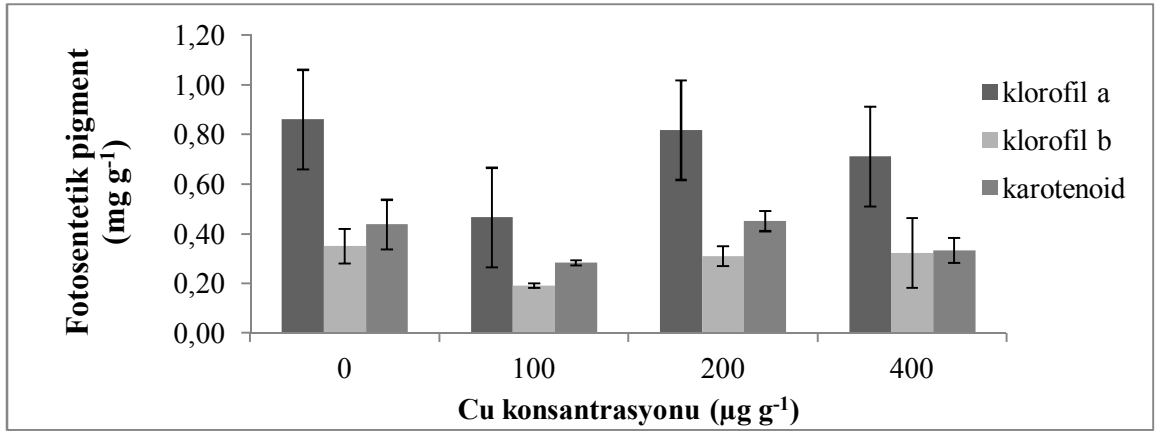
*Brassica oleracea* var. *acephala* bitkisine bakır uygulanması sonucunda elde edilen klorofil a, klorofil b, klorofil a/b ve karotenoid sonuçları Çizelge 4.12 Şekil 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.12'de görüldüğü gibi kadmiyum uygulanan deney grubunda derişimdeki artışına bağlı olarak kl-a, kl-b,kl a/b ve karotenoid miktarında bir azalma görülmüştür. Ancak bakırın klorofil a, klorofil b, klorofil a/b ve karotenoid miktarı üzerindeki etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir.

**Çizelge 4.12.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında klorofil-a, klorofil-b, kla/klb ve karotenoid içeriği

| Cu             | Klorofil (mg g <sup>-1</sup> T.A.) |             |             |             |
|----------------|------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                | Kl-a                               | Kl-b        | Kla/b       | Karotenoid  |
| <b>Kontrol</b> | 0.86±0.22 a                        | 0.35±0.07 a | 2.45±0.33 a | 0.44±0.10 a |
| <b>100</b>     | 0.47±0.03 a                        | 0.19±0.01 a | 2.42±0.09 a | 0.29±0.01 a |
| <b>200</b>     | 0.82±0.06 a                        | 0.31±0.04 a | 2.68±0.22 a | 0.45±0.04 a |
| <b>400</b>     | 0.71±0.12 a                        | 0.32±0.14 a | 2.83±0.76 a | 0.33±0.05 a |

Değerler aritmetik ortalama ve ± standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir (p≤0.05).



**Şekil 4.12.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında klorofil-a, klorofil-b, kla/klb ve karotenoid içeriği

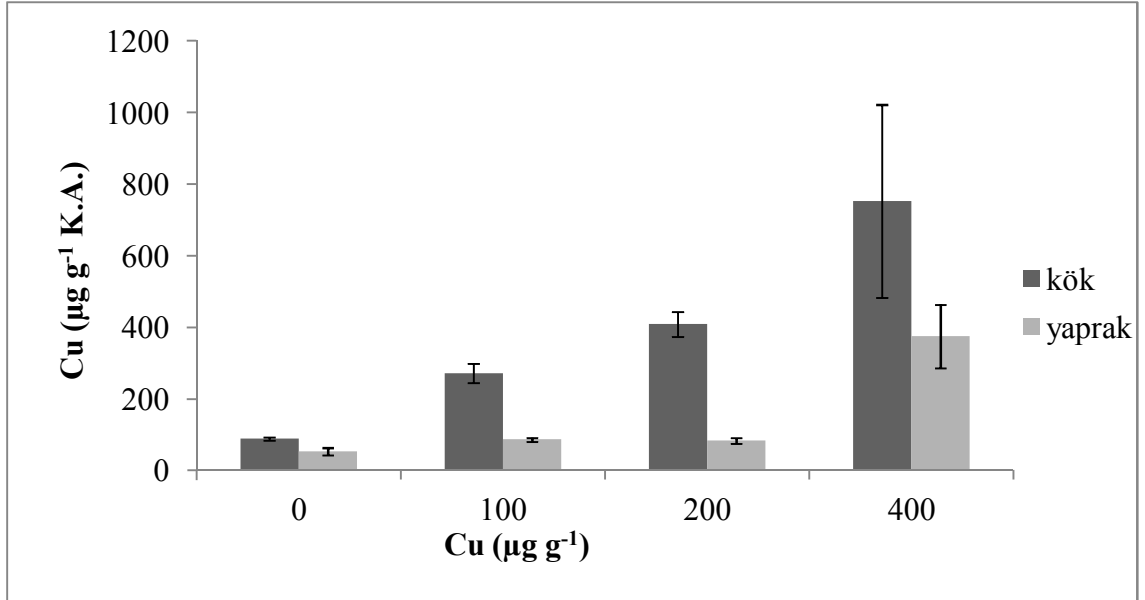
#### 4.1.2.2. Cu İçeriği

*Brassica oleracea* var. *acephala* bitkisine uygulanan bakır derişimindeki artışa bağlı olarak kökte ve yaprakta biriken bakır miktarı artmış olup bu artış istatistiki açıdan önemlidir. 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cu uygulaması sonucu kökte 752.64  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cu biriktiği yapraklara ise 375.25  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cu taşındığı görülmüştür (Çizelge 4.13, Şekil 4.13).

**Çizelge 4.13.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* kök ve yapraklardaki Cu içeriği

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | Cu ( $\mu\text{g g}^{-1}$ K.A.) |                |
|-------------------------------------|---------------------------------|----------------|
|                                     | Kök                             | Yaprak         |
| <b>Kontrol</b>                      | 89.28±4.01 a                    | 53.63±10.32 a  |
| <b>100</b>                          | 272.06±27.29 ab                 | 86.88±5.33 a   |
| <b>200</b>                          | 409.02±34.53 ab                 | 83.88±7.68 a   |
| <b>400</b>                          | 752.64±269.44 b                 | 375.25±88.30 b |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.13.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* kök ve yapraklardaki Cu içeriği

#### 4.1.2.3. Lipit Peroksidasyonu

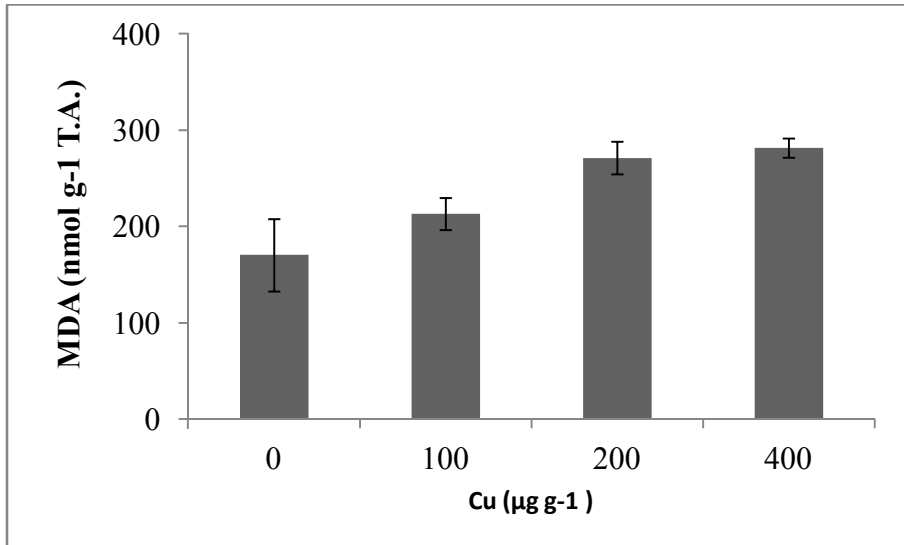
*Brassica oleracea* var. *acephala* bitkisine bakır uygulanması sonucunda elde edilen lipit peroksidasyon sonuçları ve istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 4.14 ve Şekil 4.14’de verilmiştir.

Bakırın farklı derişimlerinin etkisindeki lipit peroksidasyon miktarı kontrol grubuna göre belirgin derecede artmıştır ve bu artış istatistiki olarak önemli bulunmuştur.

**Çizelge 4.14.** Cu’nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında lipit peroksidasyonu

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | MDA<br>( $\text{nmol g}^{-1}$ T.A.) |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Kontrol</b>                      | 170.45 $\pm$ 37.58 a                |
| <b>100</b>                          | 213.52 $\pm$ 16.66 ab               |
| <b>200</b>                          | 271.38 $\pm$ 17.11 ab               |
| <b>400</b>                          | 281.99 $\pm$ 10.01 b                |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.14.** Cu’nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında lipit peroksidasyon

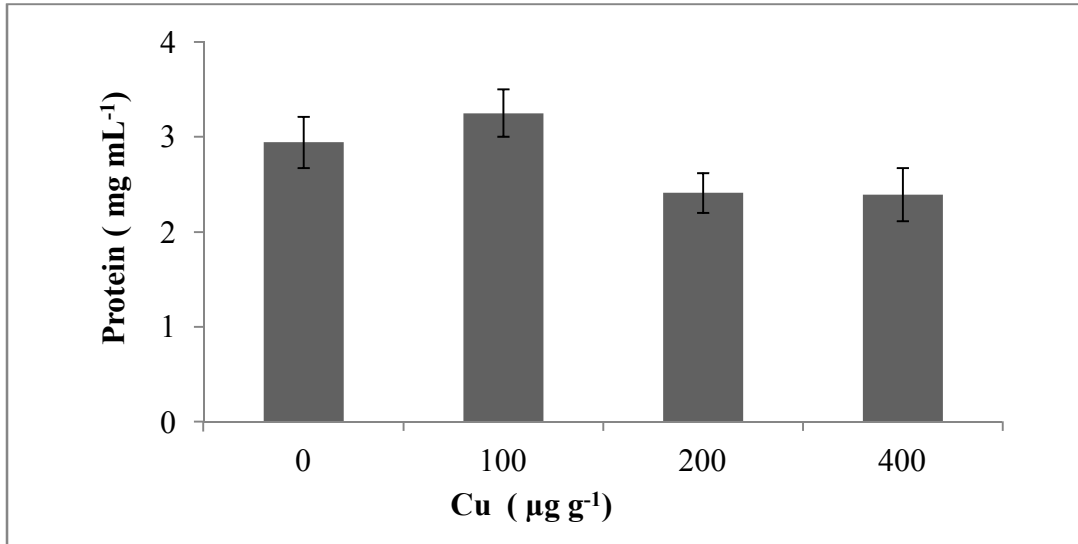
#### 4.1.2.4. Protein İçeriği

*Brassica oleracea* var. *acephala* bitkisine uygulanan bakır derişimleri ile protein miktarında bir azalma görülmüştür, ancak arasındaki farkın istatistiki açıdan önemsiz olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.15, Şekil 4.15).

**Çizelge 4.15.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında protein içeriği

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | Protein<br>( $\text{mg mL}^{-1}$ ) |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| Kontrol                             | 2.94 $\pm$ 0.27 a                  |
| 100                                 | 3.25 $\pm$ 0.25 a                  |
| 200                                 | 2.41 $\pm$ 0.21 a                  |
| 400                                 | 2.39 $\pm$ 0.28 a                  |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.15.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında protein içeriği

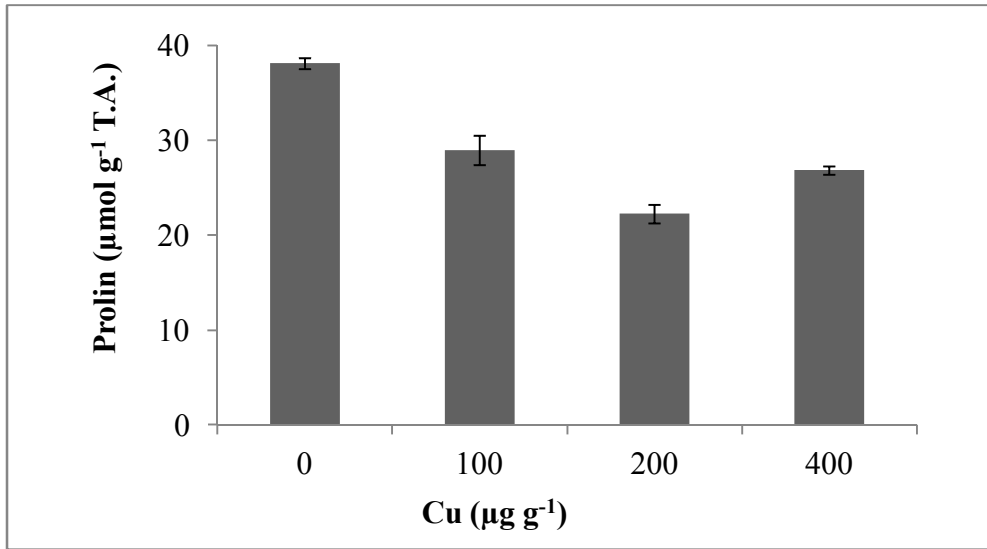
#### 4.1.2.5. Prolin İçeriği

*Brassica oleracea* var. *acephala* bitkisine uygulanan bakırın derişimindeki artışa bağlı olarak prolin miktarının azaldığı ve bu azalmanın önemli olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.16, Şekil 4.16).

**Çizelge 4.16.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında prolin içeriği

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | Prolin<br>( $\mu\text{mol g}^{-1}$ T.A.) |
|-------------------------------------|--|
| <b>Kontrol</b>                      | 38.09 $\pm$ 0.59 a                       |
| <b>100</b>                          | 28.96 $\pm$ 1.53 b                       |
| <b>200</b>                          | 22.26 $\pm$ 0.97 c                       |
| <b>400</b>                          | 26.86 $\pm$ 0.43 b                       |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.16.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında prolin içeriği



#### 4.1.2.6. Protein Olmayan –SH Grupları

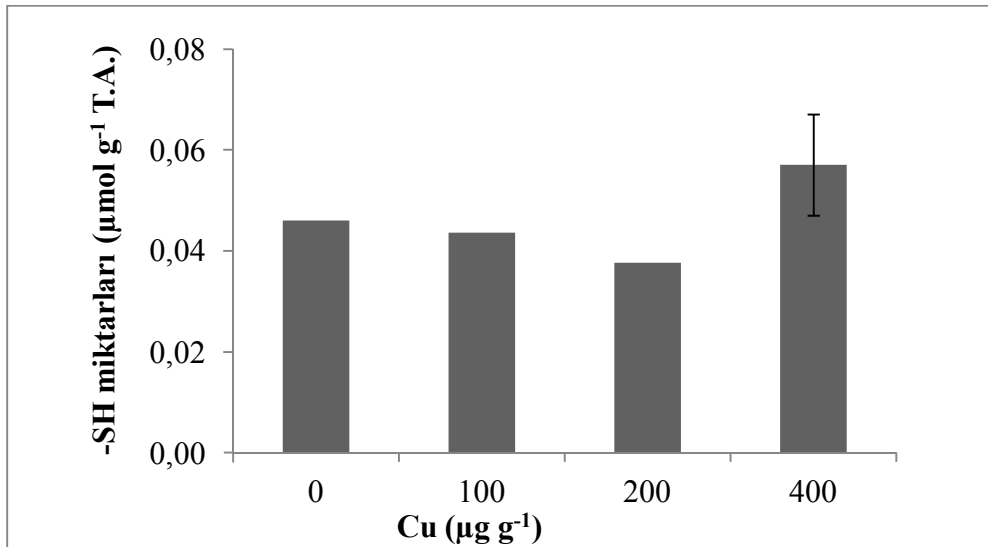
Bakırın farklı derişimlerine maruz bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında –SH grup miktarı ve istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 4.17 ve Şekil 4.17’de verilmiştir.

*Brassica oleracea* var. *acephala* bitkisine uygulanan bakır derişimindeki artışa bağlı olarak –SH miktarının önemli ölçüde değişmediği belirlenmiştir.

**Çizelge 4.17.** Cu ‘nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında protein olmayan –SH grupları

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | -SH grup miktarı<br>( $\mu\text{mol g}^{-1}$ T.A.) |
|-------------------------------------|--|
| <b>Kontrol</b>                      | 0.05 $\pm$ 0.00 a                                  |
| <b>100</b>                          | 0.04 $\pm$ 0.00 a                                  |
| <b>200</b>                          | 0.04 $\pm$ 0.00 a                                  |
| <b>400</b>                          | 0.06 $\pm$ 0.01 a                                  |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.17.** Cu ‘nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında protein olmayan –SH grupları

#### 4.1.2.7. Askorbat

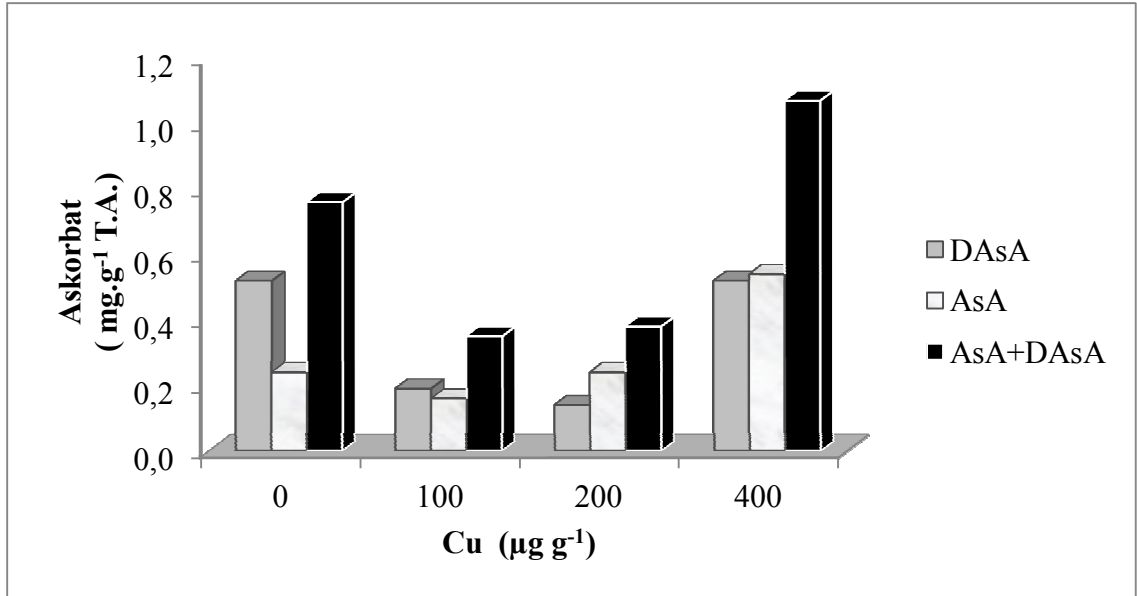
*Brassica oleracea* var. *acephala* bitkisine bakır uygulanması sonucunda elde edilen dehidroaskorbat (DAsA), askorbat (AsA) ve toplam askorbat (AsA+DAsA) miktarları Çizelge 4.18 ve Şekil 4.18’de verilmiştir.

Farklı derişimlerdeki bakır uygulamalarına bağı olarak dehidroaskorbat (DAsA), askorbat (AsA) ve toplam askorbat (AsA+DAsA) miktarlarında istatistiki olarak önemli farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Dehidroaskorbat miktarının bakır uygulanan gruplarda özellikle 100 ve 200  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cu derişimlerinde önemli derecede azaldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, askorbat miktarındaki en fazla artışın 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cu derişiminde meydana geldiği görülmüştür. Toplam askorbat miktarı ile bakır uygulanan gruplar kendi içerisinde değerlendirildiğinde, toplam askorbat miktarının 100 ve 200  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cu derişimlerinde kontrol ve 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cu’ya göre önemli derecede azaldığı belirlenmiştir.

**Çizelge 4.18.** Cu’nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala*’nın dehidroaskorbat (DAsA), indirgenmiş (AsA) ve toplam askorbat (AsA+DAsA) içerikleri

| Derişim ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | ASKORBAT ( $\text{mg g}^{-1}$ T.A.) |                   |                   |
|----------------------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|
|                                  | DAsA                                | AsA               | AsA+DAsA          |
| <b>Kontrol</b>                   | 0.52 $\pm$ 0.04 a                   | 0.24 $\pm$ 0.02 a | 0.76 $\pm$ 0.02 a |
| <b>100</b>                       | 0.19 $\pm$ 0.02 b                   | 0.16 $\pm$ 0.02 a | 0.35 $\pm$ 0.02 b |
| <b>200</b>                       | 0.14 $\pm$ 0.01 b                   | 0.24 $\pm$ 0.02 a | 0.52 $\pm$ 0.02 b |
| <b>400</b>                       | 0.52 $\pm$ 0.06 a                   | 0.54 $\pm$ 0.04 b | 1.01 $\pm$ 0.13 c |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.18.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala*'nın dehidroaskorbat (DAsA), indirgenmiş (AsA) ve toplam askorbat (AsA+DAsA) içerikleri

#### 4.1.2.8. Antioksidant Enzim Aktivitesi

##### Katalaz Aktivitesi

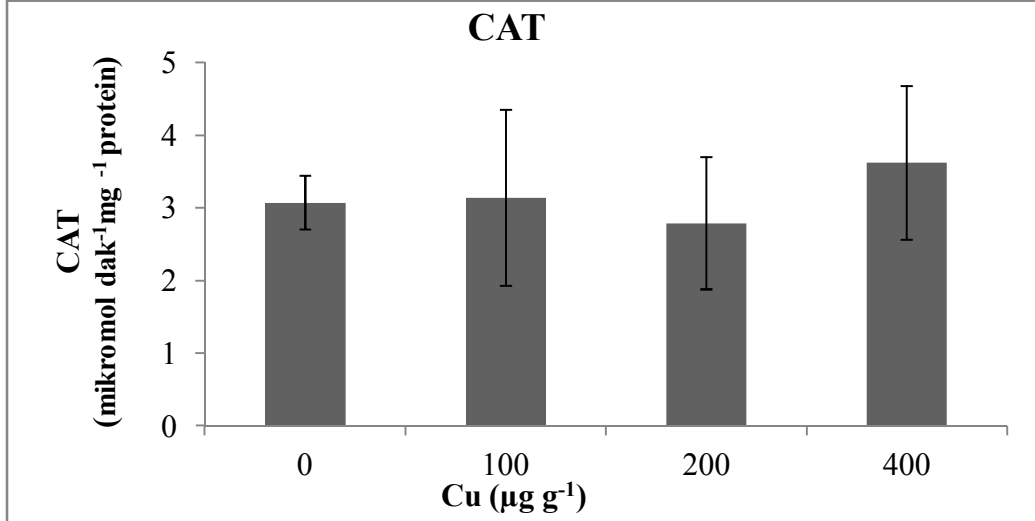
Artan derişimlerde bakıra maruz bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında CAT aktivitesindeki değişimler Çizelge 4.19 ve Şekil 4.19'da verilmiştir.

*Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında CAT aktivitesi ile Cu uygulaması arasındaki ilişki istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur.

**Çizelge 4.19.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında CAT aktivitesi

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | CAT<br>(mikromol $\text{dak}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$ ) |
|-------------------------------------|--|
| <b>Kontrol</b>                      | 3.07 $\pm$ 0.37 a  |
| <b>100</b>                          | 3.14 $\pm$ 1.21 a  |
| <b>200</b>                          | 2.79 $\pm$ 0.91 a  |
| <b>400</b>                          | 3.62 $\pm$ 1.06 a  |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p\leq 0.05$ ).



**Şekil 4.19.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında CAT aktivitesi

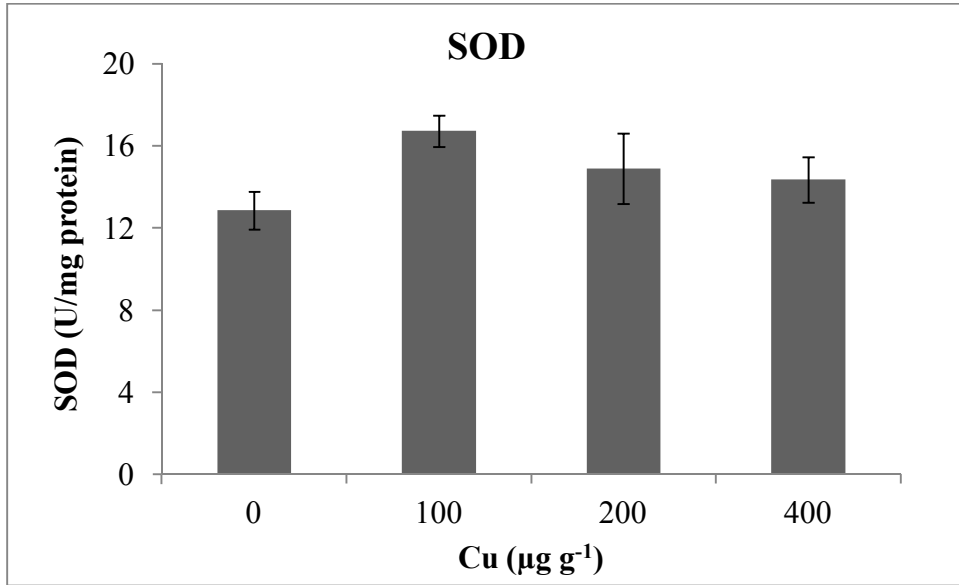
### Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

*Brassica oleraceae* var. *acephala* bitkisine uygulanan bakır derişimlerine bağlı olarak SOD aktivitesinde meydana gelen değişikler Çizelge 4.20, Şekil 4.20' de verilmiştir. Bakır uygulamasına bağlı olarak SOD aktivitesi bir miktar artmış, ancak bu artışın istatistiki açıdan önemsiz olduğu bulunmuştur.

**Çizelge 4.20.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında SOD aktivitesi

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | SOD<br>(U/mg protein) |
|-------------------------------------|-----------------------|
| Kontrol                             | 12.86 $\pm$ 0.92 a    |
| 100                                 | 16.72 $\pm$ 0.76 a    |
| 200                                 | 14.89 $\pm$ 1.72 a    |
| 400                                 | 14.35 $\pm$ 1.10 a    |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.20.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında SOD aktivitesi

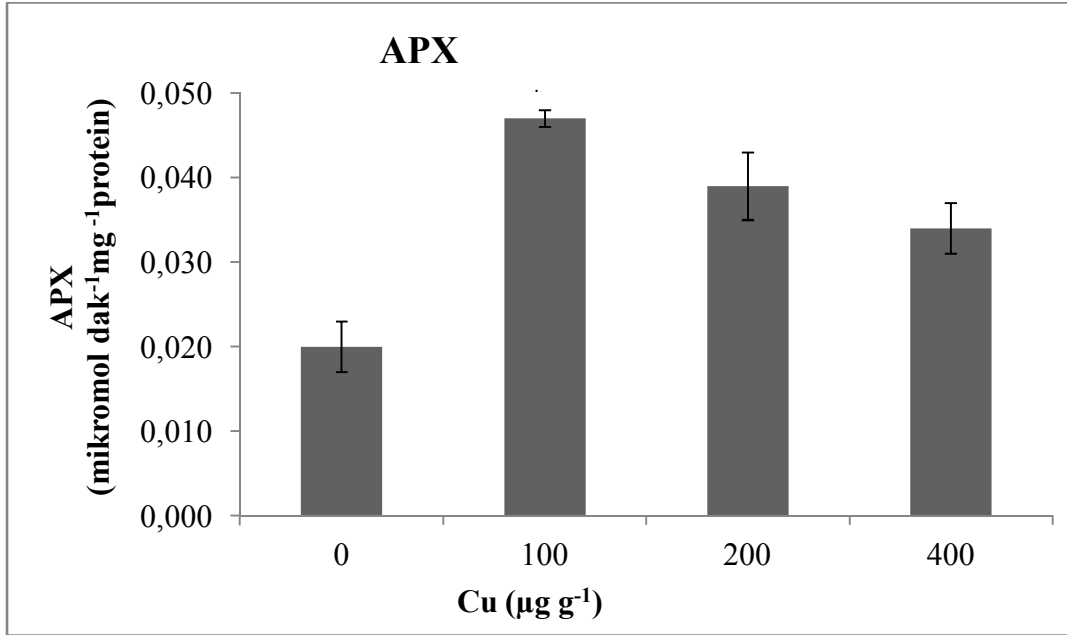
### Askorbat Peroksidaz Aktivitesi

*Brassica oleraceae* var. *acephala* bitkisine bakır uygulaması ile APX aktivitesi arasındaki farkın istatistiki açıdan önemli olduğu belirlenmiştir. Bakır uygulanan gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında APX aktivitesinin bakır uygulanan gruplarda önemli oranda arttığı belirlenmiştir. En önemli artış  $100 \mu\text{g g}^{-1}$  ve  $200 \mu\text{g g}^{-1}$  Cu derişimlerinde görülmüştür (Çizelge 4.21, Şekil 4.21).

**Çizelge 4.21.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında APX aktivitesi

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | APX<br>(mikromol $\text{dak}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$ ) |
|-------------------------------------|--|
| Kontrol                             | $0.020 \pm 0.003$ a  |
| 100                                 | $0.047 \pm 0.001$ c  |
| 200                                 | $0.039 \pm 0.004$ bc   |
| 400                                 | $0.034 \pm 0.003$ ab   |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.21.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında APX aktivitesi

### Guaiacol Peroksidaz Aktivitesi

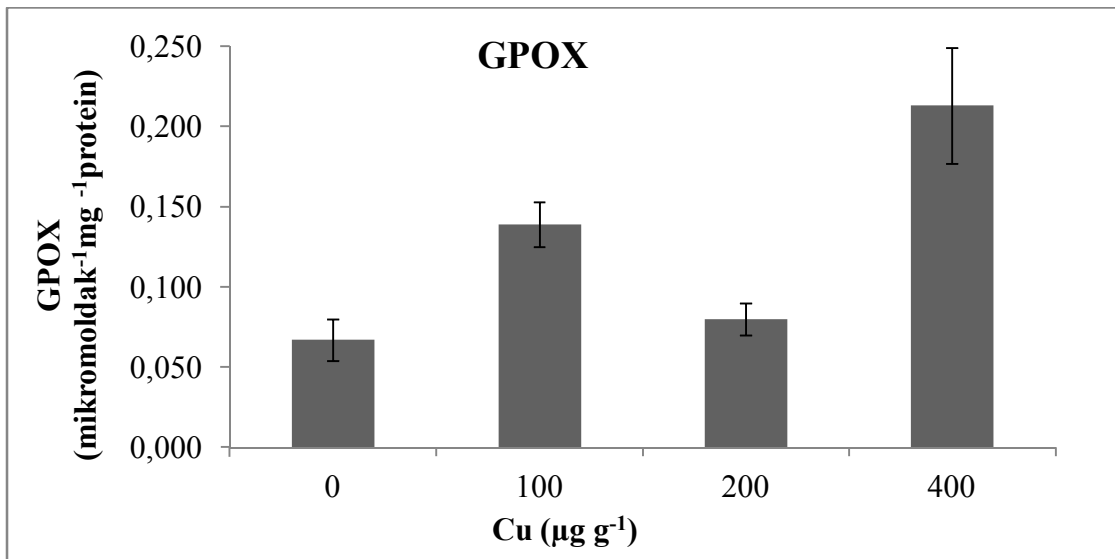
Bakırın farklı derişimlerine maruz bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında GPOX aktivitesindeki değişimler Çizelge 4.22 ve Şekil 4.22’de verilmiştir.

GPOX aktivitesi, uygulanan bakır derişimine bağlı olarak belirgin bir artış göstermiş ve bu artış istatistiki olarak önemli bulunmuştur. 400 µg g<sup>-1</sup> Cu uygulanan bitkilerin yapraklarında GPOX aktivitesinin kontrole göre 3 kattan daha fazla artış gösterdiği belirlenmiştir.

**Çizelge 4.22.** Cu’nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında GPOX aktivitesi

| Derişim<br>(µg g <sup>-1</sup> ) | GPOX<br>(mikromol dak <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protein) |
|----------------------------------|---|
| Kontrol                          | 0.067±0.013 a   |
| 100                              | 0.139±0.014 ab  |
| 200                              | 0.080±0.010 a   |
| 400                              | 0.213±0.036 b   |

Değerler aritmetik ortalama ve ± standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir (p≤0.05).

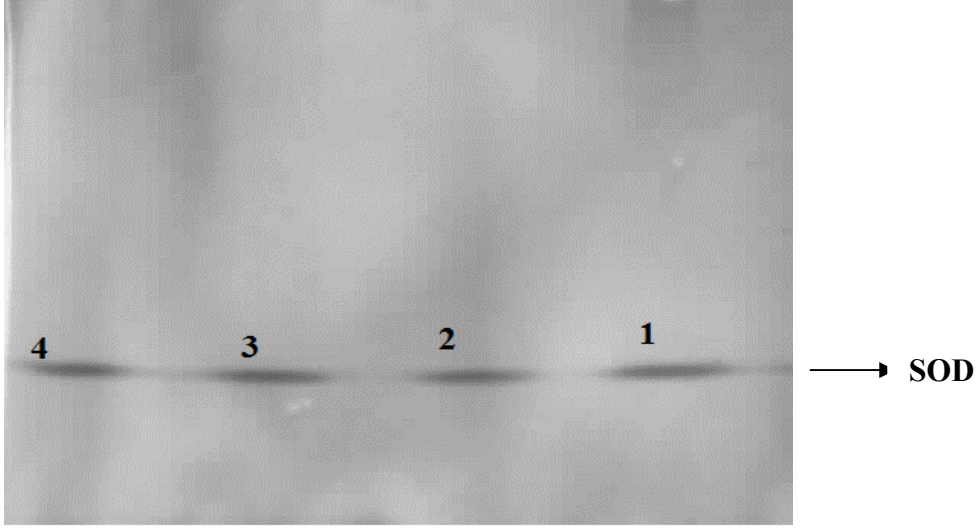


**Şekil 4.22.** Cu’nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında GPOX aktivitesi

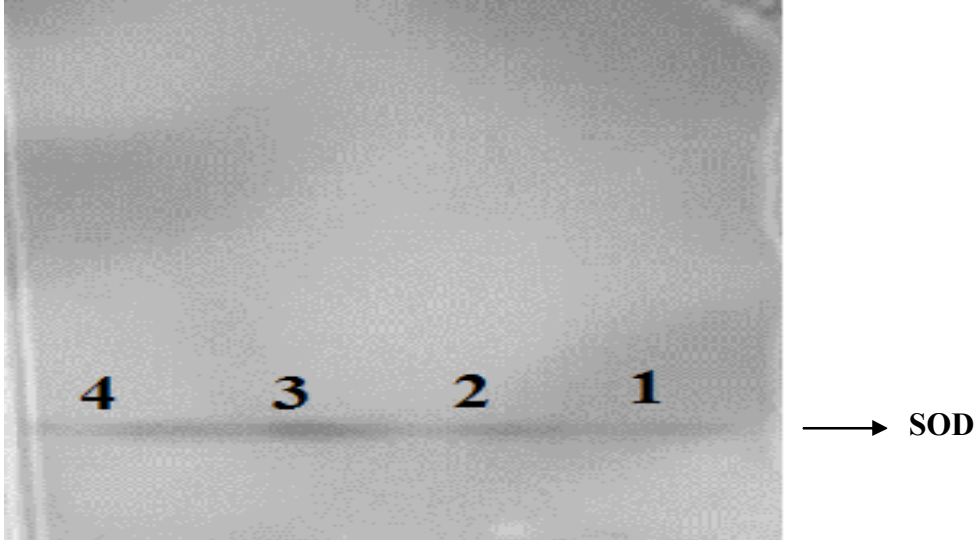
#### 4.1.3. Native Page Yöntemiyle SOD İzoenzimlerinin Belirlenmesi

*Brassica oleracea* var. *acephala*'ya kadmiyum ve bakır uygulanması sonucunda SOD izoenzimlerinin elektroforetik bant desenleri Şekil 4.23'de verilmiştir. Her iki uygulama sonucunda da yalnızca bir bant görülmüştür.

A)



B)



**Şekil 4.23.** A) Cd ve B) Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında SOD izoenzimleri (1) kontrol (2) 100 µg g<sup>-1</sup> (3) 200µg g<sup>-1</sup> (4) 400 µg g<sup>-1</sup>



## 4.2. *Silene vulgaris* var. *vulgaris*

### 4.2.1. Kadmiyumun Etkileri

#### 4.2.1.1. Pigment İçeriği

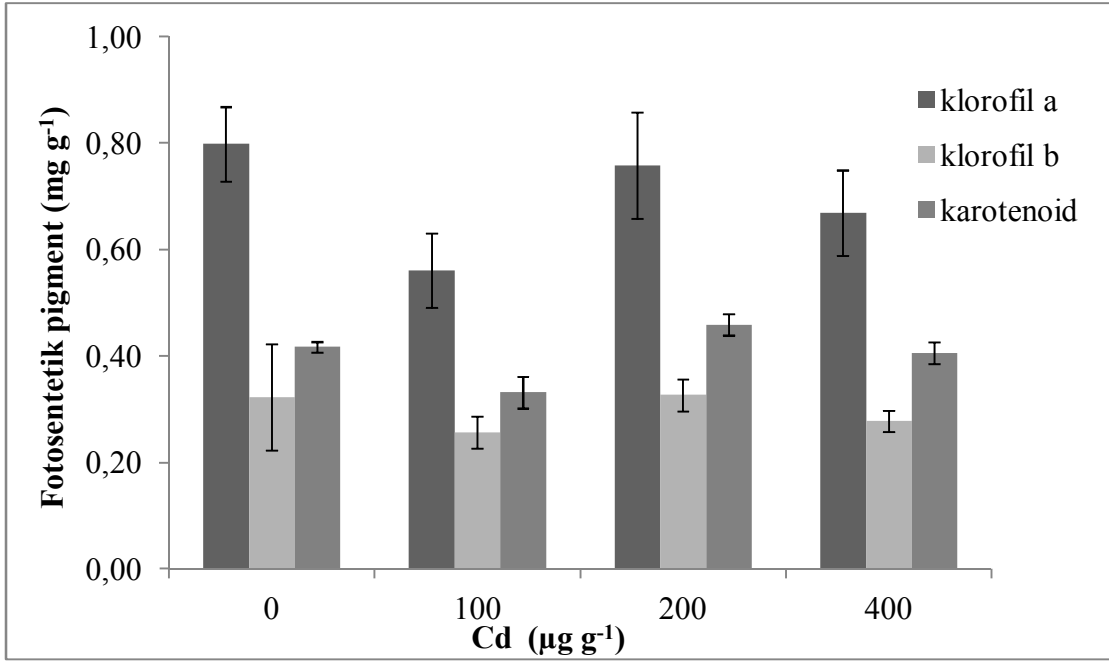
*Silene vulgaris* var. *vulgaris* bitkisine kadmiyum uygulanması sonucunda elde edilen klorofil a, klorofil b, klorofil a/b ve karotenoid sonuçları Çizelge 4.23 Şekil 4.24'de verilmiştir.

Çizelge 4.23'de görüldüğü gibi kadmiyum uygulanan deney grubunda Cd derişimindeki artışa bağılı olarak kl-a, kl-b ve kl a/b miktarında bir azalma görülürken, karotenoid miktarında önemli bir değişiklik görülmemiştir. Kadmiyumun klorofil a, klorofil b, klorofil a/b ve karotenoid miktarı üzerindeki etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir.

**Çizelge 4.23.** Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında klorofil-a, klorofil-b, kla/klb ve karotenoid içeriği

| Cd( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | Klorofil ( $\text{mg g}^{-1}\text{T.A.}$ ) |                   |                   |                   |
|----------------------------|--|-------------------|-------------------|-------------------|
|                            | Kl-a                                       | Kl-b              | Kla/b             | Karotenoid        |
| <b>Kontrol</b>             | 0.80 $\pm$ 0.07 a                          | 0.32 $\pm$ 0.10 a | 2.91 $\pm$ 0.80 a | 0.42 $\pm$ 0.01 a |
| <b>100</b>                 | 0.56 $\pm$ 0.07 a                          | 0.26 $\pm$ 0.03 a | 2.19 $\pm$ 0.13 a | 0.33 $\pm$ 0.03 a |
| <b>200</b>                 | 0.76 $\pm$ 0.10 a                          | 0.33 $\pm$ 0.03 a | 2.31 $\pm$ 0.09 a | 0.46 $\pm$ 0.02 a |
| <b>400</b>                 | 0.67 $\pm$ 0.08 a                          | 0.28 $\pm$ 0.02 a | 2.40 $\pm$ 0.20 a | 0.41 $\pm$ 0.02 a |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.24.** Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında klorofil-a, klorofil-b ve karotenoid içeriği

#### 4.2.1.2. Cd İçeriği

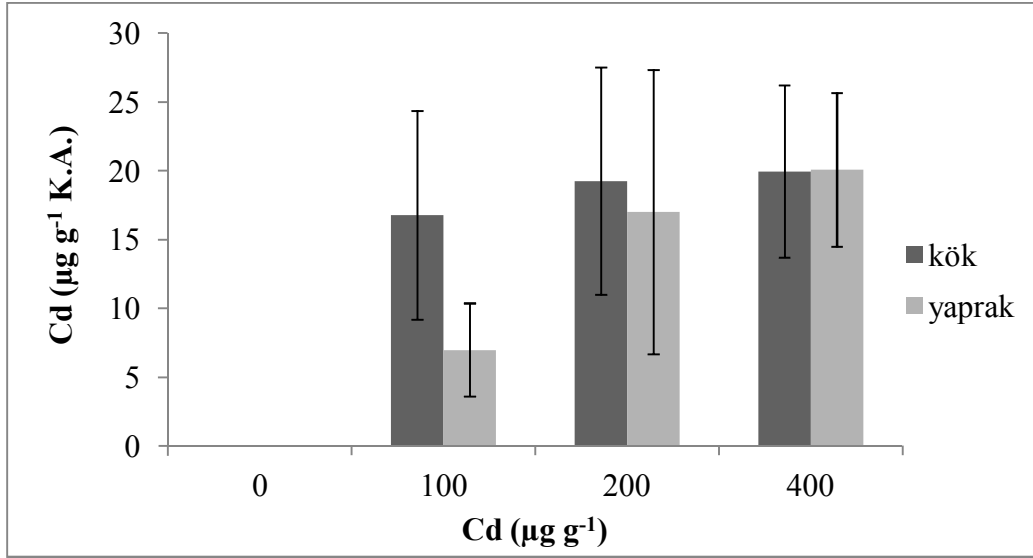
Farklı derişimlerde Cd uygulanan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* bitkisinin kök ve yapraklarında biriken Cd içeriği Çizelge 4.24 ve Şekil 4.25’de verilmiştir.

Kontrol grubu ile kadmiyum uygulanan gruplar karşılaştırıldığında kök ve yapraklardaki Cd miktarı kontrole göre belirgin bir artış göstermiştir ancak bu artış istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur.

**Çizelge 4.24.** Cd’nin farklı konsantrasyonlarının etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* kök ve yapraklarında Cd içeriği

| Derişim        | Cd ( $\mu\text{g g}^{-1}$ K.A.) |               |
|----------------|---------------------------------|---------------|
|                | Kök                             | Yaprak        |
| <b>Kontrol</b> | 0.00±0.00 a                     | 0.00±0.00 a   |
| <b>100</b>     | 16.78±7.58 a                    | 6.10±3.39 a   |
| <b>200</b>     | 19.26±8.27 a                    | 17.00±10.33 a |
| <b>400</b>     | 19.95±6.26 a                    | 20.07±5.59 a  |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.25.** Cd’nin farklı konsantrasyonlarının etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* kök ve yapraklarında Cd içeriği

#### 4.2.1.3. Lipit Peroksidasyonu

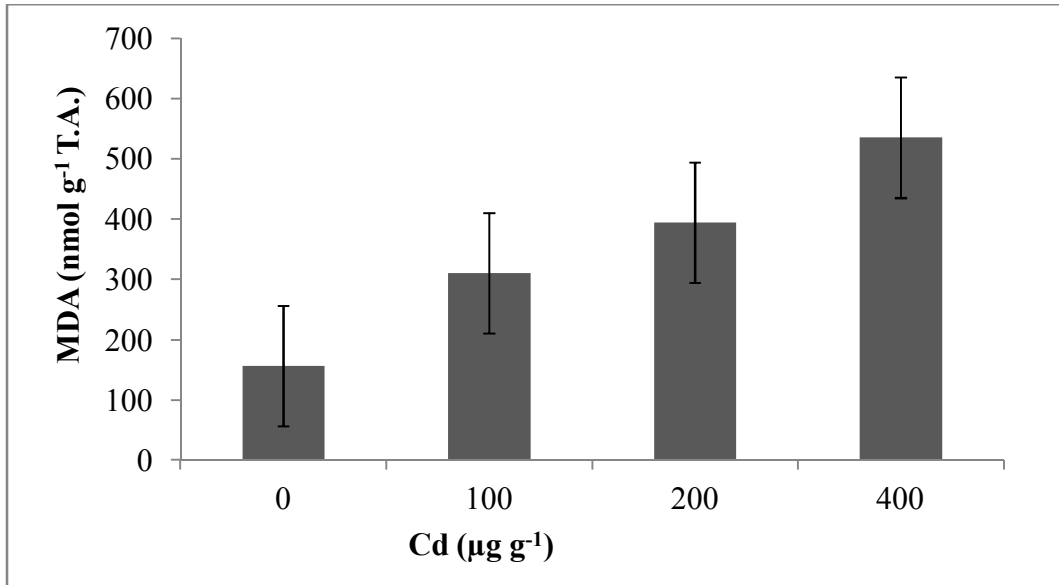
*Silene vulgaris* var. *vulgaris* bitkisine kadmiyum uygulanması sonucunda elde edilen lipit peroksidasyon sonuçları Çizelge 4.25 ve Şekil 4.26' de verilmiştir.

Kadmiyumun farklı derişimlerinin etkisinde lipit peroksidasyon miktarında kontrole göre belirgin bir artış görülmüştür ve bu artış istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Buna göre, *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarındaki lipit peroksidasyon miktarı 200 ve 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cd derişimlerinde önemli derecede artmıştır.

**Çizelge 4.25.** Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında lipit peroksidasyonu

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | MDA<br>( $\text{nmol g}^{-1}$ T.A.) |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Kontrol</b>                      | 156.32±10.74 b                      |
| <b>100</b>                          | 310.65±76.95 ab                     |
| <b>200</b>                          | 394.45±60.72 a                      |
| <b>400</b>                          | 535.19±21.81 a                      |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.26.** Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında lipit peroksidasyonu

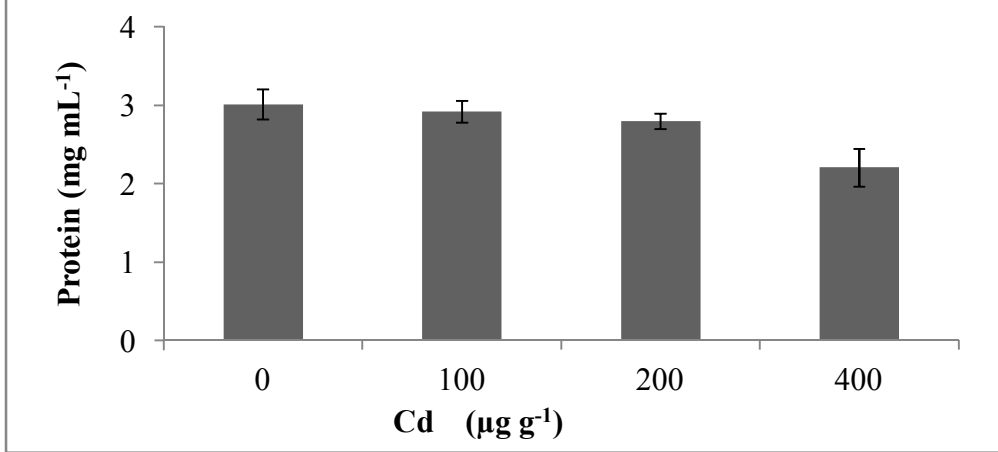
#### 4.2.1.4. Protein İçeriği

*Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında kadmiyum uygulaması sonucu protein miktarında kontrole göre bir azalma belirlenmiştir. Özellikle 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cd derişiminde önemli bir azalma görülmüştür (Çizelge 4.26, Şekil 4.27).

**Çizelge 4.26.** Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında protein içeriği

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | Protein<br>( $\text{mg mL}^{-1}$ ) |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| <b>Kontrol</b>                      | 3.01 $\pm$ 0.19 a                  |
| <b>100</b>                          | 2.93 $\pm$ 0.14 ab                 |
| <b>200</b>                          | 2.82 $\pm$ 0.10 ab                 |
| <b>400</b>                          | 2.27 $\pm$ 0.24 b                  |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.27.** Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında protein içeriği

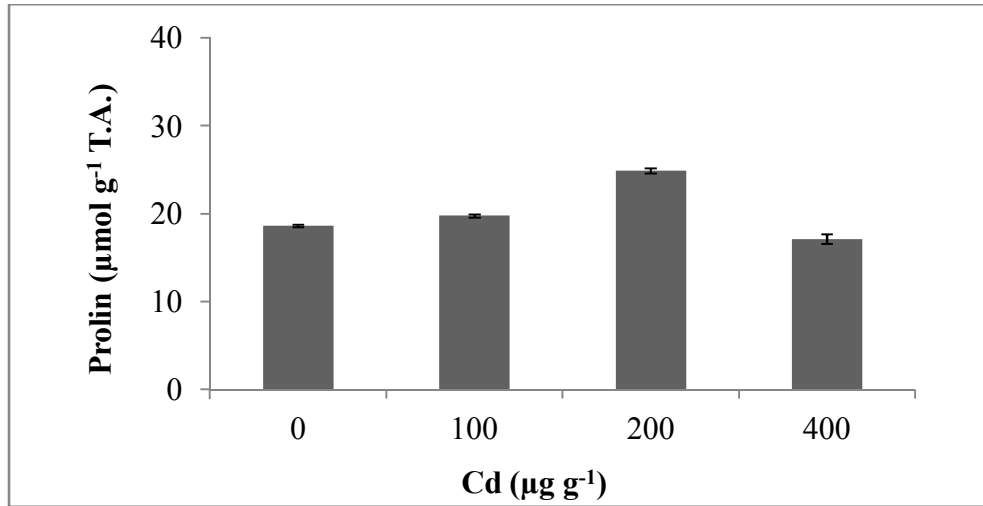
#### 4.2.1.5. Prolin İçeriği

*Silene vulgaris* var. *vulgaris* bitkisine farklı derişimlerde kadmiyum uygulaması sonucu prolin miktarındaki değişim Çizelge 4.27 ve Şekil 4.28’de görölmektedir. 200  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cd derişiminde kontrole göre istatistiki açıdan önemli bir artış görölmüştür.

**Çizelge 4.27.** Cd’nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında prolin içeriği

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | Prolin<br>( $\mu\text{mol g}^{-1}$ T.A.) |
|-------------------------------------|--|
| Kontrol                             | 18.64±0.15 bc                            |
| 100                                 | 19.76±0.19 b                             |
| 200                                 | 24.87±0.28 a                             |
| 400                                 | 17.13±0.56 c                             |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.28.** Cd’nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında prolin içeriği

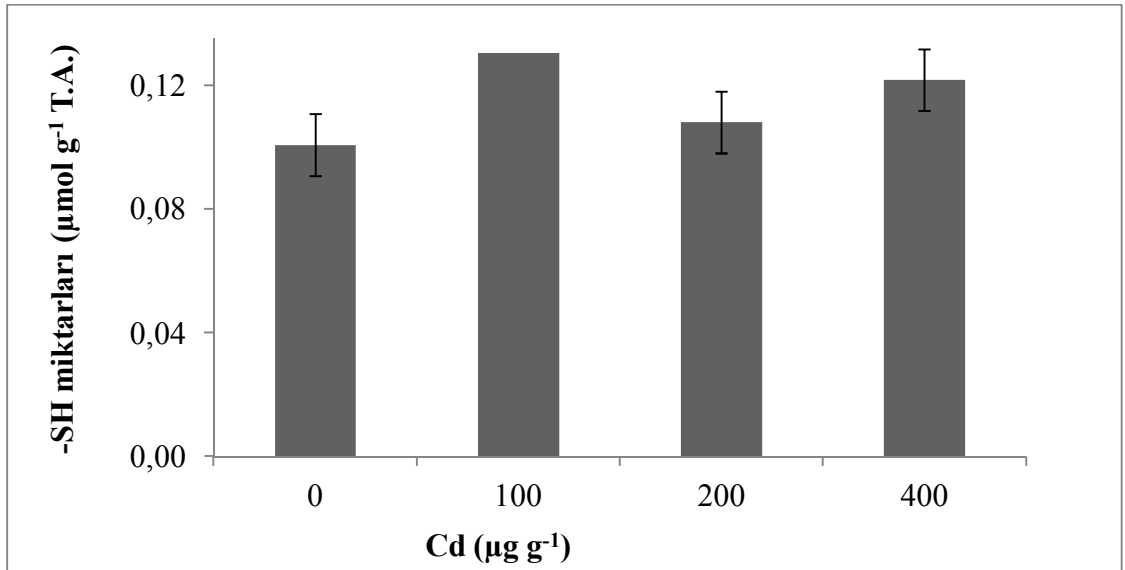
#### 4.2.1.6. Protein Olmayan –SH Grupları

*Silene vulgaris* var. *vulgaris* bitkisine uygulanan kadmiyumun –SH miktarında önemli bir değişikliğe sebep olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.28, Şekil 4.29).

**Çizelge 4.28.** Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında protein olmayan –SH grupları

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | -SH grup miktarı<br>( $\mu\text{mol g}^{-1}$ T.A.) |
|-------------------------------------|--|
| Kontrol                             | 0.10 $\pm$ 0.01 a                                  |
| 100                                 | 0.13 $\pm$ 0.00 a                                  |
| 200                                 | 0.11 $\pm$ 0.01 a                                  |
| 400                                 | 0.12 $\pm$ 0.01 a                                  |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.29.** Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında protein olmayan –SH grupları

#### 4.2.1.7. Askorbat

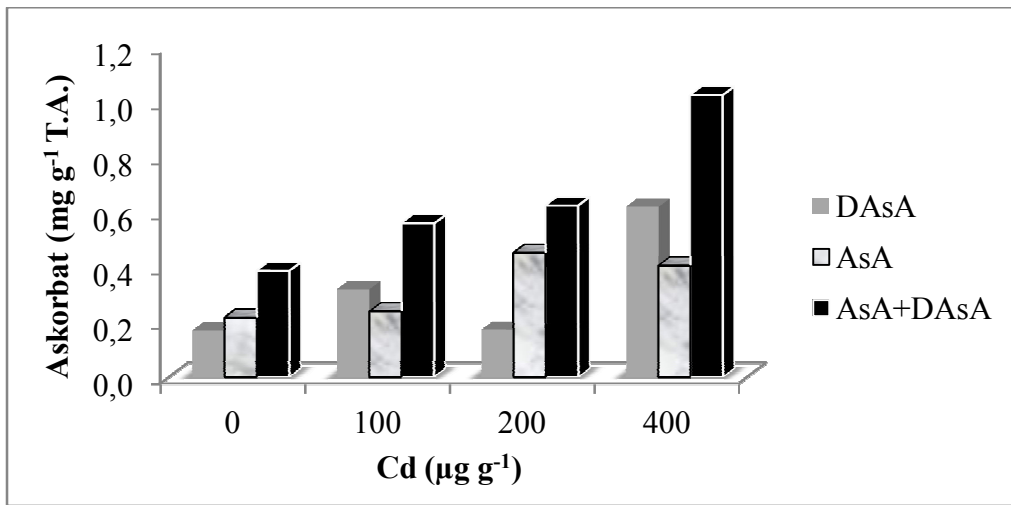
Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarındaki dehidroaskorbat (DAsA), askorbat (AsA) ve toplam askorbat (AsA+DAsA) miktarları Çizelge 4.29 ve Şekil 4.30'da verilmiştir.

Dehidroaskorbat miktarı kadmiyum uygulanan gruplarda 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cd derişiminde, askorbat ise 200 ve 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cd derişimlerinde önemli oranda artmıştır. Bununla birlikte, toplam askorbat miktarının kadmiyum derişime bağlı olarak önemli derecede arttığı, en fazla artışın 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cd derişiminde meydana geldiği görülmüştür.

**Çizelge 4.29.** Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* dehidroaskorbat (DAsA), askorbat(AsA) ve toplam askorbat (AsA+DAsA) içerikleri

| Derişim ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | ASKORBAT ( $\text{mg g}^{-1}$ T.A.) |              |              |
|----------------------------------|-------------------------------------|--------------|--------------|
|                                  | DAsA                                | AsA          | AsA+DAsA     |
| <b>Kontrol</b>                   | 0.17±0.05 a                         | 0.22±0.03 a  | 0.39±0.03 a  |
| <b>100</b>                       | 0.32±0.03 a                         | 0.24±0.03 a  | 0.56±0.00 ab |
| <b>200</b>                       | 0.17±0.03 a                         | 0.45±0.01 b  | 0.62±0.04 b  |
| <b>400</b>                       | 0.62±0.08 b                         | 0.40 ±0.01 b | 1.02±0.09 c  |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.30.** Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* dehidroaskorbat (DAsA), askorbat (AsA) ve toplam askorbat (AsA+DAsA) içerikleri



#### 4.2.1.8. Antioksidant Enzim Aktiviteleri

##### Katalaz Aktivitesi

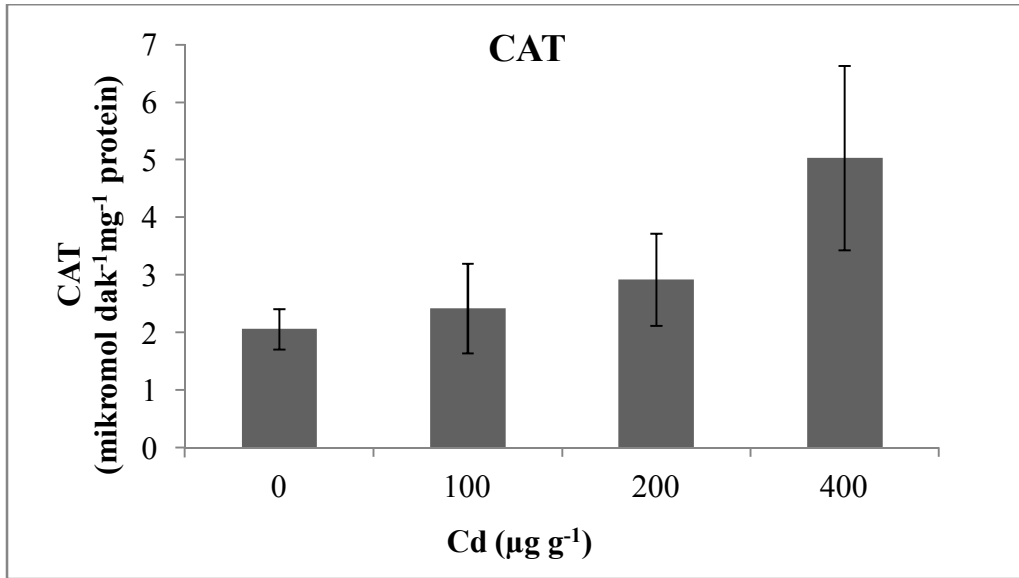
*Silene vulgaris* var. *vulgaris* bitkisine uygulanan kadmiyuma bağlı olarak CAT aktivitesinde meydana gelen değişiklikler Çizelge 4.30 ve Şekil 4.31’de verilmiştir.

Kadmiyum derişimindeki artışla orantılı olarak CAT aktivitesi artmış ancak bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

**Çizelge 4.30.** Cd’nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında CAT aktivitesi

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | CAT<br>(mikromol $\text{dak}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$ ) |
|-------------------------------------|--|
| <b>Kontrol</b>                      | 2.06±0.35 a  |
| <b>100</b>                          | 2.42±0.78 a  |
| <b>200</b>                          | 2.92±0.80 a  |
| <b>400</b>                          | 5.03±1.60 a  |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.31.** Cd’nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında CAT aktivitesi

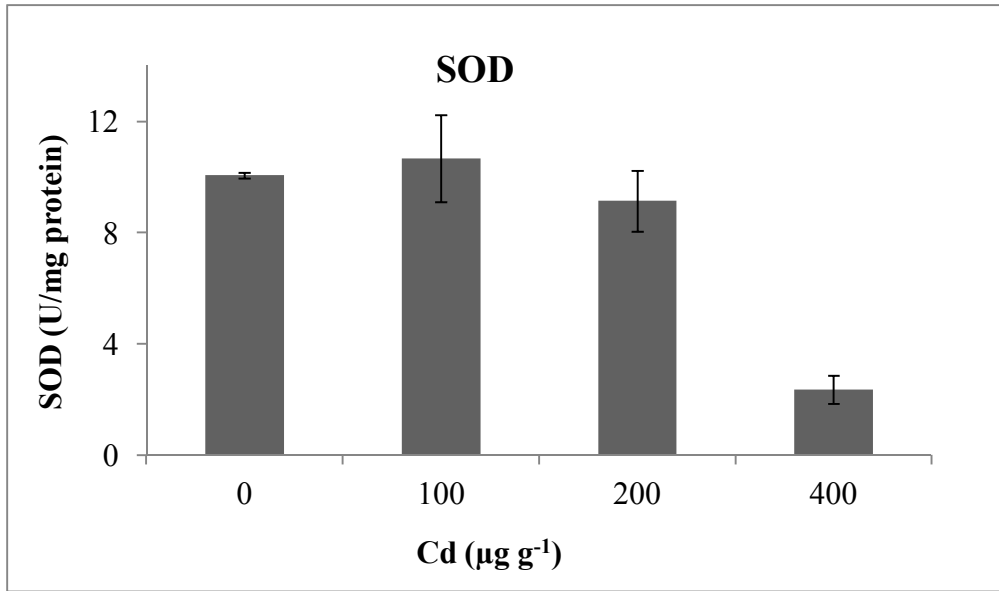
### Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

*Silene vulgaris* var. *vulgaris* bitkisine farklı derişimlerde kadmiyum uygulanması sonucu SOD aktivitesindeki değişiklikler Çizelge 4.31 ve Şekil 4.32’de verilmiştir. Artan kadmiyum derişimine bağlı olarak SOD aktivitesindeki en önemli azalma 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cd derişiminde görülmüştür.

**Çizelge 4.31.** Cd’nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında SOD aktivitesi

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | SOD<br>(U/mg protein) |
|-------------------------------------|-----------------------|
| Kontrol                             | 10.06 $\pm$ 0.10 a    |
| 100                                 | 10.67 $\pm$ 1.56 a    |
| 200                                 | 9.14 $\pm$ 1.10 a     |
| 400                                 | 2.36 $\pm$ 0.50 b     |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.32.** Cd’nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında SOD aktivitesi

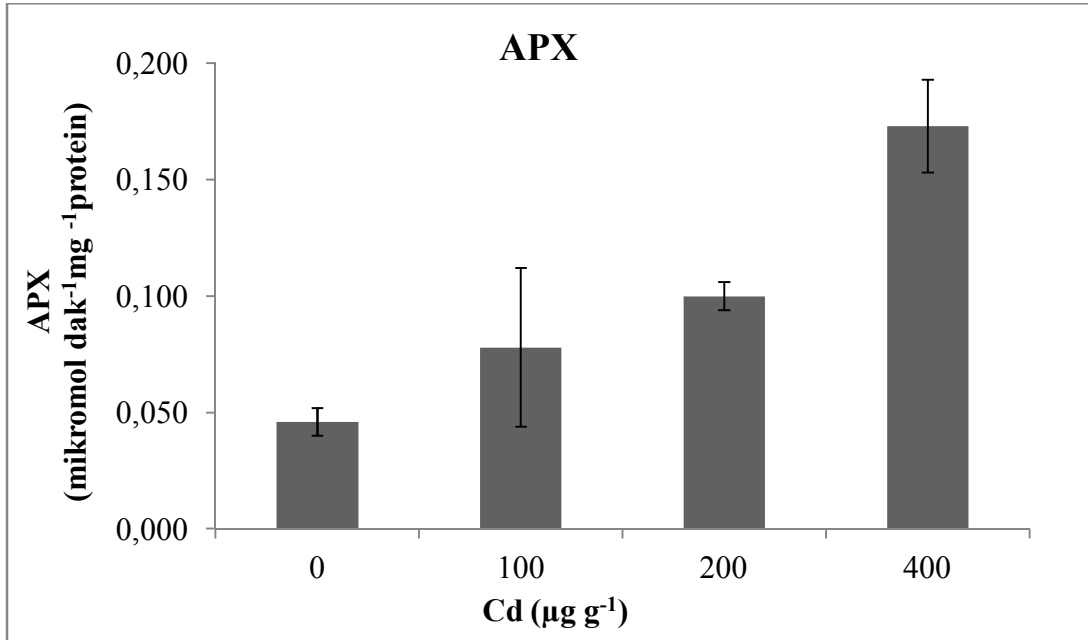
### Askorbat Peroksidaz Aktivitesi

*Silene vulgaris* var. *vulgaris* bitkisine kadmiyum uygulaması sonucunda APX aktivitesinde önemli bir artış görülmüştür ve kontrole göre en önemli artış 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cd derişiminde meydana gelmiştir (Çizelge 4.32, Şekil 4.33).

**Çizelge 4.32.** Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında APX aktivitesi

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | APX<br>(mikromol $\text{dak}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$ ) |
|-------------------------------------|--|
| Kontrol                             | 0.046 $\pm$ 0.006 a  |
| 100                                 | 0.078 $\pm$ 0.034 a  |
| 200                                 | 0.100 $\pm$ 0.006 ab   |
| 400                                 | 0.173 $\pm$ 0.020 b  |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.33.** Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında APX aktivitesi

### Guaiacol Peroksidaz Aktivitesi

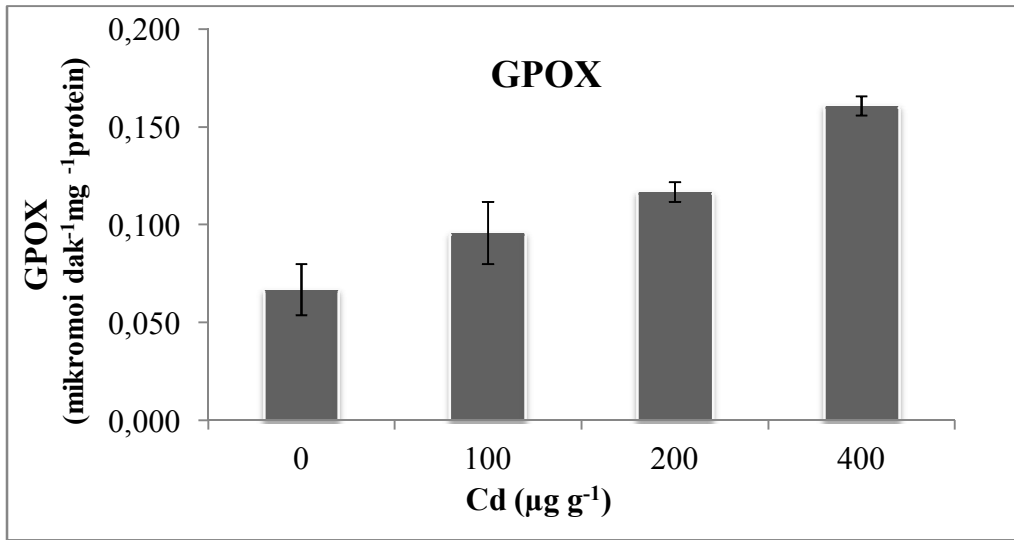
Kadmiyumun farklı derişimlerine maruz bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında GPOX aktivitesindeki değişimler Çizelge 4.33 ve Şekil 4.34'de verilmiştir.

GPOX aktivitesi ile Cd uygulaması arasında istatistiki olarak önemli bir artış bulunmuştur. Gruplar kendi içerisinde değerlendirildiğinde en önemli artışın 400 µg g<sup>-1</sup> Cd derişiminde görüldüğü belirlenmiştir.

**Çizelge 4.33.** Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında GPOX aktivitesi

| Derişim<br>(µg g <sup>-1</sup> ) | GPOX<br>(mikromol dak <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protein) |
|----------------------------------|---|
| <b>Kontrol</b>                   | 0.054±0.022 a   |
| <b>100</b>                       | 0.134 ±0.050 ab   |
| <b>200</b>                       | 0.149±0.026 ab  |
| <b>400</b>                       | 0.246 ±0.040 b  |

Değerler aritmetik ortalama ve ± standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir (p≤0.05).



**Şekil 4.34.** Cd'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında GPOX aktivitesi

## 4.2.2. Bakırın Etkieri

### 4.2.2.1. Pigment İçeriği

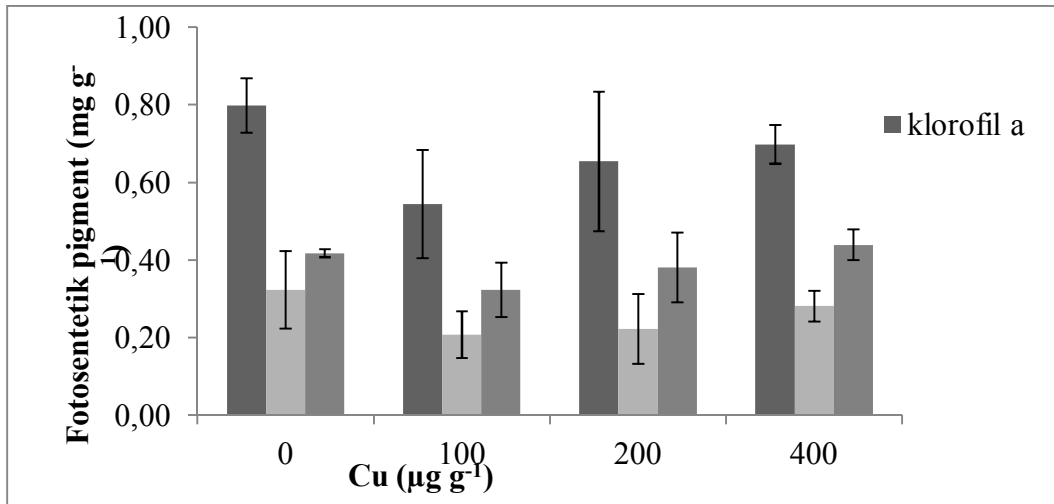
*Silene vulgaris* var. *vulgaris* bitkisine bakır uygulanması sonucunda elde edilen klorofil a, klorofil b, klorofil a/b ve karotenoid sonuçları Çizelge 4.34 Şekil 4.35’de verilmiştir.

Çizelge 4.34’de görüldüğü gibi bakır uygulanan deney grubunda konsantrasyon artışına bağlı olarak kl-a, kl-b ve kl a/b miktarında bir azalma görülmüştür. Ancak bakırın klorofil a, klorofil b, klorofil a/b ve karotenoid miktarı üzerindeki etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir.

**Çizelge 4.34.** Cu’nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında klorofil-a, klorofil-b, kla/klb ve karotenoid içeriği

| Cu( $\mu\text{g g}^{-1}$ )<br>Derişim | Klorofil ( $\text{mg g}^{-1}\text{T.A.}$ ) |                   |                   |                   |
|---------------------------------------|--|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                       | Kl-a                                       | Kl-b              | Kla/b             | Karotenoid        |
| <b>Kontrol</b>                        | 0.80 $\pm$ 0.07 a                          | 0.32 $\pm$ 0.10 a | 2.91 $\pm$ 0.80 a | 0.42 $\pm$ 0.01 a |
| <b>100</b>                            | 0.54 $\pm$ 0.14 a                          | 0.21 $\pm$ 0.06 a | 2.81 $\pm$ 0.28 a | 0.32 $\pm$ 0.07 a |
| <b>200</b>                            | 0.65 $\pm$ 0.18 a                          | 0.22 $\pm$ 0.09 a | 2.26 $\pm$ 0.41 a | 0.38 $\pm$ 0.09 a |
| <b>400</b>                            | 0.70 $\pm$ 0.05 a                          | 0.28 $\pm$ 0.04 a | 2.61 $\pm$ 0.49 a | 0.44 $\pm$ 0.04 a |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.35.** Cu’nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında klorofil-a, klorofil-b ve karotenoid içeriği

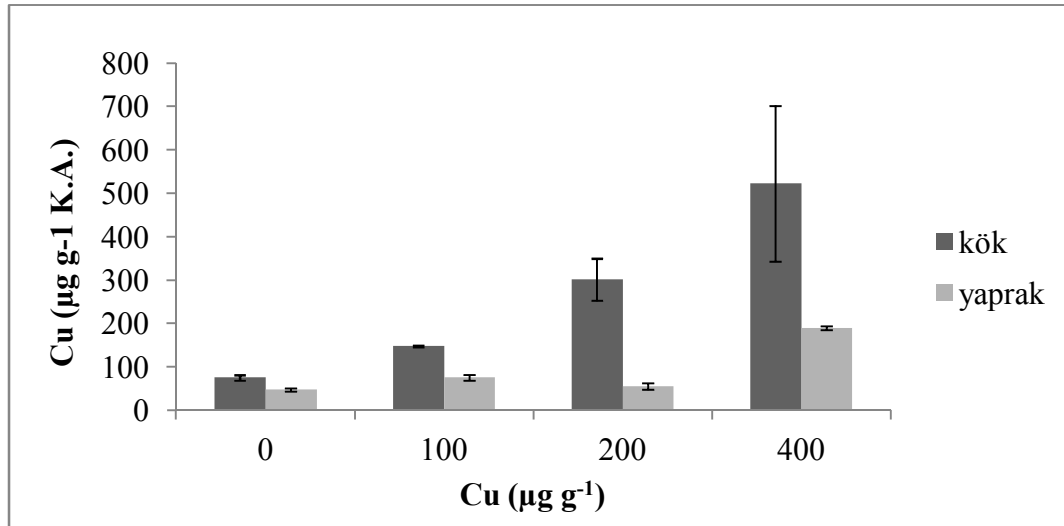
#### 4.2.2.2. Cu İçeriği

*Silene vulgaris* var. *vulgaris* bitkisine farklı derişimlerde bakır uygulaması sonucu kök ve yaprakta önemli oranda bakır biriktiği belirlenmiştir. Bakır uygulanan gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kökteki bakır miktarının önemli oranda arttığı ve en önemli artışın 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cu derişiminde olduğu görülmüştür. Yapraklarda ise 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cu uygulaması sonucu kontrol grubunun 4 katı kadar fazla bakır birikmiştir (Çizelge 4.35, Şekil 4.36).

**Çizelge 4.35.** Cu'nun farklı konsantrasyonlarının etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* kök ve yapraklarında Cu içeriği

| Derişim        | Cu ( $\mu\text{g g}^{-1}$ K.A.) |               |
|----------------|---------------------------------|---------------|
|                | Kök                             | Yaprak        |
| <b>Kontrol</b> | 75.76±5.98 a                    | 47.85±3.40 a  |
| <b>100</b>     | 148.11±1.79 ab                  | 75.67±6.36 b  |
| <b>200</b>     | 301.50±48.59 ab                 | 55.61±7.28 ab |
| <b>400</b>     | 522.73±179.58 b                 | 190.09±4.75 c |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.36.** Cu'nun farklı konsantrasyonlarının etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* kök ve yapraklarında Cu içeriği

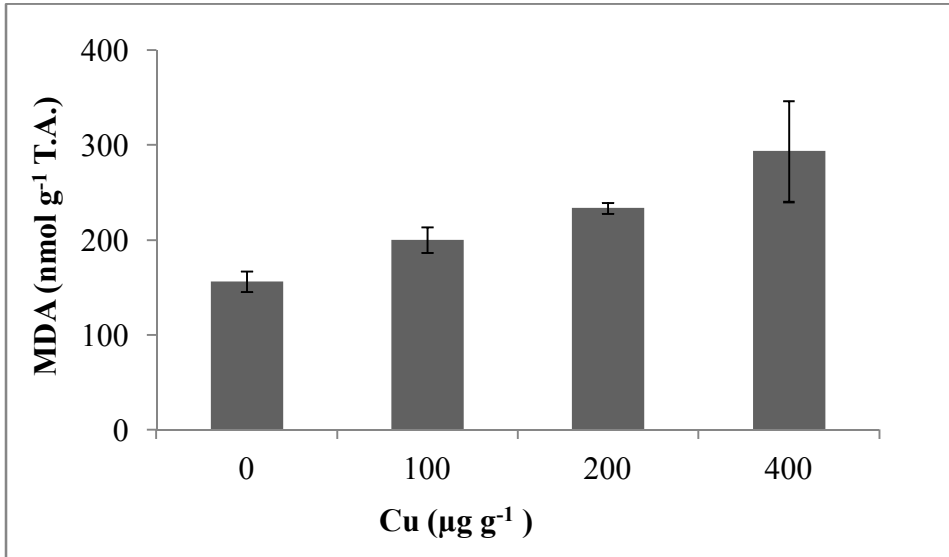
#### 4.2.2.3. Lipit Peroksidasyonu

*Silene vulgaris* var. *vulgaris* bitkisinde bakır derişiminin artışına bağı olarak yapraklardaki lipit peroksidasyonunda önemli bir artış görülmüştür. En önemli artışın 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cu derişiminde gerçekleştiğı belirlenmiştir (Çizelge 4.36, Şekil 4.37).

**Çizelge 4.36.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında lipit peroksidasyonu

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | MDA<br>( $\text{nmol g}^{-1}$ T.A.) |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Kontrol                             | 156.32±10.74 b                      |
| 100                                 | 200.39±13.49 ab                     |
| 200                                 | 233.79±5.77 ab                      |
| 400                                 | 293.65±53.18 a                      |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.37.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında lipit peroksidasyonu

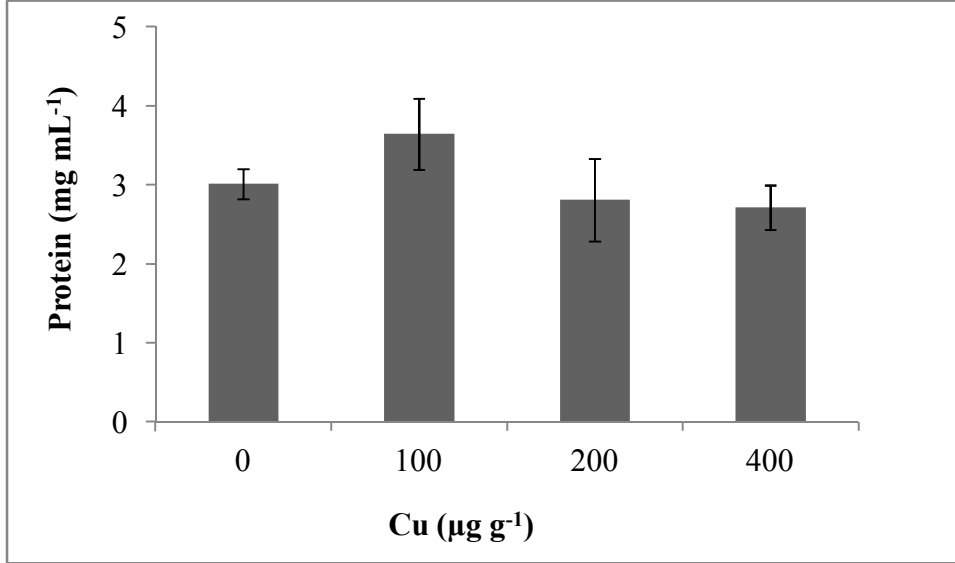
#### 4.2.2.4. Protein İçeriği

*Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında bakır uygulaması protein içeriğinde istatistiki olarak önemli bir değişime neden olmamıştır (Çizelge 4.37, Şekil 4.38).

**Çizelge 4.37.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında protein içeriği

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | Protein<br>( $\text{mg mL}^{-1}$ ) |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| <b>Kontrol</b>                      | 3.01 $\pm$ 0.19 a                  |
| <b>100</b>                          | 3.64 $\pm$ 0.45 a                  |
| <b>200</b>                          | 2.81 $\pm$ 0.52 a                  |
| <b>400</b>                          | 2.72 $\pm$ 0.28 a                  |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.38.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında protein içeriği



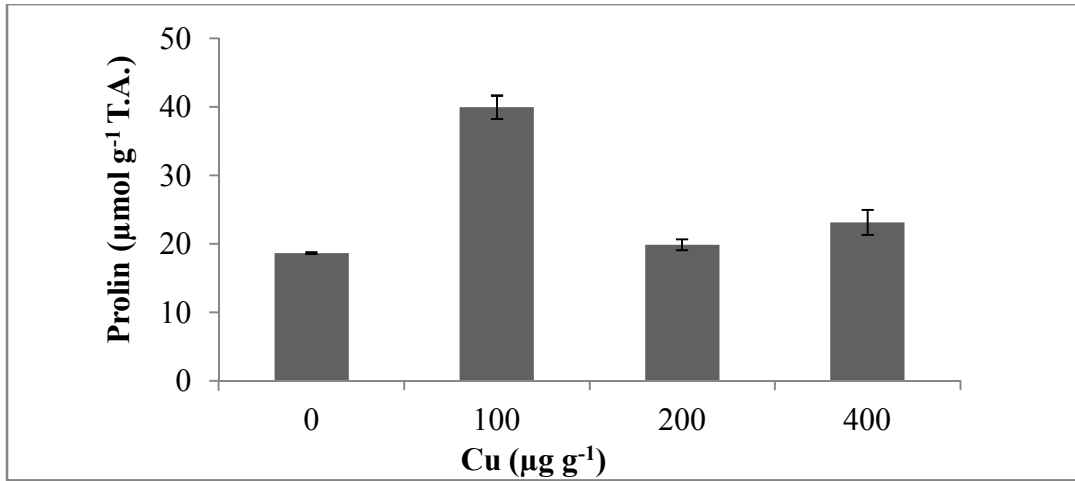
#### 4.2.2.5. Prolin İçeriği

Bakır uygulanan gruplar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında prolin miktarının  $100 \mu\text{g g}^{-1}$  Cu derişiminde önemli bir artış gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.38., Şekil 4.39).

**Çizelge 4.38.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında prolin içeriği

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | Prolin<br>( $\mu\text{mol g}^{-1}$ T.A.) |
|-------------------------------------|--|
| Kontrol                             | 18.64±0.15 b                             |
| 100                                 | 39.91±1.72 a                             |
| 200                                 | 19.88±0.81 b                             |
| 400                                 | 23.14±1.82 b                             |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.39.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında prolin içeriği

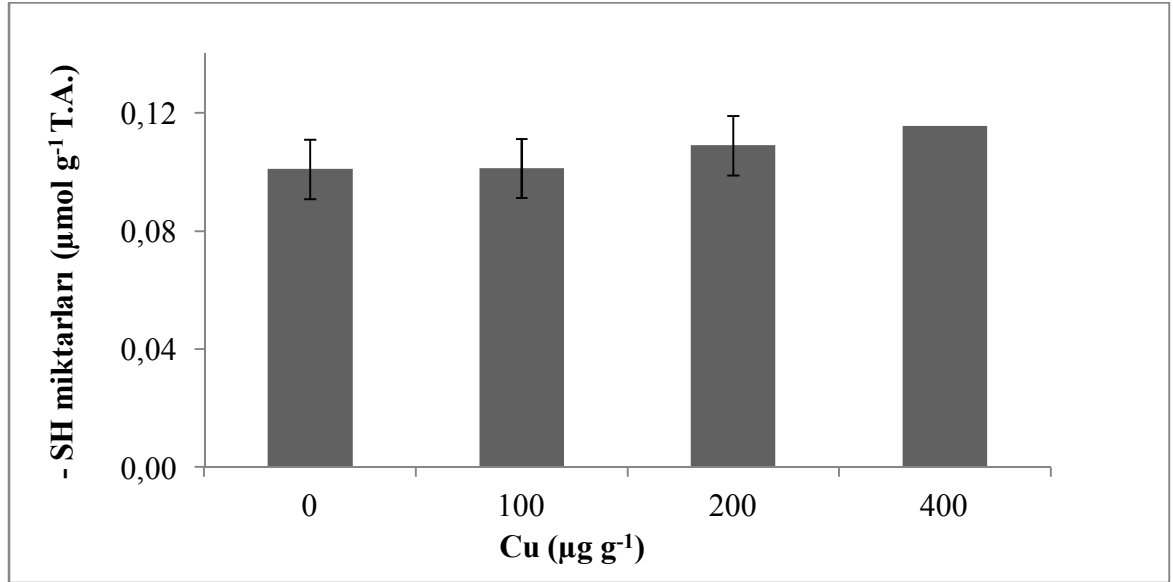
#### 4.2.2.6. Protein Olmayan –SH Grupları

*Silene vulgaris* var. *vulgaris* bitkisine uygulanan bakır derişimindeki artışa göre –SH miktarında önemli bir artış gözlenmemiştir (Çizelge 4.39, Şekil 4.40).

**Çizelge 4.39.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında protein olmayan –SH grupları

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | -SH grup miktarı<br>( $\mu\text{mol g}^{-1}$ T.A.) |
|-------------------------------------|--|
| Kontrol                             | 0.10±0.01 a  |
| 100                                 | 0.10±0.01 a  |
| 200                                 | 0.11±0.01 a  |
| 400                                 | 0.12±0.00 a  |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.40.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında protein olmayan –SH grupları

#### 4.2.2.7. Askorbat

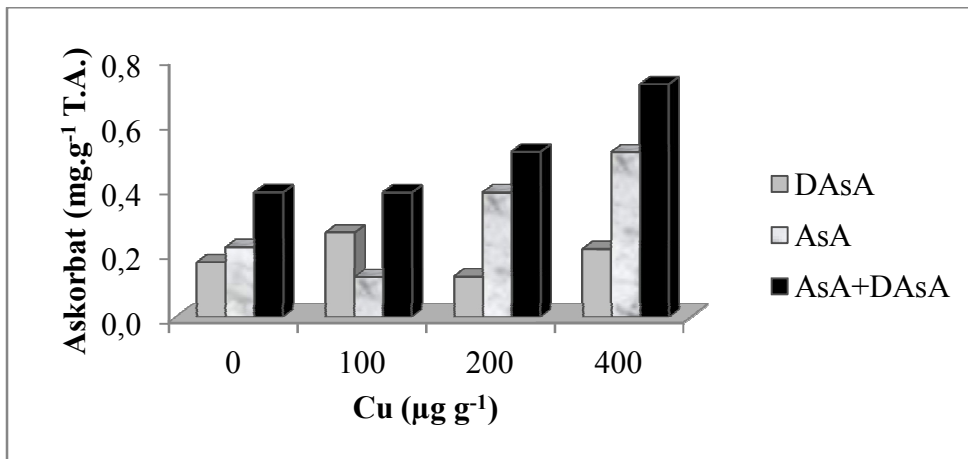
Bakırın farklı derişimlerine maruz bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarındaki dehidroaskorbat (DAsA), askorbat(AsA) ve toplam askorbat (AsA+DAsA) miktarları Çizelge 4.40 ve Şekil 4.41’de verilmiştir.

Dehidroaskorbat miktarı bakır uygulanan gruplarda önemli bir artış göstermemiştir. Bununla birlikte, askorbat ve toplam askorbat miktarının bakır derişime bağılı olarak önemli ölçüde arttığı, en fazla artışın 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cu derişiminde meydana geldiği görülmüştür.

**Çizelge 4.40.** Cu’nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* dehidroaskorbat (DAsA), askorbat (AsA) ve toplam askorbat (AsA+DAsA) içerikleri

| Derişim ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | ASKORBAT ( $\text{mg g}^{-1}$ T.A.) |              |              |
|----------------------------------|-------------------------------------|--------------|--------------|
|                                  | DAsA                                | AsA          | AsA+DAsA     |
| <b>Kontrol</b>                   | 0.17±0.05 a                         | 0.22±0.03 ab | 0.39±0.02 a  |
| <b>100</b>                       | 0.27±0.08 a                         | 0.12±0.00 b  | 0.39±0.08 a  |
| <b>200</b>                       | 0.13±0.05 a                         | 0.39±0.08 bc | 0.52±0.03 ab |
| <b>400</b>                       | 0.21±0.02 a                         | 0.51±0.01 c  | 0.72±0.02 b  |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.41.** Cu’nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* dehidroaskorbat (DAsA), askorbat(AsA) ve toplam askorbat (AsA+DAsA) içerikleri

#### 4.2.2.8. Antioksidant Enzim Aktiviteleri

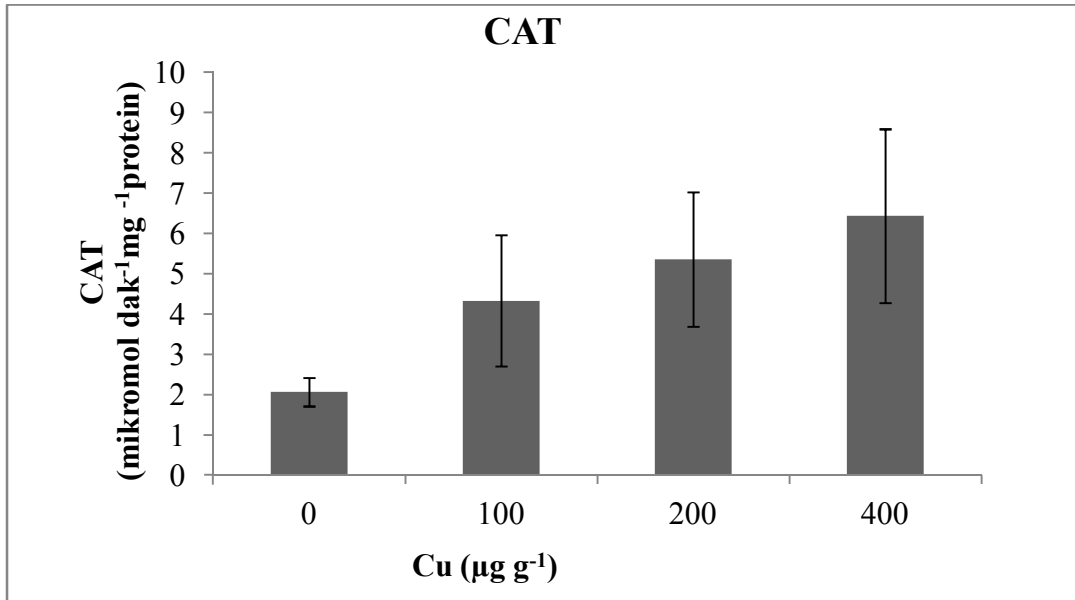
##### Katalaz Aktivitesi

Bakır uygulanan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* bitkisinde bakır derişimine bağlı olarak CAT aktivitesinde bir artış meydana gelmiş ancak bu artış istatistiki açıdan önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.41, Şekil 4.42).

**Çizelge 4.41.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında CAT aktivitesi

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | CAT<br>(mikromol $\text{dak}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$ ) |
|-------------------------------------|--|
| Kontrol                             | 2.06±0.35 a  |
| 100                                 | 4.33±1.63 a  |
| 200                                 | 5.36±1.67 a  |
| 400                                 | 6.43±2.16 a  |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.42.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında CAT aktivitesi

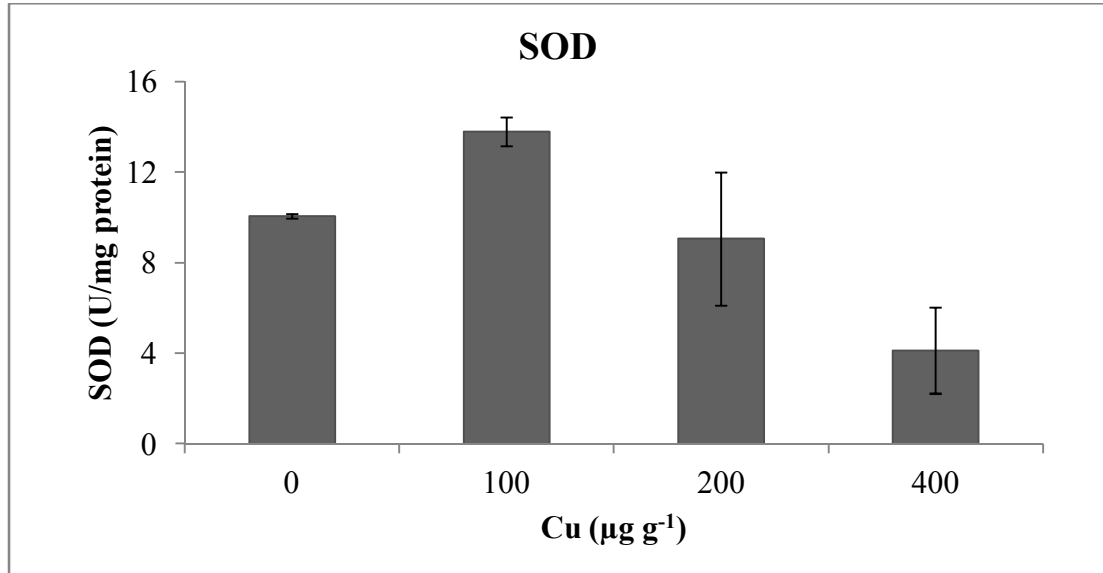
### Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

*Silene vulgaris* var. *vulgaris* bitkisinde bakır derişiminin artışına bağı olarak yapraklardaki SOD aktivitesinde önemli bir azalma görülmüştür. Gruplar kontrole göre değerlendirildiğinde, en önemli azalmanın 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cu derişiminde gerçekleştiği belirlenmiştir (Çizelge 4.42, Şekil 4.43).

**Çizelge 4.42.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında SOD aktivitesi

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | SOD<br>(U/mg protein) |
|-------------------------------------|-----------------------|
| <b>Kontrol</b>                      | 10.06 $\pm$ 0.10 ab   |
| <b>100</b>                          | 13.79 $\pm$ 0.64 b    |
| <b>200</b>                          | 9.06 $\pm$ 2.94 ab    |
| <b>400</b>                          | 4.13 $\pm$ 1.90 a     |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.43.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında SOD aktivitesi

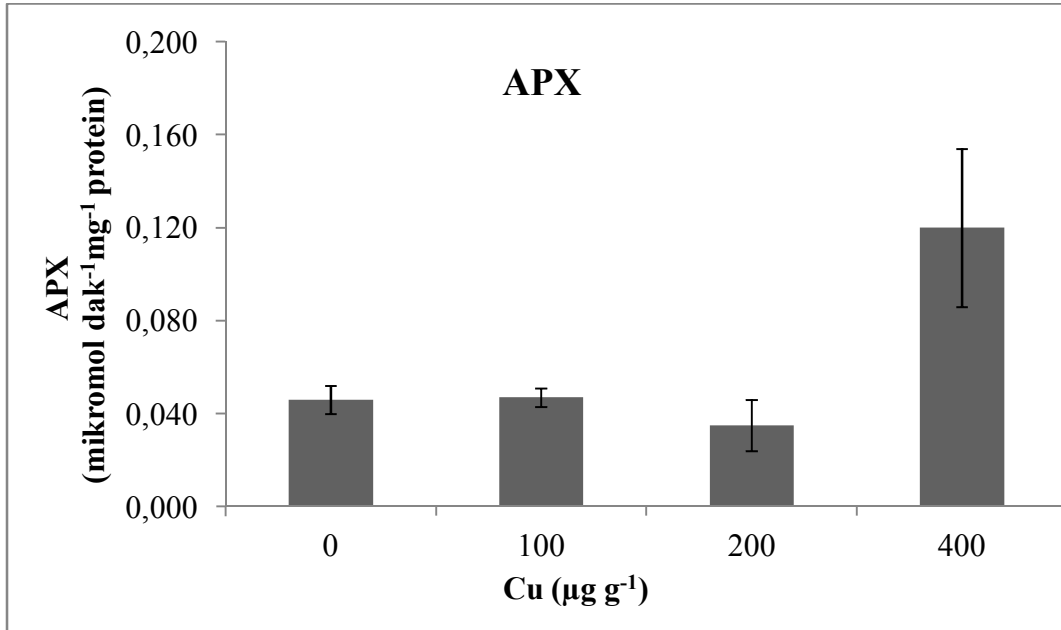
### Askorbat Peroksidaz Aktivitesi

Bakır uygulamasına bağlı olarak APX aktivitesinde meydana gelen değişiklikler önemli bulunmuştur. En önemli artış 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cu derişiminde görülmüştür (Çizelge 4.43, Şekil 4.44).

**Çizelge 4.43.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında APX aktivitesi

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | APX<br>(mikromol $\text{dak}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$ ) |
|-------------------------------------|--|
| Kontrol                             | 0.046 $\pm$ 0.006 ab   |
| 100                                 | 0.047 $\pm$ 0.004 ab   |
| 200                                 | 0.035 $\pm$ 0.011 a  |
| 400                                 | 0.120 $\pm$ 0.034 b  |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).



**Şekil 4.44.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında APX aktivitesi

### Guaiacol Peroksidaz Aktivitesi

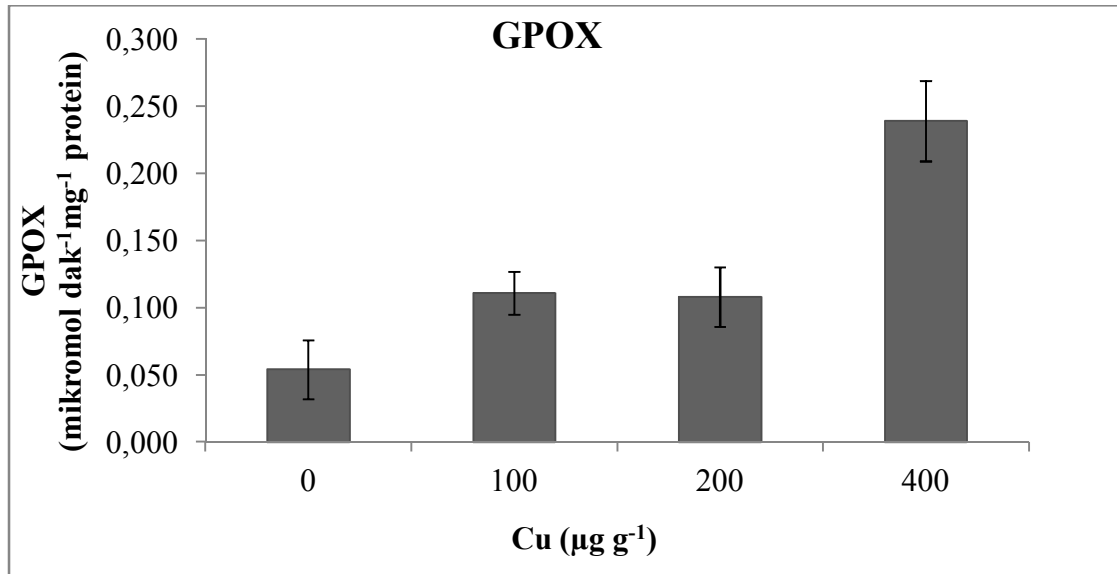
Bakırın farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında GPOX aktivitesi değişimleri ve istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 4.45 ve Şekil 4.46'de verilmiştir.

GPOX aktivitesi, Cu derişimindeki artışa paralel olarak önemli oranda artmıştır. Bakır uygulanan gruplar içerisinde en önemli artış 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cu uygulaması sonucu meydana gelmiştir.

**Çizelge 4.44.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında GPOX aktivitesi

| Derişim<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | GPOX<br>(mikromol $\text{dak}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$ ) |
|-------------------------------------|---|
| <b>Kontrol</b>                      | 0.054±0.022 a   |
| <b>100</b>                          | 0.111±0.016 a   |
| <b>200</b>                          | 0.108±0.022 a   |
| <b>400</b>                          | 0.239±0.030 b   |

Değerler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Aynı sütunda aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ( $p \leq 0.05$ ).

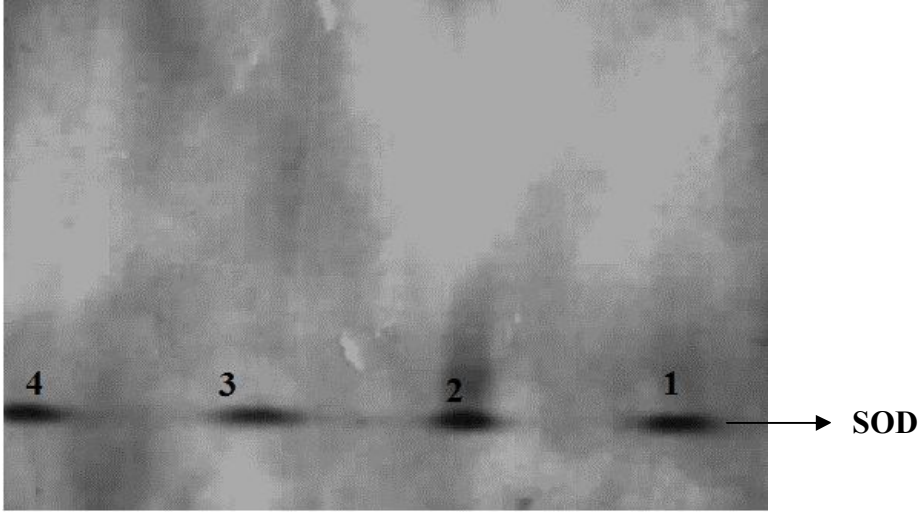


**Şekil 4.45.** Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında GPOX aktivitesi

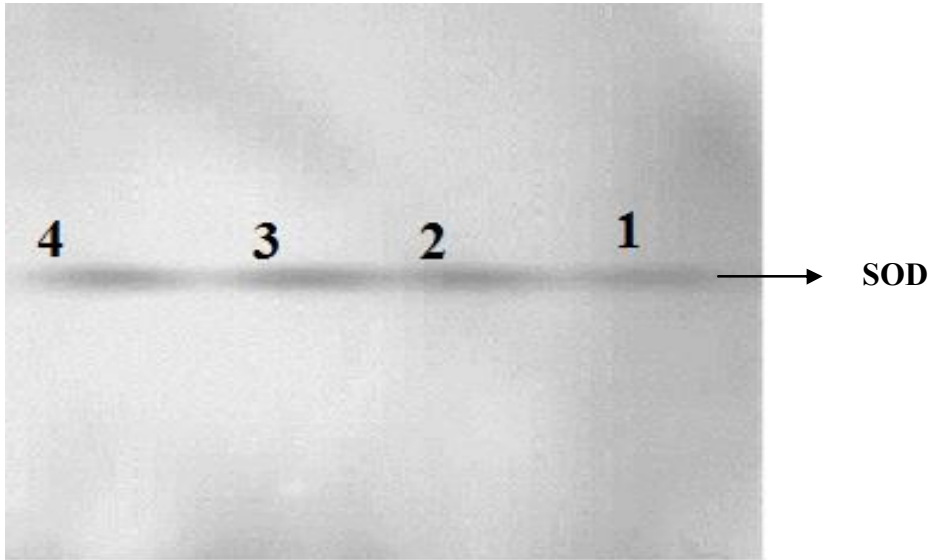
#### 4.2.3. Native Page Yöntemiyle SOD İzoenzimlerinin Belirlenmesi

*Silene vulgaris* var. *vulgaris*'e kadmiyum ve bakır uygulanması sonucunda SOD izoenzimlerinin elektroforetik bant desenleri Şekil 4.46'da verilmiştir. Her iki uygulama sonucunda da yalnızca bir bant gözlenmiştir.

A)



B)



**Şekil 4.46.** A) Cd ve B)Cu'nun farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında SOD izoenzimleri (1) kontrol (2)  $100 \mu\text{g g}^{-1}$  (3)  $200\mu\text{g g}^{-1}$  (4)  $400 \mu\text{g g}^{-1}$



## 5. TARTIŞMA

Çevremizdeki başlıca kirleticiler arasında olan ağır metaller ciddi bir şekilde bitkilerde büyümeyi sınırlamaktadır. Bugünlerde, çevresel kirlilikle beraber ağır metallere maruz kalma dünyanın her tarafında büyüyen bir problem haline gelmektedir (Ahsan ve ark., 2007). Aşırı miktarda metal iyonlarının alınması birçok bitki için toksiktir. Metal iyonlarının hücrelere olan biyokimyasal etkisi onların kimyasal yapısı kadar metal çeşidine de bağlıdır (Sharma ve Dietz, 2006).

Bitkiler üzerinde ağır metallerin olumsuz etkileri özellikle kloroplast pigmentlerine, membranlara ve nükleik asitlere zarar veren reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumundaki artıştır. Bu artış, dokulardaki büyümenin ve fotosentetik aktivitenin azalmasına neden olarak bitki verimliliğini olumsuz yönde etkilemektedir (Maksymiec ve ark., 2007)

Kadmiyum ve bakıra maruz bırakılan bitkilerde genellikle büyümede azalma gözlenirken, bu toksik kirleticiler bitki hücrelerinde birçok değişikliğe neden olabilir (Chaoui ve El Ferjani, 2005).

Bu araştırmada *Brassica oleracea* var. *acephala* ve *Silene vulgaris* var. *vulgaris*'in büyüme ortamına verilen bakır ve kadmiyumun etkisinde bırakılmasıyla bitkiye olan etkisi yapraklardaki pigment ve protein içeriği, bitkiye verilen bakır ve kadmiyumun kök ve yapraklardaki birikimi, lipit peroksidasyonu, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidantlarla araştırılmıştır.

### 5.1. Pigment İçeriği

Klorofil ve karotenoidler hemen hemen tüm bitki sisteminin enerji merkezidir ve içeriklerindeki önemli bir değişiklik bir bitkinin tüm metabolizmasında belirgin bir etkiye neden olabilir (Agrawal ve Mishra, 2009). Farklı metallere maruz bırakılan bitkilerde klorofillerin bozulması kaçınılmazdır ve bu durum metal toksisitesine verilen ilk tepkilerden biridir (Monteiro ve ark., 2009).

Araştırmamızda *Brassica oleracea* var. *acephala* bitkisine bakır ve kadmiyum uygulaması yapraklardaki klorofil a, klorofil b ve karotenoid içeriklerinde belirgin bir değişikliğe neden olmamıştır.

Aynı şekilde, bakır ve kadmiyum uygulaması *Silene vulgaris* var. *vulgaris*'in klorofil a, klorofil b ve karotenoid içeriğinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Xu ve ark. (2008) *Allium sativum*'a farklı derişimlerde kadmiyum uygulamışlardır ve kadmiyumun pigment içeriğinde önemli bir etkiye neden olmadığını rapor etmişlerdir.

Araştırmamız sonucunda, uygulanan metallerin pigment içeriğinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir. Kadmiyum ve bakır stresinin klorofil biyosentezi üzerinde herhangi bir toksik etkiye neden olmadığı ya da bu cevabın bitki türüne ve metal çeşidine ve derişimine bağlı olarak değişebildiği sonucuna varılabilir. Bununla birlikte, toleranslı bitkilerde klorofil içeriğinin arttığı ya da uygulanan metale bağlı olarak önemli şekilde değişmediği belirlenmiştir (Borghi ve ark., 2008).

## 5.2. Cd ve Cu İçeriği

Bitki kısımlarının metal içeriklerinin farklı olması bitkinin toksisiteden kaçınmak için kullandığı yaygın bir stratejidir. Kökler ağır metallerin bitkinin üst kısımlara taşınmasını engelleyen bir bariyer gibi davranır (Tanyolaç ve ark., 2007). Kadmiyum stresine karşı ilk bariyer köklerde meydana gelir ve kadmiyum hücre duvarındaki bileşikler ve ekstrasellüler karbohidratlara bağlandığı için taşınmaz (Sanita di Toppi ve Gabrielli, 1999).

Brassicaceae familyası birçok metali biriktirebilen türleri içermektedir. *Brassica juncea* Cd, Cu, Ni, Zn, Pb ve Sn gibi metalleri yüksek oranda alıp biriktirebilmektedir. Ayrıca, *Brassica oleracea*'da yüksek oranda ağır metal biriktirebilmektedir (Kabata-Pendias, 2001; Gisbert ve ark., 2006). Kadmiyumun köklerle alınımı oldukça hızlıyken, sürgünlere taşınması oldukça yavaştır (Sanita di Toppi ve Gabrielli, 1999). Bu araştırmada *Brassica oleracea* var. *acephala*'da kadmiyum köklerde yüksek oranda birikmiştir. En fazla birikim  $400 \mu\text{g g}^{-1}$  Cd derişiminde görülmüştür. Bu bulgular kadmiyumun büyük bir kısmının köklerde taşınmadan kaldığını ve küçük miktarlarda sürgün ve yapraklara taşındığını göstermektedir. Bunun sonucunda bu bitkinin kadmiyuma karşı toleranslı olduğunu söyleyebiliriz.

*Lactuca sativa* ile yapılan bir çalışmada kadmiyum birikiminin köklerde daha fazla olduğu ve bu birikimin 100 µM Cd derişiminde 980 µg g<sup>-1</sup> K.A. ulaştığı görülmüştür (Costa ve Morel, 1994).

*Silene vulgaris* var. *vulgaris* bitkisinde kök ve yapraklardaki kadmiyum birikim sonuçları birbirine çok yakındır. Bununla birlikte, uygulanan derişimlere bağı olarak kadmiyum birikiminde bir artış belirlenmiştir.

Bitkiler içerisindeki bakırın dağılımı oldukça değışkendir. Bakırın toprak kolloidlerine ve diğer organik maddelere güçlü bir şekilde bağlanması taşınmasını büyük oranda kısıtlamaktadır. Bitkiler tarafından absorbe edilen bakırın büyük bir kısmı kökte taşınmadan kalırken, yapraklarda yaşlanana kadar kalır (Kabata- Pendias ve Pendias, 2001). Bulgularımıza göre, her iki bitki türünde de köklerdeki bakır birikimi yapraklara oranla fazladır. Kök ve yapraklardaki bakır birikimi uygulanan derişimlere bağı olarak artış göstermiştir. Benzer sonuçlar *Brassica juncea* (Singh ve ark., 2010), *Rumex dentatus* (Liu ve ark., 2004) , *Salix* (Landberg ve Greger, 1996), *Carthamus tinctorius* (Ahmed ve ark., 2010) bitkileri için de elde edilmiştir. Ayrıca, *Silene vulgaris*'in bakır tolerant bir bitki olduğu da kesin şekilde bilinmektedir (Song ve ark., 2004).

Bu araştırmanın bir sonucu olarak, *Brassica oleracea* var. *acephala* ve *Silene vulgaris* var. *vulgaris*'in de bakıra karşı toleranslı olduğu öne sürülebilir. Bizim araştırmamızın sonucu da literatür bilgileri ile uyum içerisinde.

### 5.3. Lipit Peroksidasyonu

MDA lipit peroksidasyonunun sitotoksik bir ürünüdür ve oksidatif stresin bir sonucu olan lipit peroksidasyonunun ölçülmesinde indikatör olarak kullanılmaktadır (Monteiro ve ark., 2009).

Lipit peroksidasyonu ROT seviyesiyle ilişkilidir. Redoks aktif olan bakır ve redoks aktif olmayan kadmiyumun ROT oluşumu yoluyla bitkilerde lipit peroksidasyonunu arttırdığı belirlenmiştir (Chaoui ve ark., 1997). Aşırı miktarda bakır ve kadmiyumun lipit peroksidasyonu ve oksidatif hasara neden olduğu bilinmektedir (Dixit ve ark., 2001).

Bitki hücre membranları metal yaralanmalarının başlıca alanlarıdır. Membran hasarı lipoksigenaz enzimiyle ya da reaktif oksijen türleri tarafından başlatılan lipit peroksidasyonu yoluyla başarılmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1984). Araştırma bulgularımıza göre, bakır ve kadmiyuma maruz bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* ve *Silene vulgaris* var. *vulgaris* bitkilerinde lipit peroksidasyonunda derişime bağılı olarak önemli bir artış meydana gelmiştir. Bu artış özellikle 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cd ve Cu derişimlerinde görülmüştür.

Literatürde kadmiyum uygulaması sonucunda lipit peroksidasyon ürünü olan MDA seviyesindeki artış *Phaseolus vulgaris* (Chaoui ve ark., 1997; Smeets ve ark., 2005), *Lycopersicon esculentum* (Dong ve ark., 2006) ), *Bacopa monnieri* (Singh ve ark. 2006), *Brassica juncea* (Mobin ve ark., 2007; Verma ve ark., 2008) için de elde edilmiştir.

Araştırma bulgularına benzer sonuçlar *Ceratophyllum demersum* (Rama Devi ve Prasad, 1998), *Nymphoides peltatum* (Wang ve ark. 2007), *Brassica oleracea* L. var. *rubrum* (Posmyk ve ark., 2009), *Pistia stratiotes* (Upadhyay ve Panda, 2009), *Spirodela polyrhiza* (Upadhyay ve Panda, 2010) bitkilerinin bakır stresine maruz bırakılması sonucu elde edilmiştir.

#### 5.4. Protein İçeriğı

Bir organizmadaki protein içeriğı metabolizmadaki dönüşümlü ve dönüşümsüz değışikliklerin önemli bir indikatörüdür ve proteinlerin çeşitli stres faktörlerine karşı verdikleri cevap oldukça değışken olabilmektedir (Panda ve Khan, 2003).

Kadmiyum ve bakır etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında protein içeriğinde bir azalma meydana gelmiştir ancak bu azalma önemsizdir.

Kadmiyuma maruz bırakılan *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarının protein içeriğinde bir azalma belirlenmiş ve en fazla azalma 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cd derişiminde görülürken, aynı bitkiye bakır uygulaması sonucu protein içeriğinde meydana gelen azalmanın önemsiz olduğı belirlenmiştir.

Bulgularımıza göre, uygulanan metaller protein sentezi üzerinde önemli bir toksik etkiye neden olmadığı ve bu metallerin uygulanması sonucunda bitkilerin yeni bir protein sentezlemedikleri öne sürülebilir.

### 5.5. Prolin İçeriği

Prolin abiyotik strese karşı bitki yanıtında yaygın şekilde çalışılan bir moleküldür. Birçok bitki bu bileşiği su eksikliği, ağır metal, tuzluluk, yüksek ve düşük sıcaklık, patojen enfeksiyonları, besin elementi eksiklikleri, atmosferik kirlilik ve UV radyasyonları gibi stres koşullarında biriktirirler (Sharma ve Dietz, 2006). Bitkilerin büyük bir çoğunluğu bu streslerin etkisinde prolin içeriğini normal seviyesinden 100 kat arttırabilir (Matysik ve ark., 2002). Ağır metal stresinde prolin içeriğinde artışların olduğunu gösteren birçok araştırma yapılmıştır. Schat ve ark. (1997) *Silene vulgaris*'in metale toleranslı ve toleranslı olmayan ekotiplerini Cd, Cu ve Zn etkisinde bırakmış ve en yüksek prolin birikiminin Cd stresinde oluştuğunu bulmuşlardır. Bu bulguların aksine sucul makrofitlerden *Lemna minör* 0.5, 1, 5 ve 10 µM Cd etkisinde 96 saat bırakılmış ve prolin içeriğinde kontrole göre sırasıyla % 0.7, % 1.3, % 2.0 ve % 3.9 oranında azalmalar olmuştur (Mohan ve Hosetti, 1997).

Araştırma bulgularımıza göre Cd ve Cu etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında prolin içeriğinde kontrole göre önemli bir azalma meydana gelmiştir. Buna göre bu bitkide metal toksisitesine karşılık prolin biriktirilmediği ve uygulanan metallerin prolin sentezini uyarmak yerine inhibe ettiği şeklinde bir açıklama getirilebilir.

Bununla birlikte, *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarında kadmiyum uygulaması sonucunda prolin içeriğinde artış meydana gelmiş ve en önemli artış 200 µg g<sup>-1</sup> Cd derişiminde görülmüştür. Bakır uygulaması sonucunda ise sadece 100 µg g<sup>-1</sup> Cu derişiminde önemli bir artış görülmüştür.

Prolini uyarma yeteneği metallere göre değişmektedir. Büyüme ortamında eşit derişimlerde metal verildiğinde prolin birikimini uyaran en etkili olan metal bakırdır ve bunu kadmiyum ve çinko izlemektedir. Ancak, toksisiteye karşı dayanıklılık karşılaştırıldığında prolin birikimi Cd>Zn> Cu yönünde azalmaktadır (Sharma ve Dietz, 2006).

Prolinin metal toksisitesindeki rolü birçok araştırıcı tarafından çalışılmıştır. Prolini biriktirme kapasitesi uygulanan metallere bağlı olarak değişmekle beraber, bitkilerin stresten kendini korumasında önemli bir yere sahiptir (Sun ve ark, 2007).

### 5.6. Protein Olmayan –SH Grupları

Bitkiler ağır metal stresi altında çeşitli detoksifikasyon mekanizmaları geliştirmektedirler. Bunlardan biri sülfür içeren savunma bileşiklerinin (glutasyon, fitoşelatin, metallothionein) sentezindeki artıştır. Bu bileşiklerin sentezi bitkilerin hayatta kalmasında ve metal toleransında önemli bir yere sahiptir (Grill ve ark., 2006).

Araştırma bulgularımıza göre *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında kadmiyum uygulaması sonucunda protein olmayan –SH gruplarının miktarı kontrole göre önemli derecede artmıştır. Mishra ve ark. (2009) *Ceratophyllum demersum* bitkisine kadmiyum uygulanması sonucunda protein olmayan –SH grup miktarında kontrole göre önemli bir artış bulmuşlardır. Bitkilerde ağır metaller (zellikle Cd) tarafından indüklenmiş –SH artışları başka araştırıcılar tarafından da belirlenmiştir (Sanita di Toppi ve Gabrielli, 1999). Bakır uygulaması ise *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında protein olmayan –SH miktarında önemli bir artışa neden olmamıştır.

*Silene vulgaris* var. *vulgaris*'e kadmiyum ve bakır uygulaması kontrolle karşılaştırıldığında protein olmayan –SH grup miktarında önemli bir değişikliğe neden olmamıştır.

Birçok bitkide protein olmayan –SH gruplarının büyük bir kısmını (%95'den fazlası) glutasyon temsil etmektedir (Tiryakioğlu ve ark., 2006). Bununla birlikte, bitki hücrelerinde fitoşelatin, metallothionein, tiyoinler ve densinler gibi düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerde mevcut olabilir (zdener ve Aydın, 2010).

Protein olmayan –SH gruplarının antioksidant özelliği tripeptitin –SH grubunun disülfid formunun oksidasyonuna bağlıdır. Bitkiler kadmiyum uygulaması süresince yüksek miktarda protein olmayan –SH gruplarını sentezlerler. Protein olmayan –SH seviyesinin artması sülfat redüksiyon yolunun uyarılması nedeniyle olabilir, azalması ise glutasyon ve fitoşelatin sentezi için protein olmayan –SH gruplarının tkretiminden kaynaklanabilir (Noctor ve Foyer, 1998).

Yaptığımız araştırmanın sonuçlarına göre, *Brassica oleracea* var. *acephala*'da Cd toksisitesine dayalı protein olmayan –SH grup miktarındaki artış glutatyondaki artıştan kaynaklanabilir. Ancak, bu bulgular bu konuda yapılacak olan daha detaylı çalışmalar ile desteklenmelidir.

### 5.7. Askorbat

Askorbatın serbest oksijen radikallerinin süpürülmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bitkilerde aktif olarak antioksidan fonksiyonu olan askorbattır (Song ve ark., 2009).

Araştırmada kadmiyum uygulaması sonucunda *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında askorbat (AsA) içeriğinde çalışılan tüm derişimlerde kontrole göre önemli derecede bir artış meydana gelmiştir. Bununla birlikte, aynı bitkiye bakır uygulaması sonucunda askorbat içeriğindeki en önemli artış  $400 \mu\text{g g}^{-1}$  Cu derişiminde gerçekleşmiştir.

Toplam askorbat (AsA+DAsA) içeriği askorbat ve dehidroaskorbat içeriğinin toplamıdır. Bulgularımıza göre, *Brassica oleracea* var. *acephala*'da Cd uygulaması sonucu toplam askorbat içeriğinde kontrole göre önemli bir artış görülürken, bakır uygulaması sonucunda  $100$  ve  $200 \mu\text{g g}^{-1}$  Cu derişimlerinde kontrole göre önemli bir düşüş görülmüştür.

*Silene vulgaris* var. *vulgaris*'e kadmiyum ve bakır uygulanması sonucunda derişime bağılı olarak askorbat içeriğinde önemli bir artış meydana geldiği, ancak aynı bitkiye kadmiyum uygulanması sonucunda ise dehidroaskorbat içeriğinin yalnızca  $400 \mu\text{g g}^{-1}$  Cd derişiminde önemli oranda arttığı görülmüştür.

Kadmiyum ve bakır etkisinde *Silene vulgaris* var. *vulgaris* yapraklarındaki toplam askorbat içeriği kontrole göre önemli derecede artmıştır. Her iki uygulama sonucundaki en önemli artış  $200$  ve  $400 \mu\text{g g}^{-1}$  Cd ve Cu derişimlerinde görülmüştür.

Sonuçlarımıza göre, yapraklardaki askorbat içeriğinin stres faktörlerinin etkisinde arttığı bulunmuştur. Askorbatın bitki hücrelerinde oluşan oksidatif strete enzimatik ( $\text{H}_2\text{O}_2$ 'yi askorbat peroksidaz enzimi yardımıyla  $\text{H}_2\text{O}$ 'ya dönüştürmekte) ve enzimatik olmayan (membran bağımlı antioksidan olan  $\alpha$ -tokoferolün yeniden oluşturulmasında, peroksil radikal ve singlet oksijenin temizlenmesinde) etkilerinin

olduğu bilinmektedir (Smirnoff, 1996). Ancak bu biyolojik olayların işleyişinde birçok enzim (askorbat peroksidaz, monodehidroaskorbat redüktaz ve dehidroaskorbat redüktaz) ve enzim olmayan moleküller devreye girmektedir. Hangi neden ya da nedenlerden dolayı askorbat içeriğinde artışların olduğu konusunda kesin bilgi vermek mümkün değildir. Ancak Cd ve Cu uygulaması sonucunda her iki bitkideki askorbat içeriklerinde artışların olması, askorbatın bu stres veya streslere cevapta önemli bir yerinin olduğunu gösterebilir.

### **5.8. Antioksidant Enzim Aktiviteleri**

Bitkiler ağır metaller yoluyla uyarılan oksidatif hasardan korunmak için enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalarla donatılmıştır (Apel ve Hirt, 2004). Antioksidant sistem, katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), guaiacol peroksidaz (GPOX) ve askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR) gibi askorbat-glutatyon döngüsünün enzimleri ve askorbat, glutatyon gibi enzimatik olmayan antioksidantlardan oluşmaktadır. Oluşan süperoksit radikalleri SOD tarafından  $H_2O_2$ 'ye dönüştürülmektedir ve  $H_2O_2$ 'nin birikimi APX, CAT ve GPOX enzimlerinin aktiviteleri yoluyla engellenmektedir (Khatun ve ark., 2008).

Antioksidant enzimler ve belirli metabolitler stres periyodu süresince bitkilerin adaptasyonunda ve canlılıklarını devam ettirebilmelerinde önemli bir yere sahiptir. Antioksidant enzimlerin aktiviteleri oksidatif stres tarafından uyarılmaktadır (Dinakar ve ark, 2008). Ağır metal stresine karşı bazı bitkilerin toleransı antioksidant enzimlerin yüksek aktivite göstermesiyle ilişkilendirilmektedir (Dixit, 2001; Singh ve ark., 2006).

#### **Süperoksit Dismutaz Aktivitesi (1.15.1.1)**

Oksidatif strese karşı organizmadaki ilk savunma SOD enzimiyle gerçekleşir. SOD, süperoksitin  $H_2O_2$  ve  $O_2$ 'e dismutasyonunu katalizlemektedir (Singh ve ark., 2010).  $H_2O_2$  ayrıca NADPH oksidaz, ksantin oksidaz amino oksidaz ve bir hücre duvar peroksidazı gibi spesifik enzimler tarafından da oluşturulabilmektedir (Wu ve ark., 2009).



Bulgulara göre, *Brassica oleracea* var. *acephala*'ya kadmiyum uygulaması SOD aktivitesinde kontrole göre önemli derecede bir azalmaya neden olmuştur. Artan Cd derişimine bağlı olarak meydana gelen azalma özellikle 200 ve 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cd derişimlerinde görülmüştür. Bakır uygulaması ise SOD aktivitesinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır.

Kadmiyum uygulanması sonucu *Silene vulgaris* var. *vulgaris*'in SOD aktivitesinde önemli bir azalma meydana gelmiş ve en önemli azalma 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cd derişiminde gerçekleşmiştir. Bununla birlikte, aynı bitkiye bakır uygulanması sonucunda SOD aktivitesinde 100  $\mu\text{g g}^{-1}$  Cu derişiminde bir artış olmuş fakat derişim arttıkça aktivitede önemli derecede bir azalma meydana gelmiştir.

Kadmiyum uygulaması sonucunda SOD aktivitesindeki azalma, *Helianthus annuus* (Gallego ve ark., 1996), *Phaseolus vulgaris* (Somashekaraiyah ve ark., 1992) ve *Pisum sativum* (Sandalio ve ark., 2001) bitkileriyle yapılan araştırmalarda da elde edilmiştir. Kadmiyum derişimindeki artışa bağlı olarak SOD aktivitesindeki azalma nedeninin enzimin  $\text{H}_2\text{O}_2$  tarafından inaktive edilmesi yoluyla olabileceği düşünülmektedir (Mishra ve ark., 2006). Ayrıca, benzer sonuçlar, *Withania somnifera*'ya bakır uygulaması sonucunda da elde edilmiştir (Khatun ve ark., 2008).

SOD aktivitesi genellikle yüksek derişimli metaller tarafından inhibe edilmektedir. SOD aktivitesinin inhibisyonu daha fazla süperoksit radikali oluşumuna sebep olacak ve süperoksit radikali hücrelerden süpürülemeyecektir. SOD tarafından süperoksit radikal seviyesinin kontrol edilmesi oksidatif hasara karşı önemli bir koruyucu mekanizmadır.

Bununla birlikte, her iki bitkide de SOD izoenzimlerinin native page yöntemiyle belirlenmesi sonucunda yalnızca bir bant elde edilmiştir. Bir bant görülmesinin nedeni aşırı miktarda uygulanan bakır ve kadmiyumun SOD izoenzimlerini inhibe etmesinden olabilir.

#### **Katalaz Aktivitesi (1.11.1.6)**

Katalaz bitki hücrelerindeki reaktif oksijen türlerini süpürmektedir ve hidrojen peroksitin birikimine ve toksisitesine karşı başlıca savunma sistemini oluşturmaktadır.

Ayrıca, hücrelerdeki hidrojen peroksit seviyesini kontrol etmede önemli bir rol oynamaktadır (Upadhyay ve Panda, 2009).

Bazı çalışmalar yüksek derişimli kadmiyumun antioksidant kapasitesinde azalmaya neden olduğunu göstermiştir (Sanita di Toppi ve Gabrielli, 1999). Araştırmamızda *Brassica oleracea* var. *acephala*'ya kadmiyum ve bakır uygulaması CAT aktivitesinde kontrole göre önemli bir değişikliğe neden olmamıştır.

Bununla birlikte, *Silene vulgaris* var. *vulgaris*'e kadmiyum ve bakır uygulaması sonucunda da CAT aktivitesinde kontrole göre önemli bir artış meydana gelmemiştir.

Wu ve ark. (2009) *Plagiomnium cuspidatum*'a 5,10 ve 50 µM bakır uygulamışlardır ve bunun sonucunda katalaz aktivitesinde kontrole göre önemli bir değişiklik meydana gelmediğini rapor etmişlerdir.

#### **Askorbat Peroksidaz Aktivitesi (1.11.1.11)**

CAT ve peroksidazlar eş zamanlı fonksiyon gösterirler. Düşük CAT aktivitesini daha yüksek APX ve GPOX aktivitesi izlemektedir. Bu enzimler bitkilerin farklı kısımlarında birbirlerinden bağımsız çalışmaktadır (Özdener ve Aydın, 2010). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> CAT, APX ve GPOX enzimlerinin etkisiyle su ve moleküler oksijene indirgenmektedir (Mishra ve ark., 2006). APX, ROT'ların süpürülmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Upadhyay ve Panda, 2010) ve genellikle kloroplastlarda ve sitosolde bulunmaktadır, ayrıca askorbat-glutasyon döngüsünün anahtar enzimidir. APX, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i suya indirgeyebilmek için askorbatı elektron vericisi olarak kullanmaktadır (Hegedüs ve ark., 2001).

Araştırmada kadmiyum uygulaması sonucunda *Brassica oleracea* var. *acephala*'da APX aktivitesinde kontrole göre önemli derecede bir artış meydana gelmemiştir. Bununla birlikte, aynı bitkiye bakır uygulaması sonucunda enzim aktivitesinde bir artış meydana gelmiştir, ancak en önemli artış 100 ve 200 µg g<sup>-1</sup> Cu derişimlerinde görülmüştür.

Posmyk ve ark. (2009) *Brassica oleracea* var. *rubrum* bitkisine farklı derişimlerde bakır uygulamışlardır ve bunun sonucunda APX aktivitesinin arttığını belirtmişlerdir.

*Silene vulgaris* var. *vulgaris*'e kadmiyum ve bakır uygulaması sonucunda APX aktivitesinde kontrole göre önemli bir artış meydana gelmiştir ve her iki uygulama sonucunda da bu artış  $400 \mu\text{g g}^{-1}$  Cd ve Cu derişiminde görülmüştür.

Bitkilerdeki APX aktivitesi ile toplam askorbat sonuçlarını bir bütün olarak değerlendirmek gerekirse, askorbatın APX enzimi tarafından  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin süpürülmesinde indirgeyici rol oynadığı ve bunun sonucu olarak dehidroaskorbat meydana geldiği bilinmektedir. Elde edilen bulgular, kadmiyum ve bakır etkisinde *Silene vulgaris* var. *vulgaris*'in APX aktivitesi ile AsA+DAsA içeriği sonuçlarının biribiri ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

### **Guaiacol Peroksidaz Aktivitesi (1.11.1.7)**

Guaiacol peroksidaz temel olarak hücre duvarına bağlı bir enzimdir ve stoplazmada bulunmaktadır (Mishra ve ark., 2006). GPOX bitki türlerinde metal toksisitesi için potansiyel bir biyomarker olarak kullanılmaktadır (Dong ve ark., 2006).

Araştırmamızda *Brassica oleracea* var. *acephala*'ya kadmiyum ve bakır uygulaması GPOX aktivitesinde kontrole göre önemli derecede bir artışa neden olmuştur. Her iki uygulama sonucunda da en önemli artış  $400 \mu\text{g g}^{-1}$  Cd ve Cu derişiminde görülmüştür.

Kadmiyum ve bakır uygulanan *Silene vulgaris* var. *vulgaris*'in GPOX aktivitesinde önemli bir artış meydana gelmiştir. Metal uygulanan gruplar kontrol grubuna göre değerlendirildiğinde, aktivitenin derişime bağlı olarak bir artış gösterdiği belirlenmiştir.

Guaiacol peroksidazın bir stres belirteci olduğu düşünülmektedir ve bu enzimin ağır metaller tarafından yüksek oranda uyarılması biriktirilen metalin miktarı ile ilişkilendirilmektedir (Mishra ve ark., 2006). Bulgularımıza göre, GPOX aktivitesi her iki metal uygulamasında da artmıştır. Birçok bitkide Ni, Pb, Cd gibi ağır metallerin aşırı miktarda alınması GPOX aktivitesinde kuvvetli bir artışa neden olduğu belirlenmiştir (Posmyk ve ark., 2009). Yine Sun ve ark. (2007) tarafından *Solanum nigrum* bitkisi ile yaptıkları çalışmada yapraklardaki GPOX aktivitesinin kadmiyum derişimindeki artışa bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. Ayrıca, bizim sonuçlarımıza benzer olarak bakırın da GPOX aktivitesini arttırdığı bazı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Weckx ve Clijsters, 1996; Teisseire ve Guy, 2000 )

Sonuç olarak, farklı metaller ve bu metallerin uygulanan derişimleri CAT, SOD, APX ve GPOX gibi antioksidant enzimlerin aktivitelerinde değişiklikler meydana getirmektedir (Chaoui ve El Ferjani, 2005).

Kadmiyum tarafından uyarılan oksidatif strese verilen cevaplar hem uygulanan kadmiyum derişimine hem de her zaman mevcut bulunan tiyol gruplarının içeriğiyle ilişkilidir (Sanita di Toppi ve Gabrielli, 1999). Bununla birlikte, Cd iyonları bazı enzimlerin aktivitelerini inhibe ederken, bazı enzimleri de uyarabilir. *Helianthus annuus* yapraklarında kadmiyum SOD, CAT, APX ve GR aktivitelerini azaltmıştır (Gallego ve ark., 1996). Shaw (1995) tarafından yapılan çalışmada *Phaseolus aureus*'ta ise kadmiyum iyonları CAT aktivitesini azaltmış, GPOX ve APX aktivitelerini arttırmıştır.

Daha önceki çalışmalar aşırı miktarda mevcut olan bakırın Fenton tipi reaksiyonlar youyla ROT'ların oluşumunu uyararak antioksidant enzim aktivitelerinin artmasına neden olduğunu belirtmişlerdir (Lombardi ve Sebastiani, 2005). Bakıra antioksidant enzimlerin yanıtları genellikle tartışılmaktadır, çünkü bu yanıtlar bitki türleri ve bitki dokuları arasında değişebildiği gibi metal derişimine bağlı olarak da değişebilmektedir (Chaoui ve El Ferjani, 2005).

Bazı araştırmacılar bakırın CAT (Weckx ve Clijters, 1996), GPOX (Mazhoudi ve ark., 1997) ve SOD (Luna ve ark., 1994) aktivitelerini arttırdığını, bazı araştırmacılar ise, bunun aksine, bu metalin CAT (Mazhoudi ve ark., 1997) ve SOD (Sgherri ve ark., 2001) aktivitelerini inhibe ettiğini belirtmişlerdir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ağır metal stresi bitkilerin üretimini sınırlandıran önemli problemlerden biridir ve ROT üretimini arttırarak oksidatif stresin oluşmasına neden olurlar (Yadav, 2010).

Bu çalışmada, *Brassica oleracea* var. *acephala* ve *Silene vulgaris* var. *vulgaris* 'e 100, 200 ve 400  $\mu\text{g gr}^{-1}$  derişimlerinde bakır ve kadmiyum çözeltileri uygulanmıştır. Uygulama sonucunda yapraklardaki fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerdeki değişiklikler araştırılmış ve bu iki stres faktörü altında antioksidatif savunma mekanizmalarının işleyişi ile ilgili sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

Bakır ve kadmiyumun farklı derişimleri *Brassica oleracea* var. *acephala* ve *Silene vulgaris* var. *vulgaris*'in pigment içeriğinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Bununla birlikte, bitkilerde oluşan oksidatif strese karşı bitki savunma mekanizmasında karotenoitlerin önemli bir rolü olmadığı görülmüştür.

Kadmiyum uygulanması sonucunda *Brassica oleracea* var. *acephala*'da kadmiyum birikimi köklerde yapraklara göre oldukça fazladır. Bu bulgular kadmiyumun büyük bir kısmının köklerde taşınmadan kaldığını ve küçük miktarlarda sürgün ve yapraklara taşındığını göstermektedir. Bunun sonucunda bu bitkinin kadmiyuma karşı toleranslı olduğunu söyleyebiliriz.

*Silene vulgaris* var. *vulgaris* 'in kök ve yapraklarındaki Cd birikim oranı birbirine çok yakındır. Buna bağlı olarak, bu bitkinin de kadmiyuma karşı toleranslı olduğu öne sürülebilir.

Brassicaceae familyası birçok metali biriktirebilen türleri içermektedir. *Brassica juncea* Cd, Cu, Ni, Zn, Pb ve Sn gibi metalleri yüksek oranda alıp biriktirebilmektedir. Ayrıca, *Brassica oleracea*'da yüksek oranda ağır metal biriktirebilmektedir (Kabata-Pendias, 2001; Gisbert ve ark., 2006).

Bakır uygulaması sonucunda *Brassica oleracea* var. *acephala*'nın kök ve yapraklarındaki bakır birikimi karşılaştırıldığında, her iki organdaki bakır birikiminde derişime bağlı olarak bir artış olduğu, ancak köklerdeki birikimin yapraklardakinden belirgin derecede farklı olduğu belirlenmiştir. *Brassica oleracea* var. *acephala*'nın bakıra toleranslı olduğunu öne sürebiliriz.

*Silene vulgaris* var. *vulgaris* 'de de kök ve yapraklardaki bakır birikimi uygulanan bakır derişimine bağlı olarak önemli bir artış göstermiş ve köklerdeki birikimin yapraklardakinden belirgin şekilde farklı olduğu belirlenmiştir. Metale toleranslı türler bakırı alarak köklerinde biriktirirken, metale toleranslı olmayanlar ise kökleri zayıf bir bariyer gibi davranarak metal iyonlarının üst dokulara taşınmasına izin verirler (Baker, 1981). Ayrıca, *Silene vulgaris*'in bakır tolerant bir bitki olduğu kesin şekilde bilinmektedir (Song ve ark., 2004). Bu araştırmanın bir sonucu olarak *Silene vulgaris* var. *vulgaris*'in de bakıra karşı toleranslı olduğunu söyleyebiliriz.

Membran hasarına neden olan lipit peroksidasyonunun ürünü olan MDA miktarı kontrolü izleyen derişimlerde önemli oranda artış göstermiştir. Her iki stres altında *Brassica oleracea* var. *acephala*'da ve *Silene vulgaris* var. *vulgaris*'de MDA değerinin artması bu iki metalin de oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir.

*Brassica oleracea* var. *acephala* 'ya bakır ve kadmiyum uygulanması protein içeriğinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Bununla birlikte, *Silene vulgaris* var. *vulgaris* 'e kadmiyum uygulanması sonucunda protein içeriğinde bir azalma meydana gelirken, bakır uygulamasının önemli bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir.

Strese toleransta etkili olan bir diğer savunma mekanizması da enzimatik olmayan antioksidanlardır. Her iki bitkinin de prolin, askorbat ve protein olmayan -SH grupları bakımından değişimleri incelenmiştir ve iki türde de bu anlamda farklılıklar görülmüştür.

Kadmiyum ve bakır etkisinde bırakılan *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında prolin içeriğinde kontrole göre bir azalma meydana gelmiştir. Fakat, bu uygulamalar *Silene vulgaris* var. *vulgaris*'de prolin içeriğini farklı şekilde etkilemiştir. Kadmiyum prolin içeriğinde bir artışa neden olmuş ve en fazla artış  $200 \mu\text{g g}^{-1}$  Cd derişiminde görülmüştür. Bakır uygulaması sonucunda ise sadece  $100 \mu\text{g g}^{-1}$  Cu derişiminde bir artış görülmüştür.

*Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında bakır ve kadmiyum stresi protein olmayan -SH grupları üzerinde farklı etkiye neden olmuştur. Kadmiyum uygulaması sonucunda protein olmayan -SH gruplarının miktarı kontrole göre önemli derecede artarken, bakır uygulaması önemli bir artışa neden olmamıştır. *Silene vulgaris* var. *vulgaris*'e kadmiyum ve bakır uygulaması kontrolle karşılaştırıldığında protein olmayan -SH gruplarının miktarında önemli bir değişikliğe neden olmamıştır.

Bakır ve kadmiyum stresi *Brassica oleracea* var. *acephala* yapraklarında askorbat içeriğinde artışa neden olmuştur. Kadmiyum uygulaması sonucunda askorbat içeriğinde kontrole göre belirgin bir artış meydana gelirken, bakır uygulaması sonucunda en fazla artış  $400 \mu\text{g g}^{-1}$  Cu derişiminde görülmüştür. *Silene vulgaris* var. *vulgaris*'e kadmiyum ve bakır uygulaması askorbat içeriğinde bir artışa neden olmuştur, ancak bu artış kontrole göre önemsizdir.

Toplam askorbat içeriği askorbat ve dehidroaskorbat içeriğinin toplamıdır. *Brassica oleracea* var. *acephala*'da Cd uygulaması sonucu toplam askorbat içeriğinde kontrole göre bir artış görülürken, bakır uygulaması sonucunda  $100$  ve  $200 \mu\text{g g}^{-1}$  Cu derişimlerinde kontrole göre belirgin bir düşüş görülmüştür.

Her iki stres etkisinde de *Silene vulgaris* var. *vulgaris*'in toplam askorbat içeriği artmıştır. Bu artış uygulanan metallerin derişimi arttıkça daha da önemli olmaktadır.

*Brassica oleracea* var. *acephala* ve *Silene vulgaris* var. *vulgaris*'e kadmiyum ve bakır uygulaması sonucunda meydana gelen reaktif oksijen türlerini ortamdaki uzaklaştıran antioksidant enzimlerin (CAT, SOD, APX ve GPOX) aktivite düzeylerinde değişiklikler belirlenmiştir.

*Brassica oleracea* var. *acephala* 'ya kadmiyum ve bakır uygulaması CAT aktivitesi üzerinde belirgin bir değişikliğe neden olmamıştır. Aynı şekilde *Silene vulgaris* var. *vulgaris*'in CAT aktivitesi üzerinde bir değişiklik meydana getirmemiştir.

*Brassica oleracea* var. *acephala* 'ya kadmiyum ve bakır uygulaması SOD aktivitesi üzerinde farklı etkilere neden olmuştur. SOD aktivitesi  $200$  ve  $400 \mu\text{g g}^{-1}$  Cd derişimlerinin etkisinde azalırken, bakır uygulaması sonucu SOD aktivitesinde bir değişiklik meydana gelmemiştir. *Silene vulgaris* var. *vulgaris*'in SOD aktivitesi  $400 \mu\text{g g}^{-1}$  Cd ve Cu derişiminin etkisinde azalma göstermiştir.

APX aktivitesi *Brassica oleracea* var. *acephala* 'ya kadmiyum uygulaması sonucunda belirgin bir değişikliğe neden olmazken, bakır uygulaması enzim aktivitesinde artışa neden olmuştur.  $100$  ve  $200 \mu\text{g g}^{-1}$  Cu derişimlerinde belirgin bir artış göstermiştir.

Her iki stres faktörü *Silene vulgaris* var. *vulgaris*'in APX aktivitesinde bir artışa neden olmuştur. Bu artış kadmiyum uygulaması sonucunda  $200$  ve  $400 \mu\text{g g}^{-1}$  Cd derişimlerinde, bakır uygulamasında  $400 \mu\text{g g}^{-1}$  Cu derişiminin etkisinde görülmüştür.

*Brassica oleracea* var. *acephala* ve *Silene vulgaris* var. *vulgaris*'e kadmiyum ve bakır uygulaması GPOX aktivitesinde önemli bir artışa neden olmuştur. Her iki uygulama sonucunda da bu artış  $400 \mu\text{g g}^{-1}$  Cd ve Cu derişimlerinde görülmüştür.

Sonuç olarak, uygulanan bakır ve kadmiyumun yüksek derişimleri *Brassica oleracea* var. *acephala* ve *Silene vulgaris* var. *vulgaris*'de MDA seviyesinin artması (lipit peroksidasyonunun indikatörü) ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  üretimindeki artışa bağılı olarak oksidatif strese neden olmuşlardır. Bununla birlikte, her iki stres faktörü altında her iki bitki türü de oksidatif stresin azaltılmasında ya da önlenmesinde farklı savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Ayrıca, diğer enzimlerden farklı olarak guaiacol peroksidaz enziminin her iki bitki türünde de antioksidant savunmasında önemli bir rol oynadığı görülmüştür. GPOX aktivitesi ağır metal toksisitesinde potansiyel bir biyomarker olarak kullanılmaktadır. Metale toleranslı bitki türlerinde GPOX aktivitesi oldukça yüksek bulunurken, metale toleranslı olmayan bitki türlerinde ise oldukça düşük olduğu belirlenmiştir (Tanyolaç ve ark., 2007)

Yapılan çalışmalar sonucunda, *Brassica oleracea* var. *acephala* ve *Silene vulgaris* var. *vulgaris* bitkilerinin bu metallere karşı toleranslı olduğu öne sürülebilir.

*Brassica* türleri ile yapılan çalışmalar bitki ve farklı çevre faktörleri arasındaki ilişkinin anlaşılması açısından oldukça önemlidir (Jahangir, 2008). Metal kirliliği çevresel ve insan sağlığı açısından önemli bir problemdir. Halen metal kirliliğinin aşılması için etkili ve güçlü yöntemlere ihtiyaç vardır (Buendia-Gonzalez ve ark., 2010). Bu yöntemlerden biri olan fitoremediasyon için Brassicaceae (*Brassica juncea* ve *B. carinata*) (Gisbert ve ark., 2006) ve Caryophyllaceae (*Silene cucubalus*, *Silene compacta*) familyasındaki türlerin önemli olduğu ve bu familyadaki türlerin metale toleranslı ya da akümülatör olduğu rapor edilmiştir (Prasad ve Freitas, 2003).

Bu nedenle bu araştırmamızın ileride yapılacak olan farklı çalışmalara destek olacağını ve yol göstereceği düşünülmektedir. Ayrıca, bu bitkilerin diğer ağır metallere karşı tepkileri de araştırılabilir. Bu familyadaki farklı türlerle ilgili daha fazla çalışma yapılması gerektiği düşünülmektedir.



## 7. KAYNAKLAR

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymology*, 105, 121-126.
- Agrawal, S.B., Mishra, S., 2009. Effects of supplemental ultraviolet-B and cadmium on growth, antioxidants and yield of *Pisum sativum* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 610–618.
- Ahmed, A., Hasnain, A., Akhtar, S., Hussain, A., Abaid-ullah, Yasin, G., Wahid, A., Mahmood, S., 2010. Antioxidant enzymes as bio-markers for copper tolerance in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *African Journal of Biotechnology*, 9, 5441-5444.
- Ahsan, N., Lee, D.G., Lee, S.H., Kang, K.Y., Lee, J.J., Kim, P.J., Yoon, H.S., Kim, J.S., Lee, B.H., 2007. Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. *Chemosphere*, 67, 1182-1193.
- Akkuş, 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, 151 s, Konya.
- Alcantara, E., Romera, F.J., Can Ete, M., De La Guardia, M.D., 1994. Effects of heavy metals on both induction and function of root Fe(III) reductase in Fe-deficient Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plants Journal of Experimental Botany*, 45, 1893-1898.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-379.
- Arnon, G.L., 1949. Copper enzyme in isolated chloroplasts: Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24, 1-15.
- Asada, K., 1992. Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, 85, 235-241.
- Asada, K., 1999. The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 601–639.
- Asada, K., 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, 141, 391-396.
- Ashraf, M., Foolad, M.R., 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59, 206-216.
- Babula, P., Vojtech, A., Opatrilova, R., Zehnalek, J., Havel L., Kizek, R., 2008. Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 6, 189-213.
- Baker, A.J.M., 1981. Accumulators and excluders—strategies in response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition*, 3, 643–654.

- Barcelo, J., Poschenrieder, C.H., 1990. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *Journal of Plant Nutrition*, 13, 1-37.
- Barón M., López-Gorgé J., Lachica M., Sadmann G., 1992. Changes in carotenoids and fatty acids in photosystem II of Cu-deficient pea plants. *Physiologia Plantarum*, 84, 1-5.
- Beckhaldi, A., Hediji, H., Abbes, Z., Nouairi, I., Barhoumi, Z., Zarrouk, M., Chai'bi, W., Djebali, W., 2010. Effects of exogenous salicylic acid pre-treatment on cadmium toxicity and leaf lipid content in *Linum usitatissimum* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 1004-1011.
- Benavides, M.P., Gallego, S.M., Tomaro, M.L., 2005. Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1), 21-34.
- Bernal, M., Roncel, M., Ortega, J.M., Picorel, R., Yruela, I., 2004. Copper effect on cytochrome *b<sub>559</sub>* of photosystem II under photoinhibitory conditions. *Physiologia Plantarum*, 120, 686-694.
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44, 276-287.
- Bhattacharjee, S., 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: Role in stress, senescence and signal transduction in plants. *Curr. Sci.* 89: 1115-1121.
- Boojar, M.M.A., Goodarzi, F., 2007. The copper tolerance strategies and the role of antioxidative enzymes in three plant species grown on copper mine. *Chemosphere*, 67, 2138-2147.
- Borghi, M., Tognetti, R., Monteforti, G., Sebastiani, L., 2008. Responses of two poplar species (*Populus alba* and *Populus canadensis*) to high copper concentrations. *Environmental and Experimental Botany*, 62, 290-299.
- Buendia-Gonzalez, L., Orozco-Villafuerte, V., Cruz-Sosa, F., Barrera-Diaz, C.E., Vernon-Carter, E.J., 2010. *Prosopis laevigata* a potential chromium (VI) and cadmium (II) hyperaccumulator desert plant. *Bioresource Technology*, 101, 5862-5867.
- Cargnelutti, D., Tabaldi, L.A., Spanevello, R.M., Jucoski, G.D., Battisti, V., Redin, M., Linares, C.E.B., Dressler, V.L., Flores, E.M.M., Nicoloso, F.T., Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C., 2006. Mercury toxicity induces oxidative stress in growing cucumber seedlings. *Chemosphere*, 65, 999-1006.
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M.H., El Ferjani, E., 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science*, 127, 139-147.

- Chaoui, A., El Ferjani, E., 2005. Effects of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *Comptes Rendus Biologies*, 328, 23-31.
- Claussen, W. 2005. Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant Science*, 168, 241-248.
- Collins, A., 2001. Carotenoids and genomic stability. *Mutation Research*, 475, 1-28.
- Costa, G, Morel, J.L., 1994. Water relations, gas exchange and amino acid content in cd-treated lettuce. *Plant Physiology of Biochemistry*, 32, 561-570.
- Cumming, J.R., Taylor, G.J., 1990. Mechanisms of metal tolerance in plants: physiological adaptations for exclusion of metal ions from the cytoplasm. In: Alscher RG, Cumming JR, eds. *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms*, Wiley-Liss, 329-356, New York.
- Çakmak I., Marschner H., 1992. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathion reductase in bean leaves. *Plant Physiology*, 98: 1222- 1227.
- Davey, M. W., Montagu, M. V., Inze', D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Benzie, I. JJ., Strain, J.J., Favell, D., Fletcher, J., 2000. Plant L-ascorbic acid:chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 825-860.
- De Knecht, J.A., Van Baren, N., Ten Bookum, W.T., Wong Fong Sang, H.W., Koevoets, P.L.M., Schat, H., Verkleij, J.A.C., 1995. Synthesis and degradation of phytochelatins in cadmium sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Science*, 106, 9-18.
- Del Río, L.A., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Gómez, M., Barroso, J.B., 2002. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1255-1272.
- Demirevska-Kepova, K., Smova-Stoilova, L., Stoyanova, Z., Hölzer, R., Feller, U., 2004. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. *Environmental and Experimental Botany*, 52, 253-266.
- Dinakar, N, Nagajyothi, P.C., Suresh, S., Udaykiran, Y., Damodharam, T., 2008. Phytotoxicity of cadmium on protein, proline and antioxidant enzyme activities in growing *Arachis hypogaea* L. seedlings. *Journal of Environmental Sciences* 20, 199-206.
- Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R., 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal of Experimental Botany*, 52, 1101-1109.

- Domínguez, F., Moreno, J., Cejudo, F.J., 2001. The nucellus degenerates by a process of programmed cell death during the early stages of wheat grain development. *Planta*, 213, 352-360.
- Dong, J., Wu, F., Zhang, G., 2006. Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). *Chemosphere*, 64, 1659–1666.
- Drazkiewicz, M., Skorzynska-Polit, E., Krupa, Z., 2004. Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. *BioMetals*, 17, 379-387.
- Dubey, R.S., 2011. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. CRC Press. (Editor: S. Dutta Gupta), s:177-203. Enfield, NH 03748, USA
- Fernandes, J.C., Henriques, F.S., 1991. Biochemical, physiological and structural effects of excess copper in plants. *The Botanical Review*, 57, 246-273.
- Foyer, C.H., 1993. Ascorbic Acid. In: Alscher RG, Hess JL, (Eds). *Antioxidants in higher plants*. Boca Raton: CRC Press, pp. 31-58.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 119, 355-364.
- Gallego, S.M., Benavides, M.P., Tomaro, M.L., 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science*, 121, 151–159.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909-930.
- Gisbert, C., Clemente, R., Navarro-Avino, J., Baixauli, C., Ginerc, A., Serrano, R., Walker, D.J., Bernal, M.P., 2006. Tolerance and accumulation of heavy metals by Brassicaceae species grown in contaminated soils from Mediterranean regions of Spain. *Environmental and Experimental Botany*, 56, 19–27.
- Goldbold, D. L., Huttermann, A., 1985. Effect of zinc, cadmium and mercury on root elongation of *P. abies* (Karst.) seedlings and the significance of these metals to forest die-back. *Environmental Pollution*, 38, 375-381.
- Grill, E., Winnacker, E.-L., Zenk, M.H., 1985. Phytochelatins: the principal heavy metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230, 674–676.
- Grill, E., Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., 2006. Role of phytochelatins in phytoremediation of heavy metals. In: Singh, S.N., Tripathi, R.D. (Eds.), *Environmental Bioremediation Technologies*. Springer, Heidelberg, pp. 101–145.

- 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 Biointerfaces*, 57, 182-188.
- Gupta, D.S., 2009. *Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants*. Science Publishers, P.O. Box 699, Enfield, NH 03748, USA, s:16-30.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 219, 1-14.
- Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants. redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141, 312-322.
- Hancock, R.D., Viola, R., 2005. Biosynthesis and catabolism of L-ascorbic acid in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24, 167-188.
- Heath, R.L., K., Packer, 1968. Leaf senescence; correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, 32, 93-101.
- Hegedüs, A., Erdei, S., Horváth, 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 Science*, 160, 1085–1093
- Hernandez, L.E., Carpena-Ruiz, R., Garate, A., 1996. Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. *Journal of Plant Nutrition*, 19, 1581-1598.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H., 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiology*, 42, 462-468.
- Horváth, E., Szalai, G., Janda, T., Páldi, E., Rácz, I., Lásztity, D., 2003. Effect of vernalisation and 5-azacytidine on the methylation level of DNA in wheat (*Triticum aestivum* L., cv. Martonvásár 15).
- Ishikawa, T., Dowdle, J., Smirnoff, N., 2006. Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. *Physiologia Plantarum*, 126, 343-355.
- Jahangir, M., Abdel-Farid, I.B., Hae Choi, Y., Verpoorte, R., 2008. Metal ion-inducing metabolite accumulation in *Brassica rapa*. *Journal of Plant Physiology*, 165, 1429—1437.
- Jakob, B., Heber, U., 1996. Photoproduction and detoxification of hydroxyl radicals in chloroplasts and leaves in relation to photoinactivation of photosystems I and II. *Plant Cell Physiology*, 37, 629-635.

- Jiménez, A., Hernández, J.A., del Rio, L.A., Sevilla, F., 1997. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology*, 114, 275-284.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. Trace Elements in Soils and Plants. CRC Press, s: 88-113, New York.
- Kagi, J.H.R., 1991. Overview of metallothionein. *Methods Enzymology*, 205, 613-626.
- Ke, W., Xiong, Z.T., Chen, S. ve Chen J., 2006. 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*.
- Keltjens, W.G., Van Beusichem, M.L., 1998. Phytochelatin as biomarkers for heavy metal toxicity in maize: single metal effects of copper and cadmium. *Journal of Plant Nutrition*, 21, 635-648.
- Kessler, A., Brand, M.D., 1995. The mechanism of the stimulation of state 4 respiration by cadmium in potato tuber (*Solanum tuberosum*) mitochondria. *Plant Physiology of Biochemistry*, 33, 519-528.
- Khatun, S., Babar Ali, M., Hahna, E.J., Paeka, K.Y., 2008. Copper toxicity in *Withania somnifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of *in vitro* grown plants. *Environmental and Experimental Botany*, 64, 279-285.
- Kıran, Y., Şahin, A., 2005. The effects of the lead on the seed germination, root growth and root tip cell mitotic divisions of *Lens culinaris* Medik. *G. U. Journal of Science*, 18(1):17-25.
- Landberg, T., Greger, M., 1996. Differences in uptake and tolerance to heavy metal in *Salix* from unpolluted and polluted areas. *Applied Geochemistry*, 11, 175-180.
- Larsson, E.H., Bornman, J.F., Asp, H., 1998. Influence of UV-B radiation and Cd on chlorophyll fluorescence, growth and nutrient content in *Brassica napus*. *Journal of Experimental Botany*, 49, 1031-1039.
- Leita, L., Contin, M., Maggioni, A., 1991. Distribution of cadmium and induced Cd-binding proteins in roots, stems and leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Science*, 77, 139-147.
- Liu, J., Xiong, Z., Li, T., Huang, H., 2004. Bioaccumulation and ecophysiological responses to copper stress in two populations of *Rumex dentatus* L. from Cu contaminated and non contaminated sites. *Environmental and Experimental Botany*, 52, 43-51.
- Lombardi, L., Sebastiani, L., 2005. Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of *in vitro* grown plants. *Plant Science*, 168, 797-802.

- Maksymiec, W., 1997. Effect of copper on cellular process in higher plants. *Photosynthetica*, 34, 321-342.
- Maksymiec, W, Wo'jcik, M., Krupa, Z., 2007. Variation in oxidative stress and photochemical activity in *Arabidopsis thaliana* leaves subjected to cadmium and excess copper in the presence or absence of jasmonate and ascorbate. *Chemosphere*, 66, 421-427.
- Markossian, K.A., Kurganov, B.I., 2003. Copper chaperones, intracellular copper trafficking proteins. Function, structure, and mechanism of action. *Biochemistry (Mosc)* 68, 827-837.
- Matysik, J., Alia, Bhalu, B., Mohanty, P., 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science*, 82, 525-532.
- Maxwell, D.P., Nickels, R., Mc Intosh, L., 2002. Evidence of mitochondrial involvement in transduction of signals required for induction of genes associated with pathogen attack and senescence. *Plant Journal*, 29, 269-279.
- Mazhoudi, S., Chaoui, A., Ghorbal, M.H., El Ferjani, E., 1997. Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). *Plant Science*, 127, 129-137.
- Mc Kersie, B.D., Leshem, Y.Y., 1994. Oxidative stress. In: stress and stress coping in cultivated plants. Kluwer Academic Publishers, s. 256.
- Millar, A.H., Leaver, C.J., 2000. The cytotoxic lipid peroxidation product, 4-hydroxy 2-nonenal, specifically inhibits decarboxylating dehydrogenases in the matrix of plant mitochondria. *Fresenius Environmental Bulletin*, 481, 117-121.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathia, R.D., Govindarajan, R., Kuriakose, S.V, Prasad, M.N.V., 2006. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiology and Biochemistry* 44, 25-37.
- Mishra, S., Tripathi, R.D., Srivastava, S., Dwivedi, S., Trivedi, P.K., Dhankher, O.P., Khare, A., 2009. Thiol metabolism play significant role during cadmium detoxification by *Ceratophyllum demersum* L. *Bioresource Technology*, 100, 2155-2161.
- Mittler, R., Zilinskas, B.A., 1993. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Analytical Biochemistry*, 212, 540-546.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7, 405-410.

- Miyake, C., Asada, K., 1992. Thylakoid bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product, monodehydroascorbate radicals in the thylakoids. *Plant and Cell Physiology*, 33, 541-553.
- Mohan, B.S., Hosetti, B.B., 1997. Potential phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* grown in sewage stabilization ponds. *Environmental Pollution*, 98, 233-238.
- Monteiro, M.S., Santos, C., Soares, A.M.V.M., Mann, R.M., 2009. Assessment of biomarkers of cadmium stress in lettuce. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 811-818.
- Nakano, Y., Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 22, 867-880.
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 249-279.
- Nussbaum, S., Schmutz, D., Brunold, C., 1988. Regulation of assimilatory sulfate reduction by cadmium in *Zea mays* L. *Plant Physiology*. 88, 1407-1410.
- Özdener, Y., Aydın, B., 2010. The effect of zinc on the growth and physiological and biochemical parameters in seedlings of *Eruca sativa* (L.) (Rocket). *Acta Physiologia Plantarum*, 32, 469-476.
- Pál, M., Horváth, E., Janda, T., Páldi, E., Szalai, G., 2006. Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 169, 239-246.
- Panda, S.K., Khan, M.H., 2003. Antioxidant efficiency in rice (*Oryza sativa* L.) leaves under heavy metal toxicity. *Journal of Plant Biology*, 30, 23-29.
- Perl-Treves, R. Perl, A., 2002. Molecular Oxygen and Its Reactive Derivates. (D. INZE and M. Van Montagu Eds.) *Oxidative Stress in Plants*. Taylor & Francis Inc., London, 1-31.
- Pilon, M., Abdel-Ghany, S.E, Cohu, C.M., Gogolin, K.A., Ye, H., 2006. Copper cofactor delivery in plant cells. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 256-263.
- Pinto, A.P., Mota, A.M., de Varennes, A., Pinto, F.C., 2004. Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. *Science of the Total Environment*, 326, 239-247.
- Polle, A., Otter, T., Seifert, F., 1994. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiology*, 106, 53-60.



- Posmyk, M.M., Kontek, R., Janas, K.M., 2009. Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 596–602.
- Prasad, M.N.V., Freitas, H.M., 2003. Metal hyperaccumulation in plants-biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6, 286-321.
- Pryor, W.A., 1994. Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung. *Free Radical Biology and Medicine*, 17, 451-465.
- Rama Devi, S., Prasad, M.N.V., 1998. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: Response of antioxidant enzymes and antioxidants. *Plant Science*, 138, 157-165.
- Rivetta, A., Negrini, N., Cocucci, M., 1997. Involvement of Ca<sup>+2</sup>-calmodulin in Cd<sup>+2</sup>-toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. *Plant, Cell and Environment*, 20, 600-608.
- Root, R. A., Miller, R. J., Koeppe, D. E., 1975. Uptake of cadmium-its toxicity and effect on the iron-to-zinc ratio in hydroponically grown corn. *Journal of Environmental Quality*, 4, 473-476.
- Sabehat, A., Lurie, S., Weiss, D., 1998. Expression of small heat-shock proteins at low temperatures. A possible role in protecting against chilling injuries. *Plant Physiology*, 117, 651-658.
- Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, N. P. B. A., Dushenkov, V., Ensley, B. D., Chet, I., Raskin, I., 1995. Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants, *Bio/Technology*, 13, 468-472.
- Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gómez, M., Romero-Puertas, M.C., del Río, L.A., 2001. Cadmium induces changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*, 52, 2115–2126.
- Sandalio, L.M., Rodríguez-Serrano, M, del Río, L.A., Romero-Puertas, M.C., 2009. Reactive oxygen species and signaling in cadmium toxicity. *Reactive Oxygen Species in Plant Signaling* . (Editörler: L.A. del Río ve A. Puppo), s: 175-189, Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
- Sanità di Toppi, L., Gabbrielli, R., 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 41, 105–130.
- Schat, H., Sharma S.S., Vooijs R., 1997. Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a nontolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiologia Plantarum*, 101, 477-482.
- Schützendübel, A., Polle, A., 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1351-1365.

- Seregin, I. V., Ivanov, V.B., 2001. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 48, 523-544.
- Sgherri, C., Milone, M.T.A., Clijsters, H., Navari-Izzo, F., 2001. Antioxidative enzymes in two wheat cultivars, differently sensitive to drought and subjected to subsymptomatic copper doses. *Journal of Plant Physiology*, 158, 1439–1447.
- Shah, K., Dubey, R.S., 1997. Effect of cadmium on proline accumulation and ribonuclease activity in rice seedlings: role of proline as a possible enzyme protectant. *Biologia Plantarum*, 40, 121-130.
- Sharma, S.S., Dietz, K.J., 2006. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*, 57, 711-726.
- Shaw, B.P., 1995. Effects of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedlings of *Phaseolus aureus*. *Biologia Plantarum*, 37, 587-596.
- Shikanai, T., Müller-Moulé, P., Munekage, Y., Niyogi, K.K., Pilon, M., 2003. PAA1, a P-Type ATPase of *Arabidopsis*, functions in copper transport in chloroplasts. *The Plant Cell*, 15, 1333-1346.
- Sharma, P., Dubey, R.S., 2007. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Reports*, 26, 2027-2038.
- Sharma, S.S., Dietz, K.-J., 2008. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Science*, 14, 43-50.
- Shenker, M., Fan T.W.M., Crowley, D.E., 2001. Phytosiderophores influence on cadmium mobilization and uptake by wheat and barley plants. *Journal of Environmental Quality*, 30, 2091–2098.
- Siedlecka, A., Krupa, Z., 1996. Interaction between cadmium and iron and its effects on photosynthetic capacity of primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 34, 833-841.
- Singh, S., Eapen, S., D'Souza, S.F., 2006. Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere*, 62, 233-246.
- Singh, S., Singh, S., Ramachandran, V., Eapen, S., 2010. Copper tolerance and response of antioxidative enzymes in axenically grown *Brassica juncea* (L.) plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 1975-1981.
- Smeets, K., Cuypers, A., Lambrechts, A., Semane, B., Hoet, P., Laere, A.V., Vangronsveld, J., 2005. Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 437-444.

- Smirnoff, N., 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 125, 27-58.
- Smirnoff, N., 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany*, 78, 661-669.
- Smirnoff, N. and Wheeler, 2000. Ascorbic acid in plants: Biosynthesis and function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19, 267-290.
- Somashekaraiah, B.V., Padmaja, K., Prasad, A.R.K., 1992. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mungbean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiologia Plantarum*, 85, 85-89.
- Song, J., Zhao, F.-J., Luo, Y.-M., McGrath, S.P., Zhang, H., 2004. Copper uptake by *Elsholtzia splendens* and *Silene vulgaris* and assessment of copper phytoavailability in contaminated soils. *Environmental Pollution*, 128, 307-315.
- Södergren, E. 2000. Lipid peroxidation in vivo. Evaluation and application of methods for measurement. *Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine* 949. 78 pp. Uppsala. ISBN 91-554-4791-0.
- Song, X.S., Hai Hu, W., Hua Mao, W., Ogwena, J.S., Zhou, Y.H. and Quan Yu, J., 2005. Response of ascorbate peroxidase isoenzymes and ascorbate regeneration system to abiotic stresses in *Cucumis sativus* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 1082-1088.
- Song, A., Li, Z., Zhang, J., Xue, G., Fan, F., Liang, Y., 2009. Silicon-enhanced resistance to cadmium toxicity in *Brassica chinensis* L. is attributed to Si-suppressed cadmium uptake and transport and Si-enhanced antioxidant defense capacity. *Journal of Hazardous Materials* 172, 74-83.
- Sonoike, K., 1996. Photoinhibition of photosystem I: its physiological significance in the chilling sensitivity of plants. *Plant Cell Physiology*, 37, 239-247.
- Srivastava, S., Mishra, S., Tripathi, R.D., Dwivedi, S. ve Gupta, D.K., 2006. Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Aquatic Toxicology*, 80, 405-415.
- Stresty, T. V. S. and Madhava Rao, K.V., 1999. Ultrastructural alterations in response to zinc and nickel stress in the root cell of pigeonpea. *Environmental and Experimental Botany*, 41, 3-13.
- Sun, R.L., Zhou, Q.X., Sun, F.H., Jin C.X., 2007. Antioxidative defense and proline/phytochelatin accumulation in a newly discovered Cd-hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. *Environmental and Experimental Botany*, 60, 468-476.
- Szabados, L., Savoure, A., 2009. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15, 89-97.

- Quan, L.-J., Zhang, B., Shi, W.-W., Li, H.-Y., 2008. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50, 2-18.
- Quartacci, M.F., Pinzino, C., Sgherri, C.L.M., Dalla Vecchia, F., Navari-Izzo, F., 2000. Growth in excess copper induces changes in the lipid composition and fluidity of PSII-enriched membranes in wheat. *Physiologia Plantarum*, 108, 87-93.
- Tanyolaç, D., Ekmekçi, Y., Ünalın, Ş., 2007. Changes in photochemical and antioxidant enzyme activities in maize (*Zea mays* L.) leaves exposed to excess copper. *Chemosphere*, 67, 89-98.
- Teisseire, H., Guy, V., 2000. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). *Plant Science*, 153, 65-72.
- Tiryakioğlu, M., Eker, S., Özkutlu, F., Husted, S., Çakmak, İ., 2006. Antioxidant defence system and cadmium uptake in barley genotypes differing in cadmium tolerance. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 20, 181-189.
- Upadhyay, R.K., Panda, S.K., 2009. Copper-induced growth inhibition, oxidative stress and ultrastructural alterations in freshly grown water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). *Comptes Rendus Biologies*, 332, 623-632
- Upadhyay, R.K., Panda, S.K., 2010. Zinc reduces copper toxicity induced oxidative stress by promoting antioxidant defense in freshly grown aquatic duckweed *Spirodela polyrhiza* L. *Journal of Hazardous Materials*, 175, 1081-1084.
- Uysal, D., 2007. Buğdayda, kök büyümesi ve antioksidatif enzim aktivitesi üzerine alüminyum stresinin etkisi. Yüksek Lisans, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 49.
- Varnova, E., Van Breusegerm, F., Dat, J., Belles-Bolx D. E., 2002. Role of reactive oxygen species in signal transduction. pp. 41-73. In: D. Scheel and C. Wasternack [eds.] . *Plant Signal Transduction*. Oxford University Press, UK.
- Vas, I., Styring, S., 1993. Characterization of chlorophyll triplet promoting states in photosystem II sequentially induced during photoinhibition. *Biochemistry*, 32, 3334-3341.
- Verkleij, J.A.C., Koevoets, P., Van riet, J., Bark, R., Mijdam, Y., Ernst, W.H.O., 1990. Poly(g-glutamylcysteinyl)-glycines or phytochelatins and their role in cadmium tolerance of *Silene vulgaris*. *Plant, Cell and Environment*, 13, 913- 921.
- Verkleij, J.A.C, Schat, H., 1990. Mechanisms of metal tolerance in higher plants. In: Show, J. (Ed.), *Evolutionary Aspects of Heavy Metal Tolerance in Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 179-193.

- Verma, S., Dubey, R.S., 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*, 164, 645-655.
- Verma, K., Shekhawat, G.S., Sharma, A., Mehta, S.K. ve Sharma, V., 2008. Cadmium induced oxidative stress and changes in soluble and ionically bound cell wall peroxidase activities in roots of seedlings and 3-4 leaf stage plants of *Brassica juncea* (L.) czern. *Plant Cell Reports*, 27, 1261-1269.
- Vögeli-Lange, R., Wagner, G.J., 1996. Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. *Plant Physiology*, 92, 1086–1093.
- Wagner, G.J., 1993. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Advances in Agronomy*, 51, 173-212.
- Wang, S-H., Yang, Z-M., Yang, H., Lu, B., Li, S-Q., Lu, Y-P., 2004. Copper-induced stress and antioxidative responses in roots of *Brassica juncea* L. *Botanical Bulletin in Academia Sinica*, 45, 203–212.
- Wang, X., Shi, G., Xu, Q., Hu, J., 2007. Exogenous polyamines enhance copper tolerance of *Nymphoides peltatum*. *Journal of Plant Physiology*, 164, 1062-1070.
- Weckx, J.E.J., Clijsters, H.M.M., 1996. Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as a result of root assimilation of toxic amounts of copper. *Physiologia Plantarum*, 96, 506–512.
- Wu, Y., Chen, Y., Yi, Y., Shen, Z., 2009. Responses to copper by the moss *Plagiomnium cuspidatum*: Hydrogen peroxide accumulation and the antioxidant defense system. *Chemosphere*, 74, 1260-1265.
- Xu, P., Zou, J., Meng, Q., Zou, J., Jiang, W., Liu, D., 2008. Effects of Cd<sup>2+</sup> on seedling growth of garlic (*Allium sativum* L.) and selected physiological and biochemical characters. *Bioresource Technology*, 99, 6372–6378.
- Yadav, S.K., 2010. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 76, 167-179.
- Yruela, I., 2005. Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 145-156.
- Zengin, F.K., 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, 1-10.
- Zhang, H., Xia, Y., Wang, G., Shen, Z., 2008. Excess copper induces accumulation of hydrogen peroxide and increases lipid peroxidation and total activity of copper-zinc superoxide dismutase in roots of *Elsholtzia haichowensis*. *Planta*, 227, 465-475.

**ÖZGEÇMİŞ**

**Adı Soyadı** : Emel DEMİR

**Doğum Yeri** : Çarşamba

**Doğum Tarihi** : 01.12.1979

**Medeni Hali** : Evli

**Yabancı Dili** : İngilizce

**Eğitim Durumu** :

- Atatürk Anadolu Lisesi- (1993–1997)
- Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü – (1998–2002)
- Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü – (2002-2005)

**Çalıştığı Kurumlar** :

- Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ordu Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü – (2002–2006)
- Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü – (2006–.....)

**İletişim Bilgileri** :

GSM Tel : 0 505 624 56 48

e-mail : edemir@omu.edu.tr

Adres : Cumhuriyet Mahallesi 42. Sokak No:15 55300 Atakum / SAMSUN