T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# KADMİYUM STRESİ ALTINDA YETİŞTİRİLEN BUĞDAYDA EKZOJEN MOLİBDEN UYGULAMASININ TOLERANS, BÜYÜME VE KLOROPLASTİK ANTİOKSİDANLAR ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

**Büşra ZENGİN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Mayıs-2019**
**KONYA**
**Her Hakkı Saklıdır**

# ÖZET

## YÜKSEK LİSANS TEZİ

## KADMİYUM STRESİ ALTINDA YETİŞTİRİLEN BUĞDAYDA EKZOJEN MOLİBDEN UYGULAMASININ TOLERANS, BÜYÜME VE KLOROPLASTİK ANTİOKSİDANLAR ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

**Büşra ZENGİN**

**Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**
**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Doç. Dr. Evren YILDIZTUGAY**

**2019, 105 Sayfa**

**Jüri**
**Prof.Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK**
**Doç.Dr. Evren YILDIZTUGAY**
**Doç.Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI**

Bu tez çalışmasında, 150 ve 300 µM Cd (kadmiyum) stresine maruz bırakılan ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.)'da 0.15 ve 0.3 mM ekzojen Mo (molibden) uygulamalarının tolerans, büyüme ve kloroplastik antioksidanlar üzerindeki etkilerini belirlemek amaçlanmıştır. Artan Cd düzeyleri bağıl su içeriği (RWC), ozmotik potansiyel ve fotosentetik verim (Fv/Fm) miktarında önemli azalmalara neden olmuştur. En fazla azalma oranı 300 µM Cd uygulamasıdır. Aşırı Cd uygulaması prolin miktarını değiştirmemiştir. Mo uygulaması, Cd stresiyle tetiklenen bu parametreler üzerindeki olumsuz etkileri azaltmıştır. Bu parametrelere ilaveten Cd uygulaması kontrol grubuna göre sadece SOD (süperoksit dismutaz), POX (peroksidaz) aktivitelerini ve TBARS (lipid peroksidasyonu) miktarını artırmıştır. Cd stresinden dolayı hidrojen peroksit ($H_2O_2$) miktarında birikme olmuştur. Ayrıca Cd uygulanan bitkilere 0.15 mM Mo ilavesi POX, monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), askorbat peroksidaz (APX), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) ve glutatyon redüktaz (GR) aktivitelerini artırırken; 0.3 mM Mo SOD, POX, MDHAR, APX, DHAR ve GR aktivitelerini artırmıştır. Molibden Cd stresi altındaki buğdayda $H_2O_2$ ve lipid peroksidasyon seviyelerini azaltarak membran bütünlüğünün korunmasını sağlamıştır. Sonuç olarak; molibden uygulaması, Cd stresine maruz kalan bitkilerde oluşan oksidatif hasarın etkilerini iyileştirerek önemli bir role sahip olmuş ve ilk defa çalışılarak bilim dünyasının hizmetine sunulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Ağır metal stresi, antioksidan enzimler, buğday (*Triticum aestivum* L), kadmiyum (Cd), molibden (Mo), oksidatif stres

# ABSTRACT

## MS THESIS

## EFFECTS OF EXOGENOUS MOLYBDENUM APPLICATION ON TOLERANCE, GROWTH AND CHLOROPLASTIC ANTIOXIDANTS IN WHEAT GROWN UNDER CADMIUM STRESS

**Büşra ZENGİN**

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY**
**THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE**
**DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY**

**Advisor: Assoc. Prof. Dr. Evren YILDIZTUGAY**

**2019, 105 Pages**

**Jury**
**Prof.Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK**
**Assoc.Prof.Dr. Evren YILDIZTUGAY**
**Assoc.Prof.Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI**

In this study, it was aimed to determine the effects of 0.15 and 10 mM exogenous Mo (molybdenum) applications on tolerance, growth and chloroplastic antioxidants in wheat (*Triticum aestivum* L.) subjected to 150 and 300 µM Cd (cadmium) stress. Increasing Cd levels caused significant decreases on the relative water content (RWC), osmotic potential and photosynthetic yield (Fv/Fm). The highest reduction rate was in the 300 µM Cd application. Excess Cd application did not change proline contetnt. Mo treatment decreased negative effects on these parameters triggered by cadmium stress. In addition to these parameters, Cd application increased only the activities of SOD (superoxide dismutase), POX (peroxidase) and TBARS (lipid peroxidation) contents compared to the control group. Due to Cd stress, $H_2O_2$ (hydrogene peroxide) content accumulated. Besides, while the addition of 0.15 mM Mo to the Cd applied plants increased the activities of POX (peroxidase), MDHAR (monodehydroascorbate reductase), APX (ascorbate peroxidase), DHAR (dehydroascorbate reductase) and GR (glutathione reductase) activities, 0.3 mM Mo increased the activities of SOD, POX, MDHAR, APX, DHAR and GR. Mo provided the protection of membrane integrity reducing levels of $H_2O_2$ and lipid peroxidation in wheat under Cd stress. As a result, Mo application has an important role in amelioration of the effects of oxidative damage in the plants exposed to Cd stress and has been presented to the scientific world for the first time.



**Keywords:** Heavy metal stress, antioxidant enzymes, wheat (*Triticum aestivum* L.), cadmium (Cd), molybdenum (Mo), oxidative stress

# ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca engin bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, desteğini benden esirgemeyen, çalışmalarıyla ve azmiyle bana şevk veren değerli danışman hocam Sayın Doç.Dr. Evren YILDIZTUGAY'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar imkanlarını bana sunan, hoşgörüsünü ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen kıymetli hocam Sayın Prof.Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK ile tezime katkılarından dolayı sayın Doç.Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI'ya teşekkür ederim. Tez çalışmamın hazırlanmasında, denemelerin kurulmasında ve analiz süreçlerinde yanımda olan değerli büyüğüm Zir.Yük.Müh. Ramazan KELEŞ'e, arkadaşlarım Arş. Gör. Duygu BERDİ ve Fevzi ELBASAN'a teşekkürü bir borç bilirim. Eğitim hayatım boyunca sevgi, sabır ve anlayış ile desteklerini gördüğüm, her zaman yanımda olan annem Öğr.Gör.Dr. Özlem ZENGİN ve babam Prof.Dr. Mehmet ZENGİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Büşra ZENGİN
KONYA-2019

# İÇİNDEKİLER

**ÖZET** ..... **iv**

**ABSTRACT** ..... **v**

**ÖNSÖZ** ..... **vi**

**SİMGELER VE KISALTMALAR** ..... **xii**

**1. GİRİŞ** ..... **1**

**2. KAYNAK ARAŞTIRMASI** ..... **8**

2.1. Kadmiyumun Bitkiler Üzerine Zararlı Etkileri ..... 13
2.2. Molibden ..... 15
2.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşumu ..... 18
2.3.1. Süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) radikali ..... 20
2.3.2. Hidrojen peroksit ($H_2O_2$) ..... 21
2.3.3. Hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) ..... 21
2.4. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Üretim Yerleri ..... 22
2.4.1. Kloroplastlarda ROS oluşumu ..... 22
2.4.2. Mitokondrilerde ROS oluşumu ..... 25
2.4.3. Peroksizomlarda ROS Oluşumu ..... 25
2.4.4. Apoplast ..... 26
2.4.5. Plazma Zarları ..... 26
2.4.6. Hücre Duvarları ..... 27
2.4.7. Endoplazmik Retikulum ..... 27
2.5. Reaktif Oksijen Türlerinin Hücresel Lipid Yapıları Üzerine Etkisi ..... 27
2.6. Bitkilerin Reaktif Oksijen Türlerinden Korunmada Antioksidan Savunma Mekanizmaları ..... 28
2.6.1. Reaktif oksijen türlerine karşı enzimatik antioksidanlar ..... 29
2.6.2. Reaktif oksijen türlerine karşı enzimatik olmayan antioksidanlar ..... 36

**3. MATERYAL VE YÖNTEM** ..... **39**

3.1. Bitki Materyalinin Temini ve Saklanması ..... 39
3.2. Denemenin Kurulması ..... 39
3.3. Fizyolojik Ölçümler ..... 40
3.3.1. Yaprakların nisbi su içerikleri ..... 40
3.3.2. Yaprakların ozmotik potansiyel değişimleri ..... 40
3.3.3 Klorofil Flüoresans Ölçümleri ..... 41
3.4. Buğday Yapraklarında Gerçekleştirilen Biyokimyasal Parametre Ölçümleri ..... 41
3.4.1. Kloroplast izolasyonu ..... 42
3.4.2. Lipid peroksidasyon oranlarının belirlenmesi ..... 42
3.4.3. Hidrojen peroksit içeriklerinin belirlenmesi ..... 43
3.4.4. Prolin değişimlerinin belirlenmesi ..... 43
3.4.5. Antioksidan enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesi ..... 43
3.5. İstatistiksel Analizler ..... 46

**4.ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA ..... 47**

4.1. Büyüme Parametrelerinde Meydana Gelen Değişimler ..... 47
4.1.1. Yaprakların bağıl su içerikleri ..... 47
4.1.2. Ozmotik potansiyellerde meydana gelen değişimler ..... 48
4.2. Klorofil Flüoresans Ölçümleri ..... 50
4.3. Buğday Yapraklarında Gerçekleştirilen Biyokimyasal Analizlerin Sonuçları ..... 51
4.3.1. Prolin içeriği ..... 51
4.3.2. Yaprakların hidrojen peroksit içeriklerinde meydana gelen değişimler ..... 52
4.3.3. Lipid peroksidasyon seviyeleri ..... 54
4.3.4. Antioksidan enzim aktivite sonuçları ..... 56

**5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER ..... 69**

5.1. Sonuçlar ..... 69
5.2. Öneriler ..... 71

**KAYNAKLAR ..... 73**

**ÖZGEÇMİŞ ..... 93**

# ŞEKİLLER

**Şekil 3.1.** 21 gün süresince su kültüründe yetiştirilen buğday (*Triticum aestivum* L.) fidelerinin genel görünümü..... 40
**Şekil 4.1.** Kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında molibden uygulamalarının yaprak nisbi su içeriklerinde (RWC) meydana getirdiği ortalama % değişimler (n=5). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir (P< 0.05).. ..... 49
**Şekil 4.2.** Kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında molibden uygulamalarının ozmotik potansiyelde meydana getirdiği ortalama değişimler (MPa) (n=5). Sütunlar üzerindeki aynı harfler istatistiksel olarak aynı olan değerleri göstermektedir (P>0.05). ..... 49
**Şekil 4.3.** Kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında molibden uygulamalarının maksimum kuantum verimi (Fv/Fm)'nde meydana getirdiği ortalama değişimler (n=5). Sütunlar üzerindeki aynı harfler istatistiksel olarak aynı olan değerleri göstermektedir (P>0.05). ..... 50
**Şekil 4.4.** Kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında molibden uygulamalarının yaprak prolin (µmol $g^{-1}$ FW) içeriklerinde gözlenen ortalama değişimler (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir (P<0.05). ..... 51
**Şekil 4.5.** Kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında molibden uygulamalarının $H_2O_2$ içeriklerinde meydana getirdiği değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir (P<0.05)..... 53
**Şekil 4.6.** Kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında molibden uygulamalarının TBARS içeriklerinde (nmol $g^{-1}$ YA) meydana getirdiği değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir (P<0.05) ..... 54
**Şekil 4.7.** Kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında molibden uygulamalarının kloroplastik SOD izozimlerinde (a) ve total SOD (U $mg^{-1}$ protein) aktivitelerinde (b) meydana gelen değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir (P<0.05)..... 57
**Şekil 4.8.** Kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında molibden uygulamalarının yaprak POX izozimlerinde (a) ve total POX (U $mg^{-1}$ protein) aktivitelerinde (b) meydana gelen değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir (P<0.05)..... 59
**Şekil 4.9.** Kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında molibden uygulamalarının yaprak total APX (U $mg^{-1}$ protein) aktivitelerinde meydana gelen değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir (P<0.05). ..... 61
**Şekil 4.10.** Kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında molibden uygulamalarının GR (U mg-1 protein) aktivitelerinde meydana getirdiği değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir (P<0.05) ..... 62
**Şekil 4.11.** Kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında molibden uygulamalarının MDHAR (µmol $mg^{-1}$ protein) aktivitelerinde meydana getirdiği değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir (P<0.05) ..... 64
**Şekil 4.12.** Kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında molibden uygulamalarının DHAR (µmol $mg^{-1}$ protein) aktivitelerinde meydana getirdiği değişimler (n=4). Sütunlar

üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir (P<0.05) ..... 65
**Şekil 4.13.** Kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında molibden uygulamalarının yaprak NOX izozimlerinde (a) ve total NOX (U $mg^{-1}$ protein) aktivitelerinde (b) meydana gelen değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir (P<0.05)..... 67

# ÇİZELGE

**Çizelge 1.** Temel endüstrilerden atılan metal türleri. ..... 4
**Çizelge 2.** Kloroplastlarla ilgili başlıca ROS üreticileri ve temizleyicileri ..... 22
**Çizelge 3.** ROS'un kloroplastlarda moleküler hedefler üzerindeki hasar etkileri ..... 23
**Çizelge 4.** Bitkilerde ROS oluşumu, lokalizasyonu ve uzaklaştırılması. ..... 24
**Çizelge 5.** Bitkisel enzimatik antioksidanlar ..... 29

## SİMGELER VE KISALTMALAR

**Simgeler**
%: Yüzde
$CO_2$: Karbondioksit
$H_2O_2$: Hidrojen peroksit
$LOO^{\bullet}$: Lipid peroksil radikali
$O_2$: Oksijen
$O_2^{\bullet-}$: Süperoksit anyonu
$OH^{\bullet}$: Hidroksil radikali
$RO^{\bullet}$ : Alkoksil
$ROO^{\bullet}$ : Peroksil

**Kısaltmalar**
AsA: Askorbik asit
APX: Askorbat peroksidaz
CAT: Katalaz
$CdCl_2$: Kadmiyum klorür
DHA: Dehidroaskorbat
DHAR: Dehidroaskorbat redüktaz
Fv/Fm: Maksimum kuantum verimi
GPX: Glutatyon peroksidaz
GR: Glutatyon redüktaz
GSH: Glutatyon
GST: Glutatyon S-transferaz
KA: Kuru ağırlık
KCN: Potasyum siyanür
MDA: Malondialdehit
MDHAR: Monodehidroaskorbat redüktaz
mM: Milimolar
Mo: Molibden
NBT: Nitro blue tetrazolium
NOX: NADPH oksidaz
POX: Peroksidaz
Pro: Prolin
PSI: Fotosistem I
PSII: Fotosistem II
ROS: Reaktif oksijen türleri
RWC: Nispi su içeriği
SOD: Süperoksit dismutaz
TA: Turgorlu ağırlık
TBARS: Lipid peroksidasyon
YA: Yaş ağırlık
µg: Mikrogram
µM: Mikromolar

# 1. GİRİŞ

Doğaları gereği canlılar, dış çevre ile devamlı ilişki içerisindedirler. Bulundukları çevrede uygun olmayan şartların oluşması halinde adaptasyon eksikliğine bağlı olarak stres koşullarına maruz kalırlar. Bir bitkinin büyüme ve gelişmesini negatif yönde etkileyecek düzeyde çevre şartlarının değişmesi ile bitkide meydana gelen duruma stres denir. Bir başka ifade ile bitki üzerinde olumsuz etkilere sahip olan dış faktörler olarak tanımlanır (Büyük ve ark., 2012). Bitkisel üretimde stres; abiyotik (ağır metaller, tuzluluk, kuraklık, düşük ve yüksek sıcaklık, besin elementlerinin eksikliği veya fazlalığı, hava kirliliği, radyasyon gibi) ve biyotik (hastalık oluşturan fungus, bakteri, virüs vb. zararlılar) kökenli etmenlerden dolayı bitkinin büyüme ve gelişmesinde olumsuzluklara yol açar. Dolayısıyla verim düşüklüğü ile sonuçlanan bir dizi gerilemeye neden olur (Ashraf ve Wu, 1994).

Çevre kirliliği, endüstrileşme ve kentleşmenin doğada meydana getirdiği en önemli sorunlardan birisi olarak görülmektedir (Bayçu, 1997). Son zamanlarda madenlerin, kimya ve metal fabrikalarının yaygın olarak kullandıkları metal içeren mantar ilaçları ve ahşap koruyucular ile büyük sanayi komplekslerinin yaymış olduğu gaz ve tozların, toprağı ve bitkileri kirlettiği belirlenmiştir (Peterson, 1993). Ülkemizin hızla sanayileşmesi ve gün geçtikçe artan trafik yoğunluğuna maruz kalması ağır metallerin de çevredeki miktarlarını arttırmaktadır. Bu durum özellikle aktif hareket etme kabiliyeti olmayan bitkilerde öncelikle ürün kaybı olmak üzere pek çok olumsuzluğa sebep olmaktadır (Munzuroğlu ve Gür, 2000). Bu nedenle bu tür ağır metal kirliliği görülen topraklar üzerinde farklı ıslah çalışmaları uygulanarak verimliliğin yükseltilmesine yönelik yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Geiger ve ark., 1993).

Eser miktarları dahi zararlı olabilen maddeler içerisinde en önemli grubu ağır metaller olarak adlandırılan Cd, Cr, Cu, Pb, Hg, Zn, Mn gibi elementler oluşturmaktadır (Kocataş, 2003). İster doğal, ister insan aktiviteleri sonucunda meydana gelen, ağır metallerin varlığı çevre açısından oldukça önemli bir tehlike oluşturmaktadır. Ağır metaller her gün fazla miktarda metal işlemesi yapılan endüstriyel aktiviteler sırasındaki işletme yetersizlikleri sonucu alıcı ortamlara boşaltılmaktadır. Endüstriyel aktivitelerin haricinde tarımsal faaliyetlerinde sebep olduğu metal kirliliği göz ardı edilemeyecek kadar önemlidir. Ağır metallerin meydana getirdiği en önemli sorun, besin zincirinde bu metallerin birikerek insana kadar ulaşmaları ve doğada kalıcı olmalarıdır (Gadd, 2000).

Ağır metaller yağış durumuna göre doğrudan toprağa gelip, oradan da bitkilere ve bazı koşullarda taban sularına ulaşır. Kısmende olsa yüzeysel akışla birlikte uzak çevreye yayılırlar (Yıldız, 2004).

Yüksek konsantrasyonlardaki kimi ağır metaller, bitkileri ve bitkiler ile beslenen hayvan ve insanları negatif yönde etkileyebilmektedirler. Kurşun (Pb), Krom (Cr) ve Nikel (Ni) topraklarda 10 - 100 mg/kg arasında, kadmiyum (Cd) ise 1 mg/kg'ın altında bulunuyor ise bu miktarlar normal seviyeler olarak kabul görmektedir. Çevresel kirleticiler olarak kurşun ve kadmiyum, insanlar ve hayvanlarda ciddi sağlık problemlerine yol açmaktadır. Topraklarda çözünebilen ağır metal konsantrasyonları: Cd için 1 mg/kg, bakır için 0.1 mg/kg, kobalt için 10 mg/kg, selenyum için 10 mg/kg, vanadyum için 0.5-1 mg/kg, nikel için 100 mg/kg'In üzerinde olduğu durumlarda toksik etkiler ortaya çıkabilmektedir (Yıldız, 2001). Ağır metaller içerisinde en şiddetli toksik etkiye sahip olanların Cd, Hg ve Pb olduğu belirtilmektedir (Çepel, 1997).

Ağır metallerin bitkilerin vejetatif organlarını makroskobik, mikroskobik ve fizyolojik olarak etkilediği görülmektedir. Bu olumsuz durumdan yalnız bitkilerin vejetatif organları etkilenmekle kalmayıp aynı zamanda generatif organlar ve doğada aktif yaşamlarını sürdüren bütün canlılar da etkilenmektedir. Doğada, ağır metallerin yayılımları göz önüne alındığı zaman, metallerin yayılmasına ve ekosisteme zarar vermesine daha ziyade insanların neden olduğu görüşü hakimdir. Kullanıma bağlı ve sürekliliği olan kirlenme, çevrede oldukça fazla ağır metal içeriğine ve yoğunluğuna neden olmaktadır. Bu yoğunluk sonucunda doğada bulunan bitkiler negatif yönde etkilenmektedir. Elde edilen ürünlerde sağlık açısından oldukça tehlike arz etmektedir (Okcu ve ark., 2009).

Kadmiyum genel olarak oldukça toksik bir element olarak kabul edilmiş ve çalışmalarda bitki gelişimi ve büyümesi üzerindeki olumsuz etkileri sıklıkla gözlenmiştir (Rubio ve ark., 1994; Watanabe ve Suzuki, 2002; Maksymiec ve Krupa, 2006). Bitkilerde Cd toksisitesinin başlıca semptomları yaprak klorozu, yaprak ve kök nekrozu ve büyümede genel bir azalmadır (Hernández ve Cooke, 1997). Farklı bitki türleri üzerine yapılan çalışmalar, Cd'un potansiyel olarak fitotoksik olduğunu, büyüme inhibisyonuna ve hatta ölüme neden olduğunu göstermiştir.

Kimyasal gübrelerin, çamurun ve kanalizasyon suyunun, atmosferik birikimin değiştirilmesi nedeniyle toprakta daha fazla kadmiyum bulunmaktadır (McLaughlin ve ark., 1999; Adams ve ark., 2004; Ranieri ve ark., 2005). Bu artan bir sorundur çünkü topraktaki Cd bitkilere aktarılabilir, bu da besin zincirinde hayvan ve insan sağlığına

yönelik fitotoksisiteye ve tehditlere neden olabilir (Wagner, 1993). Çeşitli araştırmacılar Cd'un biyolojik sistemler üzerindeki toksik etkilerini gözlemlemişlerdir. Bitkilerde Cd toksisitesinin bazı genel belirtileri; büyüme inhibisyonu, kloroz ve farklı dokularda anatomik, morfolojik, fizyolojik veya biyokimyasal değişimlerin görülmesidir (Rubio ve ark., 1994; Watanabe ve Suzuki, 2002; Maksymiec ve Krupa, 2006). Fitotoksik metallerin birikimi endüstriyel ve tarımsal uygulamalardan kaynaklanmaktadır. Zn, Cu ve Cd, bodur büyüme, kloroz ve nekroz ile sonuçlanan yaygın kirleticilerdir (Özcan ve ark., 2004).

Topraktaki nispeten küçük bir Cd artışı, bitki mahsulünde önemli bir oranda azalmaya neden olabilir (Sauerbeck, 1991). Kadmiyum ile kirlenmiş topraklarda yetişen bitkilerde yüksek hareket kabiliyeti ve toprak kolloidleri için düşük afinite nedeniyle hızla biriktiği bildirilmektedir (Alloway, 1995). Kirli topraklarda yetişen bitkilerin büyüme parametrelerindeki azalmanın çoğu, fotosentetik aktivitelerin azalmasına, bitki besleme yetersizliğine ve bazı enzimlerin azaltılmış aktivitesine bağlanabilir (Kabata-Pendias ve Pendias, 2001).

Bitki metabolik süreçleri için gerekli olmayan Cd, en potansiyel çevresel fitotoksik maddelerden biri olarak kabul edilir. Biyolojik yarı ömrünün (10-30 yıl) uzun olması nedeniyle canlı organizmalarda birikmektedir. Cd, sitotoksik, mutajenik ve kanserojendir. Endüstriyel emisyonların atmosferik birikimi, çamur ve fosfat gübrelerinin tarımsal ekosistemlere ve madenciliğe uygulanması, topraktaki Cd kaynaklarından bazılarıdır. Cd yüksek çözünürlüğe sahip olduğundan dolayı diğer toksik elementlerden çok daha düşük konsantrasyonlarda bile aktiftir (Hardiman ve ark., 1984).

Ağır metallerin çevreye yayınımındaki en önemli etken olan endüstriyel faaliyetler; çimento üretimi, termik santraller, cam üretimi, demir çelik sanayi, çöp ve atık çamur yakma tesisleridir. Ağır metaller endüstriyel atık sularının içme sularına karışmasıyla veya ağır metal içeren partiküllerin tozlaşmasıyla bitki, hayvan ve insanlar üzerinde olumsuz etkiye neden olurlar. Temel endüstrilerden atılan metal türleri çizelge 1'de verilmiştir.

**Çizelge 1.** Temel endüstrilerden atılan metal türleri (Rether, 2002).

| Endüstri | Cd | Cr | Cu | Hg | Pb | Ni | Sn | Zn |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Kağıt Endüstrisi | - | + | + | + | + | + | - | - |
| Petrokimya | + | + | - | + | + | - | + | + |
| Klor-Alkali Üretimi | + | + | - | + | + | - | + | + |
| Gübre Sanayi | + | + | + | + | + | + | - | + |
| Demir-Çelik Sanayi | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Enerji Üretimi (Termik) | + | + | + | + | + | + | + | + |

Ağır metaller, ROS üretimine sebebiyet vererek oksidatif hasar meydana getirirler. Bitkiler, oksidatif hasar oluşumunu en aza indirmek için bir dizi koruyucu sisteme sahiptirler. Bitkilerde ROS ile reaksiyona giren ve onları çok düşük seviyede tutan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POX), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) ve dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) gibi enzimleri içeren antioksidan savunma sistemleri mevcuttur (Nahakpam ve Shah, 2011). Bitkiler kadmiyum kaynaklı oksidatif hasarı azaltabilmek için farklı stratejiler benimserler. Antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırmak, bitkilerin strese karşı toleransını artırır (Sairam ve Srivastava, 2001; Sarkar ve ark., 2001; Gratao ve ark., 2006).

Bitkilerin yaşamlarını sürdürmeleri için gerekli olan elementlere "Bitki besin elementleri" denilmektedir. Bitki dokularından yapılan analizlerde doğada bulunan bütün elementleri hemen hemen görmek mümkündür. Bitkiler besin iyonları alımında seçici olsada, yetiştirme ortamında yarayışlı formda olan besin elementleri oranı arttıkça, pasif yollarla bitki bünyesine geçebilen bazı ağır metaller, bitkiler tarafından alınıp besin zincirine dahil olmaktadırlar. Bunun sonucunda ağır metaller hem bitkilere hem de bitkilerle beslenen insan ve hayvanlara toksik etki yapabilmektedirler. Çünkü bitkiler yetiştikleri ortamda mevcut olan elementleri, kendileri için gerekli olsun veya olmasın az da olsa bünyelerine almaktadırlar. Ancak bu elementlerden bütün bitkiler için 16 tanesi (C, H, 0, N, P, K, S, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu, B, CI ve Mo) mutlak gerekli olan besin maddeleridir. Diğer 6 elementte (Co, AI, Na, Si, Ni ve V) bazı bitkiler için gerekli olduğu kabul edilen yararlı elementlerdir (Yıldız, 2003).

Her besin elementinin bitki beslenmesindeki rolü farklıdır. Bu elementlerin dengeli bir şekilde bitkiye verilmesi gerekmektedir. Tarım için çok büyük bir önem arz eden bitkiler, besin elementlerini alırlarken dışarıdan bir takım olumsuzluklar ile karşı

karşıya kalırlar. Bu olumsuzluklar bitkinin hayati fonksiyonlarını sınırlamada önemli rol oynamaktadır (Okcu ve ark., 2009).

Bitkiler ihtiyaç duyulan besin elementlerinin büyük bir çoğunluğunu kökler tarafından almaktadırlar. Bu alım sırasında toprakta toksik ağır metaller var ise besin elementlerinin alımı sırasında ağır metallerde bitki bünyesine dahil olmaktadırlar. Alınan bu toksik metaller; başlıca solunum ve fotosentezdeki elektron transportunda bozulmalara, enerji ve mineral besin alınımının azaltılmasına ve büyümedeki gerilemelerin bir sonucu olarak hayati önem arz eden enzimlerin inaktivasyonuna yol açmaktadır (Özcan ve ark., 2004).

Sosyal ve ekonomik yapısı ne olursa olsun tarımın tüm ülkeler için beslenme açısından çok büyük önemi vardır. Dünya genelinde buğday (*Triticum aestivum* L.), başlıca insan gıdası olarak kullanılan en önemli tahıl ürünlerinden birisidir. 2018 yılında buğday üretimi dünyada 759.918 milyon ton olarak bildirilmektedir (AMIS, 2019). Türkiye'de ise 2018 yılı buğday üretimi 20 milyon tondur (TÜİK, 2019). Buğday genel itibariyle ılıman ve soğuk bölgelerde başarılı bir şekilde yetişebilmektedir. Çimlenme 4-37˚C arasında olup optimum sıcaklık isteği 12-25 ˚C'dir. Çimlenme ve kardeşlenme döneminde buğdayın sıcaklık isteği 5-10 $^{o}$C, nem ise % 60'dır. Buğday gelişmesinin ikinci devresi olan sapa kalkma döneminde ise 10-15 $^{o}$C sıcaklık ve % 65 oranında nispi nem ister. Buğdayın farklı bölgelere adaptasyonunda vernalizasyon ve fotoperiyod faktörleri önemlidir. Bu durum yazlık ve kışlık genotiplere göre değişim gösterir. Buğday bitkisi yıllık 350-1150 mm yağışa sahip olan iklim bölgelerinde yetişebilmektedir. Kalite ve verim açışından iyi bir ürün elde edebilmek için yıllık 500-600 mm yağış alan yerler idealdir. Buğday çok sayıda tür ve çeşit zenginliğine sahip olduğundan dolayı değişik toprak tiplerinde yetişebilmektedir. Genel itibariyle iyi bir buğday toprağı için; nötr pH'a sahip, organik madde miktarı çok olan, orta kireçli, killi-tınlı, koyu renkli, derin, geçirgen, taban suyu yüksek olmayan, taşsız-çakılsız, makro ve mikro besin elementlerince yeterli alüvyal veya kolüvyal toprak idealdir. Yaklaşık olarak bir buğday tanesinin bileşimi %11-12 su, % 11-13 protein, % 1-3 yağ, % 2-3 selüloz, % 1-2 kül ve %70 azotsuz ekstrakt maddelerden oluşur.

Dünyada temel besin maddesi olarak kullanılan en önemli tarım ürünlerinin başında gelen buğday fideleri, giderek artan ağır metal toksisitesinden olumsuz etkilenmektedir. Ağır metal çeşidine bağlı olarak büyüme, gelişme ve verimde büyük kayıplar ile karşılaşılmaktadır.

Molibden (Mo), bitki büyümesi için vazgeçilmez bir mikro besin elementidir ve aynı zamanda birçok fizyolojik sürecin yerine getirilmesinde önemli işlevlere sahiptir (Mendel ve Hänsch, 2002; Sun ve ark., 2009). Mo ayrıca çeşitli çevresel streslere toleransta önemli bir görev üstlenmektedir. Birçok çalışmada Mo, bitkilerde tuzluluk, düşük sıcaklık ve kuraklık stresine karşı abiyotik stres toleransının arttırılmasında ekzojen olarak uygulandığı bildirilmiştir (Sun ve ark., 2009; Zhang ve ark., 2012; Sun ve ark., 2014; Wu ve ark., 2014). Mo'nun, antioksidan sistemin aktivite artışına neden olduğu düşünülmektedir. Genellikle molibdenin; süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POX), katalaz (CAT) gibi enzimatik antioksidanlar ile askorbat, karotenoidler, prolin, glutatyon gibi nonenzimatik antioksidanların aktivitesini arttırdığı öne sürülmektedir (Nie ve ark., 2007). Son zamanlarda Mo, antioksidanlarla ilişkilendirilmiştir ve brokoli yapraklarının (Yang ve Chen, 2000), patates (Li ve Li, 2002), soya fasulyesi (Liu ve Yang, 2000) ve kışlık buğday (Sun ve Hu, 2006) Mo-gübre uygulamaları ile aktif oksijen metabolizması arasında yakın bir ilişki olduğu bildirilmiştir.

Asidik toprakta (pH <5.5), düşük sıcaklık ve yüksek azot (N) konsantrasyonu içeren topraklarda molibden mevcudiyeti azalır (Wang ve ark., 1995). Mo uygulaması, sebzelerin büyümesini ve verimini arttırır ve ayrıca askorbik asit, çözülebilir şeker ve klorofil konsantrasyonları gibi nitelikleri geliştirir ve nitrat konsantrasyonunun azalmasına neden olur (Zhao ve Bai, 2001; Chen ve ark., 2004). Mo eksikliği esas olarak nitrat redüktaz aktivitesiyle, özellikle de soğuk stresi (Yaneva ve ark., 1996; Yaneva ve ark., 2000), kuraklık stresi (AbdEl-Samad ve El-Komy, 2005) gibi çevresel stres ile ilişkilidir.

Topraktaki Mo eksikliği, kışlık buğdayın soğukta direncinin zayıflamasına neden olur. Mo, özellikle soğuk stresi ile kış buğdayında yaprak sararmasına ve hatta ölüme yol açtığı rapor edilmiştir (Wang ve ark., 1995). Diğer çalışmalar Mo gübresi uygulamasının kışlık buğdayın büyümesini, verimini, kalitesini ve soğuk direncini artırabileceğini göstermiştir (Yaneva ve ark., 1995; Vankova-Radeva ve ark., 1997; Hu ve ark., 1999; Li ve ark., 2001; Hu ve ark., 2002b; Sun ve ark., 2002).

Cd stresinin zararlı etkilerini kanıtlayan birçok rapor olmasına rağmen, stres koşulları altında kloroplastlarda meydana gelen değişim, kloroplastik antioksidanlar, fotosentetik aygıtların durumunu gösteren klorofil floresans ölçümleri, lipid peroksidasyonu, uyumlu bileşikler üzerine Mo'nun etkileri ve bunların altında yatan biyokimyasal temellere ait çalışmalar çok azdır. Bununla birlikte fotosentetik

aygıtlardaki fizyolojik ve biyokimyasal karakterler üzerine Cd stresinin zararlı etkilerinin hafifletilmesinde Mo uygulamalarının etkileri hakkında bilgi mevcut değildir. Bu tez çalışmasında, hidroponik olarak Mo uygulamalarının Cd stresine maruz bırakılan buğday kloroplastlarındaki fotosentetik mekanizmalar, antioksidan enzim aktiviteleri, uyumlu bileşikler ve su ilişkileri üzerine etkilerini araştırmak amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Bitki büyümesini engelleyen tüm faktörler stres olarak adlandırılmaktadır (Shannon ve Grieve, 1998). Dünyanın pek çok yerinde ağır metal, kuraklık, pH, tuzluluk, aşırı sulama, yüksek ve düşük sıcaklığın neden olduğu stresler yaygın olarak görülmektedir (Levitt, 1980; Ashraf ve Wu, 1994). Özellikle gelişmekte olan ülkeler için bu stresler ekonomik ve sosyal problemlere yol açmaktadır (Levitt, 1980; Gorham ve ark., 1985).

Bitkiler, elverişsiz ortamlardan kaçma kabiliyetine sahip değildir. Her koşulda, bitkiler genellikle su açığı veya fazlalığı, yüksek ışık, düşük veya yüksek sıcaklık, tuzluluk, ağır metaller, UV ışınları, böcek ve haşere saldırıları vb. gibi olumsuz çevre koşullarında büyümeye yönelik zorluklarla karşılaşırlar. Bu stresler, bir oksidatif stresin ortaya çıkması gibi birçok metabolik değişikliğe yol açarak, bitki büyümesi ve gelişmesi üzerinde olumsuz etkiler yaparlar (Hernández ve ark., 2004a; Hernández ve ark., 2004b; Díaz-Vivancos ve ark., 2008).

Ağır metal, kuraklık ve ısı maruziyeti gibi stres ortamları, bitkilerde ROS oluşumunu artırabilir ve ROS üretimi ile ortadan kaldırma arasındaki denge bozulursa oksidatif stres ortaya çıkar (Cho ve Seo, 2005). Antioksidanlar; hücresel hasarların engellenmesinde görev almaktadırlar. Bu savunmada görev alan enzimler patojenlerin sebep olacağı zararı minimum düzeye indirmektedirler (Koç ve Üstün, 2008).

Küresel mahsul yetmezliğinin başlıca nedeni olarak, abiyotik stresler ana mahsuller için ortalama verimi %50'den fazla azaltır (Tuteja ve ark., 2011). Abiyotik stresler büyüme, gelişme ve verimi etkiler. Tarımsal üretkenliği önemli ölçüde sınırlandırır. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini arttırarak hücresel fizyolojiyi ve bitki biyokimyasını bozar. Abiyotik stresler sırasında ROS üretimi; fotorespirasyon, fotosentetik aygıt ve mitokondriyal solunum gibi yollardan kaynaklanır. Ek olarak; patojenler, yaralar, kuraklık veya ozmotik stresinde NADPH oksidazları tarafından ROS üretimini aktive ettiği bildirilmiştir (HammondKosack ve Jones, 1996; Cazalé ve ark., 1999; Orozco-Cardenas ve Ryan, 1999; Pei ve ark., 2000).

Hayvansal organizmalarda olduğu gibi bitkilerde yaşamlarını sürdürebilmek için serbest radikallere ve ROS'lara karşı çeşitli antioksidanlara sahiptirler. Bunlar enzimatik olanlar ve enzimatik olmayanlar diye iki kısma ayrılırlar. Enzimatik olanların doğrudan ROS'ları temizleyen SOD, CAT, GPX ve peroksidazlar; antioksidanların aktif formlarının rejenarasyonunu sağlayan GR, dehidroaskorbat redüktaz ve

monodehidroaskorbat redüktaz; lipid peroksit ürünlerini etkisiz hale getiren glutatyon S-transferazlar (GST), askorbat peroksidaz, antioksidan moleküller olan tokoferoller, askorbat, glutatyon ve fenolik bileşiklerdir (Çaylak, 2011).

Bitkilerde serbest radikaller endojen olarak kloroplastlardaki fotosentez reaksiyonlarında, mitokondrilerdeki sitrik asit döngüsünde, plastid ve peroksizomlarda, hücre duvarı peroksidazları ve de amino oksidazlar gibi enzimlerin etkisiyle oluşurken (Van Camp ve ark., 1998; Van Breusegem ve Dat, 2006), ağır metaller, kuraklık, yüksek ve düşük ısı değerleri, UV ışık, beslenme noksanlıkları, yüksek derecede tuzlu ortam, yüksek ışık stresi hipoksi ise ekzojen serbest radikal kaynaklarıdır (Lamb ve Dixon, 1997; Gechev ve ark., 2003). Serbest radikallerin meydana getirdiği oksidatif stres; normal fonksiyona sahip olan hücre ve organizmalardaki moleküllerde enzimatik olmayan oksidatif hasarın birikimi ile karakterize olmuş durumu ifade etmektedir (Baskin ve Salem, 1997).

Ağır metaller enzim gibi önemli işlevsel moleküllerin fonksiyonel guruplarını bloke eder, gerekli iyonların taşınmasına engel olarak toksik etki gösterirler. Kadmiyum tiollerle ya da reaktif moleküllere karşı korunmada görevli enzimlerle, reaksiyona girmelerinin sonucu olarak serbest radikallerin oluşumunu tetikler. Kadmiyumun plazma membranındaki sülfidril grubu gibi organik ligantlara bağlanmak suretiyle membranda yapısal lezyonların oluşumunu tetiklediği öne sürülmektedir (Malik, 2004).

ROS'un farklı hücresel kısımlarda; mitokondri, kloroplast, peroksizomlar, sitoplazma veya farklı enzimlerin etkisiyle apoplast olarak bilinen hücre dışı alanda üretildiği kanıtlanmıştır (Gill ve Tuteja, 2010; Sandalio ve ark., 2013).

Kloroplastlar, yüksek oksijen konsantrasyonu, elektron akışı ve mikro çevrelerinde metal iyonlarının bulunması nedeniyle oksidatif strese karşı oldukça hassas hücre kompartmanlarıdır (Foyer, 1996). Fotosentetik elektron taşınımı, Fotosistem I (PS I)'de Mehler reaksiyonu ile moleküler oksijeni ($O_2$) azaltabilir ve daha sonra $O_2$ ve hidrojen peroksit ($H_2O_2$)'ye dönüştürülebilen reaktif bir oksijen türü olan süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$) üretilir. $H_2O_2$, birkaç biyomolekül ile reaksiyona girebilen ve bunlara zarar verebilecek güçlü bir oksidan olan yüksek oranda reaktif hidroksil radikalini ($OH^{\bullet}$) oluşturmak için Fenton reaksiyonu yoluyla indirgenmiş geçiş metal katyonları ile kolayca etkileşime girebilir (Takeda ve ark., 1995). Kloroplastlardaki bir diğer ROS kaynağı; rezonans transferiyle oluşturulan tekli oksijendir ($^1O_2$). Kloroplastlar, ROS'u etkili bir şekilde detoksifiye etmek için karmaşık ve hassas bir antioksidan savunma

sistemi geliştirmiş ve böylece oksidatif hasarın potansiyel olarak zararlı etkilerine karşı koruma sağlamıştır.

Kloroplastik antioksidan enzimin aktiviteleri genellikle stresli koşullar altında uyarılır ve bitkilerde artan stres direnci ile yakından ilişkilidir. Bu kavram, transgenik bitkilerin kloroplastlarında antioksidan enzimlerin aşırı üretiminin, birkaç strese karşı toleransı arttırdığı gerçeği ile kanıtlanmaktadır (Foyer ve ark., 1995; Wang ve ark., 2005; Logan ve ark., 2006).

Fotosentetik elektron taşıma sistemi, bitki dokularında başlıca aktif oksijen kaynağıdır (Foyer ve Mullineaux, 1994). Aktif oksijen üretimi, fotosentetik elektron taşıma zincirinin bir oksijen atmosferinde çalışmasının kaçınılmaz bir sonucudur. Fotosentez ile ilişkili başlıca oksijen tüketen süreçler: (a) ribuloz-l,5-bisfosfat karboksilazın oksijenaz reaksiyonu (Rubisco), bu ışık solunumu yolun başlatıcı reaksiyonu ve (b) moleküler oksijenin fotosistem I (PSI) elektron taşıma zinciri ile doğrudan azaltılmasıdır. Ek olarak, bazı fotosistem II (PSII) bileşenleride moleküler $O_2$'i yüksek enerjili tekli oksijen ('$0_2$)'e dönüştürebilmektedir. Fotosentetik elektron transportu ile elektronlar için yarışan kloroplastlarda siyanüre duyarsız bir solunum yolu görülür (Bennoun, 1994). Oksidatif stres esas olarak düzenlenmiş bir süreçtir, bitkinin kaderini belirleyen oksidatif ve antioksidatif kapasiteler arasındaki dengedir. Stresli olmayan koşullar altında antioksidan savunma sistemi, aktif oksijen ve serbest radikallere karşı yeterli koruma sağlar (Asada ve Takahashi, 1987). Bitkide görülen hem doğal hem de insan kaynaklı stres durumları, toksik oksijen türevlerinin üretimini artırır. Buna karşılık, antioksidatif savunma sisteminin kapasitesi artar (Foyer ve Mullineaux, 1994). Ayrıca, PSII (DI) reaksiyon merkezi proteini ve apoplastik alan gibi bazı önemli bölgelerin, oksidatif hasara karşı çok az korumaya sahip olduğu görülmektedir (Castillo ve Greppin, 1988; Luwe ve ark., 1993).

Toprakta bulunan metal konsantrasyonları, insan aktivitelerinin bir sonucu olarak veya toprağın jeolojik orjinine bağlı olarak 1mg/kg (ppm)'den 100.000 mg/kg'a kadar değişmektedir (Raskin ve Ensley, 2000). Cd, Cr, Cu, Ni ve Zn gibi toprakta bulunan bazı ağır metallerin fazla konsantrasyonları doğal su ve karasal ekosistemlerin bozulmasına neden olmaktadır (Gardea-Torresdey ve ark., 1996; Meagher, 2000). Bazı ağır metallerin düşük dozları bitkiler için önem arz eden mikro-elementlerdir ancak yüksek dozlar bitki türlerinin birçoğunun büyümesini engeller ve metabolik düzensizliğe sebep olabilir (Carlson ve ark., 1991; Fernandes ve Henriques, 1991). Kadmiyum (Cd), zirai toprağa fosfat gübre kontaminasyonu olarak eklenen zehirli

metallerden biridir (Wagner, 1993). Temiz su kıtlığı olduğunda sulama için kanalizasyon ve endüstriyel atık su kullanıldığında ağır metal kirliliği ortaya çıkmaktadır (Sanita di Toppi ve Gabbrielli, 1999; Jamali ve ark., 2007).

Ağır metaller pek çok organizmaya zarar verebilirler (Pinto ve ark., 2003). Ağır metaller çoğunlukla endüstriyel ve tarımsal faaliyetler sonucunda toprağa, havaya ve suya karışmaktadır. Ağır metaller toprağa, havaya ve suya karışma seviyesine göre yaşamsal ve yaşamsal olmayan olarak tanımlanır. Yaşamsal olarak tanımlananların organizma yapısında belirli bir derişimde bulunmaları gerekli iken, yüksek dozlarının insan sağlığına olumsuz etkileri olur (Kahvecioğlu ve ark., 2003). Yaşamsal olmayan ağır metaller (Hg, Cd ve Pb), başlangıç derişimlerinden itibaren toksik etki göstermekte olup oldukça düşük derişimlerde bile fizyolojik yapıyı etkileyerek sağlık problemlerine sebep olabilmektedir. Özellikle Hg ve Cd 0.001-0.1 ppm gibi çok düşük derişimlerde dahi toksik etkiye sahip olabilmektedirler (Järup, 2003). Ağır metaller organizmanın içine; ağız, solunum ve deri yolu ile alınabilmektedir. Organizmaya eser miktarlarda girmeleri dahi metabolizmadan dışarı çok yavaş atıldığından dolayı zamanla organizmada birikerek tehlikeli doza erişirler. Alındıkları yol, birikim yaptıkları dokunun türünü etkilemekle birlikte toksik etkilerinin yarattığı etkileride yönlendirmektedir (Wang ve Chen, 2006; Farooq ve ark., 2008). İnsanlarda kronik Cd zehirlenmesi olduğunda ortaya çıkan en önemli zarar prostat ve akciğer kanseridir. Kemik erimesi, diş dökülmesi, kansızlık ve koku duyusunun yitirilmesi başlıca etkilerindendir (Yağmur ve ark., 2003). Kadmiyum böbrek, akciğer ve gastrointestinal sistemi etkileyebilmektedir. Uzun süreli düşük dozlarda Cd teması kemik kaybına yol açmaktadır. Prenatal dönemde Cd teması olan hayvanlarda düşük doğum ağırlığı, iskelet anomalileri, davranış ve öğrenme problemleri gözlenmiştir (Petering ve ark., 1979; Barański, 1984; Ali ve ark., 1986).

Yüksek metal konsantrasyonunun neden olduğu doğrudan toksik etkilerin bazıları sitoplazmik enzimlerin inhibisyonunun ve oksidatif strese bağlı hücre yapılarının zarar görmesidir (Van Assche ve Clijsters, 1990; Jadia ve Fulekar, 2009). Ağır metallerden dolayı toprak üzerindeki mikroorganizmaların büyüme ve aktiviteleri üzerindeki olumsuz etkileride bitkilerin büyümesini dolaylı olarak etkileyebilir. Örneğin, yüksek metal konsantrasyonuna bağlı olarak yararlı toprak mikroorganizmalarının sayısındaki bir azalmaya neden olabilir. Bitki metabolizması için yararlı olan enzim aktiviteleri, toprak mikroorganizmalarının aktivitelerine ağır metal girişimi nedeniyle de engellenebilir. Bu toksik etkiler (hem doğrudan hem de

dolaylı), bitki büyümesinde, bazen bitkinin ölümüyle sonuçlanan bir düşüşe yol açabilir (Schaller ve Diez, 1991).

Mittova ve ark. (2002), ekilen domates *Lycopersicon esculentum* (Lem) ve onun yabani tuz toleranslı *L.pennellii* (Lpa) bitkisinin kloroplastik antioksidan sisteminin NaCl stresine tepkisini araştırmışlardır. Tuz stresine maruz kalan Lem'in kloroplastlarında hidrojen peroksit ($H_2O_2$) seviyesinde ve membran lipid peroksidasyonunda bir artış gözlenmiştir. Buna karşı, tuz stresine maruz kalan Lpa bitkilerinde bu oksidatif stres göstergelerinde bir azalma görüldü. Lem ve Lpa ile tuzluluk arasındaki bu fark, kloroplastlarındaki antioksidan enzimlerin aktiviteleriyle ilişkilidir. Tuzla muamele edilen Lem bitkilerinin kloroplastlarında toplam SOD aktivitesi biraz artmış olmasına rağmen, bu artış stromal Cu/Zn-SOD izozimlerinden kaynaklanmaktadır. Tersine, tuzla muamele edilmiş Lpa bitkilerinin kloroplastlarında Fe-SOD izoziminin aktivitesi artarken Cu/Zn-SOD aktivitesinde değişiklik olmamıştır. Bu veriler, Lem kloroplastların uğradığı tuza bağlı oksidatif stresin ve hasarın bir takım antioksidatif enzimlerin artışı ile Lpa kloroplastlarında etkili bir şekilde hafifletildiğini göstermektedir.

Wang ve ark. (2009), nikel (Ni) ile bulaşık olan toprak içinde yetiştirilen mısır (*Zea mays* L.) bitkilerinde kloroplastik antioksidan savunma sisteminin büyüme, fotosentez, oksidatif stres ve yanıtlarına, dışarıdan uygulanan salisilik asit (SA)'in etkisini araştırmak için bir saksı denemesi dizayn etmişlerdir. Sonuçlar, dışarıdan uygulanan SA'in kuru ağırlık, klorofil ve β-karoten içeriğindeki azalmayı ve Ni stresli mısırın net fotosentetik hızını önemli ölçüde düşürdüğünü ve SA'in bitkilerin Ni toksisitesi üzerinde bir hafifletici etkisi olduğunu göstermiştir. Ni stresine maruz kalan mısır kloroplastlarında meydana gelen oksidatif bir hasarı ortaya çıkaran süperoksit anyon oluşum hızı, $H_2O_2$ ve malondialdehit (MDA) içerikleri ve lipoksigenaz (LOX) aktivitesi önemli ölçüde artmışken, bu parametreler Ni stres altında SA ile muamele edilen bitkilerde belirgin şekilde düşürülmüştür. SA'in uygulanması, Ni stresli mısırın kloroplastlarındaki SOD, APX, MDHAR, DHAR, GR aktivitelerini ve indirgenmiş askorbat ve glutatyon içeriklerini önemli ölçüde artırmıştır. Dolayısıyla SA, kloroplastlarda antioksidan savunma sisteminin kapasitesini arttırarak oksidatif hasarı azaltmıştır.

Feng ve ark. (2009), fazla miktarda mangana (Mn) maruz kalan salatalık fidelerinde kloroplastın fotosentetik parametrelerini ve antioksidan enzimler üzerine silikonun (Si) etkilerini incelemişlerdir. Kontrol ile karşılaştırıldığında, aşırı Mn net

fotosentetik hızı (Pn), stomatal iletkenliği ve ayrıca fotosistem II'nin fotokimyasal tepkimelerinin maksimum verimi (Fv/Fm) ve fotosistem II elektron taşıma kuantum verimini (ΦPSII) önemli ölçüde inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Silikon fazlalığı Mn'ın olumsuz etkilerini tersine çevirmiştir. Si'nin uygulanması, fazla Mn tarafından uyarılan glutatyon peroksidaz enzim aktivitesini önemli ölçüde düşürmüştür. APX, DHAR ve GR gibi askorbat-glutatyon döngüsü ile ilgili enzimlerin aktivitelerinin, aşırı mangana maruz kalan salatalıklarda kloroplastik antioksidanlara silikon uygulaması ile büyük ölçüde arttığı görülmüştür.

Diao ve ark. (2014), domates (*Lycopersicon esculentum* Miller) cv. Jihe No. 9 (tuzluluğa dirençli bir çeşit) ve cv. Shuangfeng 87-5 (tuzluluğa duyarlı bir çeşit) çeşitlerinin NaCl (100 mM) stresi altındaki domates fidelerinde kloroplastların bitki büyümesine, klorofil floresans, fotosentetik oran ve antioksidan metabolizması üzerine dışarıdan uygulanan selenyumun (0.05 mM $Na_2SeO_3$) etkilerini araştırmışlardır. Tuz stresi altındaki domates fidelerine selenyum uygulanması bitki büyümesi, net fotosentetik hızı (Pn), PSII'nin maksimum kuantum verimi (Fv/Fm), PSII'nin gerçek fotokimyasal verimliliği (ΦPSII), fotokimyasal söndürme katsayısı (qP) ve fotokimyasal olmayan sönüm katsayısı (qN) üzerine stresin olumsuz etkilerini tersine çevirmiştir. Ayrıca, selenyum uygulaması, $H_2O_2$ ve malondialdehit düzeylerini önemli ölçüde azaltmıştır. Selenyum uygulaması, süperoksidaz dismutaz, glutatyon redüktaz, dehidroaskorbat redüktaz, monodehidroaskorbat redüktaz, glutatyon peroksidaz ve tioredoksin redüktaz aktivitelerini, askorbat, glutatyon (GSH) ve NADPH içeriklerini ve her iki çeşitte de tuz stresli kloroplastlarda GSH/GSSG, AsA/DHA ve $NADPH/NADP^+$ oranlarını indüklemiştir. Bu sonuçlar selenyumun, domates fidelerinin kloroplastlarındaki antioksidan savunma sistemlerini düzenleyerek PSII'nin fotokimyasal verimliliğinin iyileştirilmesi ile bağlantılı olarak tuza bağlı oksidatif hasarı azalttığını ve dolayısıyla daha yüksek fotosentetik oranları koruduğunu düşündürmektedir. Buna ek olarak, Jiahe No. 9'un tuz toleransı, yüksek reaktif oksijen türü temizleme aktivitesi ve kloroplastlarda enerji seviyelerini düşürme ile yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir.

## 2.1. Kadmiyumun Bitkiler Üzerine Zararlı Etkileri

Kimyasal gübreler, çamur ve kanalizasyon sulaması ve atmosferik çökelme nedeniyle toprakta daha fazla kadmiyum bulunur (McLaughlin ve ark., 1999; Adams ve

ark., 2004; Ranieri ve ark., 2005). Bu artan bir sorundur çünkü topraktaki kadmiyum bitkilere aktarılabilir, bu da besin zincirinde hayvan ve insan sağlığına yönelik fitotoksisite ve tehditlere neden olur (Wagner, 1993). Çeşitli araştırmacılar, Cd'nin biyolojik sistemler üzerindeki toksik etkilerini gözden geçirdiler; bitkilerde Cd toksisitesinin bazı genel belirtileri büyüme inhibisyonu, kloroz ve farklı dokularda anatomik, morfolojik, fizyolojik veya biyokimyasal özelliklerin değişimlerini içerir (Rubio ve ark., 1994; Watanabe ve Suzuki, 2002; Maksymiec ve Krupa, 2006).

Cd kökler tarafından kolaylıkla alınır ve bitkinin farklı kısımlarına aktarılır (Pence ve ark., 2000; Stolt ve ark., 2006). Bitkiler tarafından yüksek konsantrasyonda birikerek genellikle fotosentetik işlemde, büyümede ve verimde inhibisyona neden olmaktadır (Zhang ve ark., 2003; Hassan ve ark., 2005; Wójcik ve ark., 2005).

Kadmiyum insan, hayvan ve bitkiler için oldukça toksik bir elementtir. Bitki bünyesinde azot ve karbonhidrat metabolizmalarını değiştirmesi sebebiyle pek çok fizyolojik değişikliğe neden olmaktadır. Kadmiyum proteinlerin –SH gruplarındaki enzimleri inaktive edebilmekte, klorofil biyosentezinin bozulmasına, fotosentezin engellenmesine, stomaların kapanmasına ve transpirasyon ile su kaybının azalmasına neden olmaktadır (Sheoran ve ark., 1990). Fazla miktarda bulunan kadmiyum dozlarının klorofil biyosentezini bozmasının en önemli nedenlerinin başında klorofil biyosentezinde görev alan protoklorofil redüktaz ile aminolevulinik asit sentezini engellemesi gelmektedir. Ayrıca ağır metaller serbest radikal oluşumuna yol açmaktadır. Tilakoid membran lipidlerinin oksidatif yıkımına sebep olarak klorofil yıkımını arttırdığı ve sentezini engellendiği bilinmektedir (Zengin ve Munzuroğlu, 2005).

Kadmiyum stresine maruz kalan bitkilerde, azot metabolizmasının enzimleri olan nitrat redüktaz ve nitrit redüktazın aktiviteleri azalmaktadır. Bu durum da bitkilerin nitrat asimilasyonunu azaltmaktadır (Gouia ve ark., 2000). Yapılan bir çalışmada 50 µM kadmiyum uygulanan domates yaprakları ile köklerinin nitrat içeriği, kontrol bitkilerine kıyasla % 24 ve % 62 oranında daha düşük bulunurken, toplam aminoasit miktarının arttığı görülmüştür (Chaffei ve ark., 2004).

Bir başka çalışmada ise buğday fidelerinin yetiştirildiği ortama 0.04 mM Cd uygulamasının bitkilerin kontrole göre nitrat alımını % 60, potasyum alımını ise % 56 azalttığı saptanmıştır (Veselov ve ark., 2003).

Kadmiyumun uygulandığı miktar, bitki tür ve çeşit karakteristikleri, yaprak yaşı ile bitkinin fenolojik gelişimine bağlı olarak fotosentez oranında azalmaya neden olur.

Fotosentez oranı üzerine olan bu olumsuz etkisinin nedeni $CO_2$ asimilasyonunu azaltmasından kaynaklanmaktadır. Çeltik bitkisinde kadmiyum toksitesinin büyüme oranı ile antioksidan enzim aktivitesi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada Cd miktarında artma oldukça; bitki ağırlığının, SOD, katalaz (CAT) ve POX enzimlerinin aktivitesinin azaldığı ve malondialdehit içeriğinin arttığı saptanmıştır (Hassan ve ark., 2005).

Cd stresi, lipid peroksidasyonu gibi oksidatif hasara neden olabilir ve çeşitli bitkilerde antioksidan sistemde değişikliklere yol açabilir (Foyer ve ark., 1997; Ercal ve ark., 2001; Qadir ve ark., 2004). Yüksek Cd konsantrasyonu, oksidatif strese neden olan süperoksit anyonunun ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil ($^{\bullet}OH$) radikallerinin ve $H_2O_2$ oluşumunu teşvik eder. Oksidatif stresten dolayı fotosentetik aygıtların ve membran geçirgenliğinin hasar görmesinin bir sonucu olarak tiyobarbitürik asit reaktif maddelerinin (TBARS) üretiminin arttığı bildirilmiştir (Takeda ve ark., 1995; Romero-Puertas ve ark., 1999; Mobin ve Khan, 2007).

Kadmiyumun bezelye bitkisinin fizyolojik parametreleri ve antioksidan enzimler üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada 50 µM Cd'un yapraklardaki transpirasyon, fotosentez oranı ve klorofil sentezini azalttığı görülmüştür (Sandalio ve ark., 2001).

Ulusu ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada iki aylık maydanoz (*Petroselinum hortense* L.) fidelerine dört farklı konsantrasyonda $CdCl_2$ (0, 75, 150 ve 300 µM) uygulanarak 15 gün sonra yapraklar hasat edilip Cd içeriği SOD, CAT ve APX enzim aktiviteleri incelenmiştir. İlave olarak toplam fenolik madde miktarı, enzimatik olmayan antioksidan içeriği (indirgeme gücü, süperoksit anyon ve serbest radikal giderme aktiviteleri) araştırılmıştır. Konsantrasyon artışıyla doğru orantılı olarak yapraklarda Cd önemli oranda birikmiştir. Cd konsantrasyonunda artışla birlikte antioksidan enzim aktiviteleri kısmi olarak azalırken enzimatik olmayan antioksidan içeriği artmıştır. Sonuç olarak Cd stresi maydanoz bitkisinde antioksidan enzimatik aktivite ile enzimatik olmayan antioksidan aktiviteyi farklı şekilde etkilemiştir.

## 2.2. Molibden

Mo, çoğu bitki dokusunda en az miktarda bulunan temel mikro besindir ve çoğu zaman diğer tüm besin maddelerinin karşılaştırıldığı ve ölçüldüğü baz olarak ayarlanır. Molibden, redoks reaksiyonlarını gerçekleştirmek için seçilen enzimler tarafından

kullanılır. Aktivite için molibden gerektiren enzimler arasında nitrat redüktaz, ksantin dehidrogenaz, aldehit oksidaz ve sülfit oksidaz bulunur (Kaiser ve ark., 2005).

Molibden toprakta bulunan bir eser elementtir ve bitki ve hayvanlar dahil olmak üzere çoğu biyolojik organizmanın büyümesi için gereklidir. Bitki büyümesi için gereken metallerin çoğuna benzer şekilde molibden, indirgeme ve oksidatif reaksiyonlara katılmak için spesifik bitki enzimleri tarafından kullanılmaktadır. Molibdenin kendisi biyolojik olarak aktif değildir. Fakat daha çok baskın olarak molibden kofaktörü (Moco) olarak adlandırılan organik bir pterin kompleksinin ayrılmaz bir parçası olduğu bulunmuştur. Moco, bitkiler, hayvanlar ve prokaryotlar dahil olmak üzere çoğu biyolojik sistemde bulunan molibden gerektiren enzimlere (molibdoenzimler) bağlanır (Williams ve Fraústo da Silva, 2002). Bitki büyümesi için molibden mevcudiyeti, toprak pH'ına, adsorbe edici oksitlerin konsantrasyonuna (örneğin Fe oksitler), su drenajının büyüklüğüne ve toprak kolloitlerinde bulunan organik bileşiklere bağlıdır. Alkali topraklarda molibden daha fazla çözünür hale gelir ve çoğunlukla anyon formundaki bitkilere $MoO_4$ olarak erişilebilir. Buna karşılık, asitli topraklarda (pH <5·5) molibden mevcudiyeti toprak oksitlerine anyon adsorpsiyonu arttıkça azalır (Reddy ve ark., 1997).

Tarımsal topraklarda, molibden, toprak bölgesinin kimyasal özelliklerine bağlı olarak birçok farklı kompleks halinde bulunur. Kayalarda bulunan molibden mineral biçimleri; molibdenite ($MoS_2$), wulfenite ($PbMoO_4$) ve ferrimolybdenite [$Fe_2(MoO_4)$]'dir (Reddy ve ark., 1997).

Bitki büyümesi için molibden ihtiyacı ilk önce hidroponik olarak yetiştirilen domates kullanılarak Arnon ve Stout (1939) tarafından gösterilmiştir. Molibden içermeyen besin çözeltisi içinde yetiştirilen bitkiler, yapraklar üzerinde beneklenme lezyonları ve lamellerin dahil olduğu değiştirilmiş yaprak morfolojisi dahil olmak üzere karakteristik fenotipler geliştirmiştir (Arnon ve Stout, 1939).

Mo, kuraklık, soğuk uygulamaları ve tuz stresi gibi çeşitli çevresel streslere direnmede önemli rol oynamaktadır (Sun ve ark., 2009; Zhang ve ark., 2012; Al-Issawi ve ark., 2013; Ghafarian ve ark., 2013).

Kışlık buğday ve *Brassica napus* gibi bitkilerin Mo-gübreye karşı verdikleri cevapları araştırılmıştır. Sonuçlar, molibdenin kışlık buğday ve *B. Napus'*ta büyüme, verim ve kaliteye etkisi olduğunu göstermiştir (Hu ve ark., 2002a; Sun ve ark., 2002; Chen ve ark., 2004).

Mo' nun eksiklik belirtileri ayrıca azot asimilasyon enzimleri (yani NR) üzerindeki dolaylı etkisiyle de maskelenebilir. Nitratlı gübrelerin varlığında yetersiz molibden seviyelerinde yetişen birçok bahçe bitkileri, tahıl ve baklagil mahsulleri soluk yeşil yapraklar ve bazen de yaprak kenarlarındaki nekrotik bölgeler genel bitki büyümesinde azalma gözlenir (Hewitt ve Bolle-Jones, 1952; Agarwala ve ark., 1978; Chatterjee ve ark., 1985; Chatterjee ve Nautiyal, 2001). Molibden eksikliği olan yulaf ve buğday yapraklarında nekrotik bölgeler gözlenir ve tohumlar zayıf bir şekilde geliştirilir ve büzülür (Anderson, 1956; Chatterjee ve Nautiyal, 2001).

Molibden eksikliği, bitki metabolizmasını birçok farklı seviyede etkiler. Tepkiler, bitkilerde bulunan çeşitli molibdoenzimler için molibden gereksinimi ile güçlü bir şekilde bağlantılıdır. Bitki molibdoenzimleri, nitrojen azaltma ve asimilasyon [yani nitrat redüksiyonu (nitrat redüktaz; NR), nitrojen fiksasyon (nitrojenaz), pürin katabolizması (ksantin dehidrojenaz/oksidaz; XDH), absisik asit (ABA) ve indol ile ilgili olanlara ayrılabilir. IAA sentezi (aldehit oksidaz; AO)] ve kükürt metabolizması (sülfit oksidaz; SO) enzimlerini içermektedir. Molibdoenzimler, Moco ile etkileşimlerine bağlı olarak daha da sınıflandırılabilir. NR ve SO, protein kompleksine yerleştirildiğinde proteini aktive eden bir diokso-Mo yardımcı faktörü içerir (Mendel ve Hänsch, 2002).

Baklagil bitkilerinin Mo noksanlığına karşı çok hassas oldukları bilinmektedir. Ancak Mo miktarının fazla olması da biyokütle ile tohum verimini azaltır ve de üretim kalitesini düşürür (Kevresan ve ark., 2001; Liu ve Yang, 2003; Nautiyal ve Chatterjee, 2004). Fazla Mo'nin bitkilerde verim ve kaliteyi etkilediği tespit edilmiştir. Nautiyal ve Chatterjee (2004), aşırı Mo (2.0 mg $L^{-1}$) yalnızca bitki büyümesini azaltmıyor aynı zamanda genç yaşta kloroz meydana gelerek yaşın artmasıyla da yoğunlaştığını belirtmiştir. Aşırı Mo miktarının soya fasulyesindeki protein ve C vitamini içeriklerini azalttığı rapor edilmiştir (Liu ve Yang, 2003).

Antioksidan enzimlerin ve üç soya fasulyesi türünün kalitesinin toprakta Mo ve/veya bor (B)'a tepkisi incelenmiştir. Dört büyüme safhasında dört işlem (kontrol, +Mo, +B, +[Mo+B]) ile saksı denemeleri kurulmuştur. Çalışma, Mo ve/veya B'nin tohumlardaki antioksidan enzim aktivitelerini ve protein içeriğini arttırdığını göstermiştir. Mo ve/veya B yağ içeriğini, linoleik asid içeriğini azalttı ve böylece insan sağlığı için bitki kalitesini iyileştirdiği bildirilmiştir. Topraktaki Mo ve B takviyesi arasında antioksidan enzimler ve bitkinin kalitesi arasında bazı farklılıklar vardır ve bitkideki Mo ve B arasındaki ilişki birbirine desteklemiştir. Mo uygulamasının sonucu

olarak; POX, SOD, CAT ve APX enzimlerinin aktiviteleri anlamlı olarak ($P < 0.05$) artmış SOD, POX ve APX'un +Mo'daki aktiviteleri +B'daki aktivitelerden daha fazla indüklendiği sonucuna ulaşılmıştır (Liu ve ark., 2005).

Zhang ve ark. (2012), molibdenin, tuz stresi altında çin lahanası'nın antioksidan savunma ve ozmotik düzenleme sistemleri üzerindeki etkilerini belirlemek için bir saksı denemesi yapmışlardır. Molibden üç dozda (0, 0.15, 0.3 mg $kg^{-1}$) uygulanmıştır. Ekimden 10 gün sonra, her muamele için bitkilerin yarısına 500 ml 136.8 mM NaCl çözeltisi her 10 günde üç kez ilave edilmiştir. Sonuçta tuz stresindeki çin lahanası'nda Mo uygulaması ile fidelerin taze ağırlıkları, SOD, POX ve CAT gibi antioksidan enzimlerin aktiviteleri, glutatyon (GSH), karotenoid (CAR) ve askorbik asit (ASA) gibi enzimatik olmayan antioksidanların içerikleri önemli ölçüde artmıştır. Çözünür şeker, çözünür protein ve prolin gibi düşük molekül ağırlıklı ozmotik düzenleyicilerin içeriklerinde önemli bir artışlar meydana gelmiştir.

## 2.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşumu

ROS'lar endojen olarak bitkilerin kloroplastlarında fotosentez reaksiyonlarında, plastid ve peroksizomlarda, mitokondrilerdeki sitrik asit döngüsünde, NADPH oksidaz, amino oksidaz, hücre duvarı peroksidazları gibi enzimlerin etkisi ile oluşan en yoğun serbest radikallerdir (Van Camp ve ark., 1998; Van Breusegem ve Dat, 2006).

Radikal olmayan bir atom ya da bir molekülden bir elektron çıkmasıyla veya atom ya da moleküle bir elektron ilavesi ile meydana gelirler. Diğer moleküllerden elektron alabildiklerinden veya onlara elektron verebildiklerinden dolayı organizmada yükseltgeyici veya indirgeyici olarak davranırlar (Halliwell ve Gutteridge, 1998; Flora, 2007).

Bitkisel dokularda, toplam moleküler oksijen tüketiminin yaklaşık % 1-2'si normal koşullarda ROS oluşumuna yol açar. Bu oran bitkiler; tuzluluk, kuraklık, soğuk stresi veya yüksek sıcaklıklar gibi stres koşullarına maruz kaldığında artar. ROS, moleküler oksijenin ($O_2$) indirgenmesiyle meydana gelen bileşikler olup; süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$), alkoksil (RO), peroksil ($ROO^{\bullet}$) gibi bazı serbest radikalleri ile radikal olmayan hidrojen peroksit ($H_2O_2$) ve tekli oksijen ($^1O_2$) vb. gibi ürünleri içerir (Gill ve Tuteja, 2010; Sandalio ve ark., 2013; Halliwell ve Gutteridge, 2015).

ROS üretimi, çeşitli metabolik süreçlerde kaçınılmaz bir yan ürün olup, optimum büyüme koşulları altında bitkilerde 240 µM $s^{-1}O_2^{\bullet-}$ ve 0.5 µM $H_2O_2$ gözlemlenebilir. Bununla beraber abiyotik stresler, bitki hücrelerinde stresli hücrelerin 720 µM $s^{-1}O_2^{\bullet-}$ ve 5-15 µM $H_2O_2$'e kadar birikebilen ROS üretimi gösterebileceği yerlerde çeşitli ROS oluşumunu ve bunların reaksiyon ürünlerinin meydana gelmesini önemli ölçüde artırabilir (Hasanuzzaman ve ark., 2012).

Bitkinin normal gelişim süreci boyunca da sentezlenirler ancak detoksifikasyon mekanizması ile aralarında görülen denge sayesinde zararlı etki oluşturmazlar (Levitt, 1980). Bitkilerde, çevresel stresler sonucunda ROS'lar meydana gelmektedir. Biyotik veya abiyotik stresler altında üretilen ROS'lar, hücrelere zarar veren etmenlerin temel sebebidir (Joseph ve Jini, 2010). Hücrelerde biriken ROS'lar; nükleik asitlerin proteinlerin, klorofillerin, lipidlerin, karbonhidratlar gibi maddelerin oksidasyonuna sebep olmaktadır (Ahmad ve ark., 2010).

Hücrelerde bilinen başlıca ROS'lar; singlet oksijen ($^1O_2$), süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit ($H_2O_2$) ve hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) olup normal şartlarda hücredeki düzeyleri devamlı denge halindedir (Halliwell ve Gutteridge, 1998).

Serbest radikal olan ROS'lar $OH^{\bullet}$, $O_2^{\bullet-}$, hidroperoksil ($HO_2^{\bullet}$), peroksil ($ROO^{\bullet}$), alkoksil ($RO^{\bullet}$) iken; radikal olmayan ROS'lar tekli oksijen ($^1O_2$), $H_2O_2$, ozon ($O_3$), hipokloröz asit (HOCl) olarak tanımlanmaktadır. Hemen hemen bütün abiyotik streslerde özellikle de kloroplast, mitokondri ve peroksizomlarda üretilmekte olan bu serbest radikallerle diğer oksidantlar; protein ve klorofilde tahribata, membran lipidlerinde de peroksidasyona sebep olarak hücre zarında hasar meydana getirmektedir. Bu hasar hücrenin ölümüne kadar gidebilmektedir (Tanou ve ark., 2009).

Bir hücre içinde, SOD, ROS'a karşı ilk savunma hattını oluşturur. $O_2^{\bullet-}$, bir elektron taşıma zincirinin mevcut olduğu herhangi bir yerde üretilir bu yüzden mitokondri, kloroplastlar, mikrozomlar, apoplastlar, peroksizomlar, glioksizomlar ve sitozol dahil olmak üzere hücrenin farklı bölümlerinde $O_2$ aktivasyonu meydana gelebilir (Elstner, 1991). Hücrenin tüm bölümleri $O_2$ oluşumu için olası yerler olsa da; kloroplastlar, mitokondri ve peroksizomların ROS'un en önemli üreticisi olduğu düşünülmektedir (Fridovich, 1986).

### 2.3.1. Süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) radikali

Abiyotik stres mevcutken bitkinin yaşamsal faaliyetlerinde yavaşlama görülür, su alınımında azalma olur buna bağlı olarakta stomalar kapanır. Bitkinin $CO_2$ alınımında azalma olduğundan, fotosentetik elektronlar yeterli $CO_2$ bulamadığında $O_2$ molekülüne aktarılmakta bunun sonucunda da aktive edilmiş ve toksik etkiye sahip olan süperoksit radikalleri ($O_2^{\bullet-}$) oluşmaktadır. Fazla miktarda biriken $O_2^{\bullet-}$, hidroksil radikali $OH^{\bullet}$ ve $H_2O_2$ ile birlikte singlet oksijeni ($^1O_2$) de içine alan reaktif oksijen türlerini üreterek oksidatif strese, bunun sonucunda da oksidatif hasara sebep olmaktadır (Mittler ve ark., 2004).

Kloroplastta, fotosistem I ve II'de elektron taşıma sisteminde görev alan moleküler oksijenin ($O_2$) bir elektron transferi sonucu indirgenmesi ile kararsız bir yapı olan $O_2^{\bullet-}$ radikali oluşur (Mehler, 1951b).

ROS ürünleri, oksijenli solunumun sonuçlarından birisidir. Terminal oksidazlar, sitokrom c oksidaz, alternatif oksidazlar $O_2$ ile reaksiyona girdiklerinde dört elektron transfer edilir, su açığa çıkar. Fakat bazen $O_2$, diğer elektron taşıma sistemi (ETS) bileşikleriyle reaksiyona girebilir. Bu durumda yalnızca bir elektron transfer edilir, sonuçta $O_2^{\bullet-}$ oluşur (Puntarulo ve ark., 1988).

$O_2^{\bullet-}$ oldukça reaktiftir; yarı ömrü 2-4 µsn kadardır, bu sebeple biyolojik membranları geçmeden hemen $H_2O_2$'e SOD ile dismutasyona uğratılır. Ayrıca $O_2^{\bullet-}$ metal içeren enzimlerdeki $Fe^{+3}$ ve $Cu^{+2}$'yi ve kinonları indirgeyerek aktivitelerini ortadan kaldırır. $O_2^{\bullet-}$'den oluşan hidroperoksil radikalleri ($^{\bullet}HO_2$) de biyolojik membranların sulu fazlarından geçerek, poliansatüre yağ asitlerinden ve lipid hidroperoksitlerden hidrojen atomu çıkarır ve oto-oksidasyona neden olurlar (Halliwell ve Gutteridge, 1998).

$O_2^{\bullet-}$ radikalleri, kloroplast ETS'lerinin devirsiz yollarındaki elektron transferi sırasında ve diğer hücre organellerinde bulunan $O_2$'nin indirgenmesiyle oluşturulur. $O_2$'nin $O_2^{\bullet-}$'e indirgenmesi, PSI seviyelerindeki ETS'de görülebilir. $O_2^{\bullet-}$ üretimi, $OH^{\bullet}$ ve $^1O_2$ gibi ROS'ların daha fazla üretilmesini sağlar ve bu radikaller membran lipidlerinin peroksidasyonu ile hücresel zararlara neden olur (Elstner, 1987).

### 2.3.2. Hidrojen peroksit ($H_2O_2$)

$H_2O_2$, süperoksitin çevresinde bulunan moleküllerden bir elektron alması ya da moleküler oksijenin çevresinde bulunan moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksitin iki proton ($H^+$) ile birleşmesi sonucunda meydana gelir. Biyolojik sistemlerde görülen $H_2O_2$'in asıl üretimi, $O_2^{\bullet-}$ ters değişimi ile gerçekleşmektedir. İki $O_2^{\bullet-}$ molekülü, süperoksitin ters değişim reaksiyonunda iki proton alarak $H_2O_2$ ve $O_2$'i oluştururlar. $H_2O_2$, serbest bir radikal olmadığı halde ROS kapsamına girmektedir ve serbest radikal biyokimyasında oldukça önemli bir rol oynar. Çünkü $H_2O_2$, $Fe^{+2}$ ya da diğer geçiş metallerinin varlığında, Fenton reaksiyonu sonucu oluşan $O_2^{\bullet-}$ varlığında, Haber-Weiss reaksiyonu sonucu, en reaktif ve zarar verici ROS olan $OH^{\bullet}$ radikalini oluşturur (Ahmad ve ark., 2010).

Hidrojen peroksit, aerobik canlılarda süperoksitlerin katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan SOD tarafından katalizlenmesi ile oluşur. $H_2O_2$'in oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni, demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında $OH^{\bullet}$ radikalinin öncülü olarak davranmasıdır. $H_2O_2$ özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan $H_2O_2$'nin derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir (Asada ve ark., 1974).

### 2.3.3. Hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$)

Hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) hücrede mevcut olan en reaktif oksidantlardandır. $OH^{\bullet}$, hücrelerin eliminasyonunda kullanılabilecekleri bir enzim sistemi olmadığından dolayı kolaylıkla tüm biyolojik moleküller ile reaksiyona girebilirler ve fazla miktarda üretildiğinde de hücrelerin ölümüne neden olurlar. Nispeten daha az zararlı olan $H_2O_2$ ve $O_2^{\bullet-}$ anyonunun metal iyonlarının varlığında Haber–Weiss ($Cu^+$ , $Cu^{+2}$ $Fe^{+2}$, $Fe^{+3}$) ya da fenton ($Fe^{+2}$ ve diğer geçiş metalleri; Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) reaksiyonu ile oluşur (Fenton, 1894; Fritz ve Joseph, 1934; Smirnoff, 1993).

## 2.4. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Üretim Yerleri

### 2.4.1. Kloroplastlarda ROS oluşumu

Bitkilerde farklı hücre lokasyonlarında görev yapan üç ana ROS üreticisi bölge bulunmaktadır: Bunlar kloroplast ve mitokondrilerde elektron taşıma zincirleri (ETS), bazı peroksidazlar ve oksidazlar (NADPH oksidaz, NADH oksidaz, ksantan oksidaz, lipoksijenaz, gliko oksidaz, amin oksidaz, vb.) ve klorofil molekülleri gibi ışığa duyarlılaştırıcılardır (Dat ve ark., 2000; Blokhina ve ark., 2003).

Işığa dayalı fotosentetik işlemler, kloroplastlarda ROS üretimine ana katkıda bulunan maddelerdir. Kloroplastlardaki rubisco katalizli karboksilaz-oksijenaz reaksiyonları, hem $O_2$ üretimini hem de tüketimini arttırır. Bu nedenle, kloroplastlardaki ETS, $O_2$ bakımından zengin bir ortamda çalışır. Böylece, aşırı yüklü ETS'den elektron sızıntısı kaçınılmaz olarak ROS'u meydana getirecektir. Ayrıca, ışığa duyarlılaştırıcı özelliklere sahip klorofil molekülleri, ışık enerjisinin girilmesinden sonra ROS oluşumuna aracılık eder. ROS seviyesini kloroplastlarda kontrol altında tutmak için, ROS süpürme işlevleri için çeşitli sistemler mevcuttur (Foyer ve ark., 1994; Foyer ve ark., 1994a; Foyer ve Noctor, 2000; Mittler, 2002; Ivanov ve Khorobrykh, 2003). Kloroplastlara ilişkin başlıca ROS üreticileri ve temizleyicileri, Çizelge 2'de şematik olarak sunulmaktadır.

**Çizelge 2**. Kloroplastlarla ilgili başlıca ROS üreticileri ve temizleyicileri

| **Üreticiler** | **ROS** | **Süpürücüler** | |
|---|---|---|---|
| | | Enzimatik | Enzimatik Olmayan |
| PSI'de ETS | $O_2^{\bullet -}$ | SOD | Askorbik asit, glutatyon (hidrofilik), karotenoidler, α-tokoferol (lipofilik) |
| PSII'de ETS | $H_2O_2$<br>$OH^{\bullet}$ | APX, TdPX<br>- | |
| Triplet klorofil | $^1O_2$ | - | |
| Fotorespirasyon | $H_2O_2$[a] | CAT [a] | |

Not: APX: askorbat peroksidaz; CAT: katalaz; ETS: elektron taşıma zincirleri; PSI, PSII: fotosistem I, fotosistem II; ROS: reaktif oksijen türleri; SOD: süperoksit dismutaz; TdPX: tioredoksin peroksidaz. a: Peroksizomlarda bulunur.

Yakın zamana kadar fotosistemdeki elektron taşıma sistemi (ETS) PSI, kloroplastlardaki ROS kaynağı olarak kabul edilmekteydi. Normal olarak, uyarılmış PS merkezlerinden gelen elektron akışı, NADPH'a indirgenmiş NADP'ye yönlendirilir, bu daha sonra Calvin döngüsüne girer ve son elektron alıcısı $CO_2$'yi azaltır. ETS'nin aşırı yüklenmesi durumunda, elektron akışının bir kısmı ferredoksin'den $O_2$'e yönlendirilerek, süperoksit serbest radikaline indirgenir. Ferredoksinden $O_2$'e elektron çıkışına (Mehler, 1951a) Mehler reaksiyonu denir.

$$Fd(red) + O_2e^- \rightarrow Fd(ox) + O_2^{\bullet -}$$

Yoğun ışık, aşırı elektron akışını üreterek, ETS'nin aşırı azalmasına ve dolayısıyla NADPH'nin aşırı üretilmesine neden olabilir. Bu, ETS'de ROS oluşumunun artmasına ve fotosentetik sistemin zarar görmesine neden olabilir. NADPH'ın aşırı üretimi ve azalmış $NADP^+$ rejenerasyonu, Calvin döngüsünün normal çalışmasını engelleyebilir (Vranová ve ark., 2002; Zhang ve ark., 2003).

Kloroplastlarda üretilen farklı ROS tipleri, Çizelge 3'de özetlendiği gibi çeşitli kloroplast lokalize moleküler hedefleri üzerinde spesifik zarar verici etkilere sahiptir. Tamamen reaktif olan $OH^{\bullet}$, kloroplastlarda bulunan tüm moleküler türlerle etkileşime girip zarar verir. Tekli oksijen ve $O_2^{\bullet -}$ baskın olarak çift bağ içeren bileşiklere (doymamış yağ asitleri, klorofiller) saldırır, böylece kloroplast membran sistemine ve fotosentetik reaksiyon merkezlerine zarar verir. D1 proteinindeki tirozin gibi aromatik aminoasitlere de etki eden $O_2^{\bullet -}$, PSII'nin verici tarafında tahrip edici değişikliklere neden olabilir. Calvin döngüsü enzimleri, $Fe^{+2}$- içeren enzimler, D1/D2 proteinleri ve PSII'deki Mn kümeleri de $H_2O_2$'in hassas hedefleri olarak bildirilmiştir (Slooten ve ark., 1998; Niyogi, 1999; Zhang ve ark., 2003).

**Çizelge 3**. ROS'un kloroplastlarda moleküler hedefler üzerindeki hasar etkileri

| ROS | HEDEFLER |
|---|---|
| $OH^{\bullet}$ | Tüm konumlar |
| $^1O_2$ | Membran lipid peroksidasyonu, klorofil tahribatı |
| $H_2O_2$ | –SH: Calvin döngüsü enzim inaktivasyonu<br>Çapraz bağlama: proteinler (D1, D2)<br>$Fe^{+2}$ oksidasyon: metal içeren enzimler<br>PSII'de Mn dizisinde hasar |
| $O_2^{\bullet -}$ | Membran lipid peroksidasyonu, klorofil tahribatı<br>Aromatik aminoasitler: D1 proteininde tirozin kalıntıları (Tyr) yıkımı |

$O_2^{\bullet-}$ ile $H_2O_2$'in yıkımının verimli bir şekilde olması için çeşitli antioksidan enzimlerin aktivasyonu gerekmektedir. Bitki hücrelerinin farklı bölümlerinde meydana gelen süperoksit, SOD tarafından $H_2O_2$'e dönüştürülmektedir. Kloroplast gibi organellerde askorbat yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve hızlı bir şekilde $O_2$'e indirgenmektedir. $H_2O_2$ thiol gruplarını hızlı bir şekilde oksitleyen güçlü bir oksidanttır. Fotosentez thiol-düzenleyici enzimlerle bağlantılı olduğundan dolayı $H_2O_2$'in kloroplastlarda birikimine izin verilmemelidir (Noctor ve Foyer, 1998).

Reaktif oksijen türlerinin bitkiler üzerine olumsuz etkileri uzun zamandan beri bilinmektedir. Canlılarda çeşitli hastalıklara ve yaşlanmaya neden olmaktadır. ROS geçici olarak meydana geldikleri gibi enzimatik olarak da meydana gelmektedirler. ROS'nin enzimatik kaynakları hem ekstraselüler hem de intraselülerdir (Bolwell, 1999). Büyük ROS kaynakları hücre duvarlarında bulunan peroksidazlar ve aminoksidazlar, plazma membranında bulunan NADP oksidaz, mitokondri, kloroplast, peroksizomlarda bulunan intraselüler oksidaz ve peroksidazlardır (Çizelge 4) (Mittler, 2002).

**Çizelge 4.** Bitkilerde ROS oluşumu, lokalizasyonu ve uzaklaştırılması (Mittler, 2002).

| **Mekanizma** | **Lokalizasyon** | **Başlıca Reaktif Oksijen türleri** |
|---|---|---|
| **Oluşum (ürün)** | | |
| Fotosentez ETS ve PSI-II | Kloroplast | $O_2^{\bullet-}$ |
| Solunum ETS | Mitokondri | $O_2^{\bullet-}$ |
| Glikolat oksidaz | Peroksizom | $H_2O_2$ |
| NADPH oksidaz | Plazma membranı | $O_2^{\bullet-}$ |
| Yag asidi β-oksidasyonu | Peroksizom | $H_2O_2$ |
| Oksalat oksidaz | Apoplast | $H_2O_2$ |
| Ksantin oksidaz | Peroksizom | $O_2^{\bullet-}$ |
| Peroksidaz, Mn ve NADH | Hücre Duvarı | $H_2O_2$., $O_2^{\bullet-}$ |
| Amino oksidaz | Apoplast | $H_2O_2$ |
| **Parçalama** | | |
| Süperoksit dismutaz | Kloroplast, sitozol, mitokondri, apoplast | $H_2O_2$ |
| Askorbat peroksidaz | Kloroplast, sitozol, mitokondri, apoplast | $H_2O_2$ |
| Katalaz | Peroksizom | $H_2O_2$ |
| Glutatyon peroksidaz | Sitozol | $H_2O_2$, ROOH |
| Peroksidaz | Hücre duvarı, Sitozol, Vakuol | $H_2O_2$ |
| Askorbik asit | Kloroplast, sitozol, mitokondri, apoplast | $H_2O_2$, $O_2^{\bullet-}$ |
| Glutatyon | Kloroplast, sitozol, mitokondri, apoplast | $H_2O_2$ |
| α-Tokoferol | Membranlar | ROOH, $O_2^{\bullet-}$ |
| Karetenoidler | Kloroplast | $O_2^{\bullet-}$ |

### 2.4.2. Mitokondrilerde ROS oluşumu

Mitokondri aynı zamanda $H_2O_2$ ve $O_2^{\bullet-}$ gibi zararlı ROS üretim bölgeleridir (Navrot ve ark., 2007). Mitokondriyal ETS (mtETS), ROS'u oluşturmak için $O_2$'i azaltmak için yeterince enerjilendirilmiş elektronları barındırması nedeniyle en büyük üretim yeridir. mtETS'nin ROS üretiminden sorumlu iki ana bileşeni Kompleks I ve Kompleks III'tür (Møller ve ark., 2007; Noctor ve ark., 2007). NADH dehidrojenaz veya Kompleks I, flavoprotein bölgesinde $O_2$'yi $O_2^{\bullet-}$ye doğrudan dönüştürür. Kompleks I'deki ROS üretimi, $NAD^+$ bağlantılı substratların eksikliğinden dolayı Kompleks III'ten Kompleks I'e ters elektron akışı olduğunda daha da artar. Bu ters elektron akışı ATP hidrolizi ile kontrol edilir (Turrens, 2003). Kompleks III'te, tamamen indirgenmiş formdaki ubikinon, Sitokrom cl'e elektron vermekte ve kararsız bir ubisemikinon yarı radikalini geride bırakarak elektronların $O_2$'e sızmasını sağlar. Böylece $O_2$'i üretir (Murphy, 2009). Mitokondride ROS üretiminin diğer kaynakları, mitokondriyal matristeki çeşitli enzimlerdir. Bu, doğrudan ROS üreten akonitaz gibi enzimleri ve ETS'ye elektron besleyerek dolaylı olarak ROS üreten 1-Galactono-γ-lakton dehidrojenaz (GAL) gibi enzimleri içerir (Rasmusson ve ark., 2008). $O_2^{\bullet-}$ mitokondride lider ROS olmasına rağmen, Mn-SOD ve APX tarafından $H_2O_2$'e dönüştürülür (Sharma ve ark., 2012). Tahminler, mitokondri tarafından toplam $O_2$ tüketiminin % 1-5'inin $H_2O_2$ üretimine yönlendirildiğini göstermektedir. Mitokondri, genellikle normal koşullar sırasında ROS üretir, ancak abiyotik stres koşulları sırasında büyük oranda üretim artar (Pastore ve ark., 2007). Bu gibi stresli koşullar, ETS ve ATP sentezinin sıkı bağlanmasını etkileyerek ubikinon (UQ) havuzu gibi elektron taşıyıcılarının aşırı azalmasına ve böylece ROS üretimine neden olur (Rhoads ve ark., 2006; Blokhina ve Fagerstedt, 2010).

### 2.4.3. Peroksizomlarda ROS Oluşumu

Peroksizomlar tek membrana bağlı küresel mikrocisimlerdir ve integral oksidatif metabolizması nedeniyle hücre içi $H_2O_2$ üretiminin ana bölgeleridir (Luis ve ark., 2006; Palma ve ark., 2009). Ayrıca, çeşitli metabolik süreç boyunca kloroplast ve mitokondri gibi $O_2^{\bullet-}$ üretirler. $O_2^{\bullet-}$ iki farklı yerde üretilir. Peroksizomal matristeki ksantin oksidaz (E.C.1.17.3.2), hem ksantini hem de hipoksantini ürik asit içinde metabolize eder ve bir yan ürün olarak $O_2^{\bullet-}$ üretir. İkincisi, elektron alıcısı olarak $O_2$'yi kullanan ve sitozolde

$O_2^{\bullet-}$'i serbest bırakan peroksizomal zarda lokalize NADH ve sitokrom b'den oluşan NADPH'a bağımlı küçük ETS'dir. Ek olarak, 18, 29 ve 132 kDa moleküler kütlelerin Peroksizomal Membran Polipeptitleri (PMP'ler) $O_2^{\bullet-}$ üretiminden sorumlu üç bütünleyici membran proteinidir. NADH, 18 ve 32 kDa PMP'lerin elektron donörü olarak görev yaparken, 29 kDa PMP, Sitokrom c'yi azaltmak için NADPH'ı elektron donörü olarak kullanır. Stresli koşullar sırasında, suyun mevcudiyeti düşük olduğunda ve stomata kapalı kaldığında, $CO_2$ ile $O_2$ oranı önemli ölçüde azalır ve bu da glikolat oluşumuna yol açarak artan fotorespirasyona neden olur. Bu glikolat, $H_2O_2$'i serbest bırakmak için peroksizomdaki glikolat oksidaz ile oksitlenir ve bu da fotorespirasyon sırasında lider $H_2O_2$'in üreticisi olur (Noctor ve ark., 2002a).

### 2.4.4. Apoplast

Apoplast olarak adlandırılan bitki hücre zarı arasında kalan alan, gelen $CO_2$'i fotosentez yapmak için sitozole giren çözülebilir, yayılabilir bir forma dönüştürmekten sorumludur. Olumsuz çevresel koşulları olduğu zamanlarda, absisik asit (ABA) ile birlikte verilen stres sinyalleri apoplastı $H_2O_2$ üretimi için önde gelen bir yer yapar (Hu ve ark., 2006). pH bağımlı hücre duvarı peroksidazları, okzalat oksidazlar ve amin oksidazlar bitki hücrelerinin apoplasttaki $H_2O_2$'in kaynağı olarak görülmektedirler (Bolwell ve Wojtaszek, 1997).

Hücre duvarı yerleşimli enzimlerin apoplastik ROS üretiminden sorumlu olduğu kanıtlanmıştır (Apel ve Hirt, 2004; Eiri ve ark., 2011) Germin olarak da bilinen hücre duvarı ile ilişkili oksalat oksidaz, oksalik asitten $H_2O_2$ ve $CO_2$ salgılar (Wojtaszek, 1997). Bu enzimin, farklı tahıl türleri ve mantarlar arasındaki etkileşimler sırasında apoplastik $H_2O_2$ birikiminde rol oynadığı bildirilmiştir (Lane, 2002). Amin oksidaz benzeri enzimler, özellikle $H_2O_2$ üretimi yoluyla, biyotik stresin ardından apoplastta meydana gelen savunma tepkilerine katkıda bulunabilir (Cona ve ark., 2006).

### 2.4.5. Plazma Zarları

Tüm bitki hücresini saran plazma zarı, sürekli değişen çevresel koşullarla etkileşimde önemli bir rol oynar ve hücrenin sürekli hayatta kalması için gerekli bilgileri sağlar. Plazma zarında lokalize olan NADPH'a bağlı oksidazlar, gen ekspresyonu ve farklı stres koşulları sırasında farklı homologların varlığı nedeniyle ön

plandadır (Apel ve Hirt, 2004). NADPH oksidaz, kendiliğinden $H_2O_2$'e dönüşen veya SOD tarafından katalize edilen sitozolik NADPH'dan $O_2$'e elektron transfer ederek $O_2^{\bullet-}$ üretir. NADPH oksidazın olması, patojenik enfeksiyon ve abiyotik stres koşullarına karşı bitki savunmasında önemli bir rol oynar (Kahvecioğlu ve ark., 2003).

### 2.4.6. Hücre Duvarları

Hücre duvarları, ROS üretimi için aktif alanlar olarak kabul edilir. $H_2O_2$ oluşumunda hücre duvarı ile ilişkili peroksidaz enziminin rolü olduğu bildirilmiştir (Gross, 1977). Stres sırasında hücre duvarına lokalize olan lipoksijenaz (LOX) enzimi, çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) hidroperoksidasyonuna neden olur ve bu da $OH^{\bullet}$, $O_2^{\bullet-}$, $H_2O_2$ ve $^1O_2$ gibi aktif bir ROS kaynağı haline gelir. Hücre duvarına lokalize olan diamin oksidazlar, hücre duvarında ROS üretmek için diaminleri veya poliaminleri kullanır.

### 2.4.7. Endoplazmik Retikulum

Endoplazmik Retikulum (ER)'da lokalize olan $CyP_{450}$ enzim grubunu içeren NADPH aracılı elektron taşınımı $O_2^{\bullet-}$ üretir (Mittler, 2002). Organik substrat, RH, $CyP_{450}$ ile etkileşime girer ve ardından serbest radikal bir ara ürüne (Cyt $P_{450}$ $R^-$) yol açmak için bir flavoprotein ile indirgenir. Bu ara ürün, hemen oksijenlenmiş bir kompleks ($CytP_{450}$-$ROO^-$) oluşturmak için üçlü oksijenle ($^3O_2$) reaksiyona girer. Kompleks, yan ürün olarak $O_2^{\bullet-}$ üretilerek zaman zaman Cyt $P_{450}$-Rh'a parçalanabilir (Sharma ve ark., 2012).

## 2.5. Reaktif Oksijen Türlerinin Hücresel Lipid Yapıları Üzerine Etkisi

Reaktif oksijen türleri biyolojik membranlarda mevcut olup, poliansatüre yağ asitlerinde (PUFA) oksidasyona sebep olarak lipid peroksidasyonunu başlatırlar (Gupta ve ark., 2014). Yağ asitinde bulunan çift bağ, kendisine bitişik karbon ile hidrojen arasındaki bağı zayıflattığında (C-H) hidrojenin koparılması da kolaylaşmış olur (Gutteridge, 1995). Dolayısıyla özellikle hücresel membran lipidlerinin poliansatüre yağ asiti zincirleri, peroksidasyona çok daha fazla duyarlıdır. Yağ asidi hidrojen kaybedip moleküler olarak yeniden düzenlenir ve konjuge dien yapısı oluşmuş olur. Oluşan

konjuge dien yapısı oksijenle birleşerek lipid peroksil radikallerine ($LOO^{\bullet}$) dönüşür. Bu peroksil radikalleri diğer yağ asitlerinden hidrojeni koparark zincirleme peroksidasyon reaksiyonlarını başlatır (Girotti, 1998). Lipid peroksidasyon reaksiyonları sonucunda meydana gelen lipid peroksitleri (Lipid peroksit, siklik peroksit ve siklik endoperoksit) sonuç olarak sekonder ya da son ürünler olan malondialdehit (MDA), 4-hidroksinonenal (HNE) ve hegzenal isimli aldehitlere dönüşür (Kanner ve ark., 1987; Esterbauer ve ark., 1991). Membranlarda oluşan zincirleme peroksidasyon reaksiyonları, zincir kırıcı bir antioksidanın ortama eklenmesine kadar (örn, Vit E) devam eder. Antioksidanların yokluğunda peroksil radikalleri birbirleri ile çapraz kovalent bağ meydana getirerek membran yapısını bozar ve de membranı hasarlanmaya yatkın hale getirir. Biyolojik membranlarda meydana gelen peroksidasyon; membran akışkanlığında bozulma, membran potansiyelinde azalma, mebranların $H^{+}$ ve diğer iyonlara karşı geçirgenliğinde artışa sebep olarak membranların parçalanmasına ve organel içeriğinin sitoplazmaya salınmasına neden olur. Sonuç olarak; hücre hasarı ya da hücre ölümü meydana gelir (Catalá, 2006).

Bitkilerde stres oluşumunun öncelikli etkilerinden biri olarak gösterilen lipid peroksidasyonun son ürünlerinden biri olan MDA analizleri ile stresin membranlarda görülen etkileri yansıtılmaktadır (Hodges ve ark., 1999). Günümüze kadar gerçekleştirilmiş çalışmalarda stres ile birlikte *Lycopersicon esculentum* L.'da (domates) (Krupa ve Baszynski, 1989; Ouariti ve ark., 1997; Ammar ve ark., 2005), *Triticum aestivum* L.'da (buğday) (Vassilev ve ark., 2004), *Hordeum vulgare* L.'de (arpa) (Gaur ve ark., 1994), *Brassica nigra* (L.) W.D.J.Koch'da (hardal) (Nouairi ve ark., 2006) ve birçok bitkide MDA düzeyinin yani lipid peroksidasyonunun arttığı görülmüştür.

## 2.6. Bitkilerin Reaktif Oksijen Türlerinden Korunmada Antioksidan Savunma Mekanizmaları

Bitkiler, ağır metal gibi çeşitli çevresel stresler sonucunda meydana gelen ROS'ları süpürebilmek için enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sistemlerine sahiptirler. Enzimatik savunma sistemi; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR), glutatyon peroksidaz (GPX) ve glutatyon - S - transferaz (GST) enzimleri vasıtasıyla sağlanmaktadır (Çizelge 5).

Enzimatik olmayan savunma sistemi ise askorbik asit (AA), glutatyon (GSH), fenolik bileşikler, alkoloidler, aminoasitler ve α-tokoferollerle sağlanmaktadır. Antioksidan savunma mekanizmaları bitkilerde stres toleranslarını artırıcı bir strateji sağlar. ROS'lar etilen, salisilik asit (SA), jasmonik asit, brassinosteroidler, absisik asit (ABA) gibi bitkisel hormonlarında sentezine neden olurlar. Bu fitohormonlar bitkilerin çevresel stres sırasında büyüme ve gelişimleri için ve de savunma tepkileri için gereklidir.

### 2.6.1. Reaktif oksijen türlerine karşı enzimatik antioksidanlar

Bitki hücrelerinde bulunan ana ROS süpürme mekanizmaları, SOD, askorbat-glutatyon döngüsü enzimleri ile katalazdır (Willekens ve ark., 1997; Noctor ve Foyer, 1998). Antioksidan enzimler bitki hücrelerinin farklı bölmelerinde lokalize olmaktadır. ROS mekanizmasının öne çıkan ilk enzimi SOD'dur. Hücrede oluşan süperoksit anyonunu, $H_2O_2$ ve $O_2$'ye dönüştürür ve ROS'lara karşı "savunma hattının" ilk elemanı olarak bilinir. Ancak bu reaksiyon sonucu olarak bir ROS türünden bir başka ROS türü meydana gelir ve protein tiyollerine zarar vererek oksidatif hasara neden olabilen $H_2O_2$'in de zararsız bir moleküle çevrilmesi gereklidir. $H_2O_2$'in ortadan kaldırılmasını katalize eden enzimler APX ve CAT'dır (Willekens ve ark., 1997). $H_2O_2$'e karşı bu iki enzimin afiniteleri birbirinden farklıdır ve $H_2O_2$ süpürülmesindeki hücre içi görevleri de aynı değildir. APX indirgeyici olarak askorbatı kullanırken CAT, $H_2O_2$'i süpürmek için bir indirgeyiciye ihtiyaç duymaz. Fakat CAT'ın $H_2O_2$'e olan afinitesi (mM), APX (μM)'den çok daha düşüktür (Mittler, 2002). APX'in tüm hücre seviyesinde ROS üreten bölmelerde lokalize olması ve yüksek $H_2O_2$'e yüksek afinitesinden dolayı hücre içi ROS dengesinin düzenleyicisi ve ROS sinyalleme elemanı olarak iş gördüğünün bir göstergesidir. CAT ise stres koşullarında peroksizomlarda aşırı ROS üretimini ortadan kaldırmada görevlidir (Mittler, 2002).

**Çizelge 5.** Bitkisel enzimatik antioksidanlar

| Enzim | EC No | Katalizlenen Reaksiyon |
|---|---|---|
| **Süperoksit dismutaz** | 1.15.1.1 | $O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow 2H_2O_2 + O_2$ |
| **Katalaz** | 1.11.1.6 | $2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$ |
| **Glutatyon peroksidaz** | 1.11.1.9 | $2GSH + ROO \rightarrow GSSG + ROOH + 2H_2O$ |
| **Glutatyon S-transferaz** | 2.5.1.18 | $RX + GSH \rightarrow HX + R\text{-}S\text{-}GSH$ |
| **Askorbat peroksidaz** | 1.11.1.11 | Askorbik asit (AA) + $H_2O_2 \rightarrow$ DHA + $2H_2O$ |
| **Monodehidroaskorbat redüktaz** | 1.6.5.4 | $NADH + 2MDHA \rightarrow NAD^+ + 2AA$ |
| **Dehidroaskorbat redüktaz** | 1.8.5.1 | $2GSH + DHA \rightarrow GSSG + AA$ |
| **Glutatyon redüktaz** | 1.6.4.2 | $NADPH + GSSG \rightarrow NADP^+ + 2GSH$ |
| **Peroksidaz** | 1.11.1.7 | $H_2O_2 + AH_2 \rightarrow 2H_2O + A$ |

### 2.6.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1)

Reaktif oksijen türleri, yüksek reaktif özelliklerinin olmasından dolayı herhangi bir koruma mekanizması olmadığı zaman hücre duvarının yapısına ve fonksiyonlarına zarar verir (Bennicelli ve ark., 1998). SOD, ilk kez Fridovitch ve McCord tarafından izole edilmiştir ve yüksek derecede reaktif olan ROS'lardan süperoksiti katalizleyerek organizmalara oksijen varlığında hayatta kalma olanağı sağlayan bir enzimdir. Bu reaksiyon oksijeni metabolize eden bütün organizmalarda ve bazı anaerobik solunum yapan canlılarda gerçekleşir ve sonucunda da moleküler $O_2$ ile $H_2O_2$ açığa çıkar (Öztürk ve ark., 1999).

Fotosentez ve solunum gibi bir takım anabolik ve katabolik süreç, aerobik metabolizmanın bir parçası olarak ortaya çıkar. ROS'un farklı hücresel kısımlarda; mitokondri, kloroplast, peroksizomlar, sitoplazma veya farklı enzimlerin etkisiyle apoplast olarak bilinen hücre dışı alanda üretildiği kanıtlanmıştır (Gill ve Tuteja, 2010; Sandalio ve ark., 2013).

Bitkisel dokularda, toplam moleküler oksijen tüketiminin yaklaşık % 1-2'si normal koşullarda ROS oluşumuna yol açar. Bu oran bitkiler; tuzluluk, kuraklık, soğuk stres veya yüksek sıcaklıklar gibi stres koşullarına maruz kaldığında artar.

Enzimatik antioksidanlar göz önüne alındığında, SOD her yerde bulunan metaloenzimlerdir (Jackson ve ark., 1978). Bu reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı ilk savunma hattını oluşturur. Canlı hücrelerde, SOD'lar, süperoksit radikallerinin ($O_2^{\bullet-}$) hidrojen peroksit ($H_2O_2$) ve oksijene ($O_2$) ayrışmasını katalize eder ve hücrelerin farklı hücre bölmelerinde üretilen süperoksit radikallerinin toksik etkisine karşı korunmasında önemli bir rol oynar (del Río ve ark., 2003).

SOD, reaktif oksijen türlerine karşı ilk savunma hattını ve bitki hücrelerinde ROS toksisitesine karşı antioksidan savunma sisteminin en etkili bileşenlerinden birini oluşturur. Bitkilerde bildirilene kadar (McCord ve Fridovich, 1969), SOD bilinen bir işlevi olmayan bir grup metaloprotein olarak tanımlandı. Aktif bölgedeki metal kofaktöre dayanarak, SOD'ların üç ana gruba ayrıldığı ve tüm oksijen metabolize eden hücrelerde bulunduğuna inanılmaktadır. Ayrıca mitokondri, kloroplastlar, çekirdekler, sitoplazma, peroksizomlar ve apoplastlar, vb. gibi hücre içi organellerde görülür (Alscher ve ark., 2002; Fink ve Scandalios, 2002). Süperoksit radikallerini detoksifiye etmek için $H_2O_2$'e dismutasyonunu katalize ederek ana enzimatik bileşenlerden birini oluşturur (Hossain ve ark., 2009). $O_2^{\bullet-}$'i ortadan kaldırarak, SOD'lar metal katalizörlü

Haber-Weiss tipi reaksiyon ile OH oluşma riskini azaltır. Çünkü bu reaksiyon, kendiliğinden oluşan dismutasyondan 10.000 kat daha hızlıdır (Gill ve Tuteja, 2010). Bu enzim aktivitesinin iki Haber Weiss reaksiyon substratı olan $O_2^{\bullet -}$ ve $H_2O_2$ konsantrasyonlarını belirlemesi bakımından benzersizdir. Bu nedenle antioksidan savunma mekanizmasında esas olması muhtemeldir (Bowler ve ark., 1992; Kandhari, 2004). Yüksek bitkilerin SOD sistemi, gelişimsel olarak düzenlenmiş ve eksojen uyarıcılara karşı oldukça reaktif olan birçok izoform halinde sergilenmiştir. Tüm SOD'ların verimliliğindeki önemi, çeşitli ROS ve reaksiyon ürünlerinin doğrudan veya dolaylı metabolizmasında sayısız çalışmada doğrulanmıştır (McCord ve Fridovich, 1969; Gill ve Tuteja, 2010; Kumar ve ark., 2014).

#### 2.6.1.2. Katalaz (CAT: EC 1.11.1.6)

Bir metalloenzim olan katalaz enzimi; redoks reaksiyonunu teşvik eden etkili protein katalistlerinden birisidir (Larson, 1988). SOD enzimi faaliyeti sonucunda oluşan toksik $H_2O_2$, katalaz enzimi etkisiyle su ve oksijene dönüştürülmektedir (Duthie ve ark., 1989). Katalaz, tüm antioksidan enzimler arasında ROS'ların en yüksek yıkımını yapan enzimdir. Dakikada yaklaşık 6 milyon $H_2O_2$ molekülünü $H_2O$'ya ve $O_2$'ye dönüştürmektedir (Gill ve Tuteja, 2010). CAT, tüm aerobik ökaryotlarda bulunur. Yağ asitlerinin β-oksidasyonu, glioksilat döngüsü (fotosolunum) ve pürin katabolizmasında peroksizomlarda üretilen $H_2O_2$'in yıkımında büyük rol oynamaktadır (Gill ve Tuteja, 2010). Her ne kadar CAT'ın sitosol, mitokondride sık sık rapor edilmesine rağmen, bunlarda önemli CAT aktivitesinin varlığı daha az kanıtlanmıştır (Mhamdi ve ark., 2010).

Çevresel stresler, stresin yoğunluğuna, süresine ve türüne bağlı olarak CAT aktivitesinin artmasına veya azalmasına neden olur (Sharma ve Dubey, 2005; Moussa ve ark., 2008; Han ve ark., 2009).

#### 2.6.1.3. Glutatyon peroksidaz (GPX: EC 1.11.1.9)

GPX, $H_2O_2$'i, organik ve lipid hidroperoksitleri azaltmak için GSH kullanarak bitki hücrelerinin oksidatif stresine yardımcı olan çok çeşitli izozim ailesidir (Noctor ve ark., 2002b). Bu enzim membranları oksidatif strese karşı korumakla birlikte GSH varlığında fosfolipid hidroperoksitlerin rejenerasyonunu sağlamaktadır. Peroksidazlar;

glutatyonu oksitleyerek yüksek konsantrasyonlarda bulunan $H_2O_2$'i $H_2O$'ya indirgemektedir (Avsian-Kretchmer ve ark., 1999). Stres, *C. annuum* çeşitlerinde GPX aktivitesini arttırır (León ve ark., 2002), fakat köklerde azalır ve Cd'ye maruz kalan *P. sativum* bitkilerinin yapraklarında önemli bir değişikliğe neden olmaz (Dixit ve ark., 2001).

### 2.6.1.4. Glutatyon -S- transferaz (GST: EC 2.5.1.18)

Glutatyon-S-transferazlar olarak bilinen bitki glutatyon transferazları, elektrofilik ksenobiyotik substratların tripeptit glutatyon ile konjugasyonunu katalize eden geniş ve çeşitli bir enzim grubudur. Bitki GST'lerinin, herbisit detoksifikasyonunda, hormon homeostazında, antosiyaninin vakuolar sekestrasyonunda, tirosin metabolizmasında, hidroksiperoksit detoksifikasyonunda, apoptozun düzenlenmesinde ve bitkilerin biyotik ve abiyotik streslere verdiği tepkilerde işlev gördüğü bilinmektedir (Dixon ve ark., 2010). GST'ler DNA, RNA ve proteinlere reaksiyona girebilecek veya zarar verebilecek sitotoksik ve genotoksik bileşikleri ortadan kaldırma potansiyeline sahiptir (Noctor ve ark., 2002a). GST'ler, bazı durumlarda bitki hücrelerinde % 1'den fazla çözünür proteini temsil eden çok bol proteinlerdir (Edwards ve ark., 2000). Kadmiyuma maruz kalan *P. sativum* bitkilerinin yapraklarında ve köklerinde artmış bir GST aktivitesi rapor edilmiştir (Dixit ve ark., 2001).

### 2.6.1.6. Askorbat peroksidaz (APX: EC 1.11.1.11)

Askorbat peroksidaz, bitkilerde, alglerde, öglenada ve diğer organizmalarda ROS'ların süpürülmesinde ve hücrelerin korunmasında en önemli rolü oynayan enzimdir (Gill ve Tuteja, 2010). Askorbat peroksidaz sitozolde, kloroplastlarda, peroksizomlarda bulunur (Arora ve ark., 2002). Bütün askorbat peroksidaz enzimleri elektron vericisi olarak askorbata yüksek özgüllük gösterir. Fakat enzimin fizyolojik koşullarda bulunmayan substratları da okside etme yeteneği de vardır (Raven, 2003). Askorbatın yaklaşık % 20 ile % 40'ı yaprak mezofil hücresinin kloroplastındadır. Kloroplast, oksitlenmiş ürünlerinden indirgenmiş askorbatı yeniden oluşturmak için tüm enzimleri içerir (Sade ve ark., 2011). APX, askorbat-glutatyon (AsA-GSH) döngüsünün ayrılmaz bir bileşenidir. CAT peroksizomlardaki $H_2O_2$'i ağırlıklı olarak temizlerken,

APX sitozol ve kloroplastta aynı işlevi görür. APX, indirgeyici madde olarak askorbik asit (AA) kullanılarak $H_2O_2$'i $H_2O$ ve DHA'ya dönüştürür (Das ve Roychoudhury, 2014). Kloroplast stromasında mevcut olan çözünebilir form (sAPX), tilakoide bağlı form (tAPX), sitoplazmik form (cAPX), glioksizom membran form (gmAPX) ve mitokondrideki mitAPX olarak 5 farklı APX izoformu hücrenin farklı bölümlerinde tanımlanmıştır (Noctor ve Foyer, 1998).

Bitki hücrelerinde $H_2O_2$'nin detoksifikasyonunda önemli indirgen substrat askorbattır. APX askorbatı $H_2O_2$ ve suya parçalamaktadır. Askorbik asit, süperoksit anyonu, singlet oksijen ve $H_2O_2$ gibi ROS'ların geniş bir bölümünü elemine edicidir (Beyer, 1994). Askorbat; bitkide hem fotosentetik hemde fotosentetik olmayan dokularda milimolar konsantrasyonlarda birikebilmektedir. Yapraklar, klorofilden daha fazla askorbat içermektedir. Askorbat en önemli antioksidanlardan biri olup doğrudan hidroksil radikalleri, süperoksit ve singlet oksijen ile reaksiyona girebilmektedir. Fotosentezin düzenlenmesinde, ışığa karşı korumada önemli olmasına ilaveten prostetik grup olarak metal iyonu bulunduran enzimlerin akitivitelerinin korunmasında da önemli bir rol üstlenmektedir (Koç ve Üstün, 2008). Askorbata bağlı askorbat peroksidaz aktivitesi ilk kez 1979 yılında keşfedilmiştir.

Askorbat kloroplastlarda, sitozol, vakuol ve yaprak hücrelerinin apoplastik boşluklarında yüksek konsantrasyonlarda bulunur (Polle ve ark., 1990; Pell ve Steffen, 1991). Askorbat peroksidaz aktivitesi esas olarak kloroplast ve sitozolden rapor edilmiştir (Chen ve Asada, 1989). Bununla birlikte, bazı yeni çalışmalarda mitokondride de bulunduğunu bildirmiştir (Anderson ve ark., 1995; Gómez ve ark., 1999). Kloroplastlarda, SOD ve askorbat peroksidaz enzimleri hem çözünür hem de tilakoide bağlı formlarda bulunur. Membran yüzeyinde üretilen süperoksit yakalanabilir ve membrana bağlı askorbat peroksidaz tarafından yıkılmak üzere hemen $H_2O_2$'e dönüştürülür (Anderson ve ark., 1983; Neubauer ve Schreiber, 1989). İzole edilmiş sağlam kloroplastlar, eksojen olarak eklenen $H_2O_2$'i hızla metabolize eder (Anderson ve ark., 1983; Neubauer ve Schreiber, 1989). İki enzim, indirgenmiş askorbat, yani monodehidroaskorbat redüktazın (E.C.1.6.5.4) yenilenmesinde rol oynar. Askorbat ve dehidroaskorbat redüktazı geri dönüştürmek için doğrudan NAD(P)H kullanır. Bununla birlikte, durum daha da karmaşıktır çünkü monodehidroascorbatın kendisi etkili bir elektron alıcısıdır (Miyake ve Asada, 1992; Foyer ve Lelandais, 1993). Kloroplast içinde askorbatın yenilenmesi, elektron taşınmasının düzenlenmesi için varsayılan bir mekanizma sağlar (Neubauer ve Schreiber, 1989).

APX; $H_2O_2$ (mM aralığı) için CAT ve POX'dan (mM aralığı) daha yüksek bir afiniteye sahiptir ve stres sırasında ROS süpürülmesinde daha önemli bir role sahip olabilir (Gill ve Tuteja, 2010). Bitkilerde APX'ın artan ifadesi, farklı stres koşulları sırasında gösterilmiştir. Cd stresi altında *T. aestivum*'da artmış yaprak APX aktivitesi rapor edilmiştir (Khan ve ark., 2007).

### 2.6.1.7. Monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR: EC 1.6.5.4)

MDHAR, kloroplastik ve sitozolik izozimler halinde bulunan bir flavin adenin dinükleotid (FAD) enzimidir. MDHAR, elektron alıcısı olarak monodehidroaskorbat (MDHA) için yüksek bir spesifiklik sergiler, elektron verici olarak NADPH yerine NADH'ı tercih eder (Gill ve Tuteja, 2010). APX'a eşlik eden MDHAR, peroksizomlarda ve mitokondrilerde de bulunur, burada $H_2O_2$'i temizler (Del Río ve ark., 2002). MDHAR aktivitesi bitkilerde yaygındır. MDHAR izoenzimlerinin, kloroplastlar (Hossain ve ark., 1984), sitozol ve mitokondri ve peroksizomlar (Jimenez ve ark., 1997) gibi çeşitli hücresel bölmelerde olduğu saptanmıştır. Kloroplastlarda, MDHAR iki fizyolojik fonksiyona sahip olabilir: askorbatın MDHA'dan rejenerasyonu ve dioksijenin fotoredüksiyonunun $O_2^{\bullet-}$ MDHA substrat olmadığında ara buluculuğudur (Miyake ve ark., 1998).

### 2.6.1.8. Dehidroaskorbat redüktaz (DHAR: EC 1.8.5.1)

DHAR aşırı ekspresyonunun çeşitli abiyotik streslere karşı bitki toleransını arttırdığı tespit edilmiştir (Horemans ve ark., 2000). DHAR, elektron donörü olarak indirgenmiş glutatyon (GSH) kullanarak dehidroaskorbatı (DHA) askorbata düşürür (Amin Elsadig ve ark., 2007). Böylece, askorbatın indirgenmiş halde tutulmasında önemli bir rol oynar. Askorbatın doğrudan MDHA'dan enzimatik ve enzimatik olmayan rejenerasyon olasılığına rağmen, askorbat her zaman yapraklarda ve diğer dokularda oksitlendiğinde DHA üretilir. Çok kısa ömürlü bir kimyasal olan DHA ya geri dönüşümsüz olarak 2,3-diketogulonik aside hidrolize edilebilir ya da DHAR tarafından askorbata geri dönüştürülebilir (Sharma ve ark., 2012).

DHAR tohumlarda, köklerde ve hem yeşil hem de solmuş sürgünlerde bol miktarda bulunur (Das ve Roychoudhury, 2014). Kuraklık, metal toksisitesi ve soğuk gibi çevresel stresler, DHAR'ın bitkilerde aktivitesini arttırır (Boo ve Jung, 1999;

Sharma ve Dubey, 2005; Yoshida ve ark., 2006; Sharma ve Dubey, 2007; Maheshwari ve Dubey, 2009).

### 2.6.1.9. Glutatyon redüktaz (GR: EC 1.6.4.2)

GR, hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunan bir flavoprotein oksidoredüktazdır (Romero-Puertas ve ark., 2006). Askorbat–glutatyon döngüsünün temel enzimlerinden biri GR'dir. Düşük veya yüksek molekül ağırlıklı disülfür substratlarıyla indirgenmiş piridin nükleotidleri arasında elektron aktarımını katalizleyen GR enziminin esas görevi, bir hücre ortamında bulunan GSH/GSSG oranının korunmasını sağlamaktır (Temel ve ark., 2017). ASA-GSH döngüsünün potansiyel bir enzimidir ve GSH'ın indirgenmiş durumunu koruyarak ROS'a karşı savunma sisteminde önemli bir rol oynar. Ağırlıklı olarak kloroplastlarda lokalizedir, fakat bu enzimin küçük bir kısmı mitokondri ve sitozolde de bulunmuştur (Edwards ve ark., 1990; Creissen ve ark., 1994). GR ve GSH, bir bitkinin çeşitli stresler altında toleransının belirlenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır (Rao ve Reddy, 2008). GR aktivitesinin *C. annuum* (León ve ark., 2002), *A. thaliana* (Skorzynska-Polit ve ark., 2003), *V. mungo* (Singh ve ark., 2008), *T. aestivum* (Khan ve ark., 2007) ve *B. juncea* (Mobin ve Khan, 2007)'da Cd varlığında arttığı rapor edilmiştir.

### 2.6.1.10. Peroksidaz (POX: EC 1.11.1.7)

Peroksidaz enzimi bitkilerde; hücre duvar proteinlerinin bağlanması (Fry, 1986), çimlenme (Yukio, 2002), sebze ve meyvelerin yetişme dönemleri süresince indole asetik asit miktarının ayarlanması (Agostini ve ark., 1997), savunma mekanizmaları (Bartonek-Roxå ve ark., 1991), lignin biyosentezi (Duarte-Vázquez ve ark., 2000), hormonal faaliyet (Wakamatsu ve Takahama, 1993) ve oksidatif stres (Susumu ve ark., 2001) gibi hayati fonksiyonlarda çok önemli görevler almaktadır. POX, SOD'un, $O_2^{\bullet-}$ radikallerini süpürmesiyle ortaya çıkan $H_2O_2$'in kloroplastlarda süpürülmesinde rol oynayan önemli enzimlerden birisidir (Asada ve Takahashi, 1987). Peroksidazlar, hidroksilik veya peroksidatif aktiviteleri sayesinde, birçok hücre organelinde ROS üretimini ve süpürülmesini düzenleyebilir ve böylece büyüme ve biyotik/abiyotik stres tepkileri gibi birçok bitki prosesine dahil olabilirler (Passardi ve ark., 2005).

### 2.6.2. Reaktif oksijen türlerine karşı enzimatik olmayan antioksidanlar

Enzimatik olmayanlar antioksidanlar; askorbik asit (AsA), glutatyon (GSH), α-tokoferoller (vitamin E), karotenoidler (Car) ve fenolik bileşiklerdir.

#### 2.6.2.1. Askorbik asit (Vitamin C)

Askorbik asit, en bol, güçlü ve suda çözünür antioksidandır. Bitkilerde ROS'un neden olduğu hasarı önleme veya en aza indirgeme görevi görür (Smirnoff, 2005). Bitkilerde bulunan çoğu hücrelerde, organellerde ve apoplastlarda tespiti yapılmıştır. Sulu fazlarda birçok enzimatik olan ve enzimatik olmayan reaksiyonlarda elektron verebilme kabiliyeti sebebiyle ana ROS temizleyicisidir. Bitkilerin yapraklarında ve kloroplastların stromasında yoğunlaşmış olarak askorbat halinde redükte formda görülür. ROS'lardan süperoksit, hidroksil radikali ile singlet oksijeni temizler ve hidrojen peroksidi suya askorbat peroksidaz reaksiyonu ile indirger (Lamb ve Dixon, 1997). Tokoferoksil radikalinden tokoferolün yeniden rejenerasyonunu sağlayarak membranların korunmasına katkıda bulunur (Mehlhorn ve ark., 1996).

Tüm bitki dokularında ortaya çıkar, genellikle fotosentetik hücrelerde ve meristemlerde (ve bazı meyvelerde) daha yüksektir. Tamamen gelişmiş kloroplastlar ile en yüksek klorofil içeren olgun yapraklarda konsantrasyonunun en yüksek olduğu rapor edilmiştir. Normal fizyolojik koşullar altında askorbatın çoğunlukla yapraklarda ve kloroplastta indirgenmiş formda mevcut olduğu bildirilmiştir (Smirnoff, 2000). Toplam askorbatın yaklaşık olarak % 30 ile % 40'ı kloroplasttadır ve 50 mM kadar yüksek stromal konsantrasyonları bildirilmiştir (Foyer ve Noctor, 2005a). Askorbat bir dizi enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonda elektron verme kabiliyeti nedeniyle en güçlü ROS temizleyici olarak kabul edilir. Doğrudan $O_2^{\bullet-}$ ve $OH^{\bullet}$'i temizleyerek ve tokoferoksil radikalinden α-tokoferolü yenileyerek membranlara koruma sağlayabilir (Gill ve Tuteja, 2010). Cd maruziyeti sırasında oksitlenmiş askorbat içeriğinin *H. vulgare* bitkilerinde arttığı bildirilmiştir (Demirevska-Kepova ve ark., 2006).

#### 2.6.2.2. Glutatyon (GSH)

Bitki dokularında indirgenmiş formda (GSH) bol miktarda bulunur ve sitozol, endoplazmik retikulum, vakuol, mitokondri, kloroplastlar, peroksizomlar ve apoplast

gibi tüm hücre bölümlerinde lokalizedir (Mittler ve Zilinskas, 1992; Jiménez ve ark., 1998). Yapısında sülfür bulundurması sebebiyle GSH konjugasyonu ile ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunu sağlar (Lamb ve Dixon, 1997). Antioksidan etkisini ise yapısında merkezi olarak bulunan sistein rezidüsü ile yerine getirir. Sitotoksik $H_2O_2$'i direk olarak; hidroksil, süperoksit radikalleri ile singlet oksijeni ise enzimatik olmayan bir biçimde etkisizleştirir (Avsian-Kretchmer ve ark., 1999). Askorbat glutatyon döngüsü ile suda çözünen ve güçlü bir antioksidan olan askorbatın rejenerasyonunu sağlamaktadır (Lamb ve Dixon, 1997). *P. sativum* (Metwally ve ark., 2004), *Sedum alfredii* (Sun ve ark., 2007) ve *V. mungo* (Molina ve ark., 2008)'da artan Cd konsantrasyonu ile indüklenen GSH konsantrasyonu rapor edilmiştir.

### 2.6.2.3. α-Tokoferoller (E Vitamini)

Tokoferoller ile tokotrienoller olarak ve α, β, γ, δ alt grupları ile 8 farklı tiptedir. Tokoferoller yalnız bitkisel organizmalar tarafından sentezlenir ve bitkilerin bütün kısımlarında bulunur. Özellikle de yoğun olarak kloroplast membranlarında α-tokoferol bulunur ve bu kısımda oksijenin etkisi ile varlığını gösteren oksidatif strese karşı koruyucu bir etki sağlar. Hücre membranlarındaki lipid peroksidasyonu sonucu meydana gelen alkoksil, lipid peroksil ve alkil radikallerine karşı bir koruyucu etki sağlar. Oluşan tokoferil radikali de askorbat, redükte glutatyon ve koenzim Q ile tokoferole dönüştürülür. Tokoferoller direk olarak ROS'ları etkisizleştirir. Özellikle singlet oksijeni, tokoferolün geri dönüşümsüz oksidasyonu ile etkisizleştirirler. İlaveten membranların akıcılığını ve geçirgenliğini de düzenleyerek stabilizasyonu sağlar. Özellikle tokoferollerin membranlarda bulunan yağ asitleri ve lizofosfolitlerle kompleks bir yapı oluşturması membranları zararlı etkilere karşı korumaktadır (Hofius ve Sonnewald, 2003).

### 2.6.2.4. Karotenoidler (Car)

Car, bitkilerde üç ana işlevi yerine getirir. İlk olarak, 400 ila 550 nm dalga boyunda ışığı emerler ve klorofile aktarırlar (Siefermann-Harms, 1987). İkinci olarak, fotosentez sırasında doğal olarak oluşan $^1O_2$ ve diğer zararlı serbest radikalleri süpürmesidir (Collins, 2001). Üçüncüsü, tillakoyid membran stabilizasyonu sağlar (Niyogi ve ark., 2001). Artan Cd konsantrasyonuna sahip *Phyllanthus amarus* ve *V.*

*mungo* bitkilerinde, Car ve klorofil içeriğinin azaldığı bildirilmiştir (Singh ve ark., 2008) *H. vulgare* fidelerinin Car içeriği Cd stresi altında azalmıştır (Demirevska-Kepova ve ark., 2006).

### 2.6.2.5. Flavonoidler

Fenolik bileşikler arasında bulunan flavanoidler, lignin, tanenler ve hidroksisinamat esterleri bitkilerin yapısında bol miktarda yer alır. Polifenollerin, tokoferoller ve askorbata göre in vitro şartlarında daha iyi antioksidan olduğu belirlenmiştir. Antioksidan özelliklerini; iyi birer hidrojen ya da elektron vericisi olmaları, zincir kırıcı özellikleri ve geçiş metalleriyle şelat oluşturmaları ile gösterirler. Membranların akıcılığını azaltarak, lipidlerin yer alış sırasını düzenleyerek ve serbest radikallerin hücreye difüzyonunu engelleyerek peroksidasyon reaksiyonlarını durdururlar. Bitki hücrelerindeki $H_2O_2$'in temizlenmesi reaksiyonunda da rol oynarlar (Paganga ve ark., 1999). Flavonoidler bitkilerde yaygın olarak görülür ve genellikle yapraklarda, çiçek kısımlarında ve polenlerde bulunur. Bitki hücrelerinde flavonoid konsantrasyonu genellikle 1 mM'ın üzerindedir (Richard ve ark., 1982). Flavonoidlerin çiçek, meyve ve tohum pigmentasyonu ile UV ışınlarına karşı koruma gibi birçok işlevi vardır. Fitopatojenlere karşı savunma (patojenik mikroorganizmalar, böcekler, hayvanlar), bitki verimliliğinde rol alma, polenin çimlenmesinde ve bitki mikrop etkileşimlerinde sinyal molekülleri olarak etki etmektedir (Olsen ve ark., 2010).

# 3. MATERYAL VE YÖNTEM

## 3.1. Bitki Materyalinin Temini ve Saklanması

Tezimizde kullandığımız buğday çeşidi olan Ahmetağa (*Triticum aestivum L. cv. ahmetağa*) tohumları Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Laboratuvara getirilen tohumlar, denemenin kurulması aşamasına kadar +4 $^{o}$C'de muhafaza edilmiştir.

## 3.2. Denemenin Kurulması

Laboratuvar ortamında dolgun görünüşe sahip ve aynı boyutta olan buğday tohumları seçilerek yüzey sterilizasyonu işleminden geçirilmiştir. Sterilizasyonda tohumlar % 2.5'lik sodyum hipoklorid içerisinde 10 dakika bekletildikten sonra steril deiyonize su ile yıkanmıştır. Ardından tohumlar 20'şerli gruplar halinde içerisinde steril saf su ıslatılmış kurutma kağıdı bulunan steril petri kutularında 24±1 $^{o}$C'de, karanlık ortamda inkübatör içerisinde çimlenmeye bırakılmıştır. 72 saat sonunda çimlenmiş olan tohumlar, 12 saat aydınlık (350 µmol $m^{-2}s^{-1}$ ışık şiddetinde, 24 $^{o}$C sıcaklık ve % 50 nem) ve 12 saat karanlık (21 $^{o}$C sıcaklık, % 60 nem) ışık periyodunda su kültürü ortamına aktarılarak iklim odasında 21 günlük fideler haline getirilmiştir. Buğday fideleri gruplandırılarak en uygun molibden konsantrasyonları için 0.15 mM ve 0.3 mM $MoO_3$ dozları ile birlikte fidelere stres faktöründe kullanılan kadmiyum konsantrasyonları için en uygun doz 150µM $CdCl_2$ ve 300µM $CdCl_2$ bir hafta süresince buğday fidelerine uygulanmıştır. Fideler kontrollü şartlar altında 7 gün boyunca strese maruz bırakıldıktan sonra 7. gün hasat edilerek fizyolojik ölçümler ve kloroplast izolasyonları yapılmıştır.



**Şekil 3.1.** 21 gün süresince su kültüründe yetiştirilen buğday (*Triticum aestivum* L.) fidelerinin genel görünümü

## 3.3. Fizyolojik Ölçümler

### 3.3.1. Yaprakların nisbi su içerikleri

Yaprakların bağıl su içeriklerinde meydana gelen değişimleri belirlemek için her bir gruptan 4'er yaprak alınarak yaş ağırlıkları (YA), turgorlu ağırlıkları (TA) ve kuru ağırlıkları (KA) ölçülmüştür. Her gruba ait yaprak örneklerinin bağıl su içerikleri aşağıdaki formüle göre % olarak hesaplanmıştır (Richard ve Gail, 1974).

$$\text{Bağıl Su İçeriği} = [(YA-KA)/(TA-KA)]x100$$

### 3.3.2. Yaprakların ozmotik potansiyel değişimleri

Stres ve molibden uygulamalarının sonrasında her bir gruba ait 4'er yaprağın ozmotik potansiyellerinde meydana gelen değişimler Wescor 5600 marka ozmometre ile mmol $kg^{-1}$ olarak ölçülmüştür. Ölçülen değerler Santa-Cruz ve ark. (2002)'a göre $2.408 \times 10^{-3}$ katsayısıyla çarpılarak MPa'ya dönüştürülmüştür.

### 3.3.3 Klorofil Flüoresans Ölçümleri

Buğday fidelerinin kadmiyum stresine gösterdiği yanıtları ve molibdenin fotosentetik aygıtların korunmasında önemli rolünün var olup olmadığını anlamak için bitki verim analiz cihazı (Plant Efficiency Analyser-Hansatech Instruments Ltd.) ile PS-II'nin fotokimyasal verimi (Fv/Fm)'nin tespiti önemli bir parametredir. Hasat işlemleri esnasında klorofil flüoresans ölçümleri, kadmiyum ve molibden uygulamalarının 7. gününde, her bir gruba ait 5 farklı bitkinin en genç katlanmamış yaprakları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir gruptan yaklaşık 1 $cm^2$ yüzey alanına sahip yaprak örnekleri alınarak, 10 dakika karanlıkta bekletilmiştir.

## 3.4. Buğday Yapraklarında Gerçekleştirilen Biyokimyasal Parametre Ölçümleri

Tez çalışmamızda molibdenin kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında, kloroplastlardaki stresin olumsuz etkilerini azaltmadaki rollerini tespit edebilmemiz için yapraklarda;

1- Kloroplast izolasyonu,
2- Lipid peroksidasyon oranlarının belirlenmesi,
3- Hidrojen peroksit içeriklerinin belirlenmesi,
4- Prolin değişimlerinin belirlenmesi,
5- Kloroplastik antioksidan enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesi,
    - Süperoksit dismutaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi,
    - Peroksidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi,
    - Askorbat peroksidaz enziminin aktivite tayini,
    - Glutatyon redüktaz enziminin aktivite tayini
    - Monodehidroaskorbat redüktaz enziminin aktivite tayini,
    - Dehidroaskorbat redüktaz enziminin aktivite tayini,
    - NADPH oksidaz aktivitesi gibi biyokimyasal ölçümler gerçekleştirilmiştir.

### 3.4.1. Kloroplast izolasyonu

Buğday fidelerine ait kloroplastlar Wang ve ark. (2009) ve Sgherri ve ark. (2000) tarafından yapılan metodun modifiye edilmesiyle izole edilmiştir. Hasat edilen fidelere ait her bir gruptan 5'er g yaprak, izolasyon tamponun (0.33 M sorbitol, 2 mM EDTA, 50 mM Hepes–KOH (pH 7.5), 0.1% (w/v) BSA, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $MnCl_2$, 1 mM DTT) 20 ml'si ile blender içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenat 4 katlı tülbent bezinden süzdürülüp, kalan solüsyon 4 $^oC$'de 200 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet kısmı izolasyon tamponu (5 ml) ile tekrardan süspanse edilip 2500 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Kalan pellet % 25 (v/v) Percoll (12.5 ml) içeren izolasyon tamponu ile üçüncü kez süspanse edilip 15800 g'de 20 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen pellet, BSA ve $MnCl_2$ içermeyen izolasyon tamponunda 2500 g'de 5 dakika santrifüjlenmiş, dipte kalan pellet 50 mM fosfat tamponu (pH 7.8), 0.1 mM EDTA ve 1 mM $MgCl_2$ içeren tamponda homojenize edilmiştir. Elde edilen süpernatant, enzim/izoenzim aktivitesi ve ROS tayinlerinde kullanılmıştır. APX tayini için ayrıca 2 mM askorbat içeren izolasyon tamponu kullanılmıştır. Ekstraksiyon prosedürünün tümü +4$^oC$'de gerçekleştirilmiştir.

### 3.4.2. Lipid peroksidasyon oranlarının belirlenmesi

Stres altında meydana gelen hasarın hücresel ve organel düzeyinde şiddetini en iyi şekilde gösteren lipid peroksidasyon (TBARS) değişimleri, malondialdehit içeriği ölçülerek belirlenmiştir. TBARS içeriği, Rao ve Sresty (2000)'nin metodunda bazı değişiklikler yapılarak tespit edilmiştir. Hasat edilen sağlam kloroplastların bir kısmı, trikloroasetik asit (TCA) ile homojenize edilmiştir. 10.000g x 5 dk santrifüj edildikten sonra tüplere aktarılan süpernatanta, tiobarbitürik asit (TBA) ve TCA içeren reaksiyon karışımı pipetlenmiş ve 95 °C'de 30 dk sıcaklık uygulaması yapılmıştır. Soğutma işleminden sonra karışım 10.000g x 15 dk santrifüjlenmiştir. Oluşan süpernatantın 532 ve 600 nm'deki absorbans değerleri okunmuştur. TBARS konsantrasyonu ($\epsilon$=155 $mM^{-1}$ $cm^{-1)}$ ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmış ve nmol $g^{-1}$ YA olarak ifade edilmiştir.

### 3.4.3. Hidrojen peroksit içeriklerinin belirlenmesi

Reaktif oksijen türlerinden birisi olan $H_2O_2$ içerikleri, Cheeseman (2006)'nın yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. İzole edilen kloroplastların $H_2O_2$ içeriği eFOX reaktifi (250 µM ferro amonyum sülfat, 100 µM xylenol orange, 100 µM sorbitol ve % 1 etanol (v/v)) kullanılarak ölçülmüştür. Ekstraksiyon için 25 mM $H_2SO_4$ içeren soğuk aseton kullanılmıştır. Numuneler 5 dakika boyunca 5.000 x g'de 4 ° C'de santrifüj edilmiş ve 50 µl süpernatant için 950 µl eFOX reaktifi kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı 30 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 550 ve 800 nm'de absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Örneklerdeki $H_2O_2$ konsantrasyonları bilinen $H_2O_2$ miktarlarına göre hazırlanan standart eğim grafiğine göre hesaplanmıştır.

### 3.4.4. Prolin değişimlerinin belirlenmesi

Bates ve ark. (1973)'nın metoduna göre yapılmış olan prolin içeriklerinde oluşan değişimlerin gözlenmesi strese toleransı açısından büyük öneme sahiptir. Hasat edilen örnekler % 3'lük 5-sülfosalisilik asit hidrat ile homojenize edilmiştir. 5.000g x 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatanta asit ninhidrin ve glasiyel asetik asit eklenerek 95 °C'de 75 dk su banyosunda bekletilmiştir. Soğutma işleminden sonra karışıma toluen ilave edilerek, sıvı fazdan aspire edilen toluen fraksiyonunun 520 nm'deki absorbansı spektrofotometrede okunmuştur. Prolin içerikleri daha önceden hazırlanmış olan kalibrasyon eğrisi yardımıyla hesaplanmış ve µmol prolin $g^{-1}$ YA olarak belirtilmiştir.

### 3.4.5. Antioksidan enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesi

#### 3.4.5.1. Süperoksit dismutaz enzim aktivitelerinin ve izozim profillerinin belirlenmesi

Beauchamp ve Fridovich (1971)'e göre süperoksit dismutaz (SOD) izozimlerinin elektroforetik ayrımı, riboflavin ve NBT boyaması yapılarak gerçekleştirilmiştir. 100 µg protein içeren örnekler, denatüre olmayan (SDS içermeyen) poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)'ne tabi tutulmuştur (Laemmli, 1970). SOD örnekleri 4 $^{o}$C'de sabit akım altında (120 mA), % 5 toplayıcı jel (stacking gel) ve % 12 ayırıcı jelde (seperating gel) yürütülmüştür. Elektroforezden sonra farklı SOD

izozimleri, boya çözeltisine inhibitörler eklenerek belirlenmiştir. Potasyum siyanür (KCN), Cu/Zn-SOD inhibisyonu için, $H_2O_2$ ise Fe-SOD ve Cu/Zn-SOD inhibisyonu için boya çözeltisine eklenmiştir. Mn-SOD aktivitesi ise her iki inhibitöre de direnç göstermiştir. Total SOD aktiviteleri Biorad Image Lab. Version 4.01 software programıyla densitometrik yöntemle belirlenmiştir.

### 3.4.5.2. Peroksidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Peroksidaz (POX) aktivitesi Herzog ve Fahimi (1973)'ye göre tespit edilmiştir. Spektrofotometrede 465 nm dalga boyunda DAB'ın oksidasyonu ile birlikte absorbansta oluşan artış takip edilerek POX enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Reaksiyon karışımı; DAB, % 0.6'lık $H_2O_2$, deiyonize su ve enzim ekstraktından oluşmaktadır. Reaksiyon, ortama $H_2O_2$'in katılmasıyla başlatılmış ve 180 sn boyunca absorbans artışı takip edilmiştir. Spesifik enzim aktivitesi, dakikada tüketilen µmol $ml^{-1}$ $H_2O_2$ olarak ifade edilmiştir. Peroksidaz izozimlerinin elektroforetik ayrımı Seevers ve ark. (1971)' na göre yapılmıştır. 25 µg protein içeren örnekler % 10'luk nativePAGE'e yüklenerek sabit akım altında (120 mA) yürütülmüştür. Yürütme işleminden sonra oluşan bantları görebilmek için jeller 15 dakika boyunca, benzidin ve hidrojen peroksit içeren 200 mM Na-asetat tamponunda (pH 5.0) inkübe edilmiştir. Daha sonra jeller deiyonize su ile yıkanmıştır.

### 3.4.5.3. Askorbat peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11) enziminin aktivite tayini

Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin tayini Nakano ve Asada (1981)'ya göre yapılmıştır. Askorbat okside oldukça, spektrofotometredeki 290 nm'deki absorbansta oluşan azalma okunmuş ve hesaplamalar askorbatın ekstinksiyon katsayısı kullanılarak (2.8 $mM^{-1}cm^{-1}$) yapılmıştır. Reaksiyon karışımı içerisinde; 50 mM sodyum fosfat (Na-P) tamponu (pH 7), 0.5 mM askorbat, 0.1 mM EDTA $Na_2$ ve 1.2 mM $H_2O_2$ bulunmaktadır. Askorbatın oksidasyonu, enzim ekstraktının katılmasıyla başlatılmış ve absorbanstaki azalma 180 sn boyunca takip edilmiştir. 1 birim APX aktivitesi, dakikada okside olan 1 mmol $ml^{-1}$ askorbat olarak ifade edilmektedir.

### 3.4.5.4. Glutatyon redüktaz enziminin aktivite tayini

Foyer ve Halliwell (1976)'in metoduna göre yapılan glutatyon redüktaz (GR) aktivitesi, spektrofotometrede 340 nm dalga boyundaki absorbans azalmasından yola çıkılarak tespit edilmiştir. NADPH varlığında, GSSG miktarındaki azalma, kuvartz küvette, 180 sn boyunca takip edilmiştir. Hesaplamalar, GR enziminin ekstinksiyon katsayısı ε=6.2 $mM^{-1}$ $cm^{-1}$ kullanılarak yapılmıştır. Spesifik enzim aktivitesi, dakikada indirgenen 1 mmol $ml^{-1}$ GSSG miktarı olarak ifade edilmektedir.

### 3.4.5.5. Monodehidroaskorbat redüktaz enziminin aktivite tayini

Hossain ve ark. (1984)'nın yöntemine göre gerçekleştirilen monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) aktivite değişimlerinin reaksiyon karışımı; 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.2 mM NADPH, 2.5 mM AsA, 0.5 ünite askorbat oksidaz (AO) içermektedir. Reaksiyon AO'nun eklenmesiyle başlamıştır. MDHAR aktivitesi 340 nm'de 1 dakika süresince absorbansta meydana gelen değişim izlenip 6.2 $mM^{-1}cm^{-1}$ ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

### 3.4.5.6. Dehidroaskorbat redüktaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Nakano ve Asada (1981)'nın yöntemine göre tespit edilerek yapılan dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) aktivitesinin reaksiyon karışımı; 50 mM K-P (pH 7.0), 2.5 mM GSH ve 0.1 mM DHA içermektedir. Aktivite örnek solüsyonuna reaksiyon karışımının eklenmesiyle başlamıştır. Aktivite 265 nm'de 1 dakika absorbansta meydana gelecek değişime göre 14 $mM^{-1}$ $cm^{-1}$ ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

### 3.4.5.7. NADPH oksidaz aktivitesi

XTT'nin 470 nm'de indirgenmesi izlenerek gerçekleştirilen total NADPH oksidaz (NOX) aktivitesinde, Jiang ve Zhang (2002)'ın yöntemi takip edilmiştir. NOX izozim profilleri Sagi ve Fluhr (2001)'un metodu ile ortaya konulmuştur. Jellere 25 µg protein içeren örnekler yüklenmiştir.

### 3.5. İstatistiksel Analizler

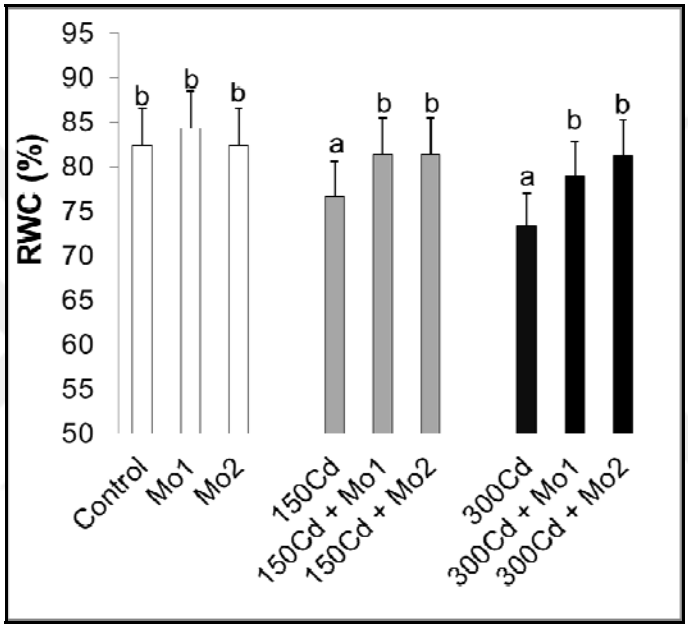
Tez çalışması süresince deneme 3 kez tekrar edilmiş ve büyüme parametreleri dışında (n=5) her bir analiz 6 tekrardan oluşmaktadır. Elde edilen veriler ANOVA ile analiz edilmiş ve ortalamalar arasındaki farklılıklar LSD testi ile karşılaştırılmıştır. $P< 0.05$ olan değerler istatistiksel bakımdan anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS programı (versiyon 20.0) ile gerçekleştirilmiştir. Bütün şekillerdeki hata çubukları ortalama standart hatayı göstermektedir ve çizelgelerdeki değerler ortalama şeklinde verilmiştir.

# 4.ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

## 4.1. Büyüme Parametrelerinde Meydana Gelen Değişimler

### 4.1.1. Yaprakların bağıl su içerikleri

Eksojen molibden uygulamasının kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarının bağıl su içeriklerinde (RWC) meydana getirdiği ortalama değişimler Şekil 4.1'de verilmiştir.




**Şekil 4.1.** Kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında molibden uygulamalarının yaprak nisbi su içeriklerinde (RWC) meydana getirdiği ortalama % değişimler (n=5). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir (P< 0.05).

Yalnız molibden uygulaması yapılan buğday yapraklarının RWC değerlerinin kontrolle benzer seviyede olduğu tespit edilmiştir. Her iki konsantrasyondaki yalnız kadmiyum uygulaması RWC'yi kontrole göre önemli oranda azaltmış, azalma oranları sırasıyla % 6.9 ve % 10.9 bulunmuştur. Stresle birlikte molibden uygulamalarında RWC pozitif yönde etkilenmiştir. 150 µM + Mo uygulanan gruplar yalnız stres uygulanan grupla kıyaslandığında, kombinasyonlu gruplardaki RWC artış oranları her iki grupta da % 6.1' dir. Yüksek konsantrasyonda Cd'ye maruz bırakılan yapraklarda ise artış oranları sırasıyla % 7.4 ve % 10.7'dir.

Ağır metal stresinden dolayı bitkide ilk etapta en belirgin etki köklerinde görülür. Ağır metale yüksek miktarda maruz kalan bitkilerin kökleri normal bitkilerin köklerine kıyasla oldukça kısa kalmakta ve saçak kök sayısında azalma olmakta,

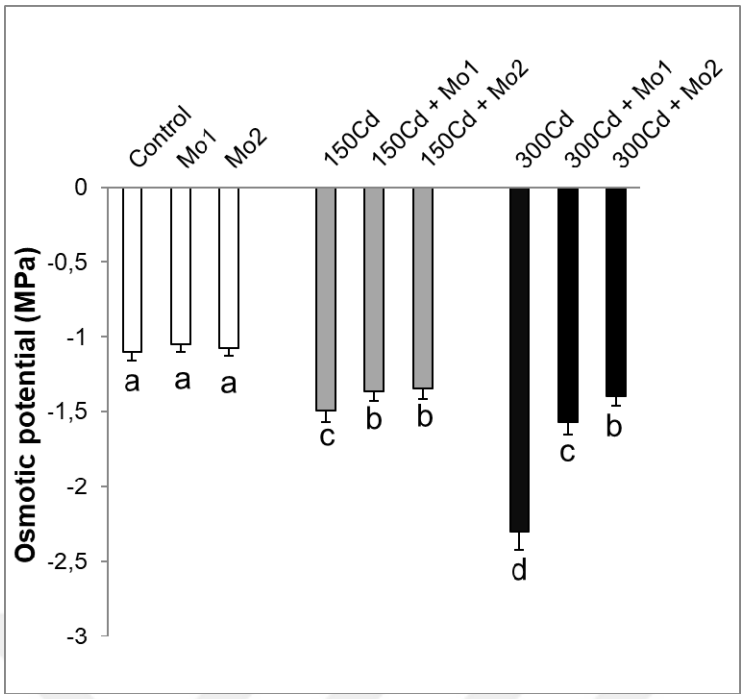
bitkinin su alımında da negatif bir etki görülebilmektedir. Ağır metal stresi hem simplastik hem de apoplastik kısa mesafeli su transferini yavaşlatabilmektedir. Böylece suyun vasküler sisteme girişini engelleyerek sürgünlere su taşınımını sınırlandırmaktadır (Rucińska-Sobkowiak, 2016). Tezimizde Cd stresi RWC üzerine olumsuz bir etki göstermiştir. Kadmiyum konsantrasyonundaki artış ile ters orantılı olarak RWC azalmıştır. Benzer bir şekilde Mahmud ve ark. (2017)'nın yapmış olduğu çalışmada, iki düzey Cd stresine (0.25 ve 0.5 mM $CdCl_2$) maruz kalan üç *Brassica* türünün (*B. napus*, *B. campestris* ve *B. juncea*) RWC değerlerine bakıldığında her üç türde de artan Cd konsantrasyonları ile RWC değerlerinin azaldığı gözlemlenmiştir.

Cd ilaveli (100, 200 ve 300 µM Cd) ve Cd içermeyen besin çözeltisinde 4 gün boyunca büyütülen *Helianthus annuus* L.'da RWC, sadece 200 ve 300 µM Cd uygulanan yapraklarda olumsuz etkilenmiştir. Stres altında RWC, kontrole göre sırasıyla % 11 ve % 14 azalmıştır (Pena ve ark., 2006). Ahmad ve ark. (2011), Cd stresine maruz bırakılan *Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss. fidelerine ekzojen salisilik asit (SA) uygulamalarının RWC üzerine olumsuz etkileri azaltıcı rollerinin olduğunu bildirmişlerdir. Agami ve Mohamed (2013), buğday bitkilerinin 500 veya 1000 µM $CdCl_2$'e maruz bırakıldığında RWC değerlerinde azalmaların olduğunu tespit etmişlerdir. Özellikle 1000 µM Cd ile muamele edilen fidelerde bu oran % 52.27'dir.

Çalışmamızda stres ile birlikte molibden uygulamaları yaprak su içeriğini artırmıştır. Benzer bir şekilde Wu ve ark. (2014)'ı kışlık buğday (*Triticum aestivum* L.) olarak yeterli Mo "97003" ve yetersiz Mo "97014" olmak üzere iki çeşit kullanmışlardır (Yu ve ark., 2002). Mo uygulaması, kışlık buğdayının her iki çeşidinde de PEG-6000 stresine karşı RWC'yi önemli ölçüde arttırdığı rapor edilmiştir. Molibden uygulamasına göre RWC'nin ortalama artışı; yeterli Mo çeşidi olan 97003'de % 8.06 iken, yetersiz Mo çeşidi olan 97014'de % 9.61 olarak görülmüştür. RWC, kuraklık stresi altındaki her iki kışlık buğday çeşidinde Mo uygulamasıyla önemli ölçüde indüklenmiştir. Ayrıca transpirasyon, kışlık buğday çeşitlerinin her ikisinde de Mo uygulaması ile artmıştır. Bu, kökün su emme kabiliyetinin ya da su tutma kapasitesinin, her iki çeşitte de Mo uygulamasıyla indüklendiğini bildirmişlerdir.

### 4.1.2. Ozmotik potansiyellerde meydana gelen değişimler

Kadmiyum stresi ve molibden uygulamalarının buğday yapraklarının ozmotik potansiyelleri üzerine olası değişimleri Şekil 4.2'de gösterilmiştir.




**Şekil 4.2.** Kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında molibden uygulamalarının ozmotik potansiyelde meydana getirdiği ortalama değişimler (MPa) (n=5). Sütunlar üzerindeki aynı harfler istatistiksel olarak aynı olan değerleri göstermektedir (P>0.05).

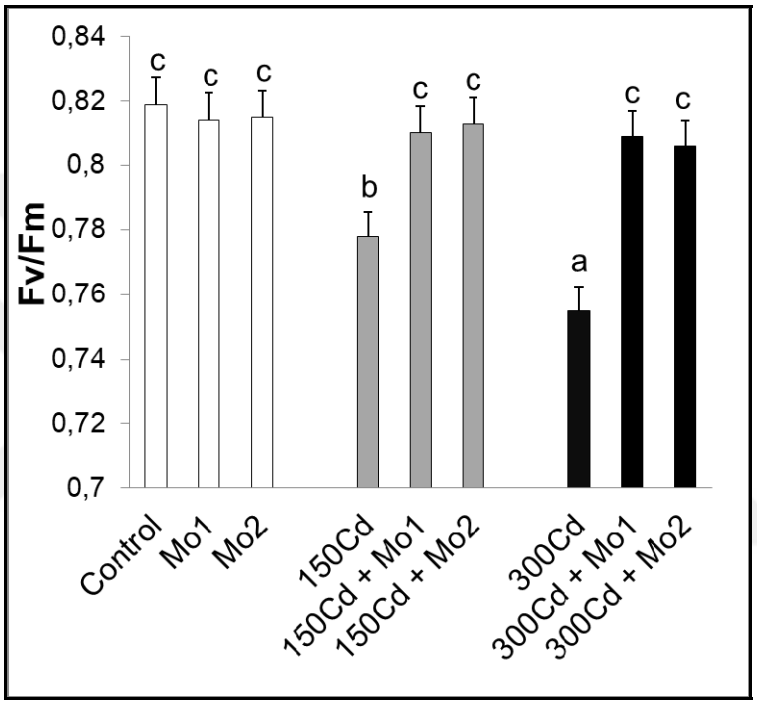
Yalnız molibdene maruz bırakılan buğday yapraklarının ozmotik potansiyellerinin kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark yoktur. 150 ve 300 µM kadmiyum uygulamaları ozmotik potansiyelde kontrole göre negatif yönde artışa (% 35.6 ve % 109.1) neden olmuştur. Yalnız strese maruz bırakılan gruplarla kıyaslandığında düşük konsantrasyonki kombinasyonlu grupların ozmotik potansiyelleri % 9.0 (150 Cd + Mo1) ve % 10.1 (150 Cd + Mo2) oranında azalmıştır. Yüksek konsantrasyon Cd altındaki kombinasyonlu gruplarda ise sırasıyla % 31.7 ve % 39.4 azalma belirlenmiştir.

Bitkilerde ağır metal birikimi ve yüksek oranda alınımı ozmotik değişikliğe, metabolik değişikliklere ve ayrıca ROS kaynaklı hasarlara neden olur (Gill ve Tuteja, 2010; Gill ve ark., 2011). Kadmiyumun neden olduğu sınırlı su alımı, hücrenin turgor durumunun korunmasını engeller (Marchiol ve ark., 1996). Toksik düzeyde kadmiyum alımı bazı mineral eksikliklerine, bitkilerde kuruma ve hücresel metabolik bozukluklara neden olur (Marscher, 2012; Gomes ve Soares, 2013). Membran geçirgenliğini ve dolayısıyla yaprak su potansiyelini azaltır (Irfan ve ark., 2014). Çalışmamızda kadmiyum stresiyle birlikte yaprakların ozmotik potansiyel değerlerinde negatif yönde artışların olduğu tespit edilmiştir. Bulgularımızı destekler nitelikte Liu ve ark.

(2012)'nın raporlarına göre kadmiyum uygulamasında ozmotik potansiyel benzer şekilde negatif yönde artış göstermiştir.

### 4.2. Klorofil Flüoresans Ölçümleri

Fotosentetik aygıtların durumunu gösteren en önemli belirteçlerden birisi olan yaprakların maksimum kuantum verimi (Fv/Fm)'ne ait bulgular Şekil 4.3'de gösterilmiştir.




**Şekil 4.3.** Kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında molibden uygulamalarının maksimum kuantum verimi (Fv/Fm)'nde meydana getirdiği ortalama değişimler (n=5). Sütunlar üzerindeki aynı harfler istatistiksel olarak aynı olan değerleri göstermektedir (P>0.05).

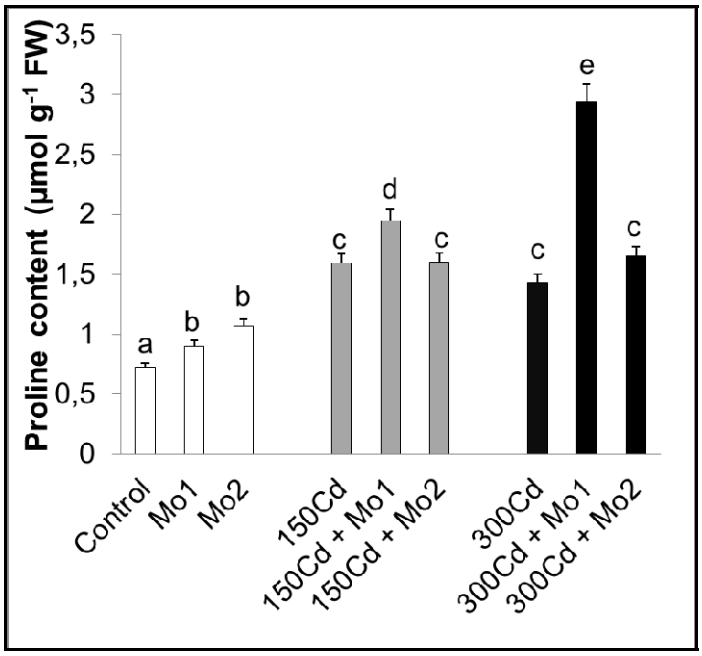
Buğday yaprakları yalnız molibden uygulamalarına maruz bırakıldığında Fv/Fm değerlerinin kontrol seviyesinde kaldığı belirlenmiştir. Buğday yapraklarına uygulanan yalnız Cd konsantrasyonundaki artışla ters orantılı olarak Fv/Fm değerleri azalmıştır. 150 µM Cd ve 300 µM Cd stresi altındaki yaprakların maksimum kuantum verimleri kontrole göre sırasıyla % 5.0 ve % 7.8 azalmıştır. Yalnız 150 µM Cd altındaki yapraklarla kıyaslandığında 150 µM Cd + Mo1 ve 150 µM Cd + Mo2 gruplarının Fv/Fm değerleri sırasıyla % 4.1 ve % 4.4 artmıştır. 300 µM Cd + Mo1 ve 300 µM Cd + Mo2 gruplarında ise % 7.1 ve % 6.7 artış olduğu belirlenmiştir. Bu durum fotosentetik aygıtların etkin bir şekilde korunmasında molibdenin önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir.

Klorofil floresans analizleri, özellikle PS II'nin fotokimyasal aktivitesinin ölçülmesinde kullanılır. Oldukça hızlı sonuç veren pratik bir yöntemdir. Fizyolojik stres çalışmalarında çeşitli floresans parametrelerinde meydana gelen değişimler, birçok çevresel stres faktörünün etkilerini belirlemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Fv/Fm değeri sıklıkla stres göstergesi olarak kullanılmakta olup, fotokimyasal reaksiyonun potansiyel verimini tanımlar (Demmig ve Björkman, 1987). Çalışmamızda kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarının Fv/Fm değerleri Cd konsantrasyonundaki artışla paralel olarak azalmıştır. Farklı konsantrasyonlarda (Control, 0 µM, 5 µM, 50 µM, 500 µM) kadmiyuma maruz kalan ayçiçeği bitkisinin yapraklarının klorofil floresan ölçümleri sonucunda Cd ile muamele edilmiş yapraklarda Fv/Fm oranı önemli ölçüde azalmıştır ve bu etki 50 ve 500 µM Cd muamelelerinde daha belirgindir (Azevedo ve ark., 2005).

## 4.3. Buğday Yapraklarında Gerçekleştirilen Biyokimyasal Analizlerin Sonuçları

### 4.3.1. Prolin içeriği

Prolin, stresle birlikte çoğu bitkide üretimi ve birikimi uyarılan önemli bir ozmotik düzenleyicidir. Kadmiyum stresi altındaki buğday fidelerinin molibden uygulamalarıyla yaprak prolin içeriklerinde meydana gelen değişimler Şekil 4.4'de verilmiştir.



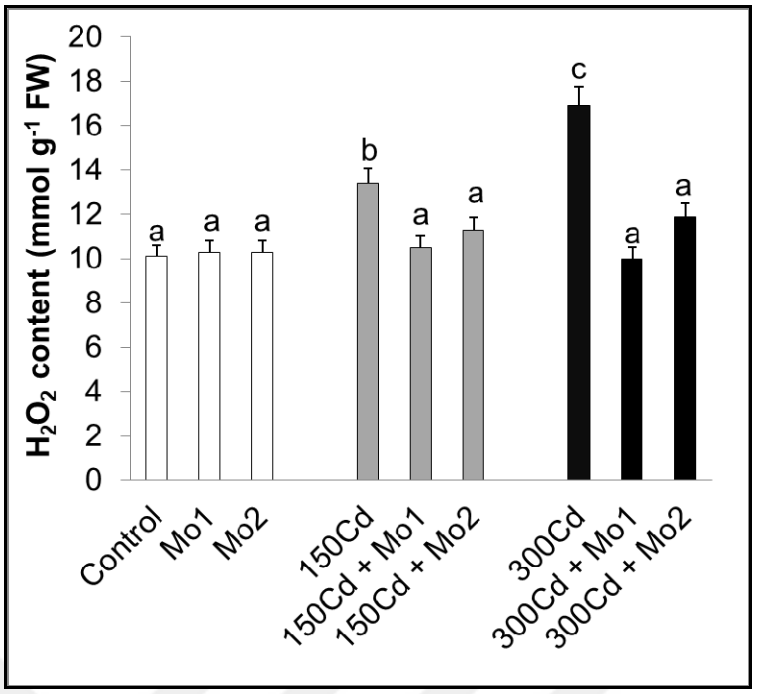

**Şekil 4.4.** Kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında molibden uygulamalarının yaprak prolin (µmol $g^{-1}$ FW) içeriklerinde gözlenen ortalama değişimler (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir ($P<0.05$).

Tüm deneme süresince stres ve molibden uygulamaları yaprakların prolin içeriklerini kontrole göre artırmıştır. En yüksek prolin içeriğine (2.94 µmol $g^{-1}$ FW) 300 µM Cd+Mo1 uygulanan fidelerde rastlanmıştır.

Prolin (Pro) ağır metal stresi gibi çevresel stresler altında bitkilerde biriken ve oldukça önem ihtiva eden ozmolitlerden birisidir. Pro, ozmotik düzenleyicisi olmasının dışında fotosentetik sistemin koruyucusu, antioksidan ve karbon kaynağı gibi görevleride vardır. Birçok bitkide yaygın olarak prolin birikimi biyotik ve abiyotik streslere karşı fizyolojik bir tepki olarak görülmektedir. Yüksek bitkiler tarafından aşırı miktarda Pro üretilmesi; ağır metal, aşırı tuzluluk, kuraklık, artan ultraviyole radyasyonu ve oksidatif stres faktörleri gibi çok çeşitli biyotik ve abiyotik streslerin sebep olduğu hasarlara karşı nonenzimatik bir etki oluşturur (Szabados ve Savoure, 2010). Çalışmamızda kadmiyum stresine bağlı olarak Pro içeriklerinde kontrol grubuna göre önemli bir artış meydana gelmiştir. Benzer olarak Irfan ve ark. (2014), *Brassica juncea* bitkisinin iki çeşidine (Varuna ve RH-30) Cd uygulaması yapmışlardır. Toprağa uygulanan kadmiyum (0, 25, 50 veya 100 mg $CdCl_2$ $kg^{-1}$)'un artan konsantrasyonuyla paralel olarak Pro içeriğinin arttığı bildirilmiştir. Varuna, tüm uygulamalara cevap olarak RH-30'a kıyasla daha fazla prolin biriktiği gözlenmiştir. Ahmad ve ark. (2011)'e göre; Cd stresine maruz bırakılan hardal bitkilerinde salisilik asit uygulaması prolin içeriğini artırmıştır. Prolindeki maksimum artış (%50.2) 200 mg/l Cd olarak görülmüştür. Çalışmamızda buğday fidelerine Mo uygulamaları Pro içeriğini pozitif yönde etkilemiştir. Zhang ve ark. (2012)'ı tuz stres altındaki Çin lahanasına 0, 0.15, 0.3 mg $kg^{-1}$ dozlarında Mo uygulamış, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, NaCl ilavesi prolin içeriğini önemli ölçüde artırmıştır.

### 4.3.2. Yaprakların hidrojen peroksit içeriklerinde meydana gelen değişimler

Cadmiyum stresi ve tek başına veya stresle birlikte uygulanan molibden uygulamalarının yaprakların $H_2O_2$ içeriklerinde meydana getirdiği değişimler Şekil 4.5'de gösterilmiştir.




**Şekil 4.5.** Kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında molibden uygulamalarının $H_2O_2$ içeriklerinde meydana getirdiği değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir ($P<0.05$)

Mo1 ve Mo2 gruplarına maruz bırakılan buğday yapraklarının $H_2O_2$ içerikleri kontrol grubu ile aynı seviyede kalmıştır. Yalnız Cd uygulamaları altındaki yaprakların $H_2O_2$ içerikleri stres konsantrasyonundaki artışla paralel olarak artış göstermiştir (kontrolün 1.3 ve 1.6 katı). Tüm deneme süresince stresle birlikte uygulanan her iki molibden konsantrasyonu da yaprakların $H_2O_2$ içeriğini düşürmüştür. $H_2O_2$ seviyesindeki en yüksek azalmaya 300 M Cd + Mo1 grubunda (%40.8) rastlanmıştır (Şekil 4.5).

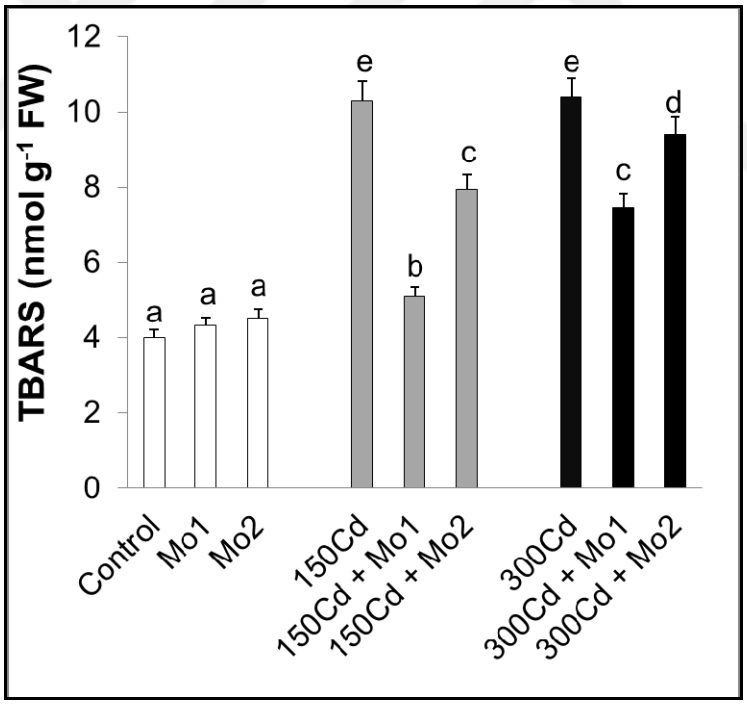
Bitki hücrelerinde $H_2O_2$ fazlalığı oksidatif stres oluşumuna yol açmaktadır. Bitki hücrelerinde $H_2O_2$, süperoksit radikalleri ile reaksiyona girerek, yüksek oranda hidroksil radikallerinin oluşumuna sebebiyet verir. Bu da hücre membran lipidlerinin peroksidasyonuna, protein yıkımına ve de hücrenin ölümüne yol açabilir (Lin ve Kao, 1998; Prousek, 2007). $H_2O_2$ tohum çimlenmesini uyarmada, kök tüy oluşumunu uyarmada, hücre duvarının güçlendirilmesinde, hücre çeperinin gevşetilmesinde, ksilem farklılaşması ile stoma hareketinin kontrolünde oldukça önemli bir role sahiptir (Dempsey ve Klessig, 1995; Wojtyla ve ark., 2016).

D'Souza ve Devaraj (2013), *Lablab purpureus* bitkisinde farklı konsantrasyonlarda Cd uygulanmış ve analiz sonuçlarına göre, zaman ve Cd konsantrasyonunun artışına bağlı olarak $H_2O_2$ içeriğinin arttığı rapor etmişlerdir.

Ahmad ve ark. (2011), 100 ve 200 mg/l Cd konsantrasyonlarında yaprakların $H_2O_2$ içeriklerinde % 48.7 ve % 61.1 artış olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, ekzojen olarak uygulanan salisilik asit, aynı Cd konsantrasyonlarında % 42.8 ve % 53.4 oranında azalmaya neden olmuştur. Çalışmamızda Cd stresi altındaki buğday bitkileri Mo uygulaması ile $H_2O_2$ konsantrasyonunu düşürmüştür. Benzer olarak Wu ve ark. (2017)'nın çalışmasında kuraklık stresi altındaki buğdayda $H_2O_2$ içeriği Mo uygulaması ile önemli ölçüde azalmıştır.

### 4.3.3. Lipid peroksidasyon seviyeleri

Lipid peroksidasyonu bitkilerin strese maruz kalması durumunda hücresel hasarın en önemli göstergelerinden birisidir. Buğday fidelerinin kadmiyum stresi ve molibden uygulamalarıyla yaprakların lipid peroksidasyon (TBARS) seviyelerinde meydana gelen değişimler Şekil 4.6'da gösterilmiştir.




**Şekil 4.6.** Kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında molibden uygulamalarının TBARS içeriklerinde (nmol $g^{-1}$ YA) meydana getirdiği değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir ($P<0.05$)

Buğday fidelerine molibden uygulamaları yaprakların TBARS içeriklerinde önemli bir değişime neden olmamıştır. TBARS içeriği kadmiyum uygulamalarıyla kontrole göre önemli derecede artış göstermiştir. Bu artış oranları uygulanan Cd

konsantrasyonundaki artışla doğru orantılıdır (150 µM Cd altında % 157.5, 300 µM Cd altında % 160). Yalnız stres uygulanan buğday yapraklarının TBARS içeriklerinin kontrolün sırasıyla 2.5 ve 2.6 katı olduğu tespit edilmiştir. Stresle birlikte molibden uygulamalarında lipid peroksidasyon içeriklerinde önemli oranda azalmaların olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.6). Yalnız strese maruz bırakılan fidelerle kıyaslandığında TBARS içeriklerindeki en yüksek azalmaya % 50.4 ile 150 µM Cd + Mo1 grubunda rastlanmıştır.

Hücre zarı ağır metal hasarının birincil bölgesi olarak kabul edilir. Stresli bitkilerde serbest radikallerin birikmesi, plazma membranında çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olur ve bu da TBARS oluşumuyla sonuçlanır (Singh ve ark., 2006). Lipid peroksidasyon seviyesi, stresli koşullar altında hücre membranlarına ROS kaynaklı hasarın bir göstergesi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Çevresel stres altında büyüyen bitkilerde lipidlerin peroksidasyonunun arttığı bildirilmiştir (Sharma ve Dubey, 2005; Han ve ark., 2009; Tanou ve ark., 2009; Mishra ve ark., 2011). Bu stresler altında lipid peroksidasyonundaki artış, ROS üretimi artışıyla paraleldir. Malondialdehit (MDA), fosfolipidlerde doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunun ilk ürünlerinden biridir ve hücre zarı hasarından sorumludur (Halliwell ve Gutteridge, 1989).

Cd stresli Sümbül fasulyesinin yapraklarının ve köklerinin TBARS içeriği zamana ve konsantrasyona bağlı bir artış gösterdiği D'Souza ve Devaraj (2013) tarafından rapor edilmiştir. TBARS seviyelerinde bu artış, Cd stresine maruz kalan bezelye (Metwally ve ark., 2004) ve pirinçte (Shah ve ark., 2001) de bildirilmiştir. Tez çalışmamızda olduğu gibi daha önceki çalışmalarda da Cd (Chaoui ve ark., 1997; Dey ve ark., 2007), Ni (Rao ve Sresty, 2000), Cu (Mazhoudi ve ark., 1997; Lombardi ve Sebastiani, 2005) ve Zn (Chaoui ve ark., 1997; Rao ve Sresty, 2000) ağır metallerinin neden olduğu ROS birikimiyle beraber membran bütünlüğünün olumsuz yönde etkilendiği rapor edilmiştir. Stresle birlikte molibden uygulamaları buğday yapraklarındaki TBARS içeriğini önemli oranda azaltmıştır. ROS üretimindeki artışla beraber kadmiyuma maruz kalan pirinç bitkilerinin sürgünlerinde lipid peroksidasyonunu gösteren TBARS içeriğindeki bir artış görülmüştür. Bu çalışmada tek başına Cd uygulaması TBARS içeriğini 100 ve 1000 µM konsantrasyonlarında sırasıyla % 489 ve % 754 artırmıştır. TBARS içeriğindeki artış, stresle birlikte salisilik asit (SA) uygulamalarında sırasıyla % 92 ve % 237 oranında azalmıştır. SA içermeyen koşullar altında TBARS içeriğindeki artış, SA uygulama işleminden sonra Cd'nin toksik

etkilerinin azaldığını göstermiştir (Panda ve Patra, 2007). Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA, genel olarak stresin bitkilerde oluşan hasarları değerlendirmek için kullanılır. Wu ve ark. (2014)'nın çalışmalarında MDA analizi sonucunda Mo uygulamasının, kışlık buğday çeşidinde MDA içeriğini, PEG-6000 stresi altında azalttığını, buğdayın radikal üretimindeki azalmayla birlikte daha az membran hasarına yol açtığını ve Mo uygulamasının lipid peroksidasyonunu hafiflettiği raporlarında belirtilmiştir.

### 4.3.4. Antioksidan enzim aktivite sonuçları

#### 4.3.4.1. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesinde gözlenen değişimler

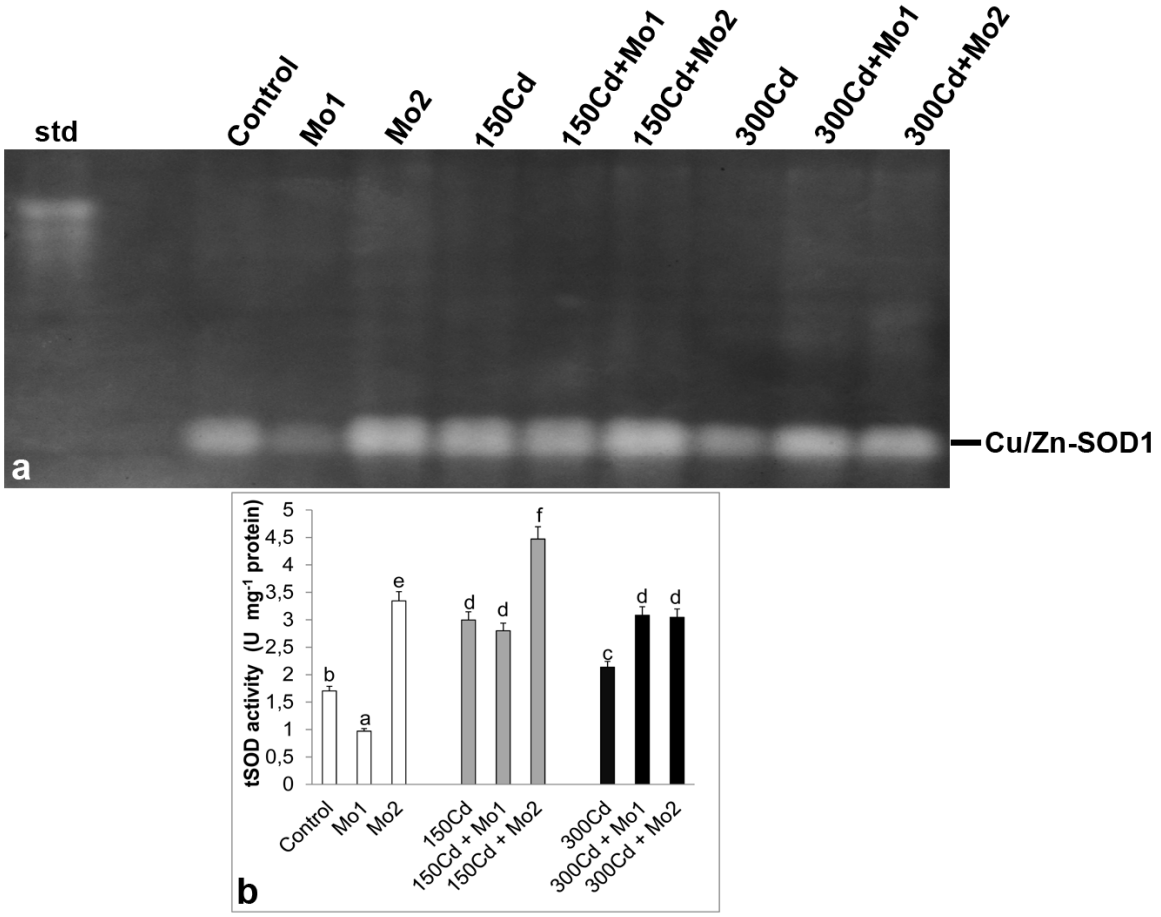
Buğday yapraklarının süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitelerinde kadmiyum stresi ve molibden uygulamalarının meydana getirdiği değişimler Şekil 4.7'de verilmiştir.

*Triticum aestivum* L. yapraklarına ait kloroplastik SOD izozim aktivitelerinde oluşan değişimleri tespit etmek için jellere 100 µg'lık protein içeren örnekler ve 0.5 ünite SOD standardı yüklenmiştir. Yürütme işleminden sonra Biorad Image Lab Version 4.0.1 yazılımı ile densitometrik analiz yapılarak SOD standardına karşılık gelen hacme göre total SOD aktivitesi ve SOD izoziminin densitometrik analizleri ile stres faktörü uygulanmış grupların aktivite değerleri, kontrol ve molibden uygulaması yapılan gruplarıyla kıyaslanarak U $mg^{-1}$ protein olarak belirlenmiştir.

Kadmiyum stresi ve molibden uygulamalarının 7. gününde izole edilen kloroplastlardaki SOD enzimine ait izozim profillemesi sonucunda tek izozim belirlenmiştir. Bu izozim hem KCN hem de $H_2O_2$ tarafından bantların inhibe olma özelliklerine göre Cu/Zn-SOD olarak tanımlanmıştır (Şekil 4.7a).

Yalnız molibden uygulamalarının SOD aktivitesi üzerine etkileri kontrol grubuyla kıyaslandığında, Mo1 uygulanan grupta anlamlı bir azalmanın (% 43) ve Mo2 grubunda ise önemli bir artışın (%96) olduğu gözlenmiştir. Tüm deneme süresince Yalnız Mo1'e maruz bırakılan fideler haricinde diğer tüm uygulamalarda SOD aktivitesi kontrole göre önemli oranda artmıştır. 150 µM Cd ile molibden kombinasyonları karşılaştırıldığında 150Cd+Mo1 uygulamalarında SOD aktivitesi değişmemiş, 150Cd+Mo2 grubunda ise % 49.2 artış gözlenmiştir. 300Cd+Mo1 ve 300Cd+Mo2 uygulamalarının da 300 µM Cd stresine göre SOD aktivitesini artırdığı,

ancak SOD aktivitesinde en etkili artışın (%49.2) 150Cd+Mo2 grubunda olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.7b).




**Şekil 4.7.** Kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında molibden uygulamalarının kloroplastik SOD izozimlerinde (a) ve total SOD (U $mg^{-1}$ protein) aktivitelerinde (b) meydana gelen değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir ($P<0.05$)

Enzimatik antioksidanlar göz önüne alındığında, SOD her yerde bulunan metaloenzimlerdir (Jackson ve ark., 1978). Bu reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı ilk savunma hattını oluşturur. Canlı hücrelerde, SOD'lar, süperoksit radikallerinin ($O_2^{\bullet-}$) $H_2O_2$ ve $O_2$'e ayrışmasını katalize eder ve hücrelerin farklı hücre bölmelerinde üretilen süperoksit radikallerinin toksik etkisine karşı hücresel ve organel düzeyinde korunmasında önemli bir rol oynar (del Río ve ark., 2003).

SOD enzimi mitokondri, kloroplastlar, çekirdekler, sitoplazma, peroksizomlar ve apoplast vb. gibi hücre içinde yapılarda görülür (Alscher ve ark., 2002; Fink ve Scandalios, 2002). Süperoksit radikallerini detoksifiye etmek için $H_2O_2$'e dismutasyonunu katalize eder ve hücresel düzeyde ana enzimatik bileşenlerin ilk sırasında yer alır (Hossain ve ark., 2009). $O_2^{\bullet-}$'i süpürerek metal katalizörlü Haber-

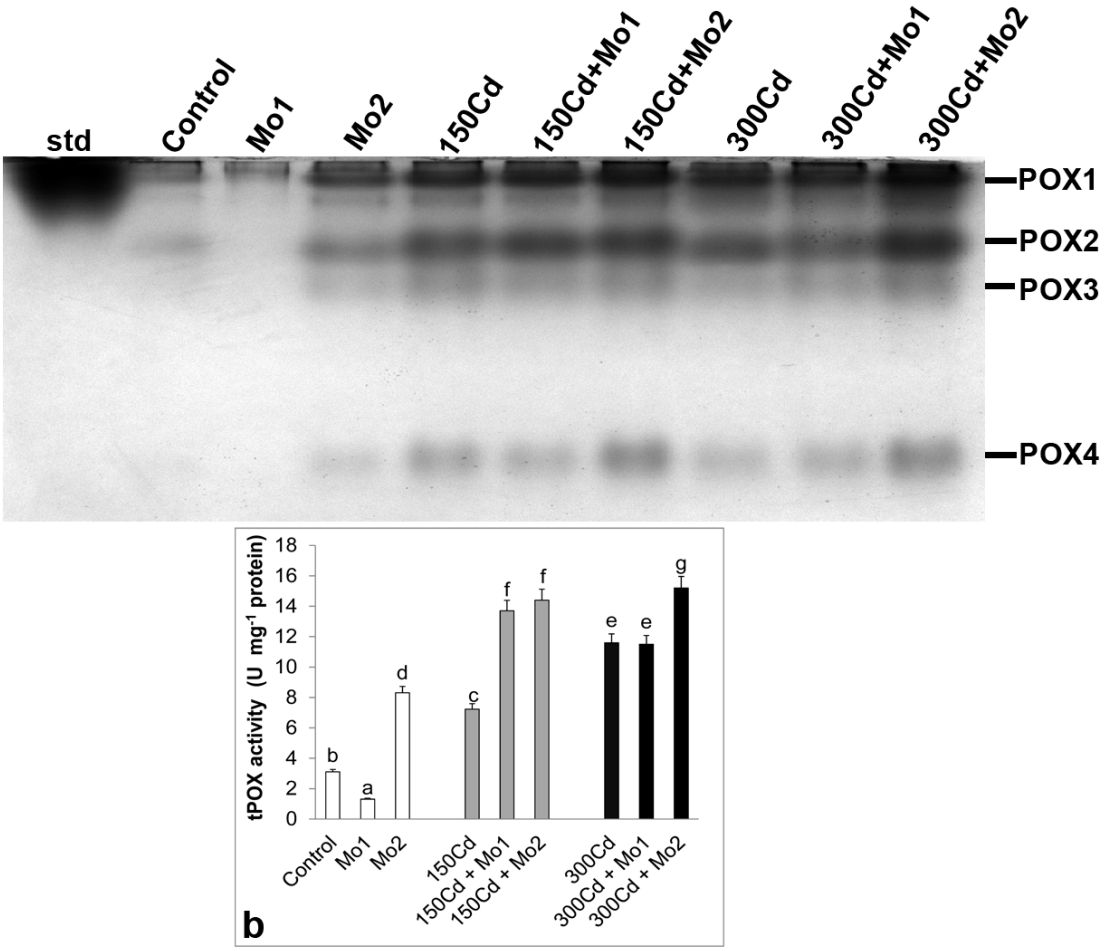
Weiss tipi reaksiyon ile $OH^{\bullet}$ oluşma riskini azaltır. Çünkü bu reaksiyon, kendiliğinden oluşan dismutasyondan 10.000 kat daha hızlı bir özelliğe sahiptir (Gill ve Tuteja, 2010).

Ahmad ve ark. (2011)'nın yapmış oldukları çalışmada, artan Cd konsantrasyonu ile SOD artışı paralellik göstermemiş, düşük konsantrasyonda kadmiyuma maruz bırakılan buğday yapraklarının SOD aktivitesi artmış, yüksek dozda ise azalmıştır. Bu durum bulgularımızla örtüşmemektedir.

Çalışmamızda Mo uygulamaları fidelerin kloroplastik SOD seviyelerinde artış meydana getirmiştir. Mo uygulaması ile SOD artışını gösteren benzer bir çalışma da: Wu ve ark. (2014)'nın raporlarına göre SOD aktiviteleri, PEG-6000 stresi altındaki kışlık buğdayda Mo ile arttığı bildirilmiştir. SOD enzim aktivitesi, yazlık ve kışlık olmak üzere her iki buğday çeşidinin Mo uygulaması yapılmış gruplarında çarpıcı bir şekilde artmış, ancak yazlık buğday çeşidine kıyasla, kışlık buğday çeşidinde artış daha yüksek olmuştur (Al-Issawi ve ark., 2016).

#### 4.3.4.2. Peroksidaz enzim aktivitesinde gözlenen değişimler

Ağır metal (kadmiyum) stresi altındaki buğday yapraklarının total peroksidaz (POX) ve POX izozimlerinin elektroforetik ayrımı sonucunda elde edilen izozim profilleri Şekil 4.8'de gösterilmiştir.




**Şekil 4.8.** Kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında molibden uygulamalarının yaprak POX izozimlerinde (a) ve total POX (U $mg^{-1}$ protein) aktivitelerinde (b) meydana gelen değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir ($P<0.05$)

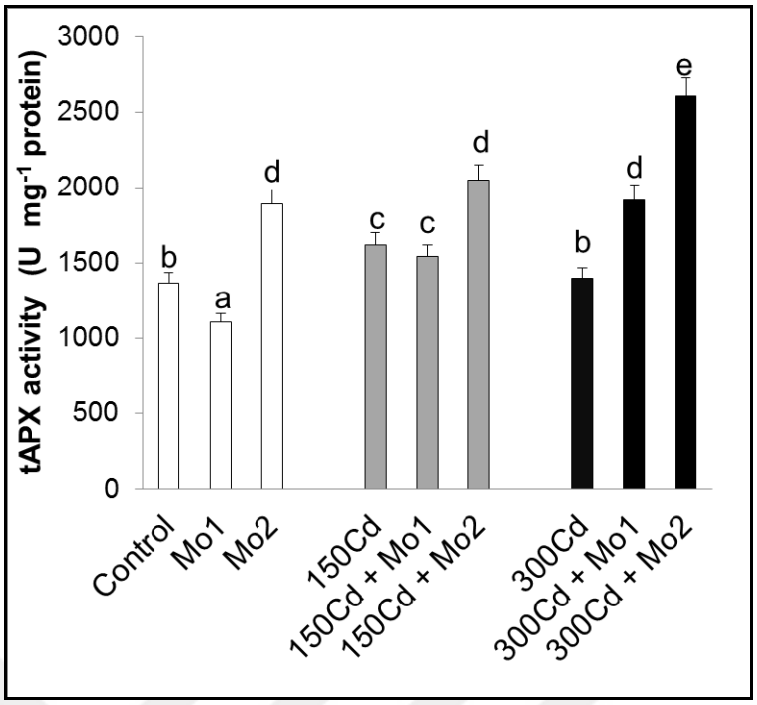
POX izozim profillemesi native PAGE elektroforezi ile belirlenmiştir. 7 gün süresince kadmiyum ve/veya molibden uygulamaları ardından buğday yapraklarında 4'er POX izozimi tespit edilmiştir (Şekil 4.8a). Peroksidaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimlerin ana sebebi POX2 ve POX4 izozimlerinin yoğunluklarında meydana gelen değişimlere bağlıdır. İzozimlerin densitometrik analizleri sonucunda total POX ve izozimlerin aktivite değişimlerinin birbirine uyumlu olduğu görülmektedir (Şekil 4.8).

Yalnız Mo uygulamalarında düşük konsantrasyondaki molibdene maruz kalan yapraklarda total POX aktivitesi kontrole göre % 42 azalmışken, yüksek konsantrasyondaki molibdende % 167 oranında artış tespit edilmiştir. Yalnız stres gruplarını kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda 150 µM Cd içeren grubun total POX aktivitesi % 132 artmışken, 300 µM Cd içeren grup % 272.9 oranında artmıştır. Stresle birlikte molibden uygulamalarındaki en yüksek artışlara 150 µM Cd + Mo2 ve 300 µM Cd + Mo2 gruplarının yapraklarında rastlanmış olup artış oranları sırasıyla % 99 ve % 31'dir (Şekil 4.8b).

Stresle birlikte fazla miktarda üretilen $H_2O_2$'nin süpürülmesinde CAT'dan sonra POX'da, ROS'ların detoksifiye edilmesinde kullanılan önemli antioksidan enzimlerden birisidir (Foyer ve Noctor, 2005b). POX, SOD'un, $O_2^{\bullet-}$ radikallerini süpürmesiyle ortaya çıkan $H_2O_2$'nin kloroplastlarda süpürülmesinde görev alan önemli enzimlerden birisidir (Asada ve Takahashi, 1987). POX enzimi strese karşı olan görevinin yanısıra lignin biyosentezinde rol oynamasından dolayı bitki gelişimine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır (Moura ve ark., 2010). Çalışmamızda Cd stresine maruz bırakılan buğday yaprakları kadmiyum konsantrasyonun artmasına paralel olarak total POX aktivitesinde de artış meydana gelmiştir. Bulgularımıza ters olarak; Cd stresi altındaki tütün (*Nicotiana tobacum*)'de POX aktiviteleri konsantrasyon artışıyla ters orantılı olarak azalmıştır (Zhou ve ark., 2014). Çalışmamızda Mo2 uygulaması kontrole kıyasla POX aktivitesini anlamlı ($P < 0.05$) olarak artırmıştır. Benzer şekilde Liu ve ark. (2005) Mo uygulamasının sonucu olarak POX, SOD, CAT ve APX enzimlerinin aktiviteleri anlamlı olarak ($P < 0.05$) artırdığını rapor etmişlerdir. Tezimizde de kadmiyum stresiyle birlikte uygulanan molibden POX aktivitesi üzerine olumlu etki yapmıştır. Zhang ve ark. (2012)'nın çalışmalarına göre; molibdenin tuz stresine maruz bırakılan Çin lahanasının antioksidan savunma sistemi üzerine etkisine bakılmış 0, 0.15 ve 0.3 mg Mo $kg^{-1}$ dozlarında molibden uygulanmıştır. Tuz stresi altındaki 0.3 mg Mo $kg^{-1}$ işlemi en SOD, POX ve CAT aktivitelerini önemli ölçüde indüklemiştir.

### 4.3.4.3. Askorbat peroksidaz enzim aktivitesinde gözlenen değişimler

Molibden uygulamalarının kadmiyum stresi altındaki buğday kloroplastlarının total askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitelerinde tespit edilen değişimler Şekil 4.9'da verilmiştir.




**Şekil 4.9.** Kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında molibden uygulamalarının yaprak total APX (U $mg^{-1}$ protein) aktivitelerinde meydana gelen değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir ($P<0.05$).

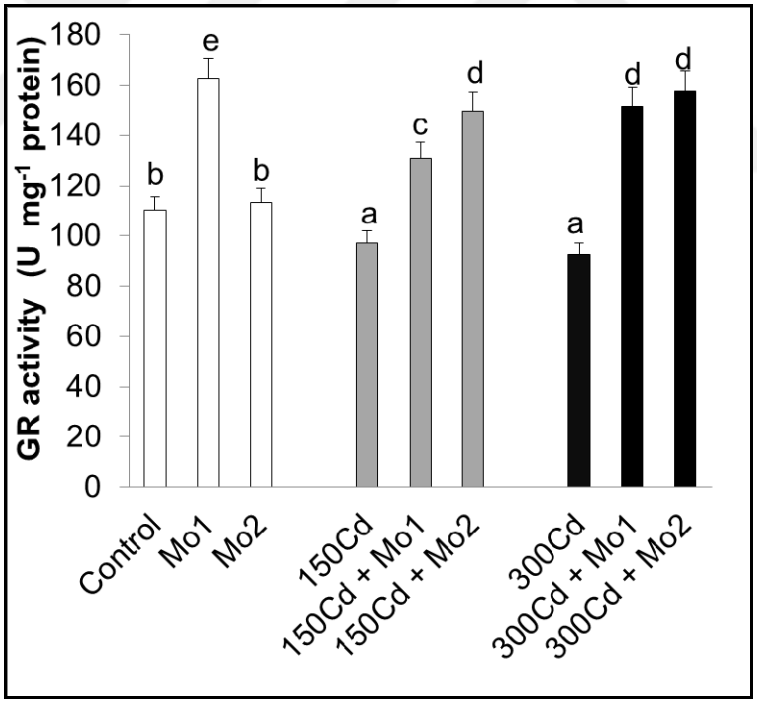
Yalnız Mo uygulanan gruplar kontrol ile kıyaslandığında, APX aktivitesinde Mo1 grubunda % 18.8 oranında azalış, Mo2 grubunda % 38.6 oranında artış meydana gelmiştir. Tüm deneme süresince Mo1 uygulanan fideler haricindeki tüm gruplarda APX aktivitesi kontrole göre önemli oranda artış göstermiş yada kontrol seviyesinde kalmıştır. Düşük dozdaki stres uygulamalarında (150 µM Cd) APX aktivitesi kontrolün 1.18 katı iken, 300 Cd µM ise kontrol ile benzer seviyededir. Tüm deneme süresince en düşük APX aktivitesine yalnız Mo1'e maruz bırakılan fidelerin yapraklarında rastlanmış olup azalma oranı kontrole göre % 18.8 iken, en yüksek APX aktivitesi 300 Cd µM+Mo2 de olup kontrole göre % 86 artış oranına sahiptir.

Askorbat peroksidaz sitozolde, kloroplastlarda, peroksizomlarda bulunur (Arora ve ark., 2002). Askorbat-glutatyon döngüsünde önemli enzimlerden birisi olan APX özellikle stromada etkili olup askorbat-glutatyon döngüsünde (Halliwell-Asada yolu) AsA'yı katalizleyerek monodehidroaskorbata (MDA) dönüştürürken, $H_2O_2$'i de suya indirger (Foyer ve Noctor, 2005b). APX; $H_2O_2$ (mM aralığı) için CAT ve POX'dan (mM aralığı) daha yüksek bir afiniteye sahiptir. Stres sırasında ROS süpürülmesinde daha önemli bir role sahip olabilir (Gill ve Tuteja, 2010). Bitkilerde APX'un artan ifadesi, farklı stres koşulları sırasında gösterilmiştir. Cd stresi altında *T. Aestivum* yapraklarında artmış APX aktivitesi Khan ve ark. (2007) tarafından rapor edilmiştir.

Ahmad ve ark. (2011)'na göre; kadmiyum (Cd) stresine maruz bırakılan hardal bitkilerinde salisilik asit (SA) uygulamasının biyokimyasal analiz sonuçlarına bakıldığında APX aktivitesinde bulgularımızı destekler nitelikte artışa sebep olduğu bildirilmiştir. Maksimum APX aktivitesi (% 12.8) 200 mg/1 Cd' stresi altındaki fidelerde gözlenmiştir. Çalışmamızda stres uygulaması ile birlikte en yüksek aktivite artışlarına stres+Mo2 gruplarında rastlanmıştır. Benzer bir şekilde Liu ve ark. (2005)'nın yapmış oldukları çalışmada da kontrole göre Mo uygulamaları APX aktivitelerini anlamlı derecede ($P < 0.05$) arttığı rapor edilmiştir.

### 4.3.4.5. Glutatyon redüktaz enzim aktivitesinde gözlenen değişimler

Buğday yapraklarının glutatyon redüktaz (GR) enzim aktiviteleri üzerine kadmiyum stresi ve/veya molibden uygulamalarının yol açtığı değişimler Şekil 4.10'de verilmiştir.




**Şekil 4.10.** Kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında molibden uygulamalarının GR (U mg-1 protein) aktivitelerinde meydana getirdiği değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir ($P<0.05$)

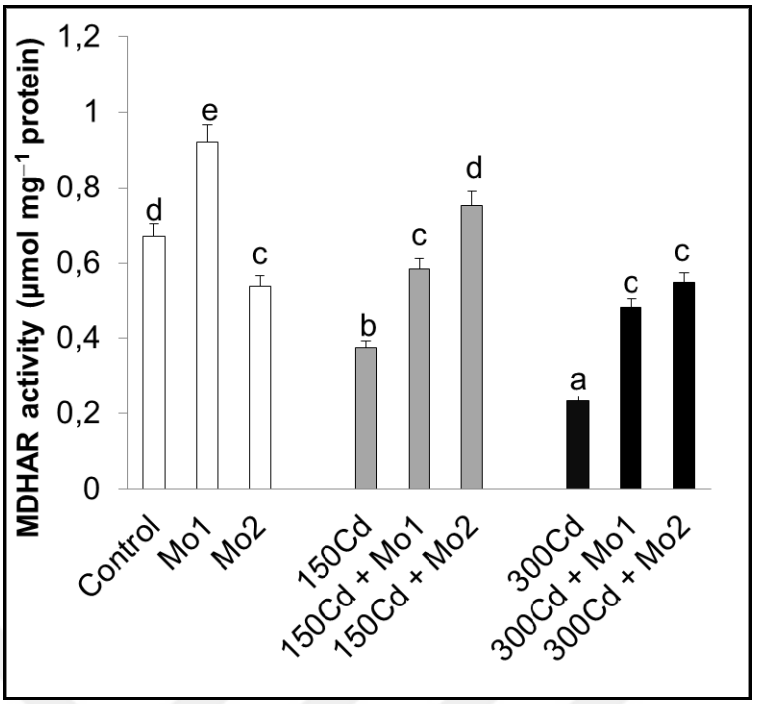
Kadmiyum stresi buğday kloroplastlarının GR aktiviteleri üzerine olumsuz etki göstermiştir. Düşük konsantrasyondaki azalma oranı %11.9 ve yüksek konsantrasyonda ise %16.2'dir. Stresle birlikte molibden uygulamaları GR aktivitesini pozitif yönde

etkilemiştir. Molibden kombinasyonlu gruplar içerisinde en yüksek artışın % 70.6 oran ile 300 µM Cd + Mo2'a maruz bırakılan buğday fidelerinde olduğu tespit edilmiştir. En yüksek GR aktivitesine Mo1 grubunda rastlanmış olup artış miktarı kontrolün 1.47 katıdır (Şekil 4.10).

İki ana enzim olan APX ve GR, kloroplastlarda, sitoplazmada, mitokondride ve peroksizomlardaki AsA/GSH döngüsünde görev almaktadır (Luis ve ark., 2006). Cd ile muamele edilmiş bitkilerde yapılan bir çalışma da, yaprak peroksizomlarının, AsA/GSH döngüsüne dahil olan antioksidan enzimlerin aktivitelerini indükleyerek tepki gösterdiğini göstermiştir (Palma ve ark., 2002). Sonuçlarımıza göre yalnız Cd uygulamalarında artan Cd miktarıyla GR aktivitelerinde düşüş meydana gelmiştir. Benzer bir çalışmada; Panda ve Patra (2007)'nın bulgularına göre kadmiyuma (0, 100, 1000 Cd µM) maruz bırakılan çeltik yapraklarında Cd konsantrasyonu arttıkça GR aktivitesinde önemli bir azalma gözlenmiştir. *Lablab purpureus* bitkisinde Cd kaynaklı stres, artan kadmiyum konsantrasyonlarına (0 ila 50 µM) ve zamana bağlı olarak GR seviyelerinde artışa neden olmuştur (D'Souza ve Devaraj, 2013). GR aktivitesi Cd stresi ile artmıştır. GR aktivitesindeki bu artışın büyüklüğü, 200 mg/1 Cd'de % 17.3 şeklindedir (Ahmad ve ark., 2011). Bu sonuçlar bulgularımızla örtüşmemektedir. Çalışmamızda stres grubuna Mo ilave edilmesiyle birlikte GR aktiviteleri artmıştır. Benzer bir örnekte; Mo (0.01, 0.15 ve 1.5 mg $L^{-1}$) uygulamasının Çin lahanasında, GR aktivitelerini artırabileceğini ve 1.5 mg $L^{-1}$ Mo uygulamasının önemli bir etkisi olduğunu göstermektedir (Nie ve ark., 2007).

#### 4.3.4.6. Monodehidroaskorbat redüktaz enzim aktivitesinde gözlenen değişimler

Kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında molibden uygulamalarıyla monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) enziminin aktivitelerinde ortaya çıkan değişimler Şekil 4.11'de verilmiştir.




**Şekil 4.11.** Kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında molibden uygulamalarının MDHAR (µmol $mg^{-1}$ protein) aktivitelerinde meydana getirdiği değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir ($P<0.05$)

Tüm deneme süresince kontrol grubuna göre en yüksek MDHAR aktivitesi Mo1 grubunda rastlanmış olup artış oranı %37'dir. Yalnız Mo2'ye maruz bırakılan fidelerde ise MDHAR aktivitesi % 19 oranında azalmıştır (Şekil 4.11). Yalnız stres gruplarında Cd konsantrasyonunun artması ile MDHAR aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. Stresle birlikte uygulanan her iki dozdaki molibden de MDHAR aktivitesini pozitif yönde etkilemiştir.

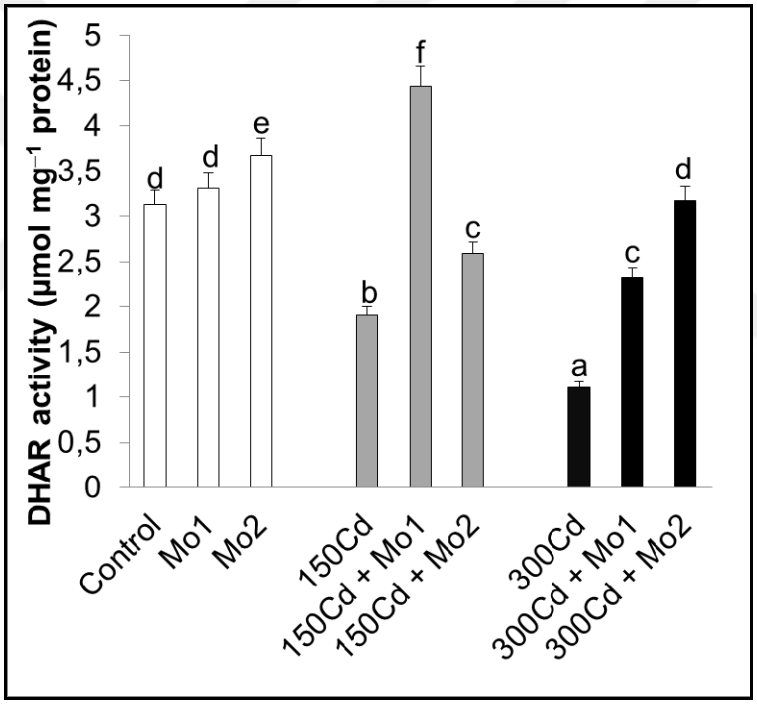
MDHAR aktivitesi bitkilerde yaygın olup izoenzimlerinin, kloroplastlar (Hossain ve ark., 1984), sitozol, mitokondri ve peroksizomlar (Dalton ve ark., 1993; Jimenez ve ark., 1997) gibi çeşitli hücresel bölmelerde mevcut olduğu bildirilmiştir. MDHAR, APX'a eşlik ederek bulunduğu bölgelerde $H_2O_2$'in süpürülmesinde görev alır (Del Río ve ark., 2002). Kloroplastlarda, MDHAR iki fizyolojik fonksiyona sahiptir. Bunlar (i) MDHA'dan AsA'nın rejenerasyonun sağlanması ve (ii) MDHA substratı yokken dioksinin $O_2^{\bullet-}$'e fotoredüksiyonuna aracılık etmesidir (Miyake ve ark., 1998).

Sonuçlarımıza göre yalnız Cd stresine maruz bırakılan buğday yapraklarından izole edilen kloroplastların MDHAR aktiviteleri kontrole göre önemli oranda azalmıştır. Markovska ve ark. (2009)'nın yaptıkları bir çalışmada 10, 30, 50 ve 100 µM Cd'ye maruz bırakılan *Brassica juncea* L. cv. *Vitasso* bitkilerinde MDHAR aktivitesi 30 µM Cd'de en yüksek olduğu rapor edilmiş olup bulgularımızla örtüşmemektedir. Ahmad ve

ark. (2018)'a göre; 150 µM $CdCl_2$ stresi altındaki domates fidelerinde MDHAR aktivitesi sonuçlarımızı destekler nitelikte % 41.18 oranında azalmıştır. Çalışmamızda stres grubuna Mo ilave edilmesiyle birlikte GR aktiviteleri artmıştır. Benzer bir örnekte; Mo (0.01, 0.15 ve 1.5 mg $L^{-1}$) uygulamasının Çin lahanasında, MDHAR aktivitesini artırdığı ve en fazla indüklenmenin 1.5 mg $L^{-1}$ Mo uygulamasıyla gerçekleştiği rapor edilmiştir (Nie ve ark., 2007).

### 4.3.4.7. Dehidroaskorbat redüktaz enzim aktivitesinde gözlenen değişimler

Kadmiyum stresinin yalnız veya molibden ile birlikte buğday fidelerine 7 gün süresince uygulanmasının ardından dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) enziminin aktivitelerinde meydana gelen değişimler Şekil 4.12'te verilmiştir.




**Şekil 4.12.** Kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında molibden uygulamalarının DHAR (µmol $mg^{-1}$ protein) aktivitelerinde meydana getirdiği değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir ($P<0.05$)

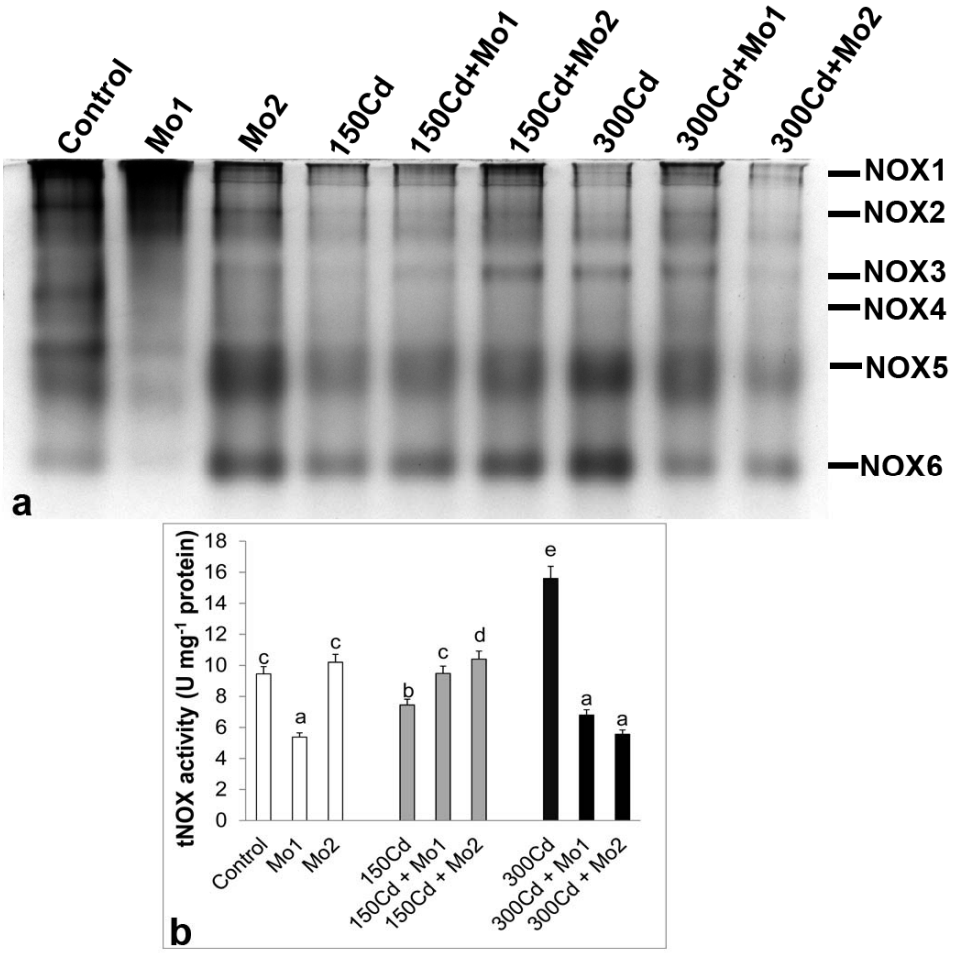
Yalnız molibden uygulamaları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında DHAR aktivitesi Mo1 grubunda değişmemiş, Mo2 grubunda ise % 17 oranında artış göstermiştir. Yalnız 150 veya 300 µM Cd altındaki buğday kloroplastlarının kontrol grubuna göre DHAR aktivitesi sırasıyla % 38.9 ve % 64.5 oranında azalmıştır. Stresle birlikte molibden uygulamalarında DHAR aktiviteleri (yalnız strese maruz kalan buğday fideleriyle karşılaştırıldığında) önemli oranda artış gösterdiği Şekil 4.12'de

görülmektedir. Tüm deneme süresince en yüksek DHAR aktivite artışına (kontrolün 1.4 katı) 150 µM Co + Mo1 grubu buğday yapraklarında rastlanmıştır.

AsA-GSH döngüsünde yer alan DHAR enzimi, MDHAR enzim aktivitesi sonucunda üretilen DHA'nın AsA'ya indirgenmesini katalizleyen önemli bir antioksidan enzimdir. DHA birikimi genellikle hücre metabolizmasında negatif bir olay olarak kabul edilmektedir (Arrigoni, 1994). Çalışmamızda kontrol grubuna kıyasla yalnız Cd uygulaması yapılan gruplarda DHAR aktivitesinde artış gözlenmemişken; Markovska ve ark. (2009)'nın yaptıkları bir çalışmada 10, 30, 50 ve 100 µM Cd'a maruz bırakılan *Brassica juncea* L. cv. *vitasso* bitkilerinde DHAR aktivitesi kontrole göre sadece 10 µM Cd grubunda artış göstermiştir. Ahmad ve ark. (2018)'a göre; 150 µM $CdCl_2$ konsantrasyonuna maruz kalan domates fidelerinin DHAR aktivitesinde % 35.62 azalma meydana gelmiştir. Bu sonuç bulgularımızla benzerlik göstermektedir. Sonuçlarımıza göre stres grubuna Mo ilave edilmesiyle birlikte DHAR aktiviteleri önemli oranda artmıştır. Benzer bir örnekte; Mo (0.01, 0.15 ve 1.5 mg $L^{-1}$) uygulamasının Çin lahanasında, MDHAR aktivitelerini artırabileceği ve 1.5 mg $L^{-1}$ Mo uygulamasının önemli bir indükleyici doz olduğu bildirilmiştir (Nie ve ark., 2007).

#### 4.3.4.4. NADPH oksidaz enzim aktivitesinde gözlenen değişimler

Ağır metal stresi altındaki buğday yapraklarının total NADPH oksidaz (NOX) enzim aktivitesi ve NOX izozimlerinin elektroforetik ayrımı sonucunda elde edilen izozim profilleri Şekil 4.13'de gösterilmiştir.




**Şekil 4.13.** Kadmiyum stresi altındaki buğday yapraklarında molibden uygulamalarının yaprak NOX izozimlerinde (a) ve total NOX (U $mg^{-1}$ protein) aktivitelerinde (b) meydana gelen değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir ($P<0.05$)

Elektroforetik ayırım sonucunda 6 farklı NOX izozimi tanımlanmış olup NOX izozim profilleri Şekil 4.13a'da verilmiştir. NADPH oksidaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimlerin ana sebebi NOX3, NOX5 ve NOX6 izozimlerinin yoğunluklarında meydana gelen değişimlere bağlıdır. İzozimlerin densitometrik analizleri sonucunda total NOX ve izozimlerin aktivite değişimlerinin birbirine uyumlu olduğu görülmektedir (Şekil 4.13).

Yalnız molibden uygulamalarının NOX aktivitesi üzerine etkileri kontrol grubuyla kıyaslandığında, Mo1 uygulanan grupta anlamlı bir azalmanın (% 43) ve Mo2 grubunda ise bir artışın (%7.9) olduğu gözlenmiştir. Yalnız stres gruplarını kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda 150 µM Cd içeren grubun NOX aktivitesi % 21 azalmışken, 300 µM Cd içeren grup % 65 oranında artmıştır. En fazla NOX aktivite artışı 300 µM Cd' a maruz bırakılan buğday kloroplastlarında gözlenmiştir. 150 µM Cd ile molibden kombinasyonları karşılaştırıldığında 150Cd+Mo1 ve 150Cd+Mo2 uygulamalarında NOX aktivitesi sırasıyla % 27 ve % 39.5 oranında artış göstermiştir

(Şekil 4.13b). Yüksek konsantrasyondaki uygulamalarda ise NOX aktivitesi sırasıyla % 56 ve % 64 oranında azalmıştır.

Fazla Cd, NADPH oksidazları aktive ederek aşırı $H_2O_2$ üretimine neden olmaktadır (Lin ve Aarts, 2012). Elektron donörü genellikle NADPH'dır ve kloroplastlarda su-su döngüsü durumunda monodehidroaskorbat redüktaz veya ferredoksin ile katalize edilir (Asada, 1999). NADPH oksidazlar hücre kültürlerinde Cd toksisitesi altındaki ROS'un önemli bir kaynağı olarak bilinmektedir (Olmos ve ark., 2003). NOX'un transkript seviyelerinin analizi *Arabidopsis* bitkilerinde Cd'nin yol açtığı oksidatif stres üzerinde NOX'un $H_2O_2$ üretiminde rol oynadığını göstermektedir (Horemans ve ark., 2007; Smeets ve ark., 2009).

# 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

## 5.1. Sonuçlar

Tez çalışmamızda, kadmiyum stresi altındaki buğdayda ekzojen molibden uygulamalarının tolerans, büyüme, kloroplastik antioksidan enzim sistemi, ROS içerikleri, lipid peroksidasyonu ve klorofil flüoresans değerleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu parametrelerin sonuçlarına ulaşabilmek için çok sayıda fizyolojik ve biyokimyasal ölçümler gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda farklı konsantrasyonlarda (150 ve 300 µM Cd) kadmiyum ve molibden (0.15mM Mo ve 0.3 mM Mo) uygulamaları yapılan buğday yapraklarında, RWC, ozmotik potansiyel ve klorofil flüoresans gibi fizyolojik ölçümlere ilaveten lipid peroksidasyonu (TBARS), prolin (Pro) ve hidrojen peroksit ($H_2O_2$) gibi biyokimyasal parametreler de incelenmiştir. Ayrıca enzimatik (SOD, POX, APX, NOX, GR, MDHAR ve DHAR) antioksidanların aktivitelerindeki değişimlerde tespit edilmiştir. Bu analizlere ek olarak kloroplastik proteinlerin native-PAGE ile elektroforetik ayrımlarıyla bazı antioksidan enzimlerin izozim profilleri de (SOD, POX ve NOX) belirlenmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda Mo; soğuk stresi, tuz stresi, kuraklık stresi üzerinde çalışılmıştır. Literatürde kadmiyum stresi ve molibden uygulamaları hakkında herhangi bir çalışma ve sonuç bulunmamaktadır. Bitkilerde tolerans mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlamak için; kadmiyum stresine karşı molibden uygulamasının fizyolojik, biyokimyasal, tolerans mekanizmaları ve antioksidan enzimler üzerine etkileri tezimizde ayrıntılarıyla ortaya konulmaya çalışılmıştır. Molibden buğday fidelerinde kadmiyum stresine karşı tolerans artırma potansiyeline sahiptir. Çalışmamızda, *Triticum aestivum* fidelerine kadmiyum uygulanması ile bağıl su içeriği (RWC), ozmotik potansiyel ve Fv/Fm değerlerinde kontrole göre önemli azalmaların olduğu tespit edilmiştir. Stres gruplarına molibden uygulaması ile birlikte bu parametrelerde pozitif etkilerin olduğu görülmüştür. Cd stresine maruz kalan buğday yapraklarında stresten dolayı üretimi ve birikimi artan ve hücrelerin, zarla çevrili organellerin membran bütünlüğünü bozan $H_2O_2$ ve TBARS içeriklerinde artış olduğu belirlenmiştir. Mo uygulamalarıyla TBARS ve $H_2O_2$ içeriği azalmış ve oluşan oksidatif hasarın etkilerini hafifletmiştir.

Önemli bir stres faktörü olan kadmiyuma maruz kalan bitkiler, artan serbest radikalleri baskılamak ve meydana gelen olumsuz etkilerini giderebilmek için enzimatik

(SOD, POX, APX, NOX, GR, MDHAR ve DHAR) antioksidanlarının aktivitelerini artırmaktadırlar. Cd uygulaması kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sadece SOD ve POX aktiviteleri artmıştır. Cd stresinden dolayı $H_2O_2$ ve TBARS miktarında birikme olmuştur. 300 µM Cd stresi altında NOX artışına bağlı olarak ROS oluşumuna yüksek Cd konsantrasyonlarında NOX' un da katkıda bulunduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca Cd uygulamalarına 0.15 mM Mo ilavesi POX, MDHAR, APX, DHAR veGR aktivitelerini artırırken; 0.3 mM Mo ilavesi SOD, POX, MDHAR, APX, DHAR, GR aktivitelerinde artışa neden olmuştur. Molibden uygulaması, Cd stresi altındaki buğdayda $H_2O_2$ birikimini ve lipid peroksidasyon seviyelerini azaltarak membran bütünlüğünün korunmasını sağlamıştır. Bu korumada AsA-GSH döngüsüne ait enzimler önemli role sahiptir. Sonuç olarak; molibden uygulaması, Cd stresi altındaki buğday yapraklarının kloroplastlarında oluşan oksidatif hasarın etkilerini hafifletici önemli bir role sahip olmuş ve bu da ilk defa çalışılarak bilim dünyasının hizmetine sunulmuştur.

## 5.2. Öneriler

Son yıllarda artan endüstriyel faaliyetler, aşırı ve bilinçsiz yapılan kimyasal gübre ve pestisid uygulamaları, atık suların su kaynaklarına karıştırılarak sulama suyu olarak kullanılması, toprak ve suyun Cd içeriğini artırmaktadır. Toprak ve sudaki kadmiyum düzeyinin artması ile canlılarda, toprak verimliliğinde ve ekosistem üzerinde negatif etki oluşturmakla birlikte bitki bünyesine geçerek; fotosentez, solunum, enzimler, iyon alımı, klorofil biyosentezinin bozulması, büyüme ve gelişme gibi birçok metabolik, anatomik, morfolojik ve fizyolojik aktiviteyi de etkilemektedir. Bu metabolik faaliyetlerde oluşan negatif etki nedeniyle bitkinin verim ve kalitesinde azalma olmaktadır. Bitkiler aracılığıyla insan ve hayvan besin zincirine de ulaşarak kansere, DNA hasarına, oksidatif stresin artışına bağlı olarak proteinlerin yıkımına, mitokondri hasarına, kemik erimesine, nörolojik bozukluklara, davranış ve öğrenme problemleri gibi birçok sağlık sorunlarına yol açmaktadır. Günümüzde nüfus yoğunluğunun git gide artması ve ekilebilir alanların azalmasından dolayı gelecekte besin sıkıntılarının yaşanabileceği düşünülerek strese bağlı ürün kayıplarının azaltılması oldukça önem taşımaktadır. Bu amaçla gelişen teknolojik gelişmeler ışığında, özellikle stres faktörlerini en aza indirgeyerek bitki metabolik, fizyolojik aktivitesinde olumlu etkiye sebep olacak, ürün verim ve kalitesini artıracak bitki takviye ürünlerinin kullanılması bitki savunma mekanizmalarının anlaşılmasında ve ürün kayıplarının en aza indirilmesinde oldukça önemli bir adım olacaktır. Bazı çalışmalarda; soğuk, tuz, kuraklık stresine karşı molibden uygulamaları yapılmış ve oluşan stresin giderilmesinde Mo etkisinin önemi rapor edilmiştir. Molibden uygulamaları yapılan araştırmalarda, Mo'nin enzim aktivitelerini arttırarak tohum verimini arttırdığı, bitki gelişiminde ve mahsül veriminde olumlu etki gösterdiği belirlenmiştir. Mo uygulamaları ile yaprak bağıl su içerikleri, ozmotik potansiyel ve fotosentetik aygıtların korunmasında olumlu etkiler görülmüştür. Molibden tarafından antioksidan enzimlerin aktivitelerinin artırılması, bitkilerin strese karşı tolerans kazanmalarının altında yatan mekanizmaların anlaşılması, bitkiler için abiyotik streslerle başa çıkabilmek adına çok önemli bir stratejidir. Çalışmamızda da Mo uygulamaları, Cd stresinin hücre ve organel membranlarında meydana getirdiği olumsuz etkileri azaltarak $H_2O_2$ ve TBARS seviyesinin azalmasına ve antioksidan enzimleri indükleyerek bitkinin oksidatif strese karşı olan toleransının artmasına sebep olmuştur. Molibden uygulamaları genel olarak antioksidan enzimlerden SOD, POX, APX, NOX, GR, MDHAR ve DHAR

aktivitelerini artırmıştır. Elde ettiğimiz veriler, ziraat mühendisliği, genetik mühendisliği, bitki biyolojisi ve biyoteknoloji alanlarında Mo uygulamalarıyla yapılacak olan bilimsel çalışmalara yol gösterici iyi bir kaynak olacağı görüşündeyiz. Çalışmamız literatür için yeni bilgiler içerdiğinden dolayı Türkiye'de ve dünyada bu alandaki çalışmalara önemli katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

**KAYNAKLAR**


AbdEl-Samad, H. M. ve El-Komy, H. M., 2005, Effect of molybdenum on nitrogenase and nitrate reductase activities of wheat inoculated with *Azonspirillum brasilense* grown under drought stress, *Gen Appl Plant Physiol*, 1 ((1-2)), 43–54.

Adams, M., Zhao, F., McGrath, S., Nicholson, F. ve Chambers, B., 2004, Predicting cadmium concentrations in wheat and barley grain using soil properties, *Journal of Environmental Quality*, 33 (2), 532-541.

Agarwala, S., Sharma, C., Farooq, S. ve Chatterjee, C., 1978, Effect of molybdenum deficiency on the growth and metabolism of corn plants raised in sand culture, *Canadian Journal of Botany*, 56 (16), 1905-1908.

Agostini, E., Medina, M. I., Milrad De Forchetti, S. R. ve Tigier, H., 1997, Properties of two anionic peroxidase ısoenzymes from turnip (*Brassica napus* L.) roots, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (3), 596-598.

Ahmad, P., Umar, S. ve Sharma, S., 2010, Mechanism of free radical scavenging and role of phytohormones in plants under abiotic stresses, In: Plant adaptation and phytoremediation, Eds: Springer, p. 99-118.

Ahmad, P., Nabi, G. ve Ashraf, M., 2011, Cadmium-induced oxidative damage in mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss.] plants can be alleviated by salicylic acid, *South African Journal of Botany*, 77 (1), 36-44.

Ahmad, P., Ahanger, M. A., Alyemeni, M. N., Wijaya, L. ve Alam, P., 2018, Exogenous application of nitric oxide modulates osmolyte metabolism, antioxidants, enzymes of ascorbate-glutathione cycle and promotes growth under cadmium stress in tomato, *Protoplasma*, 255 (1), 79-93.

Al-Issawi, M., Rihan, H. Z., Woldie, W. A., Burchett, S. ve Fuller, M. P., 2013, Exogenous application of molybdenum affects the expression of CBF14 and the development of frost tolerance in wheat, *Plant Physiology and Biochemistry*, 63, 77-81.

Al-Issawi, M., Rihan, H. Z., Al-Shmgani, H. ve Fuller, M. P., 2016, Molybdenum application enhances antioxidant enzyme activity and cor15a protein expression under cold stress in wheat, *Journal of Plant Interactions*, 11 (1), 5-10.

Ali, M. M., Murthy, R. C. ve Chandra, S. V., 1986, Developmental and long term neurobehavioral toxicity of low level in utero cadmium exposure in rats, *Neurobehav Toxicol Teratol*, (8), 463-468.

Alloway, B., 1995, Heavy Metals in Soils, Blackie Academic and Professional, London. doi: 10.1007.

Alscher, R. G., Erturk, N. ve Heath, L. S., 2002, Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants, *Journal of Experimental Botany*, 53 (372), 1331-1341.

Amin Elsadig, E., Naoyoshi, K., Ghazi Hamid, B., Hironori, K., Takeshi, S., Toshiyuki, S., Shinobu, I. ve Kiyoshi, T., 2007, Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses, *Planta*, 225 (5), 1255.

AMIS, 2019, http://statistics.amis-outlook.org/data/index.html [Ziyaret Tarihi 25 Nisan 2019].

Ammar, W. B., Nouairi, I., Tray, B., Zarrouk, M., Jemal, F. ve Ghorbel, M., 2005, Effets du cadmium sur l'accumulation ionique et les teneurs en lipides dans les feuilles de tomate *(Lycopersicum esculentum)*, *Journal de la Société de Biologie*, 199 (2), 157-163.

Anderson, A. J., 1956, Molybdenum deficiencies in legumes in Australia, *Soil Science*, 81 (3), 173-182.

Anderson, J., Foyer, C. H. ve Walker, D., 1983, Light-dependent reduction of hydrogen peroxide by intact spinach chloroplasts, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 724 (1), 69-74.

Anderson, M. D., Prasad, T. K. ve Stewart, C. R., 1995, Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings, *Plant Physiology*, 109 (4), 1247-1257.

Apel, K. ve Hirt, H., 2004, Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction, *Annu Rev Plant Biol*, 55, 373-399.

Arnon, D. I. ve Stout, P., 1939, Molybdenum as an essential element for higher plants, *Plant Physiology*, 14 (3), 599.

Arora, A., Sairam, R. ve Srivastava, G., 2002, Oxidative stress and antioxidative system in plants, *Current Science*, 1227-1238.

Arrigoni, O., 1994, Ascorbate system in plant development, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 26 (4), 407-419.

Asada, K., Kiso, K. ve Yoshikawa, K., 1974, Univalent reduction of molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination, *Journal of Biological Chemistry*, 249 (7), 2175-2181.

Asada, K. ve Takahashi, M., 1987, Photoinhibition, eds. Kyle DL, Osmond CB, and Arntzen CJ, Elsevier Scientific Publisher, Amsterdam.

Asada, K., 1999, The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons, *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology*, 50 (1), 601.

Ashraf, M. ve Wu, L., 1994, Breeding for salinity tolerance in plants, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13 (1), 17-42.

Avsian-Kretchmer, O., Eshdat, Y., Gueta-Dahan, Y. ve Ben-Hayyim, G., 1999, Regulation of stress-induced phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase expression in *Citrus*, *Planta*, 209 (4), 469-477.

Azevedo, H., Pinto, C. G. G., Fernandes, J., Loureiro, S. ve Santos, C., 2005, Cadmium effects on sunflower growth and photosynthesis, *Journal of Plant Nutrition*, 28 (12), 2211-2220.

Barański, B., 1984, Effect of exposure of pregnant rats to cadmium on prenatal and postnatal development of the young, *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology, and Immunology*.

Bartonek-Roxå, E., Eriksson, H. ve Mattiasson, B., 1991, The cDNA sequence of a neutral horseradish peroxidase, *BBA - Gene Structure and Expression*, 1088 (2), 245-250.

Baskin, S. ve Salem, H., 1997, Oxidants, antioxidants and free radicals, CRC Press.

Bates, L. S., Waldren, R. P. ve Teare, I., 1973, Rapid determination of free proline for water-stress studies, *Plant and Soil*, 39 (1), 205-207.

Bayçu, G., 1997, *Picea abies*'te kadmiyum toksisitesi ve köklerde kadmiyum birikimi, *XIII. Ulusal Biyoloji Kongresi*, 17-20.

Beauchamp, C. ve Fridovich, I., 1971, Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Analytical Biochemistry*, 44 (1), 276-287.

Bennicelli, R., Stepniewski, W., Zakrzhevsky, D., Balakhnina, T., Stepniewska, Z. ve Lipiec, J., 1998, The effect of soil aeration on superoxide dismutase activity, malondialdehyde level, pigment content and stomatal diffusive resistance in maize seedlings, *Environmental and Experimental Botany*, 39 (3), 203-211.

Bennoun, P., 1994, Chlororespiration revisited: mitochondrial-plastid interactions in *Chlamydomonas*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1186 (1-2), 59-66.

Beyer, R. E., 1994, The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: interaction with vitamin E and coenzyme Q, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 26 (4), 349-358.

Blokhina, O., Virolainen, E. ve Fagerstedt, K. V., 2003, Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review, *Annals of Botany*, 91 (2), 179-194.

Blokhina, O. ve Fagerstedt, K. V., 2010, Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems, *Physiologia Plantarum*, 138 (4), 447-462.

Bolwell, G. P. ve Wojtaszek, P., 1997, Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence a broad perspective, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51 (6), 347-366.

Bolwell, G. P., 1999, Role of active oxygen species and NO in plant defence responses, *Current Opinion in Plant Biology*, 2 (4), 287-294.

Boo, Y. C. ve Jung, J., 1999, Water deficit-induced oxidative stress and antioxidative defenses in rice plants, *Journal of Plant Physiology*, 155 (2), 255-261.

Bowler, C., Montagu, M. V. ve Inze, D., 1992, Superoxide dismutase and stress tolerance, *Annual Review of Plant Biology*, 43 (1), 83-116.

Büyük, İ., Soydam-Aydın, S. ve Aras, S., 2012, Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar, *Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology/Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji*, 69 (2).

Carlson, C. L., Adriano, D. C., Sajwan, K. S., Abels, S. L., Thoma, D. P. ve Driver, J. T., 1991, Effects of selected trace metals on germinating seeds of six plant species, *Water, Air, and Soil Pollution*, 59 (3-4), 231-240.

Castillo, F. J. ve Greppin, H., 1988, Extracellular ascorbic acid and enzyme activities related to ascorbic acid metabolism in *Sedum album* L. leaves after ozone exposure, *Environmental and Experimental Botany*, 28 (3), 231-238.

Catalá, A., 2006, An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38 (9), 1482-1495.

Cazalé, A. C., Droillard, M. J., Wilson, C., Heberle-Bors, E., Barbier-Brygoo, H. ve Laurière, C., 1999, MAP kinase activation by hypoosmotic stress of tobacco cell suspensions: towards the oxidative burst response? *The Plant Journal*, 19 (3), 297-307.

Chaffei, C., Pageau, K., Suzuki, A., Gouia, H., Ghorbel, M. H. ve Masclaux-Daubresse, C., 2004, Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in *Lycopersicon esculentum* leading to a metabolic safeguard through an amino acid storage strategy, *Plant and Cell Physiology*, 45 (11), 1681-1693.

Chaoui, A., Mazhoudi, S., El Ferjani, E. ve Ghorbal, M. H., 1997, Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Plant Science*, 127 (2), 139-147.

Chatterjee, C., Nautiyal, N. ve Agarwala, S., 1985, Metabolic changes in mustard plants associated with molybdenum deficiency, *New Phytologist*, 100 (4), 511-518.

Chatterjee, C. ve Nautiyal, N., 2001, Molybdenum stress affects viability and vigor of wheat seeds, *Journal of Plant Nutrition*, 24 (9), 1377-1386.

Cheeseman, J. M., 2006, Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions, *Journal of Experimental Botany*, 57 (10), 2435-2444.

Chen, G. X. ve Asada, K., 1989, Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties, *Plant and Cell Physiology*, 30 (7), 987-998.

Chen, G., Nian, F., Wang, Y. ve Xu, F., 2004, Effect of B, Mo on fatty acid component of *Brassica napus*, *Chinese Journal of oil Crop Sciences*, 26 (2), 69-71.

Cho, U. H. ve Seo, N. H., 2005, Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation, *Plant Science*, 168 (1), 113-120.

Collins, A. R., 2001, Carotenoids and genomic stability, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 475 (1-2), 21-28.

Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R. ve Tavladoraki, P., 2006, Functions of amine oxidases in plant development and defence, *Trends in Plant Science*, 11 (2), 80-88.

Creissen, G., Broadbent, P., Kular, B., Reynolds, H., Wellburn, A. ve Mullineaux, P., 1994, Manipulation of glutathione reductase in transgenic plants: implications for plants' responses to environmental stress, *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, Section B: Biological Sciences*, 102, 167-175.

Çaylak, E., 2011, Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar, *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 9 (1), 73-83.

Çepel, N., 1997, Toprak kirliliği erozyon ve çevreye verdiği zararlar, TEMA.

D'Souza, M. R. ve Devaraj, V., 2013, Oxidative stress biomarkers and metabolic changes associated with cadmium stress in hyacinth bean (*Lablab purpureus)*, *African Journal of Biotechnology*, 12 (29).

Dalton, D. A., Baird, L. M., Langeberg, L., Taugher, C. Y., Anyan, W. R., Vance, C. P. ve Sarath, G., 1993, Subcellular localization of oxygen defense enzymes in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) root nodules, *Plant Physiology*, 102 (2), 481-489.

Das, K. ve Roychoudhury, A., 2014, Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants, *Frontiers in Environmental Science*, 2, 53.

Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D. ve Van Breusegem, F., 2000, Dual action of the active oxygen species during plant stress responses, *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 57 (5), 779-795.

Del Río, L. A., Corpas, F. J., Sandalio, L. M., Palma, J. M., Gómez, M. ve Barroso, J. B., 2002, Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes, *Journal of Experimental Botany*, 53 (372), 1255-1272.

del Río, L. A., Sandalio, L. M., Altomare, D. A. ve Zilinskas, B. A., 2003, Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence, *Journal of Experimental Botany*, 54 (384), 923-933.

Demirevska-Kepova, K., Simova-Stoilova, L., Stoyanova, Z. P. ve Feller, U., 2006, Cadmium stress in barley: growth, leaf pigment, and protein composition and detoxification of reactive oxygen species, *Journal of Plant Nutrition*, 29 (3), 451-468.

Demmig, B. ve Björkman, O., 1987, Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77K) and photon yield of $O_2$ evolution in leaves of higher plants, *Planta*, 171 (2), 171-184.

Dempsey, D. ve Klessig, D., 1995, Signals in plant disease resistance, *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 93 (3), 167-186.

Dey, S. K., Dey, J., Patra, S. ve Pothal, D., 2007, Changes in the antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in wheat seedlings exposed to cadmium and lead stress, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19 (1), 53-60.

Diao, M., Ma, L., Wang, J., Cui, J., Fu, A. ve Liu, H.-y., 2014, Selenium promotes the growth and photosynthesis of tomato seedlings under salt stress by enhancing chloroplast antioxidant defense system, *Journal of Plant Growth Regulation*, 33 (3), 671.

Díaz-Vivancos, P., Clemente-Moreno, M. J., Rubio, M., Olmos, E., García, J. A., Martínez-Gómez, P. ve Hernández, J. A., 2008, Alteration in the chloroplastic metabolism leads to ROS accumulation in pea plants in response to plum pox virus, *Journal of Experimental Botany*, 59 (8), 2147-2160.

Dixit, V., Pandey, V. ve Shyam, R., 2001, Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. *Azad*), *Journal of Experimental Botany*, 52 (358), 1101-1109.

Dixon, D. P., Skipsey, M. ve Edwards, R., 2010, Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism, *Phytochemistry*, 71 (4), 338-350.

Duarte-Vázquez, M. A., García-Almendárez, B., Regalado, C. ve Whitaker, J. R., 2000, Purification and partial characterization of three turnip (*Brassica napus* L. var. *esculenta* D.C.) peroxidases, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (5), 1574-1579.

Duthie, G. G., Wahle, K. W. J. ve James, W. P. T., 1989, Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease, *Nutr Res Rev*, (2), 51-62.

Edwards, E. A., Rawsthorne, S. ve Mullineaux, P. M., 1990, Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.), *Planta*, 180 (2), 278-284.

Edwards, R., Dixon, D. P. ve Walbot, V., 2000, Plant glutathione S-transferases: Enzymes with multiple functions in sickness and in health, *Trends in Plant Science*, 5 (5), 193-198.

Eiri, H., Véronique, M., Peter, S. ve Anja, K.-L., 2011, Oxygen activation at the plasma membrane: relation between superoxide and hydroxyl radical production by isolated membranes, *Planta*, 234 (1), 35.

Elstner, E., 1987, Metabolism of activated oxygen species. In 'Biochemistry of metabolism (the biochemistry of plants: a comprehensive treatise. Vol. 11)'.(Ed. DD Davies) pp. 253–315, Academic Press: San Diego, CA, USA.

Elstner, E. F., 1991, Metabolisms of oxygen activation in different compartments of plant cells, *Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism.*, 13-25.

Ercal, N., Gurer-Orhan, H. ve Aykin-Burns, N., 2001, Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage, *Current topics in Medicinal Chemistry*, 1 (6), 529-539.

Esterbauer, H., Schaur, R. J. ve Zollner, H., 1991, Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes, *Free Radical Biology and Medicine*, 11 (1), 81-128.

Farooq, M., Anwar, F. ve Rashid, U., 2008, Appraisal of heavy metal contents in different vegetables grown in the vicinity of an industrial area, *Pakistan Journal of Botany*, 40 (5), 2099-2106.

Feng, J. P., Shi, Q. H. ve Wang, X. F., 2009, Effects of exogenous silicon on photosynthetic capacity and antioxidant enzyme activities in chloroplast of cucumber seedlings under excess manganese, *Agricultural Sciences in China*, 8 (1), 40-50.

Fenton, H. J. H., 1894, LXXIII. - Oxidation of tartaric acid in presence of iron, *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 65, 899-910.

Fernandes, J. C. ve Henriques, F. S., 1991, Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper inplants, *Botanical Review*, 57 (3), 246.

Fink, R. C. ve Scandalios, J. G., 2002, Molecular evolution and structure-function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 399 (1), 19-36.

Flora, S., 2007, Role of free radicals and antioxidants in health and disease, *Cellular and Molecular Biology*, 53 (1), 1-2.

Foyer, C., Descourvieres, P. ve Kunert, K., 1994a, Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants, *Plant, Cell & Environment*, 17 (5), 507-523.

Foyer, C., 1996, Free radical processes in plants, *Biochemical Society Transactions*, 24, 427-434.

Foyer, C. H. ve Halliwell, B., 1976, The Presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism, *Planta*, 133 (1), 21.

Foyer, C. H. ve Lelandais, M., 1993, The roles of ascorbate in the regulation of photosynthesis, *Photosynthetic Responses to the Environment. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD*, 88-101.

Foyer, C. H., Lelandais, M. ve Kunert, K. J., 1994, Photooxidative stress in plants, *Physiologia Plantarum*, 92 (4), 696-717.

Foyer, C. H. ve Mullineaux, P. M., 1994, Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants, *CRC Press*.

Foyer, C. H., Souriau, N., Perret, S., Lelandais, M., Kunert, K. J., Pruvost, C. ve Jouanin, L., 1995, Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees, *Plant Physiology*, 109 (3), 1047-1057.

Foyer, C. H., Lopez-Delgado, H., Dat, J. F. ve Scott, I. M., 1997, Hydrogen peroxide-and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling, *Physiologia Plantarum*, 100 (2), 241-254.

Foyer, C. H. ve Noctor, G., 2000, Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling, *The New Phytologist*, 146 (3), 359-388.

Foyer, C. H. ve Noctor, G., 2005a, Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses, *The Plant Cell*, 17 (7), 1866-1875.

Foyer, C. H. ve Noctor, G., 2005b, Oxidant and antioxidant signalling in plants: A revaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context, *Plant, Cell and Environment*, 28 (8), 1056-1071.

Fridovich, I., 1986, Advances in enzymology and related areas of molecular biology, *Superoxide dismutases*, 58, 61-97.

Fritz, H. ve Joseph, W., 1934, The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts, *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 147 (861), 332.

Fry, S. C., 1986, Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms, *Annual Review of Plant Physiology*, 37 (1), 165-186.

Gadd, G. M., 2000, Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization, *Current Opinion in Biotechnology*, 11 (3), 271-279.

Gardea-Torresdey, J., Polette, L., Arteaga, S., Tiemann, K., Bibb, J. ve Gonzalez, J., 1996, Determination of the content of hazardous heavy metals on *Larrea tridentata* grown around a contaminated area, *Proceedings of the Eleventh Annual EPA Conference on Hazardous Waste Research Substances, Albuquerque, NM*.

Gaur, A., Gupta, S. ve Gupta, S. K., 1994, Lipid components of mustard seeds (*Brassica juncea* L.) as influenced by cadmium levels, *Plant Foods for Human Nutrition*, 46 (2), 93.

Gechev, T., Willekens, H., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Camp, W., Toneva, V. ve Minkov, I., 2003, Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress, *Journal of Plant Physiology*, 160 (5), 509-515.

Geiger, G., Federer, P. ve Sticher, H., 1993, Reclamation of heavy metal contaminated soils: Field studies and germination experiments, *Journal of Environmental Quality*, 22 (1), 201-207.

Ghafarian, A. H., Zarghami, R., Zand, B. ve Bayat, V., 2013, Wheat performance as affected by foliar application of molybdenum (Mo) under drought stress condition, *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4 (11), 3050-3056.

Gill, S. S. ve Tuteja, N., 2010, Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 48 (12), 909-930.

Gill, S. S., Khan, N. A. ve Tuteja, N., 2011, Differential cadmium stress tolerance in five indian mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars: An evaluation of the role of antioxidant machinery, *Plant Signaling and Behavior*, 6 (2), 293-300.

Girotti, A. W., 1998, Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems, *Journal of Lipid Research*, 39 (8), 1529-1542.

Gomes, M. P. ve Soares, A. M., 2013, Cadmium effects on mineral nutrition of the Cd-hyperaccumulator *Pfaffia glomerata*, *Biologia*, 68 (2), 223-230.

Gómez, J. M., Hernández, J. A., Jiménez, A., del Río, L. A. ve Sevilla, F., 1999, Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants, *Free Radical Research*, 31 Suppl, S11-S18.

Gorham, J., Jones, R. G. W. ve McDonnell, E., 1985, Some mechanisms of salt tolerance in crop plants, *Plant and Soil* (1).

Gouia, H., Habib Ghorbal, M. ve Meyer, C., 2000, Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean, *Plant Physiology and Biochemistry*, 38 (7-8), 629-638.

Gratao, P. L., Gomes-Junior, R. A., Delite, F. S., Lea, P. J. ve Azevedo, R. A., 2006, Antioxidant stress responses of plants to cadmium.

Gross, G. G., 1977, Cell wall-bound malate dehydrogenase from horseradish, *Phytochemistry*, 16 (3), 319-321.

Gupta, R. K., Shah, N., Chaudhary, A. K., Patel, A. K., Jha, U. K., Yadav, U. C., Gupta, P. K. ve Pakuwal, U., 2014, Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: A review, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15 (11), 4405-4409.

Gutteridge, J., 1995, Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage, *Clinical Chemistry*, 41 (12), 1819-1828.

Halliwell, B. ve Gutteridge, J. M. C., 1989, Free radicals in biology and medicine, Oxford University Press, Oxford, UK, 2rd edition.

Halliwell, B. ve Gutteridge, J. M. C., 1998, Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. , *Oxford: Clarendon Press*, 188-196.

Halliwell, B. ve Gutteridge, J. M., 2015, Free radicals in biology and medicine, *Oxford University Press*, USA.

HammondKosack, K. E. ve Jones, J. D. G., 1996, Resistance gene-dependent plant defense responses, *Plant Cell*, 8**:** 1773-1791.

Han, C., Liu, Q. ve Yang, Y., 2009, Short-term effects of experimental warming and enhanced ultraviolet-B radiation on photosynthesis and antioxidant defense of *Picea asperata* seedlings, *Plant Growth Regulation* (2), 153.

Hardiman, R. T., Banin, A. ve Jacoby, B., 1984, The effect of soil type and degree of metal contamination upon uptake of Cd, Pb and Cu in bush beans (*Phaseolus vulgaris* L.), *Plant and Soil*, 81 (1), 3-15.

Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A., da Silva, J. A. T. ve Fujita, M., 2012, Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor, In: Crop stress and its management: Perspectives and strategies, Eds: Springer, p. 261-315.

Hassan, M., Shao, G. ve Zhang, G., 2005, Influence of cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activity in rice cultivars with different grain cadmium accumulation, *Journal of Plant Nutrition*, 28 (7), 1259-1270.

Hernández, J. A., Rubio, M., Olmos, E., Martínez-Gómez, P. ve Ros-Barceló, A., 2004a, Oxidative stress induced by long-term plum pox virus infection in peach (*Prunus persica*), *Physiologia Plantarum*, 122 (4), 486-495.

Hernández, J. A., Escobar, C., Creissen, G. ve Mullineaux, P. M., 2004b, Role of hydrogen peroxide and the redox state of ascorbate in the induction of antioxidant enzymes in pea leaves under excess light stress, *Functional Plant Biology*, 31 (4), 359-368.

Hernández, L. E. ve Cooke, D. T., 1997, Modification of the root plasma membrane lipid composition of cadmium treated *Pisum sativum*, *Journal of Experimental Botany*, 48 (7), 1375-1381.

Herzog, V. ve Fahimi, H. D., 1973, A new sensitive colorimetric assay for peroxidase using 3,3′-diaminobenzidine as hydrogen donor, *Analytical Biochemistry*, 55 (2), 554-562.

Hewitt, E. ve Bolle-Jones, E., 1952, Molybdenum as a plant nutrient: II. The effects of molybdenum deficiency on some horticultural and agricultural crop plants in sand culture, *Journal of Horticultural Science*, 27 (4), 257-265.

Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F. ve Prange, R. K., 1999, Improving the thiobarbituric acid-reactive substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds, *Planta*, 207 (4), 604-611.

Hofius, D. ve Sonnewald, U., 2003, Vitamin E biosynthesis: biochemistry meets cell biology, *Trends in Plant Science*, 8 (1), 6-8.

Horemans, N., Asard, H. ve Foyer, C. H., 2000, Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane, *Trends in Plant Science*, 5 (6), 263-267.

Horemans, N., Raeymaekers, T., Van Beek, K., Nowocin, A., Blust, R., Broos, K., Cuypers, A., Vangronsveld, J. ve Guisez, Y., 2007, Dehydroascorbate uptake is impaired in the early response of *Arabidopsis* plant cell cultures to cadmium, *Journal of Experimental Botany*, 58 (15-16), 4307-4317.

Hossain, M. A., Nakano, Y. ve Asada, K., 1984, Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide, *Plant and Cell Physiology*, 25 (3), 385-395.

Hossain, Z., López-Climent, M. F., Arbona, V., Pérez-Clemente, R. M. ve Gómez-Cadenas, A., 2009, Modulation of the antioxidant system in citrus under waterlogging and subsequent drainage, *Journal of Plant Physiology*, 166 (13), 1391-1404.

Hu, C., Wang, Y., Li, Z., He, H., Tan, Q., Du, C. ve Wei, W., 1999, Effect of N, Mo compound on yield and dry matter of winter wheat, *Journal Huazhong (Central China) Agricultural University*, 18 (3), 225-228.

Hu, C., Wang, Y. ve Wei, W., 2002a, Effect of molybdenum applications on concentrations of free amino acids in winter wheat at different growth stages, *Journal of Plant Nutrition*, 25 (7), 1487-1499.

Hu, C. X., Wang, Y. H., Tan, Q. L. ve X., W. W., 2002b, Effect of molybdenum and nitrogen fertilizers on free amino acid, protein and its amino acid composition of winter wheat grains, *Plant Nutrition and Fertilizer Sciences* (8), 224–228

Hu, X., Zhang, A., Zhang, J. ve Jiang, M., 2006, Abscisic acid is a key inducer of hydrogen peroxide production in leaves of maize plants exposed to water stress, *Plant & Cell Physiology*, 47 (11), 1484-1495.

Irfan, M., Ahmad, A. ve Hayat, S., 2014, Effect of cadmium on the growth and antioxidant enzymes in two varieties of *Brassica juncea*, *Saudi Journal of Biological Sciences* (2), 125.

Ivanov, B. ve Khorobrykh, S., 2003, Participation of photosynthetic electron transport in production and scavenging of reactive oxygen species, *Antioxidants and Redox Signaling*, 5 (1), 43-53.

Jackson, C., Dench, J., Moore, A. L., Hallıwell, B., Foyer, C. H. ve Hall, D. O., 1978, Subcellular localisation and identification of superoxide dismutase in the leaves of higher plants, *European Journal of Biochemistry*, 91 (2), 339-344.

Jadia, C. D. ve Fulekar, M., 2009, Phytoremediation of heavy metals: recent techniques, *African journal of Biotechnology*, 8 (6).

Jamali, M., Kazi, T., Arain, M., Afridi, H., Jalbani, N. ve Memon, A., 2007, Heavy metal contents of vegetables grown in soil, irrigated with mixtures of wastewater and sewage sludge in Pakistan, using ultrasonic-assisted pseudo-digestion, *Journal of Agronomy and Crop Science*, 193 (3), 218-228.

Järup, L., 2003, Hazards of heavy metal contamination, *British Medical Bulletin*, 68 (1), 167-182.

Jiang, M. ve Zhang, J., 2002, Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in abscisic acid-and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings, *Planta*, 215 (6), 1022-1030.

Jimenez, A., Hernandez, J. A., del Río, L. A. ve Sevilla, F., 1997, Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves, *Plant Physiology*, 114 (1), 275-284.

Jiménez, A., Hernández, J. A., Pastori, G., del Rio, L. A. ve Sevilla, F., 1998, Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves, *Plant Physiology*, 118 (4), 1327-1335.

Joseph, B. ve Jini, D., 2010, Insight into the role of antioxidant enzymes for salt tolerance in plants, *International Journal of Botany*, 6 (4), 456-464.

Kabata-Pendias, A. ve Pendias, H., 2001, Trace elements in soils and plants–*CRC Press, Boca Raton*.

Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A. ve Timur, S., 2003, Metallerin çevresel etkileri-I, *Metalurji Dergisi*, 136, 47-53.

Kaiser, B. N., Gridley, K. L., Brady, J. N., Phillips, T. ve Tyerman, S. D., 2005, The role of molybdenum in agricultural plant production, *Annals of Botany*, 96 (5), 745-754.

Kandhari, P., 2004, Generic differences in antioxidant concentration in the fruit tissues of four major cultivars of apples.

Kanner, J., German, J. B., Kinsella, J. E. ve Hultin, H. O., 1987, Initiation of lipid peroxidation in biological systems, *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 25 (4), 317-364.

Kevresan, S., Petrovic, N., Popovic, M. ve Kandrac, J., 2001, Nitrogen and protein metabolism in young pea plants as affected by different concentrations of nickel, cadmium, lead, and molybdenum. 24**:** 1633-1644.

Khan, N., Samiullah, Singh, S. ve Nazar, R., 2007, Activities of antioxidative enzymes, sulphur assimilation, photosynthetic activity and growth of wheat (*Triticum aestivum*) cultivars differing in yield potential under cadmium stress, *Journal of Agronomy and Crop Science*, 193 (6), 435-444.

Kocataş, A., 2003, Ekoloji-Çevre Biyolojisi (8. Baskı), *İzmir: Ege Üniversitesi Basım Evi*.

Koç, E. ve Üstün, A. S., 2008, Patojenlere karşı bitkilerde savunma ve antioksidanlar, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 24 (1), 82-100.

Krupa, Z. ve Baszynski, T., 1989, Acyl lipid composition of thylakoid membranes of cadmium-treated tomato plants, *Acta Physiologiae Plantarum (Poland)*.

Kumar, M., Sugatha, P. ve Hebbar, K., 2014, Superoxide dismutase isozymes and their heat stability in coconut (*Cocus nucefera* L.) leaves.

Laemmli, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227 (5259), 680.

Lamb, C. ve Dixon, R. A., 1997, The oxidative burst in plant disease resistance, *Annual Review of Plant Biology*, 48 (1), 251-275.

Lane, B. G., 2002, Oxalate, germins, and higher-plant pathogens, *IUBMB Life*, 53 (2), 67-75.

Larson, R. A., 1988, The antioxidants of higher plants, *Phytochemistry*, 27 (4), 969-978.

León, A. M., Palma, J. M., Corpas, F. J., Gómez, M., Romero-Puertas, M. C., Chatterjee, D., Mateos, R. M., Luis, A. ve Sandalio, L. M., 2002, Antioxidative enzymes in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium, *Plant Physiology and Biochemistry*, 40 (10), 813-820.

Levitt, J., 1980, Responses of plants to environmental stresses, Vol. II. 2nd ed. *Academic Press*. New York,, 607 pp.

Li, J. ve Li, X. D., 2002, Effect of copper and molybdenum on quality in pakchoi, *Fujian Agric Sci Technol* (3), 13-14

Li, W., Wang, Z., Mi, G., Han, X. ve Zhang, F., 2001, Molybdenum deficiency in winter wheat seedlings as enhanced by freezing temperature, *Journal of Plant Nutrition*, 24 (8), 1195-1203.

Lin, J.-N. ve Kao, C. H., 1998, Effect of oxidative stress caused by hydrogen peroxide on senescence of rice leaves, *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 39.

Lin, Y. F. ve Aarts, M. G. M., 2012, The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69 (19), 3187-3206.

Liu, P. ve Yang, Y., 2000, Effects of molybdenum and boron on membrane lipid peroxidation and endogenous protective systems of soybean leaves, *Acta Botanica Sinica,* (42), 461– 466

Liu, P. ve Yang, Y. A., 2003, Effect of molybdenum and boron pollution on quality of soybean, *Chin J Appl Environ Biol*, 9 (6), 594-597.

Liu, P., Yang, Y., Xu, G., Fang, Y. ve Yang, Y., 2005, The response of antioxidant enzymes of three soybean varieties to molybdenum and boron in soil with a connection to plant quality, *Plant Soil and Environment*, 51 (8), 351.

Liu, Y., Wang, K., Xu, P. ve Wang, Z., 2012, Physiological responses and tolerance threshold to cadmium contamination in *Eremochloa ophiuroides*, *International Journal of Phytoremediation*, 14 (5), 467-480.

Logan, B. A., Kornyeyev, D., Hardison, J. ve Holaday, A. S., 2006, The role of antioxidant enzymes in photoprotection, *Photosynthesis Research*, 88 (2), 119-132.

Lombardi, L. ve Sebastiani, L., 2005, Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants, *Plant Science*, 168 (3), 797-802.

Luis, A., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Palma, J. M. ve Barroso, J. B., 2006, Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling, *Plant Physiology*, 141 (2), 330-335.

Luwe, M. W., Takahama, U. ve Heber, U., 1993, Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves, *Plant Physiology*, 101 (3), 969-976.

Maheshwari, R. ve Dubey, R., 2009, Nickel-induced oxidative stress and the role of antioxidant defence in rice seedlings, *Plant Growth Regulation*, 59 (1), 37-49.

Mahmud, J. A., Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Rahman, A. ve Fujita, M., 2017, Relative tolerance of different species of *Brassica* to cadmium toxicity: Coordinated role of antioxidant defense and glyoxalase systems, 10 (2), 107-117.

Maksymiec, W. ve Krupa, Z., 2006, The effects of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana*, *Environmental and Experimental Botany*, 57 (1-2), 187-194.

Malik, A., 2004, Metal bioremediation through growing cells, *Environment International*, 30 (2), 261-278.

Marchiol, L., Leita, L., Martin, M., Peressotti, A. ve Zerbi, G., 1996, Physiological responses of two soybean cultivars to cadmium, *Journal of Environmental Quality*, 25 (3), 562-566.

Markovska, Y., Gorinova, N., Nedkovska, M. ve Miteva, K., 2009, Cadmium-induced oxidative damage and antioxidant responses in *Brassica juncea* plants, *Biologia Plantarum*, 53 (1), 151-154.

Marscher, P., 2012, Marschener's mineral nutrition of higher plants, third ed. *Academic Press*, London.

Mazhoudi, S., Chaoui, A., Ghorbal, M. H. ve El Ferjani, E., 1997, Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.), *Plant Science*, 127 (2), 129-137.

McCord, J. M. ve Fridovich, I., 1969, Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein), *Journal of Biological Chemistry*, 244 (22), 6049-6055.

McLaughlin, M. J., Parker, D. ve Clarke, J., 1999, Metals and micronutrients–food safety issues, *Field Crops Research*, 60 (1-2), 143-163.

Meagher, R. B., 2000, Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants, *Current Opinion in Plant Biology*, 3 (2), 153-162.

Mehler, A. H., 1951a, Studies on reactions of illuminated chloroplasts. II. Stimulation and inhibition of the reaction with molecular oxygen, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 34 (2), 339-351.

Mehler, A. H., 1951b, Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other hill reagents, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 33 (1), 65-77.

Mehlhorn, H., Lelandais, M., Korth, H. ve Foyer, C., 1996, Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases, *FEBS Letters*, 378 (3), 203-206.

Mendel, R. R. ve Hänsch, R., 2002, Molybdoenzymes and molybdenum cofactor in plants, *Journal of Experimental Botany*, 53 (375), 1689-1698.

Metwally, A., Safronova, V. I., Belimov, A. A. ve Dietz, K.-J., 2004, Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L., *Journal of Experimental Botany*, 56 (409), 167-178.

Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F. ve Noctor, G., 2010, Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models, *Journal of Experimental Botany*, 61 (15), 4197-4220.

Mishra, S., Jha, A. ve Dubey, R., 2011, Arsenite treatment induces oxidative stress, upregulates antioxidant system, and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings, *Protoplasma*, 248 (3), 565-577.

Mittler, R. ve Zilinskas, B., 1992, Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase, *Journal of Biological Chemistry*, 267 (30), 21802-21807.

Mittler, R., 2002, Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends in Plant Science*, 7 (9), 405-410.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. ve Van Breusegem, F., 2004, Reactive oxygen gene network of plants, *Trends in Plant Science*, 9 (10), 490-498.

Mittova, V., Tal, M., Volokita, M. ve Guy, M., 2002, Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species, *Physiologia Plantarum*, 115 (3), 393-400.

Miyake, C. ve Asada, K., 1992, Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids, *Plant and Cell Physiology*, 33 (5), 541-553.

Miyake, C., Schreiber, U., Hormann, H., Sano, S. ve Kozi, A., 1998, The FAD-enzyme monodehydroascorbate radical reductase mediates photoproduction of superoxide radicals in spinach thylakoid membranes, *Plant and Cell Physiology*, 39 (8), 821-829.

Mobin, M. ve Khan, N. A., 2007, Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress, *Journal of Plant Physiology*, 164 (5), 601-610.

Molina, A. S., Nievas, C., Chaca, M. V. P., Garibotto, F., González, U., Marsá, S. M., Luna, C., Giménez, M. S. ve Zirulnik, F., 2008, Cadmium-induced oxidative damage and antioxidative defense mechanisms in *Vigna mungo* L., *Plant Growth Regulation*, 56 (3), 285.

Møller, I. M., Jensen, P. E. ve Hansson, A., 2007, Oxidative modifications to cellular components in plants, *Annu Rev Plant Biol*, 58, 459-481.

Moura, J. C. M. S., de Oliveira Fernandes Viana, J., Dornelas, M. C., Mazzafera, P. ve Bonine, C. A. V., 2010, Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin

content and composition in plants, *Journal of Integrative Plant Biology*, 52 (4), 360-376.

Moussa, H. R., Abdel-Aziz, S. M., Mans, B., Andersen, J., Francischetti, I., Valenzuela, J., Schwan, T., Pham, V., Garfield, M. ve Hammer, C., 2008, Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress, *Australian Journal of Crop Science*, 1 (1), 31-36.

Munzuroğlu, Ö. ve Gür, N., 2000, The effects of heavy metals on the pollen germination and pollen tube growth of apples (*Malus sylvestris* Miller cv. Golden), *Turkish Journal of Biology*, 24 (3), 677-684.

Murphy, M. P., 2009, How mitochondria produce reactive oxygen species, *Biochemical Journal*, 417 (1), 1-13.

Nahakpam, S. ve Shah, K., 2011, Expression of key antioxidant enzymes under combined effect of heat and cadmium toxicity in growing rice seedlings, *Plant Growth Regulation*, 63 (1), 23-35.

Nakano, Y. ve Asada, K., 1981, Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant and Cell Physiology*, 22 (5), 867-880.

Nautiyal, N. ve Chatterjee, C., 2004, Molybdenum stress-induced changes in growth and yield of chickpea, *Journal of Plant Nutrition*, 27 (1), 173-181.

Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E. ve Jacquot, J. P., 2007, Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria, *Physiologia Plantarum*, 129 (1), 185-195.

Neubauer, C. ve Schreiber, U., 1989, Photochemical and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence induced by hydrogen peroxide, *Zeitschrift für Naturforschung C*, 44 (3-4), 262-270.

Nie, Z., Hu, C., Sun, X., Tan, Q. ve Liu, H., 2007, Effects of molybdenum on ascorbate-glutathione cycle metabolism in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*), *Plant and Soil*, 295 (1-2), 13-21.

Niyogi, K. K., 1999, Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches, *Annual Review of Plant Biology*, 50 (1), 333-359.

Niyogi, K. K., Shih, C., Chow, W. S., Pogson, B. J., DellaPenna, D. ve Björkman, O., 2001, Photoprotection in a zeaxanthin-and lutein-deficient double mutant of *Arabidopsis*, *Photosynthesis Research*, 67 (1-2), 139-145.

Noctor, G. ve Foyer, C. H., 1998, Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control, *Annual Review of Plant Biology*, 49 (1), 249-279.

Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S., Driscoll, S., Novitskaya, L. ve Foyer, C. H., 2002a, Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration?, *Annals of Botany*, 89 (7), 841-850.

Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H. ve Foyer, C. H., 2002b, Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling, *Journal of Experimental Botany*, 53 (372), 1283-1304.

Noctor, G., De Paepe, R. ve Foyer, C. H., 2007, Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants, *Trends in Plant Science*, 12 (3), 125-134.

Nouairi, I., Ammar, W. B., Youssef, N. B., Daoud, D. B. M., Ghorbal, M. H. ve Zarrouk, M., 2006, Comparative study of cadmium effects on membrane lipid composition of *Brassica juncea* and *Brassica napus* leaves, *Plant Science*, 170 (3), 511-519.

Okcu, M., Tozlu, E., Kumlay, A. M. ve Pehluvan, M., 2009, Ağır metallerin bitkiler üzerine etkileri, *Alınteri Zirai Bilimler Dergisi*, 17 (2), 14-26.

Olmos, E., Martínez-Solano, J. R., Piqueras, A. ve Hellín, E., 2003, Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line), *Journal of Experimental Botany*, 54 (381), 291-301.

Olsen, K. M., Lillo, C., Hehn, A., Jugdé, H., Larbat, R., Bourgaud, F. ve Slimestad, R., 2010, Identification and characterisation of CYP75A31, a new flavonoid 3'5'-hydroxylase, isolated from *Solanum lycopersicum*, *BMC Plant Biology*, 10.

Orozco-Cardenas, M. ve Ryan, C. A., 1999, Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 (11), 6553-6557.

Ouariti, O., Boussama, N., Ghorbal, M. H., Zarrouk, M. ve Cherif, A., 1997, Cadmium and copper induced changes in tomato membrane lipids, *Phytochemistry*, 45 (7), 1343-1350.

Özcan, S., Gürel, E. ve Babaoğlu, M., 2004, Bitki biyoteknolojisi kitabı II. Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, 317.

Öztürk, R., Bozkaya, L. A., Atav, E., Sağlam, N. ve Tarhan, L., 1999, Purification and characterization of superoxide dismutase from *Phanerochaete chrysosporium*, *Enzyme and Microbial Technology*, 25 (3-5), 392-399.

Paganga, G., Miller, N. ve Rice-Evans, C. A., 1999, The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute?, *Free Radical Research*, 30 (2), 153-162.

Palma, J. M., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Romero-Puertas, M. C., McCarthy, I. ve Luis, A., 2002, Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes, *Plant Physiology and Biochemistry*, 40 (6-8), 521-530.

Palma, J. M., Corpas, F. J. ve del Río, L. A., 2009, Proteome of plant peroxisomes: new perspectives on the role of these organelles in cell biology, *Proteomics*, 9 (9), 2301-2312.

Panda, S. K. ve Patra, H. K., 2007, Effect of salicylic acid potentiates cadmium-induced oxidative damage in *Oryza sativa* L. leaves, *Acta Physiologiae Plantarum*, 29 (6), 567-575.

Passardi, F., Cosio, C., Penel, C. ve Dunand, C., 2005, Peroxidases have more functions than a Swiss army knife, *Plant Cell Reports*, 24 (5), 255-265.

Pastore, D., Trono, D., Laus, M. N., Di Fonzo, N. ve Flagella, Z., 2007, Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress: a case study: durum wheat mitochondria, *Journal of Experimental Botany*, 58 (2), 195-210.

Pei, Z.-M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klüsener, B., Allen, G. J., Grill, E. ve Schroeder, J. I., 2000, Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells, *Nature*, 406 (6797), 731.

Pell, E. J. ve Steffen, K. L., 1991, Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism, *Penn State Symposium in Plant Physiology 1991: Pennsylvania State University)*.

Pena, L. B., Pasquini, L. A., Tomaro, M. L. ve Gallego, S. M., 2006, Proteolytic system in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves under cadmium stress, *Plant Science*, 171 (4), 531-537.

Pence, N. S., Larsen, P. B., Ebbs, S. D., Letham, D. L., Lasat, M. M., Garvin, D. F., Eide, D. ve Kochian, L. V., 2000, The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (9), 4956-4960.

Petering, H. G., Choudhury, H. ve Stemmer, K. L., 1979, Some effects of oral ingestion of cadmium on zinc, copper, and iron metabolism, *Environmental Health Perspectives*, 28, 97.

Peterson, P., 1993, Plant adaptation to environmental stress: metal pollutant tolerance.

Pinto, E., Sigaud-kutner, T. C., Leitao, M. A., Okamoto, O. K., Morse, D. ve Colepicolo, P., 2003, Heavy metal induced oxidative stress in algae, *Journal of Phycology*, 39 (6), 1008-1018.

Polle, A., Chakrabarti, K., Schürmann, W. ve Renneberg, H., 1990, Composition and properties of hydrogen peroxide decomposing systems in extracellular and total extracts from needles of Norway spruce (*Picea abies* L., Karst.), *Plant Physiology*, 94 (1), 312-319.

Prousek, J., 2007, Fenton chemistry in biology and medicine, *Pure and Applied Chemistry*, 79 (12), 2325-2338.

Puntarulo, S., Sánchez, R. A. ve Boveris, A., 1988, Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination, *Plant Physiology*, 86 (2), 626-630.

Qadir, S., Qureshi, M. I., Javed, S. ve Abdin, M. Z., 2004, Genotypic variation in phytoremediation potential of *Brassica juncea* cultivars exposed to Cd stress, *Plant Science*, 167 (5), 1171-1181.

Ranieri, A., Castagna, A., Scebba, F., Careri, M., Zagnoni, I., Predieri, G., Pagliari, M. ve di Toppi, L. S., 2005, Oxidative stress and phytochelatin characterisation in bread wheat exposed to cadmium excess, *Plant Physiology and Biochemistry*, 43 (1), 45-54.

Rao, A. C. ve Reddy, A. R., 2008, Glutathione reductase: a putative redox regulatory system in plant cells, In: Sulfur assimilation and abiotic stress in plants, Eds: Springer, p. 111-147.

Rao, K. M. ve Sresty, T., 2000, Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses, *Plant Science*, 157 (1), 113-128.

Raskin, I. ve Ensley, B. D., 2000, Phytoremediation of toxic metals, John Wiley and Sons.

Rasmusson, A. G., Geisler, D. A. ve Møller, I. M., 2008, The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria, *Mitochondrion*, 8 (1), 47-60.

Raven, E. L., 2003, Understanding functional diversity and substrate specificity in haem peroxidases: what can we learn from ascorbate peroxidase? *Natural Product Reports*, 20 (4), 367-381.

Reddy, K. J., Munn, L. C. ve Wang, L., 1997, Chemistry and mineralogy of molybdenum in soils, *Molybdenum in Agriculture*, 4-22.

Rether, A., 2002, Entwicklung und charaktersierung wasserlöslicher benzoyl thioharnstoff funktionalisierter polymere zur selektiven abtrennung von schwermetallionen aus abwässern und prozesslösungen, *Technische Universität München*.

Rhoads, D. M., Umbach, A. L., Subbaiah, C. C. ve Siedow, J. N., 2006, Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling, *Plant Physiology*, 141 (2), 357-366.

Richard, D. V., Theodore, R. J. ve Kenneth, L. P., 1982, Kaempferol 3-O-galactoside, 7-O-rhamnoside is the major green fluorescing compound in the epidermis of *Vicia faba*, *Plant Physiology*, 69 (2), 522.

Richard, E. S. ve Gail, E. B., 1974, Rapid estimates of relative water content, *Plant Physiology*, 53 (2), 258.

Romero-Puertas, M., McCarthy, I., Sandalio, L., Palma, J., Corpas, F., Gómez, M. ve Del Rio, L., 1999, Cadmium toxicity and oxidative metabolism of pea leaf peroxisomes, *Free Radical Research*, 31 (sup1), 25-31.

Romero-Puertas, M. C., Corpas, F. J., Sandalio, L. M., Leterrier, M., Rodríguez-Serrano, M., Del Río, L. A. ve Palma, J. M., 2006, Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme, *New Phytologist*, 170 (1), 43-52.

Rubio, M., Escrig, I., Martinez-Cortina, C., Lopez-Benet, F. ve Sanz, A., 1994, Cadmium and nickel accumulation in rice plants. Effects on mineral nutrition and possible interactions of abscisic and gibberellic acids, *Plant Growth Regulation*, 14 (2), 151-157.

Rucińska-Sobkowiak, R., 2016, Water relations in plants subjected to heavy metal stresses, *Acta Physiologiae Plantarum*, 38 (11).

Sade, B., Soylu, S. ve Yetim, E., 2011, Drought and oxidative stress, *African Journal of Biotechnology*, 10 (54), 11102-11109.

Sagi, M. ve Fluhr, R., 2001, Superoxide production by plant homologues of the gp91phox NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection, *Plant Physiology*, 126 (3), 1281-1290.

Sairam, R. K. ve Srivastava, G. C., 2001, Water stress tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.): Variations in hydrogen peroxide accumulation and antioxidant activity in tolerant and susceptible genotypes, *Journal of Agronomy & Crop Science*, 186 (1), 63-70.

Sandalio, L. M., Dalurzo, H. C., Gómez, M., Romero-Puertas, M. C. ve Río, L. A. d., 2001, Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants, *Journal of Experimental Botany*, 52 (364), 2115.

Sandalio, L. M., Rodriguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M. C. ve del-Rıo, L. A., 2013, Role of peroxisomes as a source of reactive oxygen species (ROS) signaling molecules, *Peroxisomes and Their Key Role in Cellular Signaling and Metabolism*, 231-255.

Sanita di Toppi, L. ve Gabbrielli, R., 1999, Response to cadmium in higher plants. 41**:** 105-130.

Santa-Cruz, A., Martinez-Rodriguez, M. M., Perez-Alfocea, F., Bolarin, M. C. ve Romero-Aranda, R., 2002, The rootstock effect on the tomato salinity response depends on the shoot genotype, *Plant Science*, 162 (5), 825-831.

Sarkar, R. K., Das, S. ve Ravi, I., 2001, Changes in certain antioxidative enzymes and growth parameters as a result of complete submergence and subsequent re-aeration of rice cultivars differing in submergence tolerance, *Journal of Agronomy and Crop Science*, 187 (2), 69-74.

Sauerbeck, D. R., 1991, Plant element and soil properties governing uptake and availability of heavy metals derived from sewage sludge, *Water, Air, and Soil Pollution*, 57-58 (1), 227-237.

Schaller, A. ve Diez, T., 1991, Plant specific aspects of heavy metal uptake and comparison with quality standards for food and forage crops, in Der einfluß von festen abfällen auf böden, Pflanzen, D. Sauerbeck and S. Lübben, 92–125.

Seevers, P. M., Daly, J. M. ve Catedral, F. F., 1971, The role of peroxidase ısozymes in resistance to wheat stem rust disease, *Plant Physiology*, 48 (3), 353.

Sgherri, C. L. M., Maffei, M. ve Navari-Izzo, F., 2000, Antioxidative enzymes in wheat subjected to increasing water deficit and rewatering, *Journal of Plant Physiology*, 157 (3), 273-279.

Shah, K., Kumar, R. G., Verma, S. ve Dubey, R., 2001, Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings, *Plant Science*, 161 (6), 1135-1144.

Shannon, M. C. ve Grieve, C. M., 1998, Tolerance of vegetable crops to salinity, *Scientia Horticulturae*, 78 (1-4), 5-38.

Sharma, P. ve Dubey, R. S., 2005, Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings, *Plant Growth Regulation*, 46 (3), 209-221.

Sharma, P. ve 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* (11), 2027.

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S. ve Pessarakli, M., 2012, Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions, *Journal of Botany*, 1-26.

Sheoran, I. S., Singal, H. R. ve Singh, R., 1990, Effect of cadmium and nickel on photosynthesis and the enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.), *Photosynthesis Research*, 23 (3), 345-351.

Siefermann-Harms, D., 1987, The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes, *Plant Physiology* (69), 561-568.

Singh, S., Eapen, S. ve D'souza, S., 2006, Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L., *Chemosphere*, 62 (2), 233-246.

Singh, S., Khan, N. A., Nazar, R. ve Anjum, N. A., 2008, Photosynthetic traits and activities of antioxidant enzymes in blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper) under cadmium stress, *American Journal of Plant Physiology*, 3 (1), 25-32.

Skorzynska-Polit, E., Drazkiewicz, M. ve Krupa, Z., 2003, The activity of the antioxidative system in cadmium treated *Arabidopsis thaliana*, *Biologia Plantarum*, 47**:** 71-78.

Slooten, L., Van Montagu, M. ve Inzé, D., 1998, Manipulation of oxidative stress tolerance in transgenic plants, *Transgenic Plant Research*, 241-262.

Smeets, K., Opdenakker, K., Remans, T., Van Sanden, S., Van Belleghem, F., Semane, B., Horemans, N., Guisez, Y., Vangronsveld, J. ve Cuypers, A., 2009, Oxidative stress-related responses at transcriptional and enzymatic levels after exposure to Cd or Cu in a multipollution context, *Journal of Plant Physiology*, 166 (18), 1982-1992.

Smirnoff, N., 1993, The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation, *New phytologist*, 125 (1), 27-58.

Smirnoff, N., 2000, Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-facetted molecule, *Current Opinion in Plant Biology*, 3 (3), 229-235.

Smirnoff, N., 2005, Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions, *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*, 3, 53-86.

Stolt, P., Asp, H. ve Hultin, S., 2006, Genetic variation in wheat cadmium accumulation on soils with different cadmium concentrations, *Journal of Agronomy and Crop Science* (3), 201.

Sun, Q., Ye, Z. H., Wang, X. R. ve Wong, M. H., 2007, Cadmium hyperaccumulation leads to an increase of glutathione rather than phytochelatins in the cadmium hyperaccumulator *Sedum alfredii*, *Journal of Plant Physiology*, 164 (11), 1489-1498.

Sun, X., Hu, C., Liu, J., Liu, H. ve Tan, Q., 2009, Effects of molybdenum on expression of cold-responsive genes in abscisic acid (ABA)-dependent and ABA-independent pathways in winter wheat under low-temperature stress, *Annals of Botany*, 104 (2), 345-356.

Sun, X., Tan, Q., Nie, Z., Hu, C. ve An, Y., 2014, Differential expression of proteins in response to molybdenum deficiency in winter wheat leaves under low-temperature stress, *Plant Molecular Biology Reporter*, 32 (5), 1057.

Sun, X. C., Hu, C. X., Tan, Q., Wei, W. X. ve Y.H., W., 2002, Effects of molybdenum application on contents of free amino acid, soluble sugar and protein of winter wheat at different growth stages *Journal of Huazhong Agricultural University* (21), 41-43.

Sun, X. C. ve Hu, C. X., 2006, Effects of molybdenum on anti-oxidative defense system and membrane lipid peroxidation in winter wheat under low temperature stress, *J Plant Physiol Mol Biol* (32), 175–782

Susumu, H., Katsutomo, S., Hiroyuki, I., Yuko, O. ve Hirokazu, M., 2001, A Large Family of Class III Plant Peroxidases, *Plant and Cell Physiology* (5), 462.

Szabados, L. ve Savoure, A., 2010, Proline: a multifunctional amino acid, *Trends in Plant Science* (2), 89.

Takeda, T., Yokota, A. ve Shigeoka, S., 1995, Resistance of photosynthesis to hydrogen peroxide in algae, *Plant and Cell Physiology*, 36 (6), 1089-1095.

Tanou, G., Molassiotis, A. ve Diamantidis, G., 2009, Induction of reactive oxygen species and necrotic death-like destruction in strawberry leaves by salinity, *Environmental and Experimental Botany*, 65 (2-3), 270-281.

Temel, Y., Bozkuş, T. ve Çiftçi, M., 2017, Glutatyon redüktaz (GR) enziminin japon bıldırcın (*Coturnix japanica*) eritrositlerinden saflaştırılması ve karakterizasyonu, *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7 (3), 143-150.

Turrens, J. F., 2003, Mitochondrial formation of reactive oxygen species, *The Journal of Physiology*, 552 (Pt 2), 335-344.

Tuteja, N., Tiburcio, A. F., Fortes, A. M. ve Bartels, D., 2011, Plant abiotic stress. Introduction to PSB special issue, *Plant Signaling & Behavior*, 6 (2), 173-174.

TÜİK, 2019, http:// http://tuik.gov.tr/UstMenu.do?metod=temelist [Ziyaret Tarihi 25 Nisan 2019].

Ulusu, Y., Öztürk, L. ve Elmastaş, M., 2015, Kadmiyum stresinin maydanoz bitkisinde kadmiyum birikimi ve antioksidan kapasite üzerine etkisi, *1.Ulusal Bitki Fizyolojisi Sempozyumu*.

Van Assche, F. ve Clijsters, H., 1990, Effects of metals on enzyme activity in plants, *Plant, Cell & Environment*, 13 (3), 195-206.

Van Breusegem, F. ve Dat, J. F., 2006, Reactive oxygen species in plant cell death, *Plant Physiology* (2), 384.

Van Camp, W., Van Montagu, M. ve Inzé, D., 1998, $H_2O_2$ and NO: Redox signals in disease resistance, *Trends in Plant Science*, 3 (9), 330-334.

Vankova-Radeva, R. V., Yaneva, I. A., Baidanova, V. D., L'vov, N. P., Karasev, G. S. ve I., T. T., 1997, Molybdenum-induced increase in frost tolerance of winter wheat grown on acidic soil, *Russian Journal of Plant Physiology* (44), 204–209.

Vassilev, A., Lidon, F., Scotti, P., Da Graca, M. ve Yordanov, I., 2004, Cadmium-ınduced changes in chloroplast lipids and photosystem activities in barley plants, *Biologia Plantarum* (1).

Veselov, D., Kudoyarova, G., Symonyan, M. ve Veselov, S., 2003, Effect of cadmium on ion uptake, transpiration and cytokinin content in wheat seedlings, *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 353-359.

Vranová, E., Inzé, D. ve Van Breusegem, F., 2002, Signal transduction during oxidative stress, *Journal of Experimental Botany*, 53 (372), 1227.

Wagner, G. J., 1993, Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health, *Adv Agron*, 51, 173-212.

Wakamatsu, K. ve Takahama, U., 1993, Changes in peroxidase activity and in peroxidase isozymes in carrot callus, *Physiologia Plantarum*, 88 (1), 167-171.

Wang, H., Feng, T., Peng, X., Yan, M. ve Tang, X., 2009, Up-regulation of chloroplastic antioxidant capacity is involved in alleviation of nickel toxicity of *Zea mays* L. by exogenous salicylic acid, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72 (5), 1354-1362.

Wang, J. ve Chen, C., 2006, Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review, *Biotechnology Advances*, 24 (5), 427-451.

Wang, Y., Wisniewski, M., Meilan, R., Cui, M., Webb, R. ve Fuchigami, L., 2005, Overexpression of cytosolic ascorbate peroxidase in tomato confers tolerance to chilling and salt stress, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130 (2), 167-173.

Wang, Y. H., Wei, W. X., Tan, Q. L., Du, Y. Q. ve L., X. S., 1995, Research of molybdenum fertilizer on winter wheat in yellow brown soil of Hubei province, *Chinese Soil Fertilizer* (8), 24-27.

Watanabe, M. ve Suzuki, T., 2002, Involvement of reactive oxygen stress in cadmium-induced cellular damage in *Euglena gracilis*, *Comparative Biochemistry and Physiology, Toxicology & Pharmacology: CBP*, 131 (4), 491-500.

Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D. ve Van Camp, W., 1997, Catalase is a sink for $H_2O_2$ and is indispensable for stress defence in C3 plants, *The EMBO Journal*, 16 (16), 4806-4816.

Williams, R. J. P. ve Fraústo da Silva, J. J. R., 2002, The involvement of molybdenum in life, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292 (2), 293-299.

Wójcik, M., Tukiendorf, A. ve Vangronsveld, J., 2005, Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens*: I. Growth parameters, metal accumulation and phytochelatin synthesis in response to cadmium, *Environmental and Experimental Botany*, 53 (2), 151-161.

Wojtaszek, P., 1997, Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection, *Biochemical Journal*, 322 (3), 681-692.

Wojtyla, Ł., Lechowska, K., Garnczarska, S. K. ve MałGorzata, 2016, Different modes of hydrogen peroxide action during seed germination, *Frontiers in Plant Science*.

Wu, S., Hu, C., Tan, Q., Nie, Z. ve Sun, X., 2014, Effects of molybdenum on water utilization, antioxidative defense system and osmotic-adjustment ability in winter wheat (*Triticum aestivum*) under drought stress, *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 365-374.

Wu, S., Hu, C., Tan, Q., Xu, S. ve Sun, X., 2017, Nitric oxide mediates molybdenum-induced antioxidant defense in wheat under drought stress, *Frontiers in Plant Science*, 8.

Yağmur, B., Hakerlerler, H. ve Kılınç, R., 2003, Gübreler ve insan sağlığı, *Çiftçi Dergisi* (2).

Yaneva, I., Vunkova-Radeva, R., Mäck, G. ve Tischner, R., 1996, Changes in nitrate reductase activity and the protective effect of molybdenum during cold stress in winter wheat grown on acid soil, *Journal of Plant Physiology*, 149 (1-2), 211-216.

Yaneva, I. A., Vunkova-Radeva, R. V., Petkov, G. O., Stefanov, K. L., Tsenov, A. S. ve Petrova, T. P., 1995, Changes in lipid composition of winter wheat leaves under low temperature stress: effect of molybdenum supply, *Biologia Plantarum*, 37 (4), 561-566.

Yaneva, I. A., Baydanova, V. D. ve Vunkova-Radeva, R. V., 2000, Nitrate reductase activation state in leaves of molybdenum-deficient winter wheat, *Journal of Plant Physiology* (5), 495.

Yang, J. ve Chen, X. Y., 2000, Effects of boron and molybdenum nutrition on curd yield and active oxygen metabolism in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Acta Horticulture Sinica* (27), 112-116.

Yıldız, N., 2001, Toprak kirletici bazı ağır metallerin (Zn, Cu, Cd, Pb, Co ve Ni) belirlenmesinde kullanılan yöntemler, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 32 (2), 207-213.

Yıldız, N., 2003, Toprak kirletici ağır metaller ve toprak bitki ilişkileri, I. *Ulusal Çevre Sempozyumu. Atatürk Üniversitesi Çevre Sorunları Araştırma Merkezi Müdürlüğü Erzurum*.

Yıldız, N., 2004, Toprak ve bitki ekosistemindeki ağır metaller, *ZT-531. Yüksek Lisans Ders Notları. Erzurum*.

Yoshida, S., Tamaoki, M., Shikano, T., Nakajima, N., Ogawa, D., Ioki, M., Aono, M., Kubo, A., Kamada, H. ve Saji, Y. I. K., 2006, Cytosolic dehydroascorbate reductase is important for ozone tolerance in *Arabidopsis thaliana, Plant and Cell Physiology*, 304–308.

Yu, M., Hu, C. X. ve Wang, Y. H., 2002, Molybdenum efficiency in winter wheat cultivars as related to molybdenum uptake and distribution, *Plant and Soil*, 245 (2), 287-293.

Yukio, M., 2002, Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle protrusion, *Journal of Experimental Botany*, 53 (374), 1643.

Zengin, K. ve Munzuroğlu, Ö., 2005, Fasulye fidelerinin (*Phaseolus vulgaris* L. Strike) klorofil ve karotenoid miktarı üzerine bazı ağır metallerin ($Ni^{+2}$, $Co^{+2}$, $Cr^{+3}$, $Zn^{+2}$) etkileri, *FÜ Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 17 (1), 164-172.

Zhang, F., Shi, W., Jin, Z. ve Shen, Z., 2003, Response of antioxidative enzymes in cucumber chloroplasts to cadmium toxicity, *Journal of Plant Nutrition*, 26 (9), 1779.

Zhang, M., Chengxiao, H., Xiaohu, Z., Qiling, T., Xuecheng, S., Anyong, C., Min, C. ve Zhang, Y., 2012, Molybdenum improves antioxidant and osmotic-adjustment ability against salt stress in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *Pekinensis*), *Plant and Soil*, 355 (1/2), 375.

Zhao, J. ve Bai, Q. Y., 2001, Alleviation of nitrate accumulation in vegetables by application of molybdenum *Agro-Environmental Protection* (20), 238–239.

Zhou, B., Yao, W., Wang, S., Wang, X. ve Jiang, T., 2014, The metallothionein gene, TaMT3, from *Tamarix androssowii* confers $Cd^{2+}$ tolerance in tobacco, *International Journal of Molecular Sciences*, 15 (6), 10398-10409.

# ÖZGEÇMİŞ

## KİŞİSEL BİLGİLER


| | | |
|---|---|---|
| **Adı Soyadı** | **:** | Büşra Zengin |
| **Uyruğu** | **:** | T.C. |
| **Doğum Yeri ve Tarihi** | **:** | Konya, 21.09.1992 |
| **Telefon** | **:** | 0537 939 14 64 |
| **Faks** | **:** | |
| **e-mail** | **:** | busrazngn42@gmail.com |


## EĞİTİM

| **Derece** | **Adı, İlçe, İl** | **Bitirme Yılı** |
|---|---|---|
| Lise : | Ted Konya Koleji | 2011 |
| Üniversite : | S.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma, Konya | 2015 |
| Yüksek Lisans : | S.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji ABD, Konya | 2019 |
| Doktora : | | |

## İŞ DENEYİMLERİ

| **Yıl** | **Kurum** | **Görevi** |
|---|---|---|

## UZMANLIK ALANI

## YABANCI DİLLER

**İngilizce**

## BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

## YAYINLAR