

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AŞIRI BAKIR KOŞULLARINDAKİ MISIR ÇEŞİTLERİNDE HİDROJEN  
PEROKSİT ÖN MUAMELESİNİN FOTOSENTETİK AYGIT VE ANTIOKSİDAN  
SİSTEM ÜZERİNE ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Nihan BİŞKİN**

**KASIM 2012  
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AŞIRI BAKIR KOŞULLARINDAKİ MISIR ÇEŞİTLERİNDE HİDROJEN  
PEROKSİT ÖN MUAMELESİNİN FOTOSENTETİK AYGIT VE ANTİOKSİDAN  
SİSTEM ÜZERİNE ETKİSİ**

**Biyolog Nihan BİŞKİN**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde  
“YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)”  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 17.10.2012  
Tezin Savunma Tarihi : 12.11.2012**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Rabiye TERZİ**

**Trabzon 2012**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Biyoloji Anabilim Dalında**

**Nihan BİŞKİN tarafından hazırlanan**

**AŞIRI BAKIR KOŞULLARINDAKİ MISIR ÇEŞİTLERİNDE HİDROJEN  
PEROKSİT ÖN MUAMELESİNİN FOTOSENTETİK AYGIT VE ANTİOKSİDAN  
SİSTEM ÜZERİNE ETKİSİ**

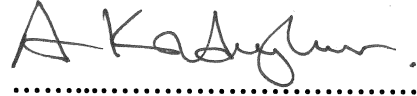
**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 23/10/2012 gün ve 1479 sayılı kararıyla  
oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**olarak kabul edilmiştir.**

**Jüri Üyeleri**

**Başkan : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU**



**Üye : Doç. Dr. Rabiye TERZİ**



**Üye : Yrd. Doç. Dr. Aykut SAĞLAM**



**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

“Aşırı Bakır Koşullarındaki Mısır Çeşitlerinde Hidrojen Peroksit Ön Muamelesinin Fotosentetik Aygıt ve Antioksidan Sistem Üzerine Etkisi” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi gerekse çalışmanın planlanması ve değerlendirilmesinde her türlü yardımını gördüğüm sayın hocam Doç. Dr. Rabiye TERZİ’ye teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmayı yapabilmem için her türlü laboratuvar imkanlarını kullanmamı sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Asım KADIOĞLU’na, çalışmalarım sırasında metot öğrenmemde yardımcı olan sayın Yrd. Doç. Dr. Aykut SAĞLAM’a, her konuda bana yardımcı olan değerli bölüm arkadaşlarıma ve sonsuz hoşgörülerinden dolayı benden destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen kıymetli aileme teşekkür ederim.

Nihan BİŞKİN  
Trabzon 2012

## **TEZ BEYANNAMESİ**

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Aşırı Bakır Koşullarındaki Mısır Çeşitlerinde Hidrojen Peroksit Ön Muamelesinin Fotosentetik Aygıt ve Antioksidan Sistem Üzerine Etkisi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. Rabiye TERZİ'nin sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 17/10/2012

Nihan BİŞKİN

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET .....	VII
SUMMARY .....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. Stres ve Stres Çeşitleri .....	2
1.3. Ağır Metaller ve Metal Stresi .....	4
1.3.1. Bakır ve Bakır Stresi.....	5
1.3.1.1. Yaprak ve Köklerde Bakır Birikimi .....	6
1.3.2. Ağır Metallerin Oksidatif Etkileri .....	6
1.4. Reaktif Oksijen Türleri .....	7
1.4.1. Süperoksit Radikali ( $O_2^{\cdot -}$ ) .....	7
1.4.2. Hidroksil Radikali ( $\cdot OH$ ).....	8
1.4.3. Hidrojen Peroksit ( $H_2O_2$ ) .....	8
1.5. Lipid Peroksidasyonu .....	9
1.6. Antioksidan Sistem.....	9
1.6.1. Antioksidan Enzimler .....	10
1.6.1.1. Askorbat Peroksidaz (APX) .....	10
1.6.1.2. Katalaz (CAT) .....	11
1.6.1.3. Glutasyon Redüktaz (GR).....	11
1.6.1.4. Guaiakol Peroksidaz (GPX) .....	12
1.6.1.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) .....	13
1.7. Stres Sinyali ve Hidrojen Peroksit ( $H_2O_2$ ) .....	13
1.8. Stres ve Fotosentetik Pigmentler .....	15
1.9. Stres ve Klorofil Flüoresans Parametreleri.....	15
1.10. Mısır ( <i>Zea mays</i> L.) ve Genel Özellikleri.....	16

2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	17
2.1.	Materyalin Sağlanması ve Deneş Bitkilerinin Seçimi .....	17
2.2.	Bitkilerin Büyütülmesi ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve Bakır (CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O) Uygulanması .....	18
2.3.	Fotosentetik Parametreler .....	18
2.3.1.	Yaprak Pigment İçeriği Tayini .....	18
2.3.2.	Klorofil Flüoresans Ölçümleri.....	19
2.4.	Antioksidan Sistemle İlgili Analizler .....	20
2.4.1.	Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) İçeriğinin Belirlenmesi .....	20
2.4.2.	Lipid Peroksidasyonu Tayini.....	20
2.4.3.	Enzimler İçin Ekstrakt Hazırlanması ve Aktivite Tayini .....	20
2.4.3.1.	Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi Tayini .....	21
2.4.3.2.	Katalaz (CAT) Aktivitesinin Tayini .....	21
2.4.3.3.	Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesinin Tayini.....	21
2.4.3.4.	Guaiakol Peroksidaz (GPX) Aktivitesi Tayini .....	22
2.4.3.5.	Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini .....	22
2.4.3.6.	Bitki Protein İçeriğinin Belirlenmesi.....	22
2.5.	İstatistiksel Analizler .....	23
3.	BULGULAR.....	24
3.1.	Mısır Çeşitlerinin Bakır Stresine Hassaslık/Dayanıklılık Seviyesinin Belirlenmesi.....	24
3.2.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Ön Muamelesinin Antioksidan Sistem Üzerine Etkisi.....	26
3.2.1.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> İçeriği.....	26
3.2.2.	Lipid Peroksidasyonu .....	27
3.2.3.1.	Askorbat Peroksidaz (APX) Enzimi.....	29
3.2.3.2.	Katalaz (CAT) Enzimi.....	30
3.2.3.3.	Guaiakol Peroksidaz (GPX) Enzimi .....	31
3.2.3.5.	Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzimi.....	33
3.3.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Ön Muamelesinin Fotosentetik Parametreler Üzerine Etkisi.....	34
3.3.1.	Klorofil İçeriği Üzerine Etkisi .....	34
3.3.2.	Klorofil Flüoresans Değerleri Üzerine Etkisi .....	35
4.	TARTIŞMA.....	37
5.	SONUÇLAR.....	42
6.	ÖNERİLER.....	43
7.	KAYNAKLAR .....	44
	ÖZGEÇMİŞ	

Yüksek Lisans

ÖZET

Aşırı Bakır Koşullarındaki Mısır Çeşitlerinde Hidrojen Peroksit Ön Muamelesinin  
Fotosentetik Aygıt ve Antioksidan Sistem Üzerine Etkisi

Nihan BİŞKİN

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Doç. Dr. Rabiye TERZİ  
2012, 56 Sayfa

Dışarıdan uygulanan düşük konsantrasyonda  $H_2O_2$ 'nin mısır (*Zea mays* L.) bitkilerinin bakır toleransı üzerine etkisi araştırıldı. Bu amaçla bakır stresine hassas (Akpınar) ve toleranslı (Pegaso) olarak seçilen iki farklı mısır (*Zea mays* L.) çeşidi düşük konsantrasyonda hidrojen peroksit ön muamelesine tabii tutuldu, daha sonra bakır stresi koşullarında fotosentetik aygıt ve antioksidan sistemlerinde meydana gelen değişimler incelendi. Antioksidan enzim aktiviteleri (askorbat peroksidaz, katalaz, guaiakol peroksidaz, glutatyon redüktaz, süperoksit dismutaz), malondialdehid (MDA) içeriği ve içsel  $H_2O_2$  miktarı spektrofotometrik olarak, fotosentetik aygıttaki değişimler ise florometrik olarak belirlendi.

Yapılan incelemeler sonucunda, bakır stresinin bitki büyümesini inhibe ettiği, MDA içeriğini, iç  $H_2O_2$  miktarını ve antioksidan enzim aktivitelerini artırdığı, klorofil flüoresans parametrelerini ise olumsuz etkilediği bulundu. Dışardan  $H_2O_2$  ön muamelesinin bitkilerin MDA içeriğini, iç  $H_2O_2$  miktarını azalttığı, antioksidan enzim aktivitelerini artırdığı ve klorofil flüoresans parametrelerini iyileştirdiği bulundu.

Elde edilen verilere göre, bakır stresi koşullarındaki mısır çeşitlerinde,  $H_2O_2$  ön muamelesinin antioksidan sistemi aktive ederek fotosentetik aygıtı koruyabileceği ve stresin olumsuz etkisini azaltabileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan enzim, Bakır stresi,  $H_2O_2$ , Klorofil flüoresansı, Lipid peroksidasyonu, Mısır (*Zea mays* L.).



Master Thesis

SUMMARY

Pre-Treatment Of Hydrogen Peroxide on Photosynthetic Machinery And Antioxidant System in Maize Cultivars Exposed to Excess Copper

Nihan BİŞKİN

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Biology Graduate Program  
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Rabiye TERZI  
2012, 56 Pages,

In this investigation, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pre-treatment were investigated on copper tolerance in maize (*Zea mays* L.) leaves.

For this purpose, antioxidant enzyme activities (ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase, glutathion reductase, superoxide dismutase), malondialdehyde (MDA) content, endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels were determined spectrophotometrically, the changes happened in the photosynthetic apparatus were analyzed fluorometrically; in two maize (*Zea mays* L.) cultivars Akpınar (sensitive) and Pegaso (tolerant).

After all observations, it has been found that the copper stress has reduced the growth of the plants, increased levels of MDA, endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content, and antioxidant enzymes activities while it damaged to the chlorophyll fluorescence parameters. It has been reported that pre-treatment of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has reduced the endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content, and levels of MDA, increased antioxidant enzymes activities and ameliorated chlorophyll fluorescence parameters.

As a consequence of these results, we can say that pre-treatment of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> may decrease the negative effects of the copper stress by activation of antioxidant system enzymes, and defense the photosynthetic apparatuses in maize plants.

**Key Words:** Antioxidant enzymes, Copper stress, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Chlorophyll fluorescence, Lipid peroxidation, Maize (*Zea mays* L.).

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Şekil 1. Başlıca çevresel stres tipleri.....	3
Şekil 2. Bakır stresine maruz bırakılan 4 farklı mısır çeşidinin toplam klorofil içeriğindeki değişimler .....	26
Şekil 3. Bakır stresi altındaki mısır çeşitlerinde H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ön muamelesinin endojen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> içeriği üzerine etkisi .....	27
Şekil 4. Bakır stresi altındaki mısır çeşitlerinde H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ön muamelesinin lipid peroksidasyonu üzerine etkisi .....	28
Şekil 5. Bakır stresi altındaki mısır çeşitlerinde H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ön muamelesinin askorbat peroksidaz aktivitesi üzerine etkisi .....	29
Şekil 6. Bakır stresi altındaki mısır çeşitlerinde H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ön muamelesinin katalaz aktivitesi üzerine etkisi .....	30
Şekil 7. Bakır stresi altındaki mısır çeşitlerinde H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ön muamelesinin guaiakol peroksidaz aktivitesi üzerine etkisi .....	31
Şekil 8. Bakır stresi altındaki mısır çeşitlerinde H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ön muamelesinin glutatyon redüktaz aktivitesi üzerine etkisi .....	32
Şekil 9. Bakır stresi altındaki mısır çeşitlerinde H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ön muamelesinin süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine etkisi .....	33
Şekil 10. Bakır stresi altındaki mısır bitkilerinde H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ön muamelesinin toplam klorofil içeriği üzerine etkisi.....	34

## TABLÖLAR DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1. Bakır stresine maruz bırakılan mısır çeşitlerinin büyüme parametrelerindeki değişimler .....	25
Tablo 2. Bakır stresi altındaki Akpınar bitkilerinde H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ön muamelesinin klorofil flüoresans parametreleri üzerine etkisi .....	35
Tablo 3. Bakır stresi altındaki Pegaso bitkilerinde H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ön muamelesinin klorofil flüoresans parametreleri üzerine etkisi .....	36

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APX	: Askorbat Peroksidaz
CAT	: Katalaz
ETR	: Elektron Taşınım Oranı
Fv/Fm	: PSII Maksimum Kuantum Verimi
GPX	: Guaiakol Peroksidaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: Glutasyon
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen Peroksit
LAR	: Yaprak Alanı Oranı
LWR	: Yaprak Kısmi Ağırlığı
MDA	: Malondialdehit
NAR	: Net Asimilasyon Oranı
NPQ	: Fotokimyasal Olmayan Sönme
OH <sup>·</sup>	: Hidroksil Radikali
O <sub>2</sub> <sup>·</sup>	: Süperoksit Radikali
POD	: Peroksidaz
PSII	: Fotosistem II
qp	: Fotokimyasal Sönme
RGR	: Nispi Büyüme Oranı
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SLA	: Özgül Yaprak Alanı
ΦPSII	: PSII Verimliliği

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Ağır metaller, önemli çevresel kirleticiler olup; çoğu doğada çok düşük yoğunlukta bile toksik etkiye sahiptirler. Ağır metallerin çevrede yaygın bir şekilde birikmesi, tüm canlılar için boyutları giderek artan bir tehlike oluşturmaktadır. Çevre kirletici unsurlar bütün canlılarda olduğu gibi bitkilerde de strese neden olmaktadır. Stres ise bitkilerin fizyolojilerini etkileyip, onların genetik potansiyellerini değiştirir, verimliliklerini kısıtlar ve bazen de ölümlerine yol açarak büyük oranlarda ürün kayıpları oluşturur (Kırbağ Zengin ve Munzuroğlu, 2003).

Bitki dokularında ağır metal birikimi; mineral besin alınımı (Ouzounidou vd., 1992), transpirasyon (Poschenrieder vd., 1989), fotosentez (Lidon vd., 1993), nükleik asit yapısı (Doncheva vd., 1996), klorofil sentezi (Somashekaraiyah vd., 1992), çimlenme (Munzuroğlu ve Geçkil, 2002), membran hasarı (Kennedy ve Gonsalves, 2002), enzim aktivitesi (Nussbaum vd., 1998) ve hormon dengesi bozukluklarına neden olur. Diğer taraftan, mısır, buğday ve arpa gibi tahıllar, büyüme peryotlarında metal stresine maruz kalabilirler. Ağır metaller gövde ve yaprak gibi bitkilerin toprak üstü kısımlarında tutulur ve saman veya kuru ot olarak kullanılabilen gibi toprağa tekrar geri de dönüştürülebilir. Bitki dokularında biriken bu ağır metaller tarım ve insan sağlığı için önemli bir sorun oluşturur (Tanyolaç vd., 2007).

Diğer taraftan, mısır tarımının fazlaca yapıldığı Karadeniz Bölgesi'nde birçok bakır madeni bulunmakta ve ülkemiz bakır üretiminde dünyada önemli bir yer almaktadır. Maden Tetkik ve Arama Bölge Müdürlüğü'nün çalışmaları sonucu ortaya çıkarılan işletilmiş veya işletilmekte olan maden yatakları Artvin-Murgul, Çayeli-Madenköy, Sürmene-Kutlular, Espiye-Killik, Espiye-Lahanos, Tirebolu-Hartköy, Trabzon-Yomra-Kayabaşı olarak sıralanmaktadır (URL-1, 2011). Bu madenlerinin işletilmesi bölgedeki tarım alanlarına ağır metal bulaşmasına neden olmaktadır. Ayrıca, motorlu taşıtların egzoz gazları, tarımda gübreleme ve ilaçlama, ağır metal içeren sulama suyunun kullanılması gibi pek çok etken bitkilerde ağır metal stresi oluşturmaktadır (Tanyolaç vd., 2007).

Yukarıda ifade edildiği gibi Karadeniz Bölgesi'nde bolca yetiştirilen mısır, Türkiye'de ekili alanların yaklaşık 600.000 hektar alanını kapsamaktadır. Bu durum mısır

bitkilerine ayrı bir önem kazandırmakta, mısır bitkisinde mevcut stres çalışmalarına hız verilmesini sağlamaktadır. Bugün mısır bitkilerinde yüksek dozlarda bakırın toksik etkilerinin anlaşılabilmesi, antioksidan ve fotokimyasal tepkilerin kıyaslanabilmesi için birçok çalışma yürütülmektedir. Diğer taraftan, son yıllarda bitkilerde biyotik ve abiyotik stresin sebep olduğu olumsuzlukları gidermek amacıyla dıştan bazı sinyal bileşiklerin bitkilere uygulanmasına yönelik çalışmalar giderek artmaktadır. Örneğin ekzogenik  $H_2O_2$ 'nin bitkilerde kuraklık (Gong vd., 2001), donma (De Azevedo Neto vd., 2005), tuz (Prasad et al., 1994), aşırı ışık (Karpinski vd., 1999; Gechev vd., 2002), patojen saldırıları (Levine vd., 1994; Alvarez vd., 1998) ve oksidatif stres (Morita vd., 1999) koşullarında bazı hücrel korunma ve sakınma mekanizmalarını devreye soktuğu bulunmuştur. Ayrıca, dışarıdan düşük konsantrasyonlarda uygulanan  $H_2O_2$ 'in bitkilerde glutatyon (GSH) birikimini (Murphy vd., 2002), antioksidan enzim aktivitelerini (De Azevedo Neto vd., 2005) reaktif oksijen türlerinin (ROS) hasarlarını en aza indirerek (Murphy vd., 2002; Wahida vd., 2007) bitkilerde strese karşı koruma sağladığı rapor edilmiştir. Alüminyum stresine maruz kalmış buğday bitkileri üzerine yapılan bir çalışmada  $H_2O_2$  ön muamelesinin antioksidan enzim aktivitesini uyararak bitkileri strese karşı koruduğu bildirilmiştir (Xu vd., 2011). Bakır stresine maruz bırakılan mısır bitkileri üzerine yapılan bir başka çalışmada ise  $H_2O_2$  ön muamelesinin osmotik ayarlama sağlayan bileşiklerin seviyesini artırarak stresin olumsuz etkisini azalttığı rapor edilmiştir (Guzel, 2011). Bununla beraber, literatürde bakır stresine maruz kalan mısır bitkilerinde  $H_2O_2$  ön uygulamasının stres etkilerini hafifletmede antioksidan sistemin rolü üzerine bir çalışma bulunmamaktadır.

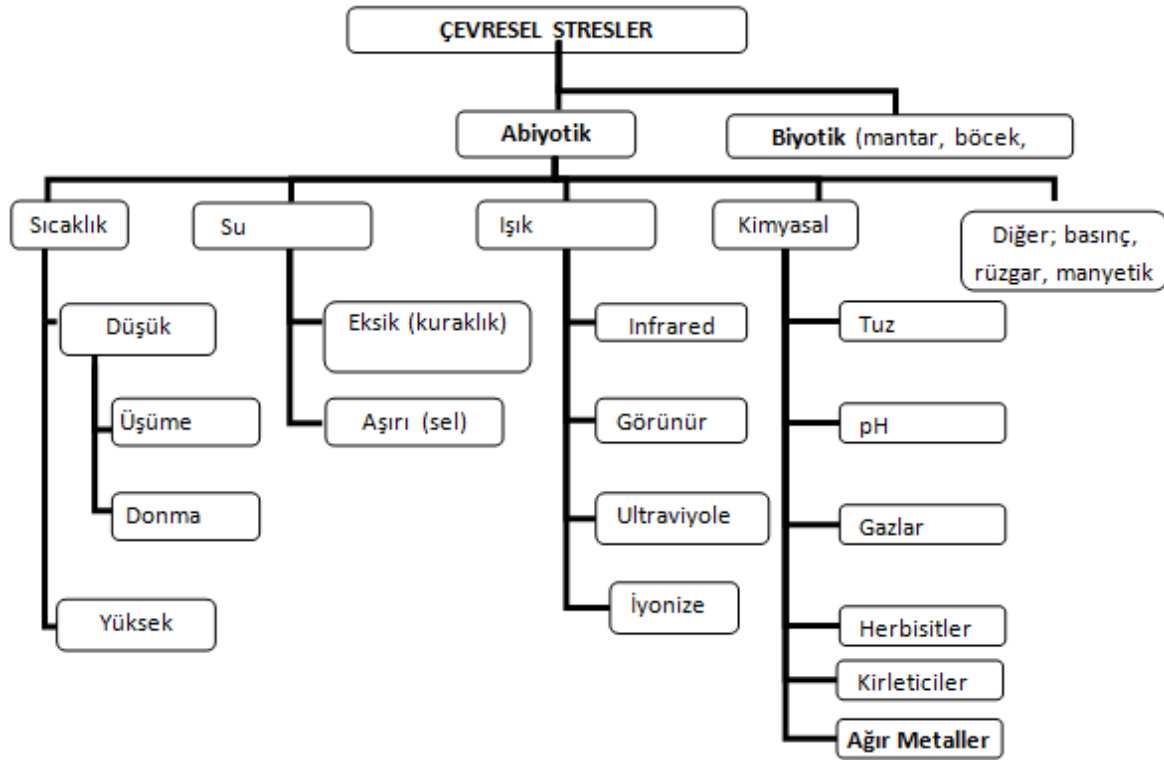
Bu çalışmada, bakır stresine maruz bırakılan strese hassas/dayanıklı mısır (*Zea mays* L.) fidelerine düşük konsantrasyonda  $H_2O_2$  ön uygulamasının antioksidan enzim (askorbat peroksidaz (APX), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), guaiakol peroksidaz (GPX), glutatyon redüktaz (GR)) aktiviteleri, klorofil flüoresan parametreleri ve klorofil içeriği üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 1.2. Stres ve Stres Çeşitleri

Stres, çeşitli çevresel (biyotik veya abiyotik) faktörlerin bir canlıda belirgin değişimler meydana getirmesi ve aynı zamanda hasar meydana getirme potansiyelini

kapsayan bir durumdur. Bir metabolizma bozukluğunun sonucunda oluşan bu hasarlar bitkinin büyümesinde ve veriminde azalma meydana getirirler (Hale ve Orcutt,1987).

Bazı bilim adamlarına göre, çevresel stres tiplerinin etkileri birbiriyle ilişkilidir. Örneğin, yüksek sıcaklığa dayanıklılık, onunla birlikte meydana gelen kuraklık şartlarına dayanıklılığa bağlıdır. Diğer taraftan donmaya dayanıklılık, dokunun dehidrasyona dayanıklılığı ile önemli derecede bağlantılıdır (Hale ve Orcutt, 1987). Bir bitkinin bazı kısımları (tohumlar, tohumcuk, dormant hücreler) strese dayanıklı iken, diğer kısımları (meristemler, sukkulent organlar, fideler) duyarlı olabilir. Ayrıca bitkiler yaşamak zorunda oldukları çevreye kısmen veya tamamen uyabilme özelliğine sahiptirler (Bidwell, 1974). Bu durum, bitkilerin ortamdaki mevcut streslere dayanıklılık veya hassaslık özelliklerine bağlıdır.



Şekil 1. Başlıca çevresel stres tipleri

Strese dayanıklılık, sakinme ve tolerans olmak üzere ikiye ayrılır (Lewitt, 1972). Sakınma, bitkiye dıştan uygulanan olumsuz bir faktörün etkisini stres oluşturmadan önleme yeteneğidir (Street ve Öpik, 1984). Çoğu bitkilerde çeşitli ağır metal stresine karşı sakinme mekanizmaları gelişmiştir. Örneğin, ağır metal stresi altındaki bazı bitkilerde

fotosentezin inhibisyonu ile biyomass büyümesinin indirgenmesi ve böylece oksidatif hasarların en az zararlar atlatılması sağlanmış olur (Kupper vd., 1996) ya da kserofit bitkilerde su kaybını azaltan yaprak kıvrılması, yüzey tüyleri, alt durumlu stoma ve benzer mekanizmalar bulunur. Benzer şekilde kaktüs bitkisi su stresi esnasında hücre içindeki su miktarını koruyarak kuraklıktan sakınabilir (Bidwell, 1974).

Eğer bir bitki stres sonucu oluşan hasarları azaltabilme veya hiç oluşturmama özelliğinde ise bu durum tolerans olarak adlandırılır. Diğer bir deyişle tolerans dıştan uygulanan bir strese canlının dayanabilme yeteneğidir (Street ve Öpik, 1984). Örneğin, ağır metal stresine tolerans, metallerin plazma membrandan içeri alınması kısıtlanarak ya da sitosole sızmasını engellemek için pompalanarak gerçekleştirilir (Hall, 2002). Toleranslı türler veya ekotipler artan stresin etkilerini en aza indirmek için sakınma ya da homeostazik mekanizmalar kullanırlar (Dietz vd., 1999). Bu tolerans ve koruma mekanizmaları; çeşitli metabolik reaksiyonlar boyunca, süperoksit, hidroksil radikalleri ve peroksidaz gibi serbest radikalleri temizlemek için ortaya çıkarlar. Peroksidaz (POD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon reduktaz (GR), süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan enzimler, glutatyon (GSH), askorbat, karotenoid gibi antioksidan bileşikler (Zhang ve Kirkham, 1996), bu radikallerin ve peroksidlerin hücresel seviyede kontrolünde kilit bir role sahiptir. Yine aynı şekilde kuraklık toleransına sahip bitkiler protoplazma su kaybettiği zaman, protoplazmaları yeniden su alana kadar hayatsal faaliyetlerine devam edebilirler (Hopkins, 1995).

Stres altındaki bitkiler üzerinde çalışma yapılmasının iki önemli nedeni vardır. Birincisi bitkilerin strese karşı reaksiyon mekanizmasının öğrenilmesidir. İkincisi ise tarımsal alanlarda stres altında bulunan bitkilerin söz konusu streslere dayanma yeteneklerinin ölçülmesi ve dolayısıyla daha verimli ürün elde edilmesidir. Bilindiği gibi dünya topraklarının % 10'undan daha azı tarıma elverişlidir. Bu nedenle aşırı olumsuz şartlardan kaynaklanan streslere dayanabilen ya da bu stresleri tolere edebilen bitkiler yetiştirmeye ihtiyaç vardır. Daha dayanıklı ve tolerant bitkiler yetiştirmek için strese dayanıklılık ve tolerans mekanizmalarının bilinmesi gerekmektedir (Bidwell, 1974).

### **1.3. Ağır Metaller ve Metal Stresi**

Ağır metaller, önemli çevresel kirleticiler olup aynı zamanda çoğu doğada çok düşük yoğunlukta bile toksik etkiye sahiptir. Bunların başında bakır, demir, mangan, molibden,



çinko, kobalt, nikel, kadmiyum, krom, civa ve kurşun gibi ağır metaller gelir. Bu ağır metaller çeşitli yollardan tarımsal ekosisteme girerler ve bitki bünyesinde çözünürlüklerine bağlı olarak çeşitli konsantrasyonlarda birikirler (Bergmann, 1992).

Dünya üzerindeki kullanılabilir alanlar stres faktörlerine göre sınıflandırıldığında doğal bir stres faktörü olan kuraklık stresi %26'luk, %20 ile ağır metal-mineral stresi, %15 ile soğuk ve don stresi, bunların dışında kalan tüm stresler %29'luk bir pay alırken, yalnızca %10'luk bir alan herhangi bir stres faktörüne maruz kalmamaktadır (Blum, 1986). Bu durumda ağır metal stresi büyümeyi ve verimi etkileyen en yaygın çevresel streslerden biri olup bitkilerde birçok fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler cevabı oluşturmaktadır. Buna bağlı olarak bitkiler, sınırlı çevresel koşullara adapte olmayı sağlayacak bazı tolerans mekanizmaları geliştirirler (Arora ve Mohan, 2002).

### 1.3.1. Bakır ve Bakır Stresi

Atmosfer koşullarında metalik gri tonunda bulunmayan iki metalden biri olan bakır, M.Ö. 5000 yılından beri tanınmaktadır ve adını ilk bulunduğu yer olan Kıbrıs'ın latinesinden (aes cyprium = Kıbrıs cevheri, cyprium ve daha sonra cuprum) almıştır. İlk kez Mısırlılar tarafından işlenen bakır, M.Ö. 3000 yılından itibaren (Bronz Çağı) Anadolu, Yunanistan ve Hindistan'da mekanik özellikleri alaşımlandırma yolu ile artırılarak kullanılmıştır. Dünya bakır rezervlerinin % 68'i Şili, ABD, Sovyetler Birliği, Zambiya, Peru, Zaire ve Kanada, % 32'si ise diğer ülkeler olmak üzere toplamda yaklaşık  $650 \times 10^6$  ton olduğu tahmin edilmektedir. Yıllık üretim miktarı, 14 milyon ton (2001 yılı) civarındadır (URL-2,3,4,5,6, 2011; Mertz, 1987; Geneva, 1996; Habashi, 1997). Bakır;  $\text{Cu}^0$ ,  $\text{Cu}^{+1}$  ve  $\text{Cu}^{+2}$  değerlikli üç oksidasyon durumu ile bir geçiş metalidir. Ayrıca  $5 \text{ g/cm}^3$  den daha ağır bir yoğunluğa sahip olmasından dolayı ağır metal olarak sınıflandırılmıştır (Forstner ve Wittmann, 1979).

Bakır, çeşitli kaya ve minerallerde bol bulunan ve bitkilerde büyüme ve gelişmede rol oynayan esas mikrobesein elementlerinden biridir (Tanyolaç vd., 2007). Birçok mikrobesein gibi bakır, bitkiler tarafından düşük miktarda ihtiyaç duyulan bir elementtir (Bowen, 1985). Oksijen taşıyıcıları (hemosiyenin) ya da redoks katalizörleri (sitokrom oksidaz, nitrat redüktaz) gibi fonksiyonları olan, bilinen en az 30 tane bakır içeren enzim vardır (Weser, 1979). Redoks reaksiyonlarında kullanılan bir geçiş metali olan (Ouzounidou., vd., 1994; Monni vd., 2000) bakır, hücreseel seviyede protein yönlendirme

aygıtı, oksidatif fostorilasyon, demir taşınımı ve transkripsiyonda önemli bir sinyal molekül olarak görev yaparken (Yruela, 2005), yüksek konsantrasyonda bitki büyümesini inhibe edebilir (Monni vd., 2000). Yüksek Cu konsantrasyonları proteinlerin fonksiyonunu ve enzim aktivitesini değiştirerek önemli derecede toksik etkilere yol açabilir (Marschner, 1995). Bu toksisite, Cu'nun proteinlerde metallerin sülfidril gruplarına bağlanıp, aktivitelerin azalması ya da protein yapılarının bozulmasıyla sonuçlanabilir (Meharg, 1994).

Fotosentezin bakır ile inhibisyonu sonucu, biyomass büyümesinin indirgenmesi ve klorofillerin kloroplasttaki fotosentetik membranlara bağlanmasını engellenmiş olur. Ayrıca bakır; klorofil merkezindeki Mg'nin yerine geçerek, klorofilin hem yapısına ve fonksiyonuna zarar verir (Kupper vd., 1996). Artan bakır, bitkilerde pigmentlerin ve membran lipitlerinin peroksidatif bozunması ve pigment içeriğinin indirgenmesinden dolayı yapraklarda klorozise neden olur (Maksymiec, 1997; Shainberg vd., 2001; Pätsikkä vd., 2002; Liu vd., 2004).

### **1.3.1.1. Yaprak ve Köklerde Bakır Birikimi**

Yüksek yapılı bitkilerde metal birikimi, bitkilerin metal tolerans kapasitelerine direkt katkıda bulunacak çeşitli hücrel değişikliklerle birlikte eşlik eder (Rama Devi ve Prasad, 1998; Hau, 2002). Düşük bakır konsantrasyonunda yapraklarda metal birikiminin hem hassas hem de toleranslı çeşitlerde aynı olduğu ancak hassas çeşitlerde toleranslıya göre daha güçlü bir bakır tutma ve yapraklara taşıma kabiliyetinin olduğu saptanmıştır (Tanyolaç vd., 2007). Benzer şekilde, Ouzaunidou vd. (1994), hassas bitkilerin, sürgün yapılarında toleranslı bitkilerden daha yüksek konsantrasyonda bakır topladıklarını kaydetmiştir. Bu sonuç bakırın hassas olan çeşitlerde köklerden sürgün yapılarına taşınımının toleranslı çeşitlere göre daha fazla olduğunu desteklemiştir.

### **1.3.2. Ağır Metallerin Oksidatif Etkileri**

Bitkilerde oksidatif etki, serbest radikallerin özellikle de reaktif oksijen türlerinin oluşumunu içerir. Serbest radikaller eşleşmemiş elektron içeren moleküller olup oldukça reaktiftirler. Her türden kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonlar her zaman atomların dış orbitallerindeki elektronlar sayesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron

varlığı serbest radikallerin reaktivitesini arttırdığı için, serbest radikaller kimyasal aktifliği yüksek moleküllerdir (Mc Kersie ve Lehsem, 1994). Bununla birlikte, toprakta ağır metal varlığı ve çevredeki diğer mevcut stres koşulları sonucu doğrudan veya dolaylı olarak bitkide fotosentez elektron akseptörü NADP<sup>+</sup> kısıtlı hale gelir ve ferrodoksin NADP yerine oksijeni indirger ve PSI elektronlarının oksijene transferi sonucunda reaktif süperoksit radikali (O<sub>2</sub><sup>·</sup>) üretilir (Mehler reaksiyonu) (Tambussi vd., 2000).

Süperoksit molekülleri tek başına fazla reaktif olmayıp H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve OH<sup>·</sup> radikallerini oluşturmak suretiyle etkili olur (Hallwell ve Gutteridge, 1989). Süperoksit ve hidrojen peroksidin hidroksil radikalini oluşturmak üzere tepkimesi sırasında (Haber-Weiss reaksiyonu), artan demir ya da bakır gibi diğer geçiş metalleri, bu reaksiyonları hızlandırarak oksidatif hasarı daha da arttırabilir (Fenton reaksiyonu) (Smirnoff, 1993). Serbest radikaller hem indirgen hem de yükseltgen olarak bazen de bu iki etkiyi birlikte göstererek hücre hasarına neden olurlar. Birçok türde ağır metal stresi altında artan süperoksit üretim hızı lipid peroksidasyonuna, yağ asidi doymunluğuna, sonuç olarak membranların tümüyle zarar görmesine neden olur (Sgherri vd., 1996).

## **1.4. Reaktif Oksijen Türleri**

### **1.4.1. Süperoksit Radikali (O<sub>2</sub><sup>·</sup>)**

Süperoksit radikali (O<sub>2</sub><sup>·</sup>), oksijene bir elektron aktarılması ile oluşur. Bu reaksiyon enzimatik olarak çeşitli organellerde meydana gelebilir. Moleküler oksijenin, oksidatif fosforilasyon sırasında NADPH-oksidaz veya ksantin oksidaz gibi enzimlerin katalizörlüğünde süperoksit radikali meydana gelir. Süperoksit radikalinin yarılanma ömrü hücrelerin farklı yerlerinde bulunan süperoksit dizmutaz enziminin varlığına bağlıdır. Ayrıca indirgeyici moleküler oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksit radikali oluşur. Hidrokinonlar, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler gibi yüzlerce molekül aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit oluşumuna neden olurlar (Stahl ve Sies, 2002).

Çeşitli dehidrogenazlar, oksidazlar olmak üzere yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında ürün olarak süperoksit radikali oluşabilir. Plazma membranlarında da süperoksit üreten NAD(P)H oksidaz enziminin varlığı belirlenmiştir (Vionella ve Macri, 1991). Bunun dışında süperoksit enzimatik olmayan reaksiyonlarla örneğin kloroplast, mitokondri

ve plazma membranlarındaki elektron transport sisteminin yeterince düşük redoks potansiyeline sahip bileşenleri ve ferrodoksin tarafından da üretilebilir. Ayrıca kloroplastlarda PSI ve PSII tarafından süperoksitin üretildiği kaydedilmiştir (Elstner ve Osswald, 1994).

#### **1.4.2. Hidroksil Radikali ( $\cdot\text{OH}$ )**

Hidroksil radikali, en aktif ve en toksik oksijen radikali olarak bilinir ve üretildiği her yerde birçok molekül ile tepkimeye girebilir. Bütün bu tepkimeler  $\cdot\text{OH}$ 'ın paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır (Halliwell, 1984). Hidroksil radikali, iyonlaştırıcı radyasyonun (X-ışınları) etkisiyle su moleküllerinin homolitik kırılması sonucunda oluştuğu gibi hidrojen peroksit molekülünün metaller ile reaksiyonu sonucunda eksik indirgenmesi ile de oluşabilir (Stahl ve Sies, 2002).

Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur.  $\cdot\text{OH}$ 'ın başlıca hedefi yağ asitleri olup zar lipidlerinin peroksidasyonu sonucunda zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilir (Nishiyama vd., 1998).

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

Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik veya enzimatik olmayan dismutasyon tepkimeleri sonucu oluşur. Süperoksitin oluştuğu yerlerde önemli miktarda  $\text{H}_2\text{O}_2$  de üretilir. Fotosentetik elektron transport zinciri  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin üretiminden sorumludur.  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin üretildiği başka bir kaynak fotorespirasyonla glikolatın oksidasyonunun meydana geldiği peroksizomlardır. Ayrıca biyokimyasal olarak da oksijenin iki elektronlu indirgenmesinin gerçekleştiği solunum işlemleri sırasında ve genellikle flavoproteinlerle gerçekleştirilen reaksiyonlarla da oluşturulur. Diğer taraftan plazma membranı ekstrasellular matriks de  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin üretildiği diğer önemli kaynaklardır (S'lesak vd, 2007).

Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımayan  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni demir ve bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalının öncülü olarak davranmasıdır.  $\text{H}_2\text{O}_2$  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 ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücredeki önemli antioksidan olan katalaz ve peroksidaz yerine getirir (Halliwell, 1984).

### **1.5. Lipid Peroksidasyonu**

Stres etkisiyle oluşan serbest radikaller bitkilerde lipid peroksidasyonunu başlatabilir (Thompson vd., 1987). Lipid peroksidasyonu oksidatif stres sonucunda oluşan malondialdehit (MDA) içeriğine bakılarak belirlenir (Irigoyen vd., 1992) ve yaprak senesensi esnasında önemli bir değişim olarak düşünülür (Dhindsa vd., 1981/82; Thompson vd., 1987). Stres altında lipidlerin oksidasyonunun önemli derecede artış gösterdiği bilinmektedir. (Tanyolaç vd., 2007; Pourakbar vd., 2007; Bouazizi vd., 2007a/b; Kumar vd., 2007). Birçok türde ağır metal stresi altında artan süperoksit üretim hızı lipid peroksidasyonuna, yağ asidi doymunluğuna, sonuç olarak membranların tümüyle zarar görmesine neden olur (Sgherri vd., 1996). Lipid peroksidasyonu oksidatif stres sırasında süperoksit moleküllerinin tek başına fazla reaktif olmayıp,  $H_2O_2$  ve hidroksil radikallerini oluşturması suretiyle etkili olur (Hallwell ve Gutteridge, 1989). Lipid peroksidasyonunun düşük seviyede olması özellikle SOD ve POD gibi bazı antioksidan enzimlerin aktivitesinin yüksek seviyede tutulmasının bir sonucu olabilir (Fu ve Huang, 2001). Literatürde, ağır metal stresine maruz bırakılmış bitkilerde lipid peroksidasyonunun arttığı kaydedilmiştir (Bouazizi vd., 2007a/b; Pourakbar vd., 2007). Buna rağmen son yıllarda metal stresi koşullarında  $H_2O_2$  ön muamelesinin lipid peroksidasyonunu azalttığı bildirilmiştir (Xu vd., 2011).

### **1.6. Antioksidan Sistem**

Antioksidan terimi, zararlı bir forma dönüşmeksizin Reaktif Oksijen Türleri (ROS)'ni temizleyebilen bileşikler için kullanılmaktadır. Bitki dokuları, stres koşullarında hücreleri ROS etkisinden korumak için, bazı enzimler (süperoksit dizmutaz, katalaz, glutatyon, redüktaz, peroksidazlar) ve düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar (glutatyon, askorbat, karotenoidler, tokoferoller vb.) ihtiva ederler. Antioksidan enzimler koordineli

bir şekilde ROS'ları temizlerler veya onları daha az toksik olan bileşiklere dönüştürürler. Bitkiler apoplastik boşluk dâhil bütün hücre alt yapılarında antioksidan sisteme sahiptirler. Kuraklık stresine maruz kalan bitkiler antioksidan savunma sistemlerinin bazılarını ya da tamamının aktivasyonu ile oksidatif stresin üstesinden gelebilirler (Srivalli vd., 2003; Ramachandra vd., 2004; Pinheiro vd. 2004).

### **1.6.1. Antioksidan Enzimler**

Antioksidant enzimler ve bazı metabolitler çeşitli hububat bitkilerinde stres toleransı ile ilişkilidir (Liebler vd., 1986; Elstner, 1987). Son yıllarda, metal stresi altında bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerinin arttığı rapor edilmiştir (Hu vd., 2009; Xu vd. 2011). Başlıca antioksidan enzimler süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz ve glutatyon redüktazdır. Bitkinin su durumuna bağlı olarak, strese karşı koruma, bu enzimlerin aktivitelerinin artışıyla yerine getirilir. Yukarıda da değinildiği gibi antioksidan enzim ve bileşiklerin artması, temizleme kapasitesinin yükselmesi ve bitkilerin strese toleransının artmasıyla ilişkilidir (Bowler vd., 1992).

#### **1.6.1.1. Askorbat Peroksidaz (APX)**

Hidrojen peroksidi parçalarken substrat olarak askorbatı kullanan enzimler askorbat peroksidazlar (APX, EC,1.11.1.11) olarak adlandırılırlar. APX'un bitki hücrelerinin sitoplazma ve kloroplastlarındaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin temizlenmesinde etkili oldukları düşünülmektedir (Dalton vd., 1987; Asada,1992). Bu enzimin kloroplastlarda tilakoid membrana bağlı ve stromada bulunan formları vardır (Chen ve Asada, 1989; Miyake ve Asada, 1992). Bu formlar elektron verici olarak askorbat için spesifik olup, askorbatın yokluğunda aşırı derecede kararsızdırlar (Miyake ve Asada, 1996). Sitoplazmada bulunan askorbat peroksidazlar, kloroplasttakine benzer ancak askorbat yokluğunda daha fazla kararlı olup askorbattan başka elektron vericilerini de kullanabilirler. Son yıllarda yapılan çalışmalar askorbat peroksidazın ağır metal stresi koşullarında etkilendiğini göstermiştir (Tanyolaç vd., 2007; Kumar vd. 2008).

### 1.6.1.2. Katalaz (CAT)

Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6), tabiatta çok yaygın dağılım göstermektedir. Bu enzim, aerobik mikroorganizmaların hepsinde, omurgalılarda, bitkilerde ve mantarlarda bulunmaktadır (Bergmeyer ve Grable, 1983). Katalaz yüksek konsantrasyonlardaki  $H_2O_2$ 'nin iki elektronunu kullanarak su ve oksjene indirgenmesini katalizleyen tetramerik demir porfirin içeren yüksek molekül ağırlığa sahip enzimdir. Aynı zamanda katalaz, düşük  $H_2O_2$  konsantrasyonlarında alkoller, askorbat ve fenol içeren indirgenmiş substratları kullanarak peroksidatif aktivite gösterilebilir. Katalazın görev aldığı genel bir reaksiyon aşağıda gösterilmiştir.

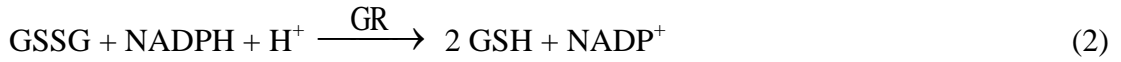


Katalaz kararlı bir enzim değildir. Yüksek ışık yoğunluğu ve stresli bitki hücrelerinde oluşan  $H_2O_2$ 'nin yüksek konsantrasyonlarıyla inhibe edilebilir (Feierabend vd., 1992; Streb vd., 1993). Siyanid, azid, süperoksit ve indirgenmiş glutatyon tarafından da katalaz aktivitesinin inhibe edildiği rapor edilmiştir (Fridovich, 1986). Ayrıca  $H_2O_2$ 'ye olan zayıf ilgisi bu enzimin etkinliğini kısıtlamaktadır (Foyer vd., 1997). Katalazın büyük bir kısmı, peroksizomlarda çok az miktarda da mitokondri matriksinde bulunur.

Son yıllarda yapılan çalışmalar bazı bitki türlerinin apoplastik alanlarında da katalaz aktivitesinin olduğunu göstermiştir (Edwards vd., 1990; Vanacker vd., 1998). Katalazın bitki dokusunda  $H_2O_2$ 'nin uzaklaştırılmasında önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Tanyolaç vd., 2007; Kumar vd., 2007; Bouazizi vd., 2007a/b; Pourakbar vd., 2007). Katalazın temel fonksiyonu, moleküler oksijen mevcudiyetinde  $H_2O_2$ 'nin ve ROOH gibi bir peroksitin radikalliğini gidererek, özellikle membranalarda oluşturabilecekleri geri dönüşümsüz hasarları engellemektir.

### 1.6.1.3. Glutatyon Redüktaz (GR)

Glutatyon redüktaz (GR, EC 1.6.4.2) elektron verici olarak NADPH'ı kullanan oksitlenmiş glutatyonun (GSSG), indirgenmesini (GSH) katalizleyen bir enzimdir (Seruton vd., 1990; Creissen vd., 1994).



GR'nin hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunduğu belirlenmiş olup (Creissen vd., 1994) ilk defa eritrositlerde ve mayalarda tespit edilmiştir (Meldrum ve Tarr, 1935). GR hem Gimnospermler hem de Angiospermlerin dahil olduğu bir çok bitkide çalışılmıştır (Creissen vd., 1994). GSH'nin antioksidan özelliğinden dolayı , glutatyon redüktaz hücrenin antioksidan kapasitenin devamlılığı için önemlidir (Meister, 1983; Creissen vd., 1994). GR, bitkilerin kuraklık, yüksek oksijen basıncı ve hava kirleticileri tarafından üretilen oksidatif stresin olumsuz etkilerinin düzeltilmesine ve strese karşı direnç sağlanmasına katkıda bulunur (Sairam, vd., 1997; Tanyolaç vd., 2007; Pourakbar vd., 2007). GR diğer enzimlerle birlikte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin temizlenmesinde de görev alır.

Hayvanlarda substrat olarak GSH'ı kullanan glutatyon peroksidazla birlikte GR, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in temizlenmesine katılır (Schirmer vd., 1989). Glutatyon peroksidaz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi temizlerken substrat olarak GSH'ı kullanır ve reaksiyon sonucu GSSG oluşur. Oluşan GSSG, GR enzimiyle tekrardan GSH'a indirgenir ve böylece glutatyon peroksidaz enziminin substratı yeniden oluşur. GR'nin benzer fonksiyonu bitkilerde mevcuttur. Oksitlenmiş askorbik asiti (dehidroaskorbat) tekrardan askorbik asite indirgeyen dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) enzimi de GSH'yi kullanmakta ve reaksiyon sonucu GSSG oluşmaktadır. Ayrıca GR enzimi GSSG'yi GSH'a indirgerken, NADPH'ı kullanmakta ve böylece CO<sub>2</sub> fiksasyonu azaldığı zamanlarda, NADPH/NADP<sup>+</sup> oranının ayarlanmasına yardımcı olmaktadır. Bu nedenle GR tarafından GSSG'nin GSH'a indirgenmesi, oksidan temizlenmesinde bir adım olarak kabul edilmektedir (Creissen vd., 1996).

#### **1.6.1.4. Guaiakol Peroksidaz (GPX)**

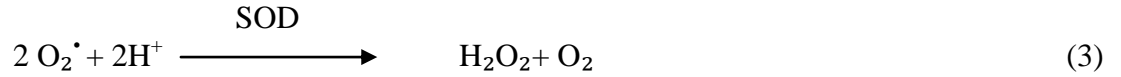
Guaiakol peroksidaz (GPOD, EC 1.11.1.7) bitkilerin yaygın olarak bulunan ve hem grubu ihtiva eden oksidaz grubu enzimlerdir. Guaiakol peroksidazlar guaiakole olan yüksek spesifikliklerine rağmen başka birçok substratı elektron vericisi olarak kullanabilirler. Hücre çeperine bağlı olan peroksidazlar çözünebilir, iyonik bağlı ve kovalent bağlı formlarda mevcuttur. Peroksidazların birçok fizyolojik olayla ilişkili olduğu ve metabolizmada aktif bir rol oynadığı belirlenmiştir. Bitki hücrelerindeki çeperin uzama kabiliyeti, lignin biyosentezi ve oksin katabolizmasıyla ilişkili olmasının yanı sıra en



önemli fonksiyonu  $H_2O_2$ 'nin parçalanmasını katalizleyerek antioksidan sistemine katkı sağlamalarıdır (Eltner,1987).

### 1.6.1.5. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) süperoksit serbest radikalinin hidrojen peroksit ve oksijene dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir (Fridovich, 1986; Eltner,1987). SOD, ilk kez Mann ve Keilis (1938) tarafından izole edilmiş ve başlangıçta bir bakır depo proteini olduğu düşünülmüştür. Bu enzimin katalitik fonksiyonu keşfedilene kadar eritrokuprein, indofenol oksidaz ve tetrazolium oksidaz gibi isimlerle adlandırılmıştır. Canlı organizmalar SOD ile süperoksiti uzaklaştırır ve Haber-Weiss reaksiyonu ile hidroksil radikalinin oluşum riskini azaltır. SOD, süperoksit anyonlarını uzaklaştırmasına rağmen toksik bir oksijen türevini ( $O_2^{\cdot-}$ ) diğerine ( $H_2O_2$ ) dönüştürülür. Bu reaksiyon sonucu oluşan  $H_2O_2$ , fotosentezin güçlü bir inhibitörüdür ve kloroplast fonksiyonu için risk oluşturur. Bu toksik ürün peroksidazlar tarafından temizlenebilir (Mehlhorn, 1996).



SOD bütün aerobik organizmalarda ve aktifleşmiş oksijen üreten bütün hücre alt yapılarında bulunduğu için oksidatif strese karşı savunmada merkezi bir rolünün olduğu düşünülmektedir (Tanyolaç vd., 2007; Kumar vd., 2007; Bolwer vd., 1992).

### 1.7. Stres Sinyali ve Hidrojen Peroksit ( $H_2O_2$ )

Fungisit, pestisit ve bitki büyüme düzenleyicileri gibi pek çok bileşik, çevresel streslerin bitkiler üzerindeki olumsuz etkilerini azaltmak için uzun yıllardır tarımda kullanılmaktadır. Son yıllarda ise insan ve hayvanlardaki sinyal bileşiklerin dışarıdan bitkilere uygulanması ile stresin etkilerini azaltmaya yönelik çalışmalar artmaktadır.

Günümüzde, bu bileşiklerin bitkilerdeki sinyal iletim yolları bile aydınlatılmıştır. Örneğin 1990'lı yılların sonlarında insan ve hayvanlarda sinyal bileşik olarak rol oynadığı bilinen nitrik oksit (NO)'in bitkiler üzerine etkisi ancak 2000'li yıllarda çalışılmıştır.

Günümüzde ise NO'nun sinyal iletiminde salisilik asit, jasmonik asit ve ROS üretimi ile ilişkisi araştırılmış ve sinyal iletim yollarının hayvanlardakine çok benzediği ortaya konmuştur (Farooq vd., 2009). Bu yüzden bitkilere NO'in dışarıdan uygulanmasıyla antioksidan sistemin uyarılması sağlanmış böylece olumsuz çevresel koşullarına karşı direnç sağlanmaya çalışılmıştır. Bütün bu çalışmalarla beraber, ROS olarak bilinen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, genellikle toksik hücrel bir metabolit olarak düşünülürken; şuan ki mevcut veriler H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin hem bitki hem de hayvan hücrelerinde NO gibi sinyal bir molekül olarak iş gördüğünü göstermektedir. (Neill vd., 2002b; S'lesak vd., 2007; Quan vd., 2008). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin çeşitli biyotik ve abiyotik streslerde yanıt olarak artışı bazı bilim adamlarının bitkilerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin iki önemli rolü olduğu fikrini uyandırmıştır. Bunlardan biri; düşük konsantrasyonlarda adaptasyon, uyum, çeşitli abiyotik streslere karşı tolerans yanıtında sinyal molekül olarak çalışırken diğeri de; yüksek konsantrasyonlarda programlanmış hücre ölümlerini hücelere uygun olarak uyarlamaktır (Prasad vd.,1994; Van Breusegem vd., 2001; Neill vd., 2002a; Vandenabeele vd.,2003). Bu yüzden özel bazı dokularda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikimi ve uygun miktarda bulunuşu; hem biyotik hem de abiyotik streslerde bu bitkilere uyum ve anti-tolerans çalışmalarında yarar sağlamaktadır (Bowler ve Fluhr, 2000). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin katalaz (CAT) (Prasad vd., 1994; Polidoros ve Scandalios, 1999), askorbat peroksidaz (Van Breusegem vd., 2001), guaiakol peroksidaz ve glutatyon redüktaz (Janda vd., 1999) enzimlerinin gen ekspresyonunun indüksiyonunda sinyal bir molekül olarak rol aldığı ispatlanmıştır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, homeostazi değişiklikleri, sıcak şok proteinlerinin sentezine ve mitojenle aktifleştirilmiş kinaz şelalesinin aktifleştirilmesine neden olur (Kovtun vd., 2000; Van Breusegem vd., 2001). Dahası, Desikan vd., (2001) cDNA mikroarray teknolojilerini kullanarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından düzenlenen 175 tane tanımlı tag sekansı ekspres etmişlerdir. Bezelyeye dışarıdan uygulanan düşük konsantrasyonda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin paraquat toksisitesini ve antioksidan sistem değişikliklerini düzenleyerek paraquat hasarlarını en aza indirdiği gösterilmiştir (Moskova vd., 2007).

Dışarıdan uygulanan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin bitkilerde çok çeşitli stres koşullarında bazı hücrel korunma ve sakınma mekanizmalarını devreye soktuğu belirlenmiştir (Van Camp vd., 1998; Gong vd., 2001; Zhang vd., 2001; De Azevedo Neto vd., 2005). Yine, dışarıdan uygulanan düşük konsantrasyonlardaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin bitkilerde kök biyoması ve uzunluklarının artışı teşvik ettiği ileri sürülmüştür (Narimanov ve Korystov, 1997). Çeltikte ise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasının kök hücrelerinde absisik asitin (ABA) neden olduğu büyüme inhibisyonunu ortadan kaldırdığı kaydedilmiştir (Lin ve Kao, 2001). Hidrojen

peroksit'in ayrıca çamlarda (Barnett, 1976; James ve Genz, 1981) bitki dış yüzeyinin mikroplardan arındırılması ve marul tohumlarında patojen istilalarına karşı korumada kullanılabildiği rapor edilmiştir (Pernezny vd., 2001). Kökleri inhibe ederek toprakta çeşitli bakteri ve fungus istilalarını engelleyip yapraklarda çeşitli hastalıkları önlediği bildirilmiştir (Edwards ve Sutherland, 1979; James ve Genz, 1981; Pervezny vd 2001). Brüksel lahanalarında ise  $H_2O_2$ 'nin büyümeyi ve çimlenmeyi teşvik ettiği görülmüştür. (Narimanov ve Korystov, 1997).

### **1.8. Stres ve Fotosentetik Pigmentler**

Fotosentetik pigmentler fotosentez olayındaki rollerine ilave olarak ışık tarafından uyarılan aşırı reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyerek fotodinamik hasarlara karşı bir koruma sağlarlar (Herbinger vd., 2002). Bu pigmentlerden en önemlisi karotenoidler de singlet oksijenin temizlenmesinde görev alırlar. Bu nedenle bir genotipteki karotenoid seviyesi aynı zamanda o genotipin strese toleransını da belirler (Sairam vd., 1997/98). Ağır stresine toleranslı genotipler, yüksek karotenoid içeriğinin yanı sıra aynı zamanda yüksek klorofil içeriğine de sahiptirler (Pastori ve Trippi, 1992). Örneğin, tolerant buğday ve mısır genotiplerinde stres şartları altında klorofil azalmakla beraber toleranslı olan genotiplerde hassas olanlardan daha yüksek klorofil içeriği bulunur (Kraus vd., 1995; Chandrasekar vd., 2000; Lascano vd., 2001).

### **1.9. Stres ve Klorofil Flüoresans Parametreleri**

Yüksek bakır konsantrasyonları yüksek yapılı bitkilerde fotosentez için etkili bir inhibitördür. Bakırın bitkilerdeki fotosentetik birimlerde, fotosentezin öncül reaksiyonlarında ve elektron taşınımında toksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Ouzounidou vd., 1997). Artan Cu, etkisini ilk olarak fotosistem II (PSII)'nin reaksiyon merkezinde gösterir. PSII, bakır toksisitesinde PSI'den daha çok hassastır. (Yruela vd., 2005; Ouzounidou vd., 1997; Pätsikkä vd., 2002). Çünkü PSII' nin hem donör, hem akseptör bölgeleri bakır kısıtlayıcı bölgeler olarak düşünülmektedir (Bernal vd., 2004; Yruela, 2005). Artan bakır miktarları, oksijen yayan protein kompleksi PSII' nin donör ve akseptör bölgelerine, kinon B ( $Q\beta$ ) bağlanma bölgesine ve Pheo-Fe-QA'ya zarar vererek, PSII' nin ürün miktarının azalmasına sebep olur (Mohanty vd., 1998; Yruela vd., 2005;

Maksymiec vd., 1994). Tilokoid zarların yapısının değişiminin PSII'nin fotokimyasal aktivitelerinin azalmasına yol açtığı gösterilmiştir (Lidon vd., 1993). ФPSII, NPQ, qP, ETR flüoresans parametreleri değerlerinin artan bakır konsantrasyonları ile birlikte düştüğü kaydedilmiştir (Tanyolaç vd., 2007).

### 1.10. Mısır (*Zea mays* L.) ve Genel Özellikleri

Mısır, *Poaceae* (buğdaygiller) familyasına ait monokotiledon bir bitkidir. *Poaceae* familyası içerisinde çiçeklenme biçimi bakımından diğer türlerden farklıdır. Çiçekleri monoik yapıda olup, erkek (tepe püskülü) ve dişi çiçekler (koçan) aynı bitki üzerinde fakat farklı yerlerde bulunmaktadır. Geniş adaptasyon kabiliyeti nedeniyle dünyanın farklı bölgelerinde kültürü yapılabilen mısır,  $2n=20$  kromozumlu diploid bir bitkidir. Bitkinin sistematikteki yeri aşağıdaki sunulmuştur (Morris, 2002).

Alem	: Plantae
Bölüm	: Magnoliophyta
Sınıf	: Liliopsida
Ordo	: Cyperales
Familya	: Poaceae
Cins	: <i>Zea</i>
Species	: <i>Zea mays</i>

Mısır, diğer tahıllardan farklı olarak geniş bir kullanım alanına sahip ekonomik önemi olan bir bitkidir. İçerdiği zengin besin maddeleri ile mısır, hem insan hem de hayvan beslenmesinde kullanılır. Olgun bir mısır danesinin yapısında %70-75 nişasta, % 8-10 protein ve % 4-5 yağ bulunur (Earle vd., 1946). Mısır, nişasta protein ve yağ kaynağı olarak kullanılmasının dışında içeceklerde glukoz kaynağı, etanol ve biodizel yakıt üretimi, plastik yapımı gibi birçok alanda da kullanılmaktadır.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Materyalin Sağlanması ve Deney Bitkilerinin Seçimi

Bakır ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) stresine hassaslık/dayanıklılık seviyesi bilinmeyen 4 mısır (*Zea mays* L.) çeşidine ait tohumlar Advanta Tohumculuk'tan (Pegaso), ve Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden (Akpınar, Batem 72/55 ve Karaçay) temin edildi. Tohumlar saf su ile yıkanmış steril dere kumu içeren eşit büyüklükteki saksılara dikildi. Saksılara iki günde bir 15 gün boyunca 100 ml Hoagland besin çözeltisi (pH:6.0) verilerek fideler büyütüldü. Mısır çeşitlerinin bakır stresine karşı hassaslık/dayanıklılık seviyelerini belirlemek için, fideler Tanyolaç vd., (2007) referans alınarak, yüksek konsantrasyonda bakır içeren (1,5 mM  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) içeren Hoagland besin çözeltisi (pH:6.0) ile birlikte muamele edildi. Bitki çeşitleri aşağıda belirtilen bazı büyüme parametrelerine ve pigment içeriğine bakılarak hassas ve dayanıklı olarak gruplandırıldı.

Büyüme parametresi olarak net asimilasyon oranı (NAR), nispi büyüme oranı (RGR), özgül yaprak alanı (SLA), yaprak alanı oranı (LAR), yaprak kısmi ağırlığı (LWR) ölçümleri Hunt vd., (2002)'e göre ImageJ programı ile aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı. Büyüme parametreleri bakır uygulamasından sonraki 7., 10., ve 13. günlerde ölçüldü.

RGR= [SLA x ULR x LWF] formülüne göre belirlendi.

Bu formül açık şekilde yazıldığında:

$$\text{RGR} = \left[ \frac{1}{W} \cdot \frac{dW}{dt} \right] = \left[ \frac{1}{LA} \cdot \frac{dW}{dt} \right] \cdot \left[ \frac{LA}{LW} \right] \cdot \left[ \frac{LW}{W} \right],$$

Bu denkleme göre;

$$\text{RGR} = \left[ \frac{1}{W} \cdot \frac{dW}{dt} \right], \text{ULR} = \text{NAR} = \left[ \frac{1}{LA} \cdot \frac{dW}{dt} \right], \text{SLA} = \left[ \frac{LA}{LW} \right], \text{LWF} = \text{LWR} = \left[ \frac{LW}{W} \right]$$

ifadelerini vermektedir. Burada kullanılan ifadelerden;

W: Her bitki için toplam kuru ağırlığı,

LA: Her bitki için yaprak alanını,

LW: Her bitki için yaprak kuru ağırlığını

t: zamanı, ifade etmektedir.

## 2.2. Bitkilerin Büyütülmesi ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve Bakır (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) Uygulanması

Bakır (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) stresine hassas ve dayanıklı olarak gruplandırılan çeşitlerden birer adet (hassas; Akpınar, dayanıklı; Pegaso) seçilerek, tohumlar dere kumu içeren eşit büyüklükteki saksılara dikildi. Saksılara iki günde bir 15 gün boyunca, Hoagland besin çözeltisi (pH:6.0) verilerek; fidelerin bitki büyütme odasında (18-24 °C sıcaklık, % 60 ±5 nem ve 300 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> ışık yoğunluğu) büyümeleri sağlandı. Her iki mısır çeşidi için saksılar dört gruba ayrıldı ve daha sonra birinci gruptaki saksılara 25 günlük deney periyodu boyunca sadece Hoagland besin çözeltisi (pH 6.0 ) uygulandı. Bu grup bitkiler kontrol grubu olarak adlandırıldı. İkinci gruptaki saksılara ise 17. ve 19. günlerde olmak üzere iki kez, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren Hoagland besin çözeltisiyle birlikte ön uygulama yapıldı. Bu gruptaki bitkilere 21. ve 25. günler arasında ise 5 gün boyunca sadece Hoagland verildi ve bitkiler H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu olarak adlandırıldı. Üçüncü gruptaki saksılara, 21. güne kadar iki günde bir Hoagland verildikten sonra, 21. ve 25. günler arasında 5 gün boyunca 0.5 mM bakır uygulaması (bitkiler 0,5, 1,0 ve 1,5 mM bakır stresine maruz bırakılmış ve yaprak klorofil içeriği, MDA içeriği, endojen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı gibi parametrelerin ölçümü sonucunda en iyi cevaplar 0,5 mM elde edilmiştir) yapıldı ve bu bitkiler bakır stresi grubu olarak adlandırıldı. Dördüncü gruptaki saksılara ise 17. ve 19. günlerde 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ön uygulaması yapıldı. 21. ve 25. günler arasında ise saksılar, 5 gün boyunca 0.5 mM bakır stresine maruz bırakıldı. Bu grup bitkiler ise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+bakır grubu olarak adlandırıldı. Bitkilerde klorofil flüoresan parametreleri ve antioksidan sistemdeki değişimler ile ilgili aşağıdaki analizler yapıldı.

## 2.3. Fotosentetik Parametreler

### 2.3.1. Yaprak Pigment İçeriği Tayini

Bitki yapraklarından 0,1 g alınarak 3 ml % 80'lik aseton içerisinde homojenize edildi. 2 gün (48 saat) boyunca +4°C'de bekletilen homojenatlar 3000 rpm'de 5dk. boyunca santifrjü edildi. Elde edilen pigment ekstraktlarının 663, 645 ve 450 nm'lerdeki absorbansları spektrofotometrede okunup absorbans değerleri aşağıdaki formüllerde yerine konarak klorofil a, klorofil b, toplam klorofil içeriği Arnon (1949)'a göre bulundu. Daha

sonra klorofil a/b oranları hesaplandı. Pigment miktarı sonuçları mg g<sup>-1</sup> taze ağırlık olarak ifade edildi.

$$\text{Toplam Klorofil (mg/1): } 20,2 \times A_{645} + 8,02 \times A_{663}$$

### 2.3.2. Klorofil Flüoresans Ölçümleri

Klorofil floresans ölçümleri Floresans Monitör Sistemi (FMS) ile hesaplandı. Bu ölçüm oda sıcaklığında büyütme kabininde yapraklar seçilerek çalışıldı. Çalışmada 30 dk. karanlık adaptasyonundan (aktinik ışık 5,5 W bir halojen lamba, MLS990, Micron, Tokyo, Japan) sonra minimum klorofil floresans (F<sub>0</sub>) belirlendi. Bu belirleme λ660-uyarım ile 0,1-0,2 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> ışık kullanılarak gerçekleştirildi.

Bir doygunluk vuruşu (8.000 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) maksimum floresansı (F<sub>M</sub>) λ690 uyarımı ile (0,8 s) μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> ışık kullanılarak PSII birimleri belirlendi. PSII'nin karanlık adaptasyonlu φ(P0, Fv/F<sub>M</sub>) açık fidelerinde quantum etkinlik miktarı belirlenip ifade edildi. Klorofil flüoresan parametrelerinden fotokimyasal sönme (qp), fotokimyasal olmayan sönme (NPQ), PSII maksimum kuantum verimi (Fv/F<sub>M</sub>) ve PSII etkinliği (ΦPSII) Van Kooten ve Snel (1990)'e göre aşağıdaki formüller kullanılarak belirlendi,

$$qP = \left[ \frac{(F_{M'} - F_s)}{(F_{M'} - F'_0)} \right]$$

$$NPQ = \left[ \frac{(F_M - F_{M'})}{F_{M'}} \right] \text{ formülleri ile Bilger ve Björkman, (1990)'a göre belirlendi.}$$

$$\Phi = \left[ \frac{F_v}{F_M} \right] = \left[ \frac{(F_M - F_0)}{F_M} \right],$$

ΦPSII =  $\left[ \frac{(F_{M'} - F_s)}{F_{M'}} \right]$  değerleri flüorometre tarafından otomatik olarak Genty vd., (1989)'e göre hesaplandı.

$$\text{Elektron taşınım oranı (ETR) = } (\Phi_{PSII} \times PAR \times 0,5 \times 0,84),$$

Tüm parametreler OS1-FL'nin modul 4 sistemi ile ölçüldü.

## 2.4. Antioksidan Sistemle İlgili Analizler

### 2.4.1. Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) İçeriğinin Belirlenmesi

Ekstraksiyon için 0.25 g taze bitki yaprak dokusu alınıp sıvı azottan geçirilerek iyice ezilen numuneler 5 ml %5'lik TCA (triklorasetik asit) ile ekstrakte edildi. Bu ortama 0,1 g aktif kömür ilave edilip iyice karıştırıldıktan sonra mikrosantifrj tüplerine (ependorflara) konulup enzimatik reaksiyonları durdurmak için buzda bekletildi. Tüm numuneler ekstrakte edilince tüplere karşılıklı aynı ağırlıkta olmak üzere 15.000 rpm'de 5 dk. boyunca santifrj edildi. Santifrjden sonra tüplerin üst fazları alınıp tekrar yeni mikrosantifrj tüplerine konuldu. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tayini Velikova vd. (2000) metoduna göre çalışılıp; ölçüm 390 nm'de spektrofotometre ile yapıldı.

### 2.4.2. Lipid Peroksidasyonu Tayini

Lipid peroksidasyon seviyesi, lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan malondialdehit (MDA) içeriği Heath ve Packer (1968) metoduna göre ölçüldü. Kontrol ve ağır metal stresine maruz bırakılan bitkilerin yapraklarından 0,5 g alınarak 100 ml % 0,1 TCA içerisinde homojenize edildi. Homojenatlar 15.000xg de 5 dk. boyunca santifrj edildi. Süpernatantın 1 ml'sine 4 ml, %20 TCA içerisinde hazırlanmış %0,5 tiorbarbiturik asit (TBA) ilave edildi. Karışım 95 °C' de 30 dk. boyunca ısıtılıp ve sonra hızlı bir şekilde buz banyosunda soğutuldu. 10.000xg de 10 dk. boyunca santifrj edildikten sonra süpernatantların absorbansı 532 nm'de spektrofotometrede okutulup değerleri kaydedildi. Elde edilen sonuçlara göre MDA konsantrasyonu hesaplandı ve sonuçlar nmol g<sup>-1</sup> taze ağırlık olarak ifade edildi.

### 2.4.3. Enzimler İçin Ekstrakt Hazırlanması ve Aktivite Tayini

Enzim ekstraksiyonunun hazırlanması için taze yaprak numunelerinden 0,5 g tartılıp ve sıvı azot içerisinde toz haline getirildi. Daha sonra 5 ml ekstraksiyon tamponu (50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA pH 7,0; % 1 PVPP) içerisinde ekstrakte edildi. Ekstraktlar +4 °C'de



20.000xg'de 20 dk. boyunca santifrüj edildi. Elde edilen süpernatant enzim aktivitesi tayinleri için daha sonra kullanılmak üzere  $-18^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

#### **2.4.3.1. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi Tayini**

Askorbat peroksidaz aktivitesi, 290 nm'de absorbansdaki azalışa bağlı olarak Nakano ve Asada (1981) metodu ile belirlendi. Enzim aktivitesi, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0). 250  $\mu\text{M}$  askorbat, 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve 20  $\mu\text{l}$  enzim ekstraktı içeren 1 ml'lik reaksiyon karışımının spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle belirlendi. Askorbat peroksidaz aktivitesi, 290 nm'de askorbat için  $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı ve sonuçlar mg protein başına unite olarak ifade edildi.

#### **2.4.3.2. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Tayini**

Katalaz aktivitesi, Aebi (1983)'nin yönetimine göre belirlendi. Enzim aktivitesi, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0), 30 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve 20  $\mu\text{l}$  enzim ekstraktı içeren 1 ml'lik aktivitesi,  $\text{H}_2\text{O}_2$  için  $39.4 \text{ mM}^{-1}$  epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı ve sonuçlar mg protein başına unite olarak ifade edildi.

#### **2.4.3.3. Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesinin Tayini**

Glutasyon redüktaz aktivitesi spektrofotometrik olarak Foyer ve Halliwell (1976)'e göre belirlendi. Substrat olarak 0.25 mM NADPH ve 1 mM oksitlenmiş glutasyon (GSSG) kullanıldı. Yükseltgenmiş glutasyonun enzimler tarafından indirgenmesi için indirgeyici faktör olarak NADPH kullanıldı. Aktivite tayini için, 200  $\mu\text{l}$  0.5 mM EDTA içerisinde hazırlanmış 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 250  $\mu\text{l}$  GSSG ve 500  $\mu\text{l}$  NADPH ihtiva eden karışıma 50  $\mu\text{l}$  enzim ekstraktı ilave edildi. NADPH'ın oksidasyonu 340 nm'de 5 dk. boyunca azalmanın ölçülmesi ile belirlendi ve sonuçlar mg protein başına unite olarak ifade edildi.

#### 2.4.3.4. Guaiakol Peroksidaz (GPX) Aktivitesi Tayini

Guaiakol peroksidaz aktivitesi, Urbanek vd., (1991)'in yöntemine göre belirlendi. Enzim aktivitesi, 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0), 0.1 mM EDTA, 5 mM guaiakol, 15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 50 µl enzim ekstraktı içeren 2 ml'lik reaksiyon karışımının 470 nm' de 1 dk. boyunca ölçülmesiyle belirlendi. Guaiakol peroksidaz (GPX) aktivitesi 26,6 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı ve sonuçlar mg protein başına unite olarak ifade edildi.

#### 2.4.3.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini, Beauchamp ve Fredovich (1971) metodunun Dhinsa ve Matowe (1981) tarafından gerçekleştirilen yöntemi ile belirlendi. Bu metotta aktivite, indikatör molekül olarak kullanılan Nitro Blue Tetrazolium (NBT)'un süperoksit radikalleri ile mavi renkli formazon'a indirgenmesi reaksiyonun SOD enzimi tarafından engellenmesinin ölçülmesiyle tayin edildi. Bu reaksiyonun % 50' sinin inhibisyonuna uygun süpernatant hacmi 1 enzim ünitesi olarak kabul edildi. Aktivite tayini için 50 mM fosfat tamponu (pH 7,8), 0.1 mM EDTA, 13 mM metiyoinin, 75 µM NBT ve 2 µM riboflavin içeren karışıma 50 µl enzim ekstraktı ilave edildi. Son olarak riboflavin eklendi ve tüplerin flüoresans lamba altına yerleştirilmesiyle reaksiyon başlatıldı. 10 dk. sonra ışık kaynağının uzaklaştırılmasıyla reaksiyon sonlandırıldı ve oluşan reaksiyon ürünü 560 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu ve sonuçlar mg protein başına unite olarak ifade edildi.

#### 2.4.3.6. Bitki Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Bitki protein tayini için 0,5g yaprak numuneleri 100 mM soğuk fosfat tamponu (pH 7.5), 1mM EDTA ve %1 PVPP içine konularak homojenize edildi. Bu homojenat 4<sup>0</sup>C' de 14000 rpm(=18000 g, rotor 82 mm çaplı)'de 20 dk. boyunca santifrüj edilip oda sıcaklığında, karanlık bir ortama konuldu. Burada 30 dk. muhafaza edildikten sonra protein tayini için kullanılmak üzere standartlar belirlendi. Protein tayini Bradford, (1976)'a göre Bovine Serum Albumin standart olarak kullanılıp belirlendi.

## 2.5. İstatistiksel Analizler

Analizler üç tekerrürlü olarak bağımsız üç ayrı ekstraksiyon ile yapıldı. Elde edilen ortalamaların varyansı, % 5' lik önemde ( $p < 0.05$ ) Microsoft Windows sürüm 11,5 SPSS yazılımı kullanılarak Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak kontrol edildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Mısır Çeşitlerinin Bakır Stresine Hassaslık/Dayanıklılık Seviyesinin Belirlenmesi

Dört farklı mısır (*Zea mays* L.) çeşidinin (Akpınar, Pegaso, Karaçay ve Batem 72/55) bakır stresine hassaslık/dayanıklılık seviyesinin belirlenmesi için, bakır stresine maruz bırakılan bitki çeşitlerinin bazı büyüme parametrelerine (NAR, RGR, SLA, LAR, LWR) ve pigment içeriğine bakılarak, çeşitler hassas ve dayanıklı olarak gruplandırıldı. Büyüme parametreleri bakır uygulamasından sonraki 7., 10., ve 13. günlerde ölçüldü. En etkili sonuçlar 13. günde gözlemlendiğinden sadece 13. güne ait veriler sunuldu.

Büyüme parametresi olarak öncelikle net asimilasyon oranındaki (NAR) değişimler incelendi. Akpınar çeşidine ait kontrol bitkilerinde NAR değeri 195,9 iken bu değer Pegaso'da 167,6, Karaçay'da 279, Batem 72/55'de 230,4 olarak bulundu. Stres koşullarında ise NAR değeri Akpınar'da 119,8, Pegaso'da 152,5, Karaçay'da 218,2, Batem 72/55'de 220,9 olarak ölçüldü (Tablo 1). NAR'daki azalma oranının en fazla Akpınar'da (%38,8), en az ise Batem 72/55'de olduğu (%4,1) gözlemlendi ( $P < 0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Tablo 1).

Diğer bir büyüme parametresi olarak nispi büyüme oranındaki değişimler (RGR) hesaplandı. Akpınar çeşidine ait kontrol bitkilerinde RGR değeri 193,9 iken, bu değer Pegaso'da 189,9, Karaçay'da 151,8, Batem 72/55'de 146,4 olarak bulundu. Stres koşullarında ise bu değer, Akpınar'da 151,4, Pegaso'da 188,8, Karaçay'da 149,2, Batem 72/55'de 134,1 olarak ölçüldü (Tablo 1.). RGR'deki azalma oranı hesaplandığında ise azalmanın en fazla Akpınar'da (%21,9), en az Pegaso'da (%0,6) olduğu görüldü ( $P < 0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Tablo 1).

Yukarıda ifade edildiği gibi özgül yaprak alanındaki (SLA) değişimler de büyüme parametresi olarak ölçüldü. Akpınar çeşidine ait kontrol bitkilerinde SLA değeri 1.132,1 cm<sup>2</sup> iken bu değer Pegaso'da 931 cm<sup>2</sup>, Karaçay'da 501 cm<sup>2</sup>, Batem 72/55'de 464,3 cm<sup>2</sup> olarak bulundu. Stres bitkilerinde ise SLA, Akpınar'da 720,8 cm<sup>2</sup>, Pegaso'da 869,1 cm<sup>2</sup>, Karaçay'da 483,3 cm<sup>2</sup>, Batem 72/55'de 443,1 cm<sup>2</sup> olarak ölçüldü (Tablo 1.). SLA'daki azalma oranının en fazla Akpınar'da (%36,3), en az ise Karaçay'da (%3,5) olduğu gözlemlendi ( $P < 0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Tablo 1.).

Ayrıca mevcut çalışmada büyüme parametresi olarak yaprak alanı oranı (LAR) ve yaprak kısmi ağırlığı (LWR)'deki değişimler belirlendi. Yaprak alanı oranı, Akpınar çeşidine ait kontrol bitkilerinde 132,4 iken bu değer Pegaso'da 135, Karaçay'da 150,9, Batem 72/55'de 144,4 olarak bulundu. Stres bitkilerinde ise LAR değeri Akpınar'da 120,1, Pegaso'da 129,1, Karaçay'da 130,3, Batem 72/55'de 134,8 olarak ölçüldü (Tablo 1.). LAR'daki azalma oranının en fazla Karaçay'da (%13,7), en az ise Pegaso'da (%4,4) olduğu belirlendi ( $P < 0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Tablo 1.).

Mevcut çalışmada, yaprak kısmi ağırlığı (LWR), Akpınar çeşidine ait kontrol bitkilerinde 76 mg iken bu değer Pegaso'da 72,8 mg, Karaçay'da 111,4 mg, Batem 72/55'de 119 mg olarak bulundu. Stres bitkilerinde ise bu değer, Akpınar'da 56,3 mg Pegaso'da 67,1 mg, Karaçay'da 110 mg, Batem 72/55'de 114,2 mg olarak ölçüldü (Tablo 1.). LWR'deki azalma oranının en fazla Akpınar'da (%25,9), en az ise Karaçay'da (%1,3) olduğu görüldü ( $P < 0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Tablo 1.).

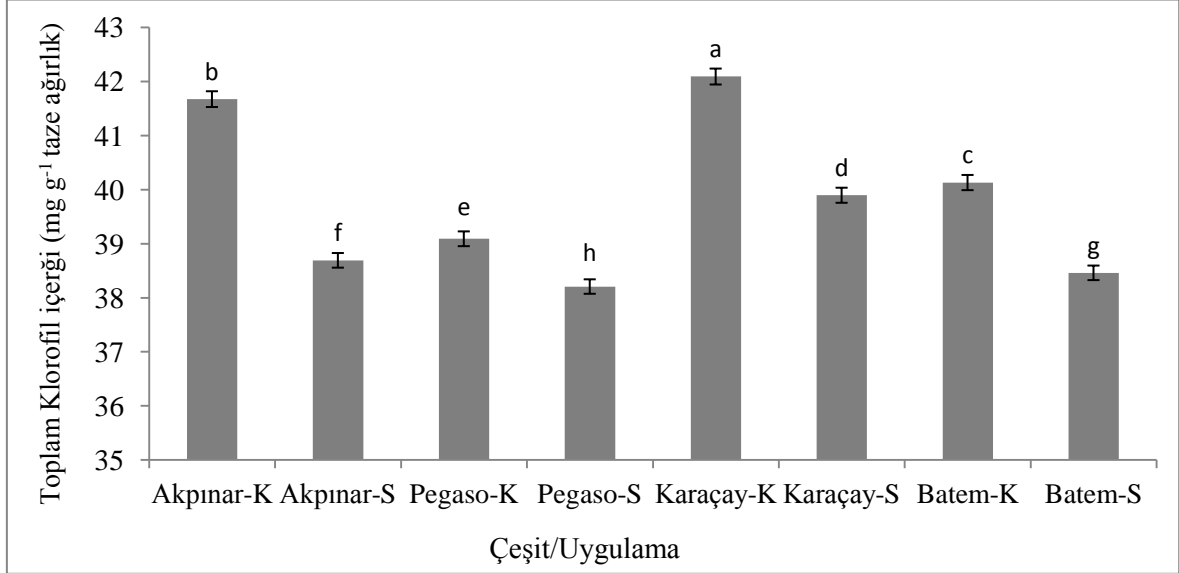
Tablo 1. Bakır stresine maruz bırakılan mısır çeşitlerinin büyüme parametrelerindeki değişimler

Çeşit/Uygulama	NAR	RGR	SLA/cm <sup>2</sup>	LAR	LWR/mg
Akpınar-Kontrol	195,9±0,025d	193,9±0,033a	1.132,1±0,056a	132,4±0,012d	76±0,065d
Akpınar-Stres	119,8±0,032g	151,4±0,019c	720,8±0,075d	120,1±0,023e	56,3±0,039f
Pegaso-Kontrol	167,6±0,029e	189,9±0,029b	931±0,023b	135±0,036c	72,8±0,042d
Pegaso-Stres	152,5±0,046f	188,8±0,040b	869,1±0,013c	129,1±0,040d	67,1±0,052e
Karaçay-Kontrol	279±0,020a	151,8±0,025c	501±0,009e	150,9±0,035a	111,4±0,023c
Karaçay-Stres	218,2±0,042c	149,2±0,011cd	483,3±0,064f	130,3±0,018d	110±0,044c
Batem 72/55-Kontrol	230,4±0,013b	146,4±0,034d	464,3±0,006g	144,4±0,024b	119±0,084a
Batem72/55-Stres	220,9±0,009c	134,1±0,049e	443,1±0,011h	134,8±0,030c	114,2±0,028b

\*\* ± Üç tekerrürlü ortalamının standart sapmasıdır ( $P < 0,05$  seviyesinde önemsizdir).

Mevcut çalışmada, mısır çeşitlerinin bakır stresine hassaslık/dayanıklılık seviyesinin belirlenmesi için ayrıca yaprak klorofil içeriğindeki değişimlere de bakıldı. Yaprak klorofil içerikleri, kontrol bitkilerinde, Akpınar'da 41,7 mg g<sup>-1</sup> taze ağırlık, Pegaso'da 39,1 mg g<sup>-1</sup> taze ağırlık, Karaçay'da 42,1 mg g<sup>-1</sup> taze ağırlık, Batem 72/55'de 40,1 mg g<sup>-1</sup> taze ağırlık olarak bulundu. Stres bitkilerinde Akpınar'da 38,7 mg g<sup>-1</sup> taze ağırlık, Pegaso'da 38,2 mg g<sup>-1</sup> taze ağırlık, Karaçay'da 39,9 mg g<sup>-1</sup> taze ağırlık, Batem 72/55'de 38,5 mg g<sup>-1</sup> taze ağırlık olarak ölçüldü. Mevcut çalışmada, ayrıca yaprak klorofil içeriklerindeki azalma

oranları da hesaplandı ve azalış oranının en fazla Akpınar'da (%7,2), en az ise Pegaso'da (%2,2) olduğu tespit edildi ( $P < 0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Şekil 2).



Şekil 2. Bakır stresine maruz bırakılan 4 farklı mısır çeşidinin toplam klorofil içeriğindeki değişimler. (Akpınar-K:Akpınar-Kontrol, Akpınar-S:Akpınar-Stres, Pegaso-K:Pegaso-Kontrol, Pegaso-S:Pegaso-Stres, Karaçay-K:Karaçay-Kontrol, Karaçay-S:Karaçay-Stres, Batem-K:Batem72/55–Kontrol, Batem-S: Batem72/55–Stres). Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ( $P < 0,05$ ) seviyesinde önemsizdir.

Bakır stresine hassaslık/dayanıklılık seviyesinin belirlenmesine yönelik olarak ölçülen büyüme parametreleri ve toplam klorofil içeriği sonuçlarına göre Akpınar, bakır stresine karşı hassas, Karaçay ve Batem 72/55 ara form, Pegaso ise toleranslı çeşit olarak belirlendi. Sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere bakır stresine toleranslı olarak Pegaso, hassas olarak ise Akpınar çeşidi kullanıldı.

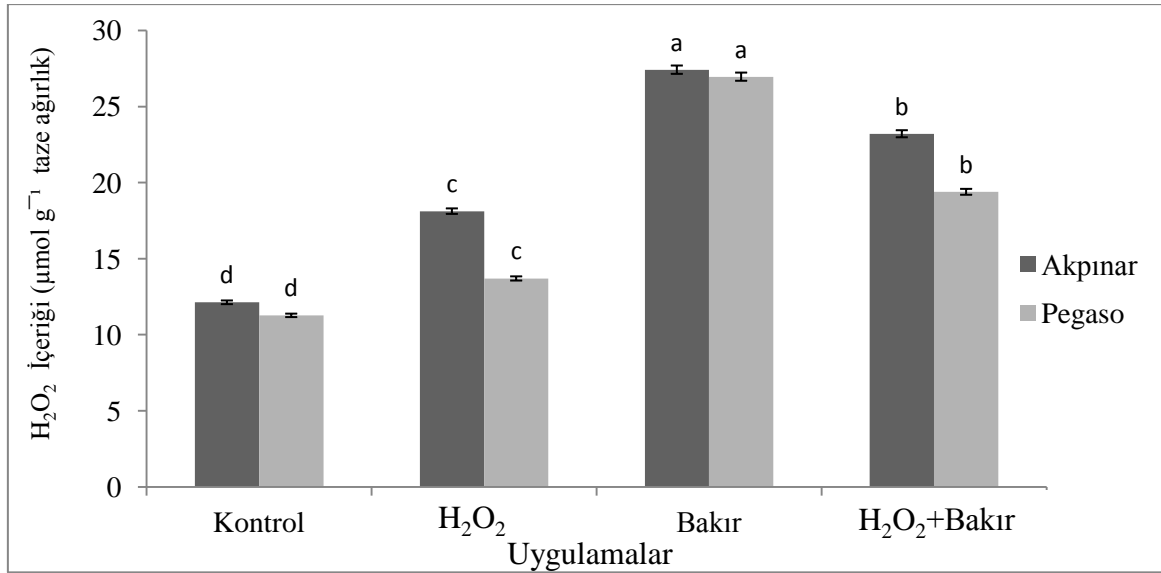
### 3.2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Ön Muamelesinin Antioksidan Sistem Üzerine Etkisi

#### 3.2.1. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> İçeriği

Düşük konsantrasyonda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ön uygulamasının bakır stresinin etkisini hafifletmedeki rolünü saptamak amacıyla antioksidan sistemin elemanlarından biri olan

içsel  $H_2O_2$  içeriğindeki değişimler araştırıldı. Akpınar çeşidine ait kontrol bitkilerinde  $12,13 \mu\text{mol g}^{-1}$  taze ağırlık olarak tespit edilen içsel  $H_2O_2$  içeriği,  $H_2O_2$  ön uygulaması yapılmış bitkilerde  $18,12 \mu\text{mol g}^{-1}$  taze ağırlık değerlerine kadar yükseldi. Bakır stresine maruz bırakılan bitkilerde  $H_2O_2$  içeriği  $27,42 \mu\text{mol g}^{-1}$  taze ağırlık iken,  $H_2O_2$  ve stresin birlikte uygulandığı bitkilerde ise bu değer  $23,21 \mu\text{mol g}^{-1}$  taze ağırlık değerlerine kadar düştü ( $P<0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Şekil 3).

Pegaso çeşidine ait kontrol bitkilerinde  $11,27 \mu\text{mol g}^{-1}$  taze ağırlık olarak tespit edilen endojenik  $H_2O_2$  içeriği,  $H_2O_2$  ön uygulaması yapılmış bitkilerde  $13,69 \mu\text{mol g}^{-1}$  taze ağırlık değerlerine kadar yükseldi. Bakır stresine maruz bırakılan bitkilerde  $H_2O_2$  içeriği  $26,96 \mu\text{mol g}^{-1}$  taze ağırlık iken,  $H_2O_2$  ve stresin birlikte uygulandığı bitkilerde  $19,39 \mu\text{mol g}^{-1}$  taze ağırlık değerlerine kadar indi ( $P<0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Şekil 3).



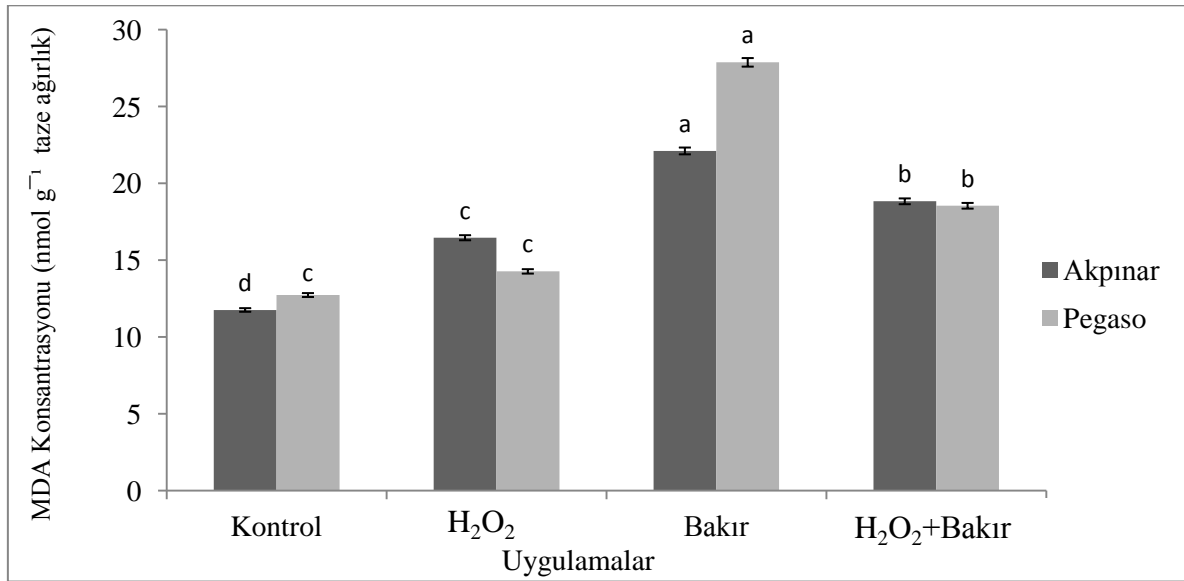
Şekil 3. Bakır stresi altındaki mısır çeşitlerinde  $H_2O_2$  ön muamelesinin endojen  $H_2O_2$  içeriği üzerine etkisi. Kontrol;(Hoagland),  $H_2O_2$ ;(1 mM  $H_2O_2$  içeren Hoagland), Bakır; Hoagland+0,5 mM bakır ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ),  $H_2O_2$ +Bakır (1 mM  $H_2O_2$  içeren Hoagland+0,5 mM bakır ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ )). Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ( $P<0,05$ ) seviyesinde önemsizdir.

### 3.2.2. Lipid Peroksidasyonu

Düşük konsantrasyonda  $H_2O_2$  ön muamelesinin bakır stresinin etkisini hafifletmedeki rolünü belirlemek amacıyla antioksidan sistemin etkilediği lipid

peroksidasyonundaki değişimler incelendi. Lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan malondialdehit (MDA) içeriği bakır uygulanmış mısır çeşitlerinin her ikisinde de kontrol bitkilerine göre istatistiki açıdan önemli derecede değişimler gösterdi. Akpınar çeşidine ait kontrol bitkilerinde  $11,76 \text{ nmol g}^{-1}$  olarak tespit edilen MDA içeriği,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ön uygulaması yapılmış bitkilerde  $16,46 \text{ nmol g}^{-1}$ 'e kadar yükseldi. Bakır stresine maruz bırakılan bitkilerde MDA içeriği  $22,11 \text{ nmol g}^{-1}$  iken,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve stresin birlikte uygulandığı bitkilerde ise bu değer  $18,33 \text{ nmol g}^{-1}$  olarak ölçüldü ( $P < 0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Şekil 4.).

Pegaso çeşidine ait kontrol bitkilerinde  $12,73 \text{ nmol g}^{-1}$  olarak tespit edilen MDA içeriği,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ön uygulaması yapılmış bitkilerde  $14,27 \text{ nmol g}^{-1}$  olarak ölçüldü. Bakır stresine maruz bırakılan bitkilerde MDA içeriği  $27,87 \text{ nmol g}^{-1}$  iken,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve stresin birlikte uygulandığı bitkilerde ise bu değer  $18,54 \text{ nmol g}^{-1}$ 'e kadar indi ( $P < 0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Şekil 4.)



Şekil 4. Bakır stresi altındaki mısır çeşitlerinde  $\text{H}_2\text{O}_2$  ön muamelesinin lipid peroksidasyonu üzerine etkisi. Kontrol;(Hoagland),  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;(1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  içeren Hoagland), Bakır; Hoagland+0,5 mM bakır ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$ +Bakır (1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  içeren Hoagland+0,5 mM bakır ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )). Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ( $P < 0,05$ ) seviyesinde önemsizdir.

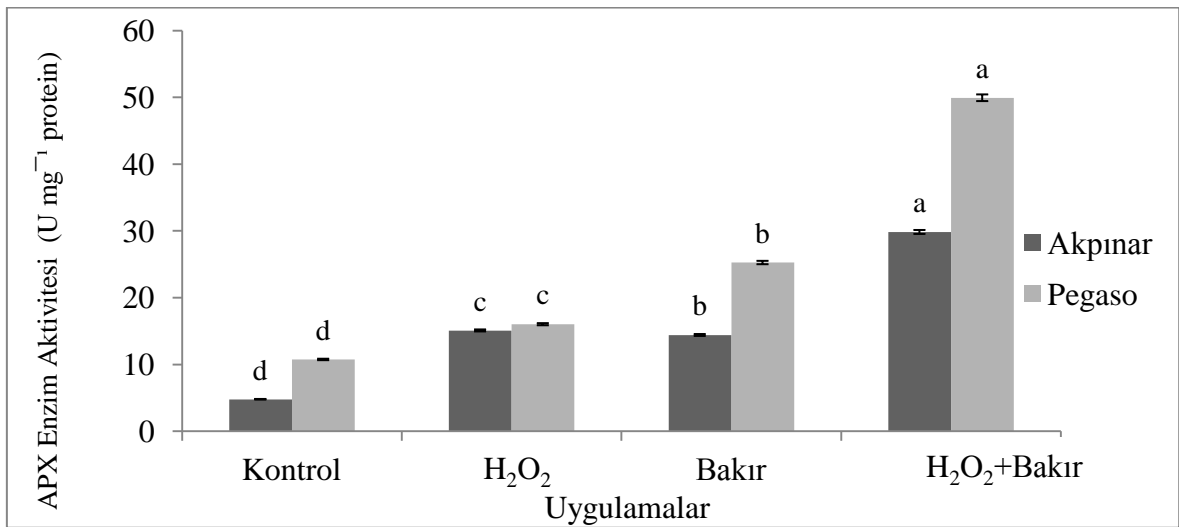


### 3.2.3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Ön Muamelesinin Antioksidan Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

#### 3.2.3.1. Askorbat Peroksidaz (APX) Enzimi

Düşük konsantrasyonda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ön uygulamasının bakır stresinin antioksidan sistem üzerinde etkisini saptamak amacıyla antioksidan enzimlerden askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinde meydana gelen değişimler araştırıldı. Bakır uygulanmış mısır çeşitlerinin her ikisinde de APX aktivitesi, kontrol bitkilerine göre istatistiki açıdan önemli derecede değişimler gösterdi. Akpınar çeşidine ait kontrol bitkilerinde 4,77 U mg<sup>-1</sup> protein olarak tespit edilen APX aktivitesi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ön uygulaması yapılmış bitkilerde 15,08 U mg<sup>-1</sup> protein'e kadar yükseldi. Bakır stresine maruz bırakılan bitkilerde APX aktivitesi, 14,40 U mg<sup>-1</sup> protein iken, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve stresin birlikte uygulandığı bitkilerde ise bu değer 29,83 U mg<sup>-1</sup> protein olarak ölçüldü (P<0,05 seviyesinde önemsizdir) (Şekil 5).

Pegaso çeşidine ait kontrol bitkilerinde 10,74 U mg<sup>-1</sup> protein olarak tespit edilen APX aktivitesi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ön uygulaması yapılmış bitkilerde 16,02 U mg<sup>-1</sup> protein'e kadar yükseldi. Bakır stresine maruz bırakılan bitkilerde 25,25 U mg<sup>-1</sup> protein iken, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve stresin birlikte uygulandığı bitkilerde ise bu değer 49,93 U mg<sup>-1</sup> protein olarak ölçüldü (P<0,05 seviyesinde önemsizdir) (Şekil 5).

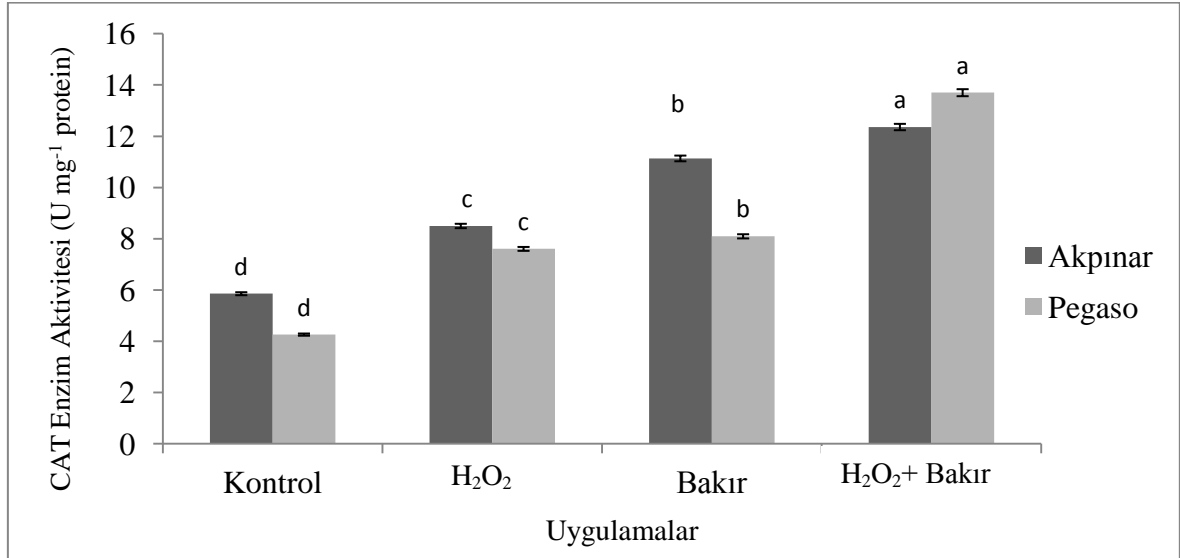


Şekil 5. Bakır stresi altındaki mısır çeşitlerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ön muamelesinin askorbat peroksidaz aktivitesi üzerine etkisi. Kontrol;(Hoagland), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;(1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren Hoagland), Bakır; Hoagland+0,5 mM bakır (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Bakır (1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren Hoagland+0,5 mM bakır (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O)). Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0,05) seviyesinde önemsizdir.

### 3.2.3.2. Katalaz (CAT) Enzimi

Antioksidan enzimlerden olan katalaz (CAT) aktivitesinde meydana gelen değişimler araştırıldı. Bakır uygulanmış mısır çeşitlerinin her ikisinde de CAT aktivitesi, kontrol bitkilerine göre istatistiki açıdan önemli derecede değişimler gösterdi. Akpınar çeşidine ait kontrol bitkilerinde  $5,86 \text{ U mg}^{-1}$  protein olarak tespit edilen CAT aktivitesi,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ön uygulaması yapılmış bitkilerde  $8,50 \text{ U mg}^{-1}$  protein'e kadar yükseldi. Bakır stresine maruz bırakılan bitkilerde CAT aktivitesi  $11,14 \text{ U mg}^{-1}$  protein iken,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve stresin birlikte uygulandığı bitkilerde ise bu değer  $12,36 \text{ U mg}^{-1}$  protein olarak ölçüldü ( $P < 0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Şekil 6).

Pegaso çeşidine ait kontrol bitkilerinde  $4,26 \text{ U mg}^{-1}$  protein olarak tespit edilen CAT aktivitesi,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ön uygulaması yapılmış bitkilerde  $7,61 \text{ U mg}^{-1}$  protein'e kadar yükseldi. Bakır stresine maruz bırakılan bitkilerde CAT aktivitesi  $8,10 \text{ U mg}^{-1}$  protein iken,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve stresin birlikte uygulandığı bitkilerde ise  $13,70 \text{ U mg}^{-1}$  protein olarak ölçüldü ( $P < 0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Şekil 6).

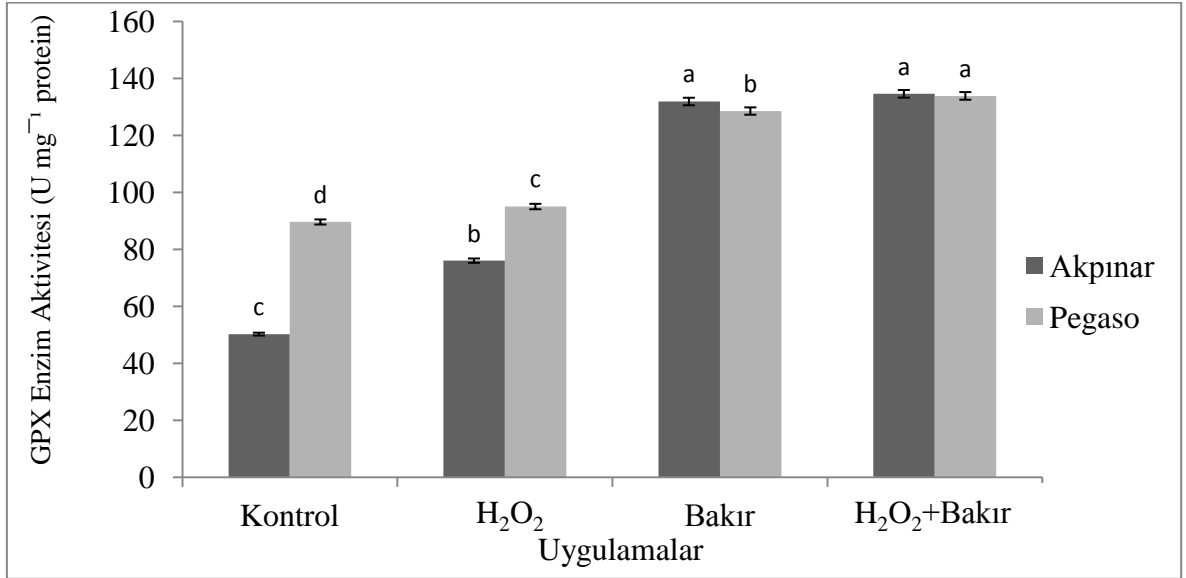


Şekil 6. Bakır stresi altındaki mısır çeşitlerinde  $\text{H}_2\text{O}_2$  ön muamelesinin katalaz aktivitesi üzerine etkisi. Kontrol;(Hoagland),  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;(1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  içeren Hoagland), Bakır; Hoagland+0,5 mM bakır ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$ +Bakır (1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  içeren Hoagland+0,5 mM bakır ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )). Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ( $P < 0,05$ ) seviyesinde önemsizdir.

### 3.2.3.3. Guaiakol Peroksidaz (GPX) Enzimi

Guaiakol peroksidaz (GPX) enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler incelendiğinde, bakır uygulanmış mısır çeşitlerinin her ikisinde de GPX aktivitesi, kontrol bitkilerine göre istatistiki açıdan önemli derecede değişimler gösterdi. Akpınar çeşidine ait kontrol bitkilerinde  $50,27 \text{ U mg}^{-1}$  protein olarak tespit edilen GPX aktivitesi,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ön uygulaması yapılmış bitkilerde  $76 \text{ U mg}^{-1}$  protein'e kadar yükseldi. Bakır stresine maruz bırakılan bitkilerde GPX aktivitesi  $131,92 \text{ U mg}^{-1}$  protein iken,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve stresin birlikte uygulandığı bitkilerde ise bu değer  $134,62 \text{ U mg}^{-1}$  protein olarak ölçüldü ( $P < 0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Şekil 7).

Pegaso çeşidine ait kontrol bitkilerinde  $89,64 \text{ U mg}^{-1}$  protein olarak tespit edilen GPX aktivitesi,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ön uygulaması yapılmış bitkilerde  $95,05 \text{ U mg}^{-1}$  protein'e kadar yükseldi. Bakır stresine maruz bırakılan bitkilerde GPX aktivitesi,  $128,57 \text{ U mg}^{-1}$  protein iken,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve stresin birlikte uygulandığı bitkilerde ise  $133,89 \text{ U mg}^{-1}$  protein olarak ölçüldü ( $P < 0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Şekil 7).

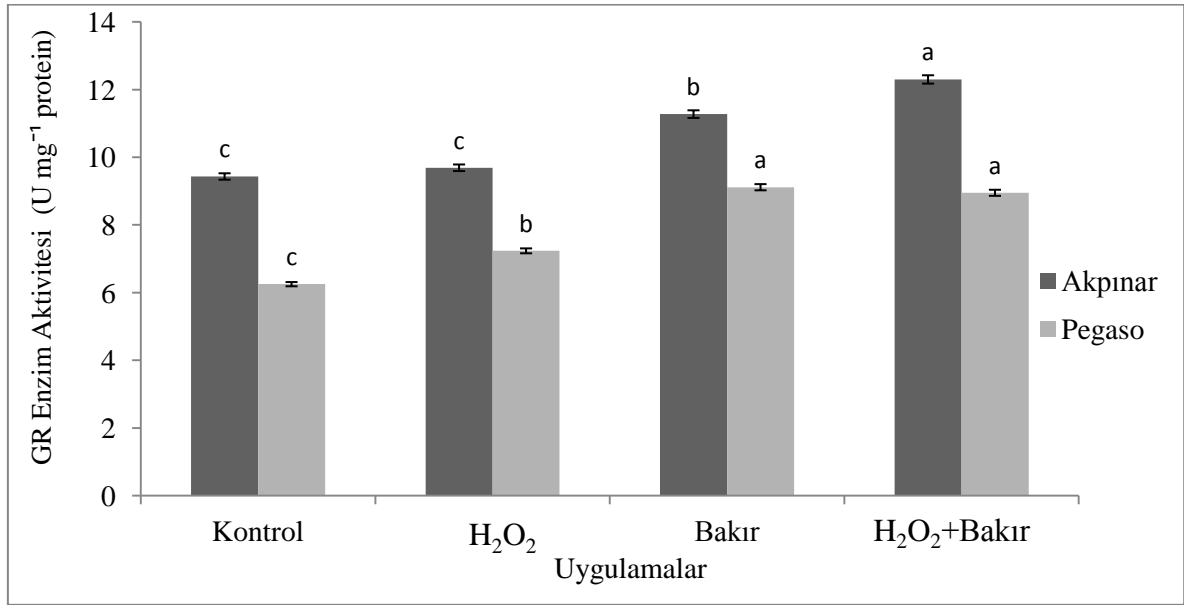


Şekil 7. Bakır stresi altındaki mısır çeşitlerinde  $\text{H}_2\text{O}_2$  ön muamelesinin guaiakol peroksidaz aktivitesi üzerine etkisi. Kontrol;(Hoagland),  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;(1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  içeren Hoagland), Bakır; Hoagland+0,5 mM bakır ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$ +Bakır (1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  içeren Hoagland+0,5 mM bakır( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )). Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ( $P < 0,05$ ) seviyesinde önemsizdir.

### 3.2.3.4. Glutasyon Redüktaz (GR) Enzimi

Glutasyon redüktaz (GR) enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler de araştırıldı. Bakır uygulanmış mısır çeşitlerinin her ikisinde de GR aktivitesi, kontrol bitkilerine göre istatistiki açıdan önemli derecede değişimler gösterdi. Akpınar çeşidine ait kontrol bitkilerinde  $9,43 \text{ U mg}^{-1}$  protein olarak tespit edilen GR aktivitesi,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ön uygulaması yapılmış bitkilerde  $9,69 \text{ U mg}^{-1}$  protein olarak ölçüldü. Bakır stresine maruz bırakılan bitkilerde GR aktivitesi,  $11,28 \text{ U mg}^{-1}$  protein iken,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve stresin birlikte uygulandığı bitkilerde ise bu değer  $12,30 \text{ U mg}^{-1}$  protein olarak ölçüldü ( $P<0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Şekil 8).

Pegaso çeşidine ait kontrol bitkilerinde  $6,25 \text{ U mg}^{-1}$  protein olarak tespit edilen GR aktivitesi,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ön uygulaması yapılmış bitkilerde  $7,24 \text{ U mg}^{-1}$  protein'e kadar düştü. Bakır stresine maruz bırakılan bitkilerde GR aktivitesi,  $9,12 \text{ U mg}^{-1}$  protein iken,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve stresin birlikte uygulandığı bitkilerde ise bu değer  $8,95 \text{ U mg}^{-1}$  protein olarak ölçüldü ( $P<0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Şekil 8).

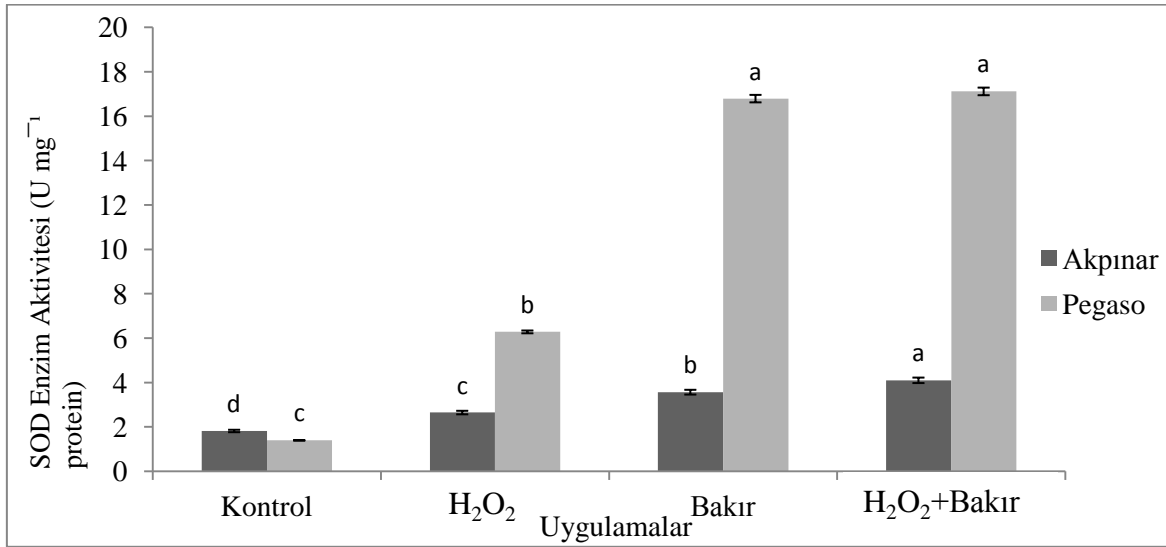


Şekil 8. Bakır stresi altındaki mısır çeşitlerinde  $\text{H}_2\text{O}_2$  ön muamelesinin glutasyon redüktaz aktivitesi üzerine etkisi. Kontrol;(Hoagland),  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;(1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  içeren Hoagland), Bakır; Hoagland+0,5 mM bakır sülfat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$ +Bakır (1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  içeren Hoagland + 0,5 mM bakır sülfat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )). Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ( $P<0,05$ ) seviyesinde önemsizdir.

### 3.2.3.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzimi

Antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler de araştırıldı. Bakır uygulanmış mısır çeşitlerinin her ikisinde de SOD aktivitesi, kontrol bitkilerine göre istatistiki açıdan önemli derecede değişimler gösterdi. Akpınar çeşidine ait kontrol bitkilerinde  $1,82 \text{ U mg}^{-1}$  protein olarak tespit edilen SOD aktivitesi,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ön uygulaması yapılmış bitkilerde  $2,65 \text{ U mg}^{-1}$  protein'e kadar yükseldi. Bakır stresine maruz bırakılan bitkilerde SOD aktivitesi,  $3,57 \text{ U mg}^{-1}$  protein iken,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve stresin birlikte uygulandığı bitkilerde ise bu değer  $4,10 \text{ U mg}^{-1}$  protein olarak ölçüldü ( $P<0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Şekil 9).

Pegaso çeşidine ait kontrol bitkilerinde  $1,40 \text{ U mg}^{-1}$  protein olarak tespit edilen SOD aktivitesi,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ön uygulaması yapılmış bitkilerde  $6,28 \text{ U mg}^{-1}$  protein'e kadar yükseldi. Bakır stresine maruz bırakılan bitkilerde SOD aktivitesi,  $16,79 \text{ U mg}^{-1}$  protein iken,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve stresin birlikte uygulandığı bitkilerde ise bu değer  $17,12 \text{ U mg}^{-1}$  protein olarak ölçüldü ( $P<0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Şekil 9).



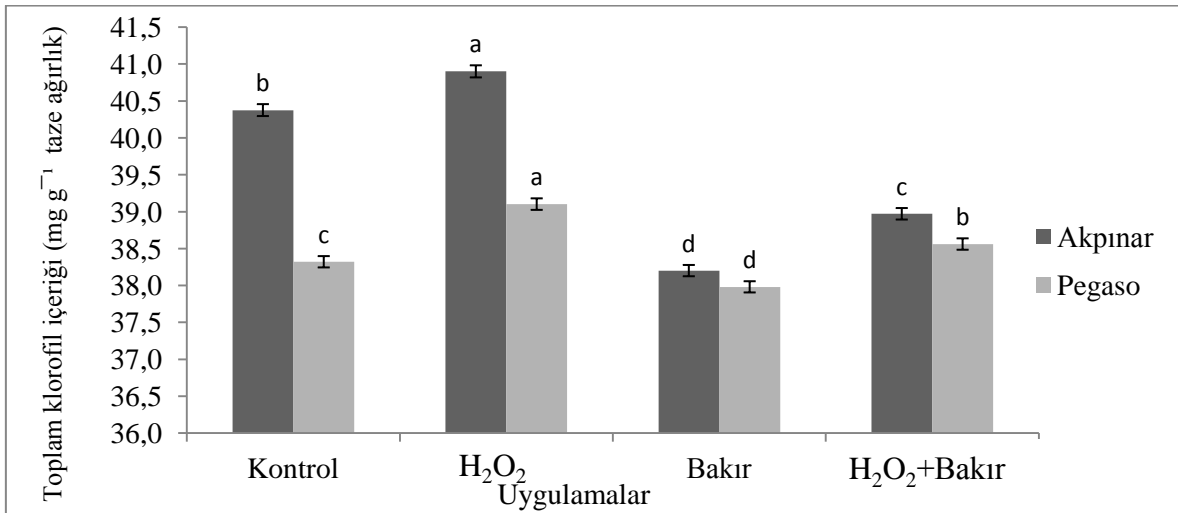
Şekil 9. Bakır stresi altındaki mısır çeşitlerinde  $\text{H}_2\text{O}_2$  ön muamelesinin süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine etkisi. Kontrol; Hoagland,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  içeren Hoagland, Bakır; 0,5 mM bakır sülfat içeren Hoagland,  $\text{H}_2\text{O}_2$ +Bakır; 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  içeren Hoagland + 0,5 mM bakır sülfat. Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ( $P<0,05$ ) seviyesinde önemsizdir.

### 3.3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Ön Muamelesinin Fotosentetik Parametreler Üzerine Etkisi

#### 3.3.1. Klorofil İçeriği Üzerine Etkisi

Düşük konsantrasyonda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ön uygulamasının bakır stresinin etkisini hafifletmedeki rolünü saptamak amacıyla klorofil içeriğinde meydana gelen değişimler araştırıldı. Bakır uygulanmış mısır çeşitlerinin her ikisinde de toplam klorofil içeriği, kontrol bitkilerine göre istatistiki açıdan önemli derecede değişimler gösterdi. Akpınar çeşidine ait kontrol bitkilerinde 40,38 mg g<sup>-1</sup> taze ağırlık olarak tespit edilen toplam klorofil içeriği, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ön uygulaması yapılmış bitkilerde 40,90 mg g<sup>-1</sup> taze ağırlık olarak bulundu. Bakır stresine maruz bırakılan bitkilerde toplam klorofil içeriği, 38,20 mg g<sup>-1</sup> taze ağırlık iken, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve stresin birlikte uygulandığı bitkilerde bu değer 38,97 mg g<sup>-1</sup> taze ağırlık ölçüldü ( $P < 0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Şekil 10).

Pegaso çeşidine ait kontrol bitkilerinde 38,32 mg g<sup>-1</sup> taze ağırlık olarak tespit edilen toplam klorofil içeriği, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ön uygulaması yapılmış bitkilerde 39,10 mg g<sup>-1</sup> taze ağırlık olarak ölçüldü. Bakır stresine maruz bırakılan bitkilerde toplam klorofil içeriği, 37,98 mg g<sup>-1</sup> taze ağırlık iken, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve stresin birlikte uygulandığı bitkilerde ise bu değer 38,56 mg g<sup>-1</sup> taze ağırlık olarak ölçüldü ( $P < 0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Şekil 10).



Şekil 10. Bakır stresi altındaki mısır bitkilerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ön muamelesinin toplam klorofil içeriği üzerine etkisi. Kontrol; (Hoagland), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren Hoagland), Bakır; Hoagland + 0,5 mM bakır sülfat (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Bakır (1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren Hoagland + 0,5 mM bakır sülfat (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O)). Barlar 3 tekerrürlü olarak yapılan ölçümlerin standart sapmasını göstermektedir. Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ( $P < 0,05$ ) seviyesinde önemsizdir.

### 3.3.2. Klorofil Flüoresans Değerleri Üzerine Etkisi

Düşük konsantrasyonda  $H_2O_2$  ön uygulamasının bakır stresinin etkisini hafifletmedeki rolünü saptamak amacıyla PSII maksimum kuantum verimi (Fv/Fm), FotosistemII etkinliği ( $\Phi$ PSII), elektron taşınım oranı (ETR), fotokimyasal olmayan sönme (NPQ), ve fotokimyasal sönme (qP) çeşitli değişimler gösterdi.

PSII maksimum kuantum verimi (Fv/Fm) Akpınar çeşidine ait kontrol bitkilerde; 0,8 olarak tespit edilirken,  $H_2O_2$  ön uygulaması yapılmış bitkilerde 0,8, bakır stresine maruz bırakılan bitkilerde 0,73,  $H_2O_2$  ve stresin birlikte uygulandığı bitkilerde ise 0,76'ye yükseldi ( $P<0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Tablo 2.).

$\Phi$ PSII Akpınar çeşidine ait kontrol bitkilerde 0,7 olarak tespit edilirken,  $H_2O_2$  ön uygulamalı bitkilerde 0,71, bakır stresine maruz bırakılan bitkilerde 0,68,  $H_2O_2$  ve stresin birlikte uygulandığı bitkilerde ise 0,69 ölçüldü ( $P<0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Tablo 2.).

ETR Akpınar çeşidi kontrol bitkilerde  $0,89 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  olarak tespit edilirken,  $H_2O_2$  ön uygulamalı bitkilerde  $0,98 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 'e yükseldi. Bakır stresine maruz bırakılan bitkilerde  $0,62 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $H_2O_2$  ve stresin birlikte uygulandığı bitkilerde ise  $0,69 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 'e yükseldi ( $P<0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Tablo 2.).

NPQ Akpınar çeşidine ait kontrol bitkilerde 1,13 olarak tespit edilirken,  $H_2O_2$  ön uygulaması yapılmış bitkilerde 1,15, bakır stresine maruz bırakılan bitkilerde 1,25'e yükseldi.  $H_2O_2$  ve stresin birlikte uygulandığı bitkilerde ise bu değer 1,23'e indi ( $P<0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Tablo 2.).

qP Akpınar çeşidine ait kontrol bitkilerde 1,52 olarak tespit edilirken,  $H_2O_2$  ön uygulaması yapılmış bitkilerde 1,44'e indi. Bakır stresine maruz bırakılan bitkilerde 1,48'e yükseldi,  $H_2O_2$  ve stresin birlikte uygulandığı bitkilerde ise bu değer 1,34 'e kadar indi ( $P<0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Tablo 2.).

Tablo 2. Bakır stresi altındaki Akpınar bitkilerinde  $H_2O_2$  ön muamelesinin klorofil flüoresans parametreleri üzerine etkisi

Bitkinin Adı	(Fv/Fm)	$\Phi$ PSII	ETR	NPQ	qP
Kontrol	0,80±0,001a	0,70±0,02a	0,89±0,04b	1,13±0,01b	1,52±0,04a
$H_2O_2$	0,80±0,001a	0,71±0,03a	0,98±0,01a	1,15±0,06b	1,44±0,02b
Bakır	0,73±0,001a	0,68±0,05a	0,62±0,04d	1,25±0,09a	1,48±0,06b
$H_2O_2$ +Bakır	0,76±0,001a	0,69±0,01a	0,69±0,04c	1,23±0,01a	1,34±0,01c

± Üç tekerrürlü ortalamının standart sapmasıdır ( $P<0,05$  seviyesinde önemsizdir).

Fv/Fm Pegaso çeşidine ait kontrol bitkilerde; 0,77 olarak tespit edilirken, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ön uygulaması yapılmış bitkilerde 0,76, bakır stresine maruz bırakılan bitkilerde 0,76, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve stresin birlikte uygulandığı bitkilerde ise 0,75 olarak ölçüldü ( $P<0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Tablo 3.).

ΦPSII Pegaso çeşidine ait kontrol bitkilerde 0,72 olarak tespit edilirken, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ön uygulaması yapılmış bitkilerde 0,70, bakır stresine maruz bırakılan bitkilerde 0,70, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve stresin birlikte uygulandığı bitkilerde bu değer yine 0,70 olarak ölçüldü ( $P<0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Tablo 3.).

Pegaso çeşidine ait kontrol bitkilerinde yine ETR 0,59  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  olarak tespit edilirken, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ön uygulaması yapılmış bitkilerde 0,63  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 'e yükseldi. Bakır stresine maruz bırakılan bitkilerde ETR 0,53  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 'e kadar indi. Ancak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve stresin birlikte uygulandığı bitkilerde ise bu değer 0,55  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  olarak ölçüldü ( $P<0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Tablo 3.).

NPQ Pegaso çeşidine ait kontrol bitkilerde 0,84 olarak tespit edilirken, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ön uygulaması yapılmış bitkilerde 1,00'e yükseldi. Bakır stresine maruz bırakılan bitkilerde 1,10, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve stresin birlikte uygulandığı bitkilerde ise bu değer 1,09 olarak ölçüldü ( $P<0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Tablo 3.).

qP Pegaso çeşidine ait kontrol bitkilerde 2,26 olarak tespit edilirken, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ön uygulaması yapılmış bitkilerde 2,16'e kadar indi. Bakır stresine maruz bırakılan bitkilerde 1,83 iken H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve stresin birlikte uygulandığı bitkilerde ise bu değer 1,98'e kadar yükseldi ( $P<0,05$  seviyesinde önemsizdir) (Tablo 3.).

Tablo 3. Bakır stresi altındaki Pegaso bitkilerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ön muamelesinin klorofil flüoresans parametreleri üzerine etkisi

Bitkinin Adı	(Fv/Fm)	ΦPSII	ETR	NPQ	qP
Kontrol	0,77±0,001a	0,72±0,03a	0,59±0,02a	0,84±0,04c	2,26±0,05a
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,76±0,001a	0,70±0,03a	0,63±0,01a	1,00±0,05b	2,16±0,06b
Bakır	0,76±0,001a	0,70±0,05a	0,53±0,03a	1,10±0,09a	1,83±0,05d
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Bakır	0,75±0,001a	0,70±0,04a	0,55±0,05a	1,09±0,03a	1,98±0,02c

\* ± Üç tekerrürlü ortalamanın standart sapmasıdır ( $P<0,05$  seviyesinde önemsizdir).



#### 4. TARTIŞMA

Mısır (*Zea mays* L.)'ın iki farklı çeşidinde (Akpınar ve Pegaso) dışarıdan uygulanan  $H_2O_2$ 'nin bitkiyi bakır stresine karşı korumada antiosidan sistemin rolünü anlamak için lipid peroksidasyonu ve endojen  $H_2O_2$  içeriğindeki değişimler ile antioksidan enzim aktiviteleri, klorofil içeriği ve klorofil flüoresans değerleri araştırılmıştır.

Mevcut çalışmada öncelikle bakır stresine tolerans seviyeleri bilinmeyen 4 ayrı mısır (*Zea mays* L.) çeşidinin (Akpınar, Pegaso, Batem 72/55 ve Karaçay) bakır stresine hassaslık/dayanıklılık seviyeleri çeşitli büyüme parametrelerine bakılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla net asimilasyon oranı (NAR), nispi büyüme oranı (RGR), özgül yaprak alanı (SLA), yaprak kısmi ağırlığı (LWR) ve yaprak alanı oranı (LAR) hesaplanmıştır. Ayrıca bitki klorofil içeriğinde meydana gelen değişimler de incelenmiştir. NAR, RGR, SLA ve LWR gibi birçok büyüme parametreleri ile klorofil içeriğinde en fazla azalma oranı Akpınar'da gözlenmiştir. RGR, LAR gibi büyüme parametreleri ile klorofil içeriğinde en az azalma oranı ise Pegaso'da gözlenmiştir. Yine, diğer büyüme parametrelerindeki azalış oranı değerlendirildiğinde, bu oranın Pegaso'da düşük olduğu saptanmıştır. Bu nedenle mevcut çalışmada; Akpınar; bakır stresine karşı hassas, Karaçay ve Batem 72/55 ara formlar ve Pegaso ise tolerant çeşit olarak belirlenmiştir. Bu aşamadan sonra; bakır stresine karşı hassas çeşit olarak Akpınar ve tolerant çeşit olarak Pegaso seçilip çalışmalara bu iki çeşit üzerinden devam edilmiştir.

Oksidatif stres boyunca bitkilerde hasarın anlaşılması için kullanılan bir parametre, lipid peroksidasyonudur (Liu vd., 2009). Mevcut çalışmada; hem dayanıklı, hem hassas çeşitlerde stres bitkilerinde yüksek MDA içeriği gözlemlenmekle beraber,  $H_2O_2$  ön uygulamasından sonra yapılan ölçümlerde, daha düşük MDA değerleri elde edilmiştir. Benzer şekilde literatürde yapılan bazı çalışmalarda, ağır metal stresine maruz bırakılmış bitkilerin MDA içeriğinin arttığı kaydedilmiştir (Bouazizi vd., 2007a/b; Pourakbar vd., 2007).  $H_2O_2$  ön muamelesinin ağır metal stresi üzerine etkileri ile ilgili literatürde az sayıda çalışma bulunmakla beraber, çalışmamıza benzer şekilde, Xu vd., (2011) alüminyum stresine maruz bırakılan buğday üzerine yaptıkları çalışmada hem dayanıklı, hem hassas çeşitlerde yüksek MDA içeriği tespit etmiş, ancak MDA içeriğinin  $H_2O_2$  ön muamelesi ile düştüğünü rapor etmişlerdir. Yine Hu vd., (2009) kadmiyum stresine maruz

kalan çeltik bitkilerinde MDA içeriği için yüksek değerler tespit ederken,  $H_2O_2$  ön muamelesinin MDA içeriğini azalttığını rapor etmişlerdir. Literatürde  $H_2O_2$  ön muamelesinin lipid peroksidasyonunu azaltarak salatalık yapraklarında ozmotik stres toleransını indüklediği ve böylece membran yapısını koruduğu rapor edilmiştir (Liu vd., 2009). Gechev vd., (2002) ise,  $H_2O_2$  ön muamelesinin lipid peroksidasyonunu azaltarak tütün bitkilerini oksidatif hasarlardan koruduğunu gözlemlemişlerdir. Burada,  $H_2O_2$  ön uygulamasının, bakır stresine karşı membran hasarını azalttığı söylenebilir.

Çalışmamızda  $H_2O_2$  ön muamelesinin antioksidan sistemle ilgili parametrelerden biri olan endojen  $H_2O_2$  içeriğindeki değişimler de incelenmiştir. Önceki çalışmalarda, alüminyum stresine maruz bırakılmış buğday bitkilerinde, hem dayanıklı, hem hassas çeşitlerde endojen  $H_2O_2$  seviyesinin arttığı,  $H_2O_2$  ön muamelesinin ise bu seviyeyi azalttığı bulunmuştur (Xu vd., 2011). Mevcut çalışmada yine benzer şekilde, bakır stresi durumunda hem dayanıklı, hem hassas çeşitlerde artan endojen  $H_2O_2$  miktarının,  $H_2O_2$  ön muamelesi ile stres bitkilerine göre düştüğü gözlemlenmiştir. Bununla beraber, literatürde bazı çalışmalarda (Morita vd., 1990; Garnier vd., 2006; Kumar vd., 2008; Liu vd., 2009) oksidatif stres koşullarında,  $H_2O_2$ 'in arttığı, bazı çalışmalarda (Moskova vd., 2009; Gao vd., 2010) ise antioksidan sistemin uyarılması nedeniyle endojen  $H_2O_2$  miktarının düştüğü rapor edilmiştir. Bu çalışmada  $H_2O_2$  ön muamelesi yapılan bitkilerde endojen  $H_2O_2$  seviyesinin bakır uygulanan göre azalması, muhtemelen antioksidan sistemin uyarılmasından kaynaklanmaktadır.

Stres esnasında antioksidan enzim aktivitelerinde artış sayısız çalışmada rapor edilmiştir (Tanyolaç vd., 2007; Bouazizi vd., 2007a/b; Pourakbar vd., 2007; Kumar vd., 2008; Ekmekçi vd., 2008; Hu vd., 2009; Xu vd., 2011). Bitkileri oksidatif hasardan korumak için reaktif oksijen türlerinin (ROS) antioksidan sistem tarafından kontrol altında tutulması gerekmektedir (Ros Barcelo vd., 1987). Süper oksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR), katalaz (CAT) ve guaiakol peroksidaz (GPX) gibi enzimler serbest oksijen radikallerinin yok edilmesinde etkili antioksidatif enzimler olarak bilinmektedirler (Cakmak ve Marschner, 1992; Cakmak, 1994; Gossett vd., 1994a). Çalışmamızda, bakır stresi koşullarında, her iki mısır çeşidinde de enzim (APX, CAT, GPX, GR ve SOD) aktivitelerinde artış tespit edilmiştir. Benzer şekilde literatürde, Tanyolaç vd., (2007), bakır stresine maruz bırakılan mısır bitkilerinde antioksidan enzim (APX, POD,

GR, SOD) aktivitelerinde kontrole göre yüksek değerler elde etmiştir. Başka bir çalışmada, Ekmekçi vd., (2008) kadmiyum stresine maruz bırakılan mısır bitkisinde antioksidan enzim (SOD, APX, GR ve GPX) aktivitelerinde artış tespit etmiştir. Çalışmamızda,  $H_2O_2$  ön uygulamasının bakır stresi koşullarında artış tespit edilen antioksidan enzim (APX, CAT, GPX, GR ve SOD) aktivitesini daha da artırdığı gözlenmiştir. Literatürde çalışmamıza benzer şekilde, alüminyum stresine maruz bırakılan buğday çeşitlerinde kontrol bitkilerine göre artan antioksidan enzim (APX, CAT, POD ve SOD) aktiviteleri tespit edilmiş,  $H_2O_2$  ön uygulamasının ise bu aktiviteyi daha da artırdığı belirlenmiştir (Xu vd., 2011). Yine Hu vd., (2009), kadmiyum stresine maruz bırakılan çeltik fiderinde  $H_2O_2$  ön uygulamasının GPX aktivitesini kadmiyum stresine göre daha da artırdığını kaydetmiştir. Bununla beraber çalışmamızda, CAT enzim aktiviteleri dayanıklı çeşit (Pegaso)'te diğer antioksidan enzimlere göre çok daha fazla artmıştır. Burada toleranslı çeşitte daha etkili bir savunma mekanizmasına sahip olduğu ifade edilebilir. Mevcut çalışmada,  $H_2O_2$  ön uygulaması ile bakır stresi altında artan antioksidan enzim aktivitelerinin fotosistemi koruyabileceği düşünülmektedir.

Mevcut çalışmada, klorofil flüoresans parametrelerindeki değişimler de araştırılmıştır. Bu parametrelerden biri fotosentetik aygıtın stres koşullarında sağlamlığını gösteren  $F_v/F_m$  'ndeki değişimdir.  $F_v/F_m$  değerindeki azalma ile çevresel streslere cevapta fotoinhibitör hasarın varlığını gösterdiği belirlenmiştir (Maxwell ve Johnson, 2000). Li vd. (2006) kuraklık stresine maruz bırakılan yulaf çeşitlerinden kuraklığa hassas olanlarda  $F_v/F_m$  değerinin azaldığını rapor etmişlerdir. Benzer şekilde, çalışmamızda hassas çeşitte  $F_v/F_m$ 'de azalma fotosistemin bakır stresinden olumsuz etkilendiğini göstermektedir. Buna karşın, bakır stresi ile kıyaslandığında,  $H_2O_2$  ön uygulaması ile  $F_v/F_m$  değerinde meydana gelen artış,  $H_2O_2$ 'in fotosentetik aygıtı bakır stresinden koruğunu düşündürmektedir. Diğer taraftan dayanıklı çeşitte tüm uygulamalarda  $F_v/F_m$ 'nin değişmemesi fotosentetik aygıtın bakır stresinden etkilenmediğini göstermektedir.

Kadmiyum stresi altındaki mısır bitkilerinde Ekmekçi vd., (2008),  $\Phi PSII$ 'de düşüşler rapor ederken, Tanyolaç vd., (2007) bakır stresi altındaki mısır bitkilerinde  $\Phi PSII$  değerlerinin kontrol grubuna göre değişmediğini kaydetmişlerdir. Benzer şekilde, çalışmamızda her iki mısır çeşidinde  $\Phi PSII$ ' in bakır stresi ile değişmediği belirlenmiştir.

Çalışmamızda ayrıca bakır stresi ile her iki çeşitte de NPQ değerlerinin arttığı kaydedilmiştir. Bununla beraber, Tanyolaç vd., (2007) bakır stresi altındaki mısır

bitkilerinde, NPQ değerlerinin kontrol bitkilerine göre düştüğünü belirlemiştir. Buna karşın, birçok stres çeşidinde NPQ değerlerinin arttığı rapor edilmiştir. Örneğin, Qiu vd. (2003) tuz stresi koşulları altında artan NPQ değerleri belirlemiş ve fotosistemdeki yükün ısı ile dağıtılmasının fotosentetik verimi düşürerek sistemi ışık hasarından koruduğunu ileri sürmüştür. Mevcut çalışmada  $H_2O_2$  ön uygulaması ile NPQ'da kaydedilen artışların, fotosistemin bakır stresinden korunmasında rol oynayabileceği söylenebilir.

ETR'de meydana gelen azalmaların fotosentezde indirgenmeye yol açtığı bilinmektedir (Lu ve Zhang, 1999). Tanyolaç vd., (2007) bakır stresi altındaki mısır bitkilerinde, Ekmekçi vd., (2008) ise kadmiyum stresi altındaki mısır bitkilerinde ETR için yaptıkları çalışmada düşen değerler kaydetmişlerdir. Çalışmamızda da benzer şekilde her iki çeşitte de artan bakır stresi ile beraber ETR'de düşüşler meydana gelmiştir. ETR'de meydana gelen bu düşüşler, artan NPQ etkisiyle fotosistemdeki enerjinin ısı yoluyla dağılımının artmasına bağlanabilir.

Stres altındaki bitkilerde, qP değerlerinin kontrol bitkilerine göre düştüğü belirlenmiştir (Tanyolaç vd., 2007; Ekmekçi vd., 2008). Benzer şekilde; yapılan çalışmalarda, bakır stresi altındaki mısır bitkilerinde kontrol bitkilerine göre daha düşük qP değerleri tespit edilmiştir. Klorofil flüoresans parametreleri ile ilgili sonuçlara dayanarak,  $H_2O_2$  ön uygulamasının özellikle dayanıklı çeşitte fotosentetik aygıtı koruduğu söylenebilir.

Bitkilerin stres cevabını ölçmek için kullanılan bir parametre yaprak klorofil içeriğidir. Daha önce bakır stresi sonucu bitkilerde klorofil içeriğinin düştüğü rapor edilmiştir (Tanyolaç vd., 2007). Ghani vd., (2010), bunu destekler şekilde, kurşun stresine tabi tutulan bitkilerde, klorofil içeriğinde; hassas çeşitte daha belirgin olmakla beraber her iki çeşitte de düşüş bulmuşlardır. Çalışmamızda dayanıklı çeşitlerde meydana gelen toplam klorofil azalışının hassas çeşitlere göre daha az oluşu bu görüşü desteklemektedir. Yine, Lascano vd. (2001) kuraklığa duyarlı ve hassas buğday çeşitleri üzerinde yaptıkları çalışmada, klorofil içeriğinin kontrole göre önemli ölçüde düştüğünü kaydetmiştir. Diğer taraftan yine Nyachiro vd., (2001) kuraklık stresi altındaki buğday bitkilerinde klorofil içeriğinin kontrole göre önemli ölçüde düştüğünü belirlemiştir.  $H_2O_2$  ön uygulamasının stres etkilerini ortadan kaldırılabileceği ve böylece bitkilerin hayatta kalma ihtimalinin arttığı ifade edilebilir.

Sonuç olarak; mevcut çalışmada  $H_2O_2$  ön muamelesinin bakır stresine maruz bırakılan iki farklı mısır çeşidinde MDA içeriği, endojen  $H_2O_2$  miktarında düşmeye, antioksidan enzim aktiviteleri, yaprak klorofil içeriğinde yükselmeye ve klorofil flüoresans değerlerinde iyileşmeye katkıda bulunduğu tespit edilmiştir. Dıştan uygulanan  $H_2O_2$ 'nin bakır stresi altındaki bitkilerde antioksidan sistemi uyararak stresin olumsuz etkisini azaltabileceği dolayısıyla fotosentezin devamlılığını sağlayabileceği sonucuna varılmıştır.

## 5. SONUÇLAR

Yapılan çalışma sonucunda;

1. Mısır (*Zea mays* L.) bitkisinin bakır stresine hassas/dayanıklılıkları belirlenmek üzere yapılan çalışmalarda klorofil içeriği ve büyüme parametrelerindeki azalış oranının en fazla Akpınar, en az Pegaso'da olduğu görülmüştür. Bu nedenle Akpınar'ın hassas, Karaçay ve Batem 72/55'in ara form, Pegaso'nun ise bakır stresine karşı dayanıklı olduğu sonucuna varılmıştır.
2. Stres sırasında bitkilerde endojenik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğinde önemli derecede bir artışın olduğu belirlenmiştir. Bu artışın ise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ön uygulamasıyla birlikte azaldığı belirlenmiştir.
3. Bakır stresi sırasında bitkilerde malondialdehit (MDA) içeriğinde önemli derecede bir artışın olduğu belirlenmiştir. Bu artışın ise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ön uygulamasıyla birlikte azaldığı kaydedilmiştir.
4. Stres periyodu sırasında bitkilerde antioksidan enzim aktivitelerinde önemli bir artışın olduğu belirlenmiştir. Bu artışın ise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ön uygulamasıyla daha da arttığı tespit edilmiştir.
5. Bakır stresi koşullarında bitkilerin yaprak klorofil miktarında önemli bir kaybın olduğu görülmüştür. Yaprak klorofil miktarındaki bu kaybın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ön uygulamasıyla önemli derecede önlendiği sonucuna varılmıştır.
6. Stres boyunca klorofil flüoresans değerlerinde önemli değişimler meydana gelmiş, fotosentez hızı ve verimi zarar görmüştür. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ön uygulamasıyla klorofil flüoresans değerlerinde meydana gelebilecek zararların önemli derecede engellenebileceği saptanmıştır.

Kısaca bu çalışmada, bakır stresine maruz kalan mısır (*Zea mays* L.) çeşitlerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ön uygulamasının antioksidan sistem aktivitesindeki artışı uyarabildiği, endojen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı, lipid peroksidasyonu, klorofil flüoresans değerlerini düzenlediği ve böylece ağır metal stresini hafifletmede rolünün olabileceği belirlenmiştir.

## 6. ÖNERİLER

Yapılan çalışmalarla; yüksek sıcaklık, tuz stresi, ısı, yüksek ışık, parakuat gibi herbisitler ve ağır metal stresine maruz kalan çeşitli bitkilerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ön uygulamasının stresin etkisini hafifletmede rolünün olduğu ispatlanmıştır. Benzer şekilde, mevcut çalışmada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ön uygulamasının mısır bitkilerinde ağır metal stresinin etkilerini önemli derecede azalttığı belirlenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin stres koşullarında bitkilerde iyileştirmeyi sağlamak amacıyla tarımda kullanılabileceği, böylece ağır metal sızıntılarına maruz kalma durumunda bu bitkilere dışardan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamak suretiyle mısır üretimindeki ekonomik kayıpların önlenebileceği söylenebilir.

Bununla beraber, bitkilerin ağır metal stresinin hasarını azaltmak için çeşitli mekanizmalar geliştirdikleri bilinmektedir. Örneğin, ağır metal stresi koşullarında, bitkilerin antioksidan sistemi uyardığı, lipid peroksidasyonunu artırdığı, yaprak klorofil içeriğini düşürdüğü ve böylece strese karşı tolerans sağladığı birçok çalışmada tespit edilmiştir. Mevcut çalışmada, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ön uygulaması ile bitkilerde bu mekanizmalardan antioksidan sistemi uyararak fotosentetik birimleri bakır stresine karşı koruyabileceği bulunmuştur. Bundan sonraki çalışmalarda, antioksidan sistem enzimlerinden glutatyon redüktaz, guaiakol peroksidaz ve özellikle iki çeşit arasında farklılık belirlenen askorbat peroksidaz enzimlerinin moleküler düzeyde araştırılması sonuçların birçok veriyle desteklenmesi açısından yarar sağlayabilir.

## 7. KAYNAKLAR

- Aebi, H.E., 1983. Catalase. In: Methods of Enzymatic Analysis, Bergmeyer, H.U., Ed., Verlag Chemie, Weinheim, 273-286 s.
- Alvarez, M., E., Pennell R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R. A. ve Lamb, C.J., 1998. Reactive Oxygen Intermediates Mediate a Systemic Signal Network in the Establishment of Plant Immunity. Cell, 92, 773–784.
- An, Z., Jing, W., Liu Y.ve Zhang, W., 2008. Hydrogen Peroxide Generated by Copper Amine Oxidase is Involved in Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure in *Vicia Faba*. J. of Exp. Bot., 59, 4, 815–825.
- Arnon, D.I., 1949. Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, Plant Physiol., 24, 1–15.
- Arora, A. ve Mohan, J., 2002. Expression of Dwarfing Genes Under Nitrogen and Moisture Stress in Wheat (*Triticum* spp): Dry Matter Partitioning, Root Growth and Leaf Nitrogen, J. Agronon. Crop Sci., 186, 111-118.
- Asada, K., 1992. Ascorbate Peroxidase-Hydrogen Peroxide Scavenging Enzyme in Plants, Physiol. Plant., 85, 235-241.
- Baker, A.J.M. ve Brooks, R.R., 1989. Terrestrial Higher Plants which Hyperaccumulate Metallic Elements, A Review of Their Distribution, Eco.& Phyt. 1, 81-126.
- Barnett, J.P., 1976. Sterilizing Southern Pine Seeds With H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tree P. 3, 17–9.
- Beauchamp, C. ve Fridovich, I., 1971. Superoxide Dismutase: Improved Assays and An Assay Applicable to Acrylamide Gels, Anal. Biochem., 44, 276-287.
- Bergmann, W., 1992. Nutritional Disorders of Plants: Development, Visual and Analytical Diagnosis, New York.
- Bergmeyer, J. ve Grabl, M., 1983. Methods of Enzymatic Analysis, Germany, 190-302 s.
- Bernal, M., Roncel, M., Ortega, J. M., Picorel, R., ve Yruela, I., 2004. Copper Effect on Cytchrome b<sub>559</sub> of Photosystem II Under Photoinhibitory Conditions. Physiol. Plant, 120, 686-694.
- Bidwell, R. G. S., 1974. Plant Physiology, Giles, McMillan Co., New York.
- Bilger, W. ve Björkman, O., 1990. Role of The Xanthophyll Cycle in Photoprotection Elucidated by Measurements of Light-Induced Absorbance Changes, Fluorescence and Photosynthesis in Leaves of *Hedera canariensis*, Photosynth. Res., 25, 173-185.



- Blum, A., 1986. *Plant Breeding for Stress Environments*, CRC Press, Boca Raton, USA, 1-223 s.
- Bouazizi, H., Jouili, H., El Ferjani, E., 2007: Effects of Copper Excess on Growth, Hydrogen Peroxide, production and peroxidase activities in maize seedlings (*Zea mays* L.). Pak. J. Biol. Sci., 10, 5, 751-6. (A)
- Bouazizi, H., Jouili, H., Geitmann, A., ve El Ferjani, E., 2007. Copper-Induced Oxidative Stress in Maize Shoots (*Zea mays* L.): Hydrogen Peroxide Accumulation and Peroxidases Modulation. Acta Biol Hung., 58, 2, 18, 209. (B)
- Bowen, H. J. M., 1985. *The Natural Environment and The Biogeochemical Cycles*, In: *The Handbook of Env. Ch.*, New York.
- Bowler, C., Van Maontague, M. ve Inze, D., 1992. Superoxide Dismutase and Stress Tolerance, *Ann. Rev. Plant Physiol.* Plant Mol. Biol., 43, 83-116.
- Bowler, C., ve Fluhr, R., 2000. The Role of Calcium and Activated Oxygens as Signals for Controlling Cross-Tolerance. Trends Plant Sci. 5, 241–246.
- Bradford, M.M., 1976. Rapid and Sensitive Method for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of Protein-Dye Binding, Anal. Biochem., 72, 248–254.
- Cakmak, I., ve Horst, W. J., 1994. Effect of Aluminium on Lipid Peroxidation, Superoxide Dismutase, Catalase and Peroxidase Activities in Root Tips of Soybean (*Glycine max*). Plant Physiol., 83, 463–8.
- Cakmak, I., Strbac, D. ve Marschner, H., 1993. Activities of Hydrogen Peroxide-Scavenging Enzymes in Germinating Wheat Seeds, J. Exp. Bot., 44, 127-132.
- Cakmak, I., ve Marschner, H., 1992. Magnesium Deficiency and High Light Intensity Enhance Activities of Superoxide Dismutase, Ascorbate Peroxidase, and Glutathione Reductase in Bean Leaves. Plant Ph. 98, 1222–1227.
- Chandrasekar, V., Sairam, R. K., ve Srivastava, G. C., 2000. Physiological and Biochemical Responses of Hexaploid and Tetraploid Wheat to Drought Stress. J.A.C.Sci. 185, 219-227.
- Chen, G.X. ve Asada, K., 1989. Ascorbate Peroxidase in Tea Leaves: Occurrence of Two Isozymes and the Differences in Their Enzymatic Properties, Plant Cell Physiol., 30, 987-998.
- Creissen, G., Edwards, E.A. ve Mullineaux, P.M., 1994. Glutathione Reductase and Ascorbate Peroxidase, In: *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants*, Foyer, C.H., ve Mullineaux, P.M., Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 343-364 s.

- Creissen, G., Broadbent, P., Stevens, R., Wellburn, A.R. ve Mullineaux, P.M., 1996. Manipulation of Glutathione Metabolism in Transgenic Plants, J. Biochem., 24, 465-472.
- Dalton, D.A., Harus, F.J., Russell, S.A. ve Evans, H.J., 1987. Purification, Protection and Distribution of Ascorbate Peroxidase in Legumen Root Nodules, Plant Physiol., 83, 789-794.
- Desikan, R., Hancock, J. T., Ichimura, K., Shinozaki, K., ve Neill, S. J. 2001. Harpin Induces Activation of the Arabidopsis Mitogen-Activated Protein Kinases AtMPK4 and AtMPK6. Plant Physiol. 126,1579–1587.
- Dhindsa, R. S., Plumb-Dhindsa, P. ve Thorpe, T. A., 1981. Leaf Senescence: Correlated With Increased Levels of Membrane Permeability and Lipid Peroxidation, and Decreased Levels of Superoxide Dismutase and Catalase. J. Exp. Bot. 32, 93, 101.
- Dhindsa, R. S., Plumb-Dhindsa, P., ve Reid, D. M. 1982. Leaf Senescence and Lipid Peroxidation : Effects of Some Phytohormones, and Scavengers of Free Radicals and Singlet Oxygen. Physiol. Plant. 56, 453-457.
- Dietz., H., Steinlein, T., ve Ullmann, I., 1999. Establishment of the Invasive Perennial Herb *Bunias orientalis* L.: An Experimental Approach—Acta Oecologia. 20, 621-632.
- Dias de Azevedo Neto, A., Prisco, J. T., Ene'as-Filho, J., Medeiros, J. V. ve Gomes-Filho, E., 2005. Hydrogen Peroxide Pre-treatment Induces Salt Stress Acclimation in Maize Plants, Journal of Plant Physiology. 162, 1114-1122.
- Doncheva, S., Nikolov, B. ve Ogneva, V., 1996. Effect of Copper Excess on The Morphology of The Nucleus in Maize Root Meristem Cells, P.P. 96, 118-122.
- Earle, F. R., Curtis, J. J, ve Hubbard, J. E., 1946. Composition of the Component Parts of the Kernel. Cereal Chem., 23, 504.
- Edwards, D. G. W. ve Sutherland, J. R., 1979. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of Abies Seeds. Can. F. S., 35, 3–4.
- Edwards, M., Serrao, J. M., Gent, J. P., ve Goodchild, C. S., 1990. On the Mechanism by Which Midazolam Causes Spinally Mediated Analgesia. Anest., 73, 273-277.
- Ekmekçi, Y., Tanyolaç, D. ve Ayhan, B., 2008. Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. J. P. Ph., 165, 600-611.
- Elstner, E. F. ve Osswald, W., 1994. Mechanisms of Oxygen Activation During Plant Stress, P. Royal Soc. Edinburg, 103, 131-154 s.
- Farooq, M., Basra S. M. A., Wahid A., Rehman H., 2009. Exogenously Applied Nitric Oxide Enhances The Drought Tolerance in Fine Grain Aromatic Rice (*Oryza sativa* L.), J. Agr. Crop Sci., 195, 254-261.

- Feierabend, J., Schaan, C. ve Hertwig, B., 1992. Photoinactivation of Catalase Occurs under Both High and Low Temperature Stress Conditions and Accompanies Photoinhibition of Photosystem II, Plant Physiol., 100, 1554-1561.
- Forstner, U. ve Wittmann, G. T. W., 1979. Metal Pollution in The Aquatic Environment, Springer-Verlag, Berlin, 386 s.
- Foster, J. G. ve Hess, J. L., 1982. Oxygen Effects on Maize Leaf Superoxide Dismutase and Glutathione Reductase, Phytochemistry, 21, 1527-1532.
- 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. Physiol. Plant., 100, 241-254.
- Foyer, C. H. ve Halliwell, B., 1976. Presence of Glutathione and Glutathione Reductase in Chloroplast: A Proposed Role in Ascorbic Acid Metabolism, Planta, 133, 21-25.
- Fridovich, L., 1986. Biological Effect of Superoxide Radical, Arch. Biochem. Biophys., 247, 1-11.
- Fu, J. ve Huang, B., 2001. Involvement of Antioxidants and Lipid Peroxidation in the Adaptation of Two Cool-Season Grasses to Localized Drought Stress, Environ. Exp. Bot., 45, 105-114.
- Ghani, A., 2010. Effect of Lead Toxicity on Growth, Chlorophyll and Lead (Pb+) Contents of Two Varieties of Maize (*Zea mays* L.). Pakistan Journal of Nutrition, 9, 887-891.
- Garnier, L., F. Simon-Plas, Thuleau, P., ve Agnel, J. P., 2006. Cadmium Affects Tobacco Cells By A Series of Three Waves of Reactive Oxygen Species That Contribute to Cytotoxicity. P. Cell Environ. 29, 1956–1969.
- Gechev, T., Gadjev, I., Van Breusegem F., Inze, D., Dukiandjiev, S. ve Toneva, V. vd., 2002. Hydrogen Peroxide Protects Tobacco from Oxidative Stress by Inducing a Set of Antioxidant Enzymes, Cell Mol Life Sci., 59, 708–714.
- World Health Organization, 1996. Trace Elements in Human Nutrition and Health, Geneva, Macmillan / Ceuterick-8000.
- Gong, G., Chang, J., ve Liang, M., 2001. A Photosynthetic-Irradiance Model For the Upwelling Region Northeast of Taiwan and Its Application to the East China Sea. J. of Geo. R. 106, C9, 10.
- Gossett, D. R., Millhollon, E. P., ve Lucas, M. C., 1994. Antioxidant Response to NaCl Stress in Salt-Tolerant and Salt-Sensitive Cultivars of Cotton. Crop. Sci. 34, 706-714. (A)
- Guzel, S., 2011. Hidrojen Peroksit Ön Muamelesinin Bakır Stresi Toleransı Üzerine Etkisi. Yüksek lisans tezi. KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Habashi, F., 1997. Handbook of Extractive Metallurgy, 2, Wiley-VCH, Germany.
- Hale, M. G. ve Orcutt, D. M., 1987. The Phys.of Water Stres, J. Wiley&Sons, N. York.
- Hall, J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. Journal of Experimental Botany 53: 1–11.
- Halliwell, B., 1984. Toxic Effects of Oxigen on Plant Tissues, In: Chloroplast Metabolism, The Structure and Function of Chloroplasts in Green Leaf Cells, Halliwell, B., Ed., Oxford Press, Oxford, 180-206.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M.C., 1989. Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford, Clarendon Press.
- Hau, Y.T., Kao, C.H., 2002. Cadmium Toxicity is Reduced by Nitric Oxide in Rice Leaves. Plant Growth Regul. 42, 227–238.
- Heath, R.L. ve Packer, L., 1968. Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts. I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation, Arch. Biochem. Biophys. 125, 189–198.
- Herbinger, K., Tausz, M., Wonisch, A., ve Grill, D., 2002. Complex Interactive Effects of Drought and Ozone Stress on the Antioxidant Defence Systems of Two Wheat Cultivars. Plant Physiol. Biochem., 40, 691-696.
- Hopkins, W.G., 1995. Introduction to Plant Physiology, The University of Western Ontario, John Wiley and Sons Inc., 423-443 s.
- Hu, Y., Ge, Y., Zhang, C., Ju, T., ve Wangda, C., 2009. Cadmium Toxicity and Translocation in Rice Seedlings are Reduced by Hydrogen Peroxide Pre-Treatment. P. G. R. 59, 51-61.
- Hunt, G. E., Bergen, J. ve Bashir, M., 2002. Medication Compliance and Comorbid Substance Abuse in Schizophrenia: Impact on Community Survival 4 Years After a Relapse. Schizophrenia Research. 54, 253-264.
- Irigoyen, J. J., Emerich, D. W. ve Sacher-Diaz, M., 1992. Alfalfa Leaf Senescence Induced by Drought Stress: Photosynthesis, Hydrogen Peroxide Metabolism, Lipid Peroxidation and Etylene Evolution, Physiol. Plant., 84, 67-72.
- James, R. L., Genz, D., 1981. Ponderosa Pine Seed Treatments: Effects on Seed Germination and Disease Incidence. USDA Forest Service Report, 81,13–4.
- Janda, T., Szalai, G., ve Tari, I., 1999. Hydroponic Treatment waebith Salicylic Acid Decreases the Effects of Chilling Injury in Maize (*Zea mays* L.) Plants. Planta, 208, 175-180.

- Karpinski, S., Reynolds, H., Karpinska, B., Wingsle, G., Creissen, G. ve Mullineaux, P., 1999. Systematic Signaling and Acclimation in Response to Excess Excitation Energy in Arabidopsis, Science, 284, 654–657.
- Kennedy, C. D. ve Gonsalves, F. A. N., 1987. The Action of Divalent Zinc, Cadmium, Mercury, Copper and Lead on The Trans-Root Potential and H<sup>+</sup>, Efflux and Excised Roots, J. Exp. Bot., 38, 800-817.
- Kırbağ Zengin, F. ve Munzuroğlu, Ö., 2003. Fasulye Fidelerinin (*Phaseolus vulgaris* L.) Kök, Gövde ve Yaprak Büyümesi Üzerine Kadmiyum (Cd<sup>++</sup>) ve Civa (Hg<sup>++</sup>)'nın Etkileri, Fen Bilimleri Dergisi, 24, 1, 64-75.
- Kraus T. E., Mc Kersie B. D., ve Fletcher, R. A., 1995. Paclobutrazole Induced Tolerance of Wheat Leaves to Paraquat May Involve Antioxidant Enzyme Activity. J. P. P. 145, 570–576.
- Kovtun, Y., Chiu, W-L., Tena, G., ve Sheen, J., 2000. Functional Analysis of Oxidative Stress-Activated Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade in Plants. Pr. N. Acad Sci. USA. 97, 2940–2945.
- Kumar , P., Tewari, R. K., ve Sharma, P. N., 2007. Modulation of Copper Toxicity-Iduced Oxidative Damage by Excess Supply of Iron in Maize Plants. P.C.R. 399-409.
- Kumar, P., Tewari, R. K., ve Sharma, P. N., 2008. Cadmium Enhances Generation of Hydrogen Peroxide and Amplifies Activities of Catalase, Peroxidases and Superoxide Dismutase in Maize. J.A.& Crop Sci. 931,2250.
- Kupper, J., Ascher, P. ve Neyton, J., 1996. Probing the Pore Region of Recombinant N-Methyl-<sup>a</sup>\_Aspartate Channels Using External and Internal Magnesium Block. Proceedings of the Nat. Ac. of Sci. of the USA 93, 8648—8653.
- Lascano, H. R., Antonicelli, G. E., Luna, C. M., Melchiorre, M. N., Gómez, L. D., Racca, R. W., Trippi, V. S. ve Casano, L. M., 2001. Antioxidant System Response of Different Wheat Cultivars Under Drought, Field and in vitro Studies, Aust. J. Plant Physiol., 28, 1095-1102.
- Levine, R. V., Norenzayan, A., ve Phillbrick, K., 1994. Cross-Culturel Differences in Helping Strangers. J. Cross-Cult. Ph., 32, 543-560.
- Lewitt, J., 1972. Responses of Plants to Environmental Stresses, Academic Press, New York.
- Li, R. H, Gou. P. G., Baum, M., Grando, S. ve Ceccarelli, S., 2006. Evaluation of Chlorophyll Content and Fluorescence Parameters as Indicators of Drought Tolerance in Barley. Agric. Sci. China, 5, 751-757.
- Lidon, F.C. Ramalho, J. ve Henriques, F. S., 1993. Copper Inhibition of Rice Photosynthesis. J. Plant Physiol., 142, 12-17.

- Liebler, D.C., Kling, D.S., Reed, D.J., 1986. Antioxidant Protection of Phospholipid Bilayers by  $\alpha$ -Tocopherol. Control of  $\alpha$ -Tocopherol Status and Lipid Peroxidation by Ascorbic Acid and Glutathione. J. Biol. Chem. 261, 12114–12119.
- Lin, L.S. ve Varner, J.E., 1991. Expression of Ascorbic Acid Oxidase in Zucchini Squash (*Cucurbita pepo* L.), Plant Physiol., 96, 159-165.
- Lin, C. C., ve Kao, C. H., 2001. Abscisic Acid Induced Changes in Cell Wall Peroxidase Activity and Hydrogen Peroxide Level in Roots of Rice Seedlings. Plant Sci., 2, 323, 9.
- Liu, J., Xiong, Z., Li, T., Huang, H., 2004. Bioaccumulation and Ecophysiological Responses to Copper Stress in Two Populations of *Rumex dentatus* L. From Cu Contaminated and Non-Contaminated Sites. En. Exp Bot. 52, 43–51.
- Liu, Z. J., Guo, Y. K., Bai, J. G., 2009. Exogenous Hydrogen Peroxide Changes Antioxidant Enzyme Activity and Protects Ultrastructure in Leaves of Two Cucumber Ecotypes under Osmotic Stress. Journal of Plant Growth Regulation, 29, 171–183.
- Lu, C. ve Zhang, J., 1999. Effect of Water Stress on Photosystem II Photochemistry and Its Thermostability in Wheat Plants, J. Exp. Bot., 50, 1199-1206.
- Mann, C. ve Kleilil, D., 1938. Homocuprein and Heptacuprein, Copper Protein Compounds of Blood and Liver in Mammals, Proc. R. Soc., London, 126, 303-315 s.
- Maxwell, K. ve Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll Fluorescence - A Practical Guide, J. Exp. Bot., 51, 659-668.
- Maksymiec, W., Russa, R., Urbanik-Sypniewska, T., ve Baszynski, T., 1994. Effects of Excess Copper on Photosynthetic Apparatus of Runner Bean Leaves Treated at Two Different Growth Stages. Physio. Plant. 91,715-721.
- Maksymiec, W. 1997. Effect of Copper on Cellular Processes in Higher Plants. P. 34, 321–342.
- Marschner, H., 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. London, Academic Press.
- Mc Kersie, B.D. & Leshem, Y.Y., 1994. Salt Stress. Stress and Stress Coping in Cultivated Plants. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Meharg, A. A., 1994. Integrated Tolerance Mechanisms-Constitutive and Adaptive Plant-Responses to Elevated Metal Concentrations in the Environment. P. C. E. 17, 989–993.
- Meister A., 1983. Selective Modification of Glutathione Metabolism, Science, 220, 472-477.

- Meldrum, N. U. ve Tarr, H. L. A., 1935. The Reduction of Glutathione by the Warburg Christian System, Biochem. J., 29, 108-115.
- Mehlhorn, H., Cottam, D. A., Lucas, P. W. ve Wellburn, A. R., 1987. Induction of Ascorbate Peroxidase and Glutathione Reductase Activities by Interactions of Mixtures of Air Pollutants. Free Radical Res. Commun., 3, 193-197.
- Mehlhorn, H., Lelandais, M., Korth, H. G. ve Foyer, C. H., 1996. Comparison of Ascorbate - Dependent Peroxidase Activity in Horseradish Peroxidase Types I and II and in Leaf Extracts, FEBS Letts., 378, 203-206.
- Mertz, W., 1987. Trace Elements In Human and Animal Nutrition. 1, Ac. P.
- Miyake, C. ve Asada, K., 1992. Tylakoid Bound Ascorbate Peroxidase in Spinach Chloroplasts and Photoreduction of Its Primary Oxidation Product Monodehydroascorbate Radicals in the Tylakoids. Plant Cell Physiol., 33, 541-553.
- Miyake, C. ve Asada, K., 1996. Inactivation Mechanism of Ascorbate Peroxidase at Low Concentrations of Ascorbate, Hydrogen Peroxide Decomposes Compound I of Ascorbate Peroxidase. Plant Cell Physiol., 37, 423-430.
- Mohanty, B.S. ve Hosetti, B.B., 1998. Potential Phytotoxicity of Lead and Cadmium to *Lemna minor* Grown in Sewage Stabilization Ponds, Environ. Pollut., 98, 233-238.
- Monni, S., Salemaa, M., White, C., Tuittila, E. ve Huopalainen, M., 2000. Copper Resistance of *Calluna vulgaris* Originating from The Pollution Gradient of A Cu-Ni Smelter, in Southwest Finland, Environ. Pollut., 109, 211-219.
- Morita, K., Chow, K. L., ve Ueno, N. 1999. Regulation of Body Length and Male Tail Ray Pattern Formation of *Caenorhabditis elegans* by a Member of TGF- $\beta$  Family. Development, 126, 1337-1347.
- Morris, M. L., 2002. Impacts of International Maize Breeding Research in Developing Countries, 1966-98. Mexico.
- Moskova, I., Todorova, D., Alexieva, V., ve Sergiev, I., 2007. Hydrogen Peroxide Pretreatment Alleviates Paraquat Injuries in Pea (*Pisum sativum* L.), C. R. A. B. Sci., 60,10, 1101-1106.
- Moskova, I., Dessislava T., Alexieva, V., Ivanov, S., ve Iskren, S., 2009. Effect of Exogenous Hydrogen Peroxide on Enzymatic and Non Enzymatic Antioxidants in Leaves of Young Pea Plants Treated With Paraquat. P. G. R. 57, 193-202, 10, 1007.
- Munzuroğlu Ö. ve Geçkil H., 2002. Effects of Metals on Seed Germination, Root Elongation, Coleoptile and Hypocotyl Growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*, Environ. Cont. & Toxi., 43, 203-213.

- Murphy, T., Sung, W. W. ve Lin, C. H., 2002. Hydrogen Peroxide Treatment Induces Glutathione Accumulation and Chilling Tolerance in Mung Bean, F. P. B., 29, 1081–1087.
- Nakano, Y. ve Asada, Y., 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-Specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts, Plant Cell Physiol., 22, 867-880.
- Narimanov, A. A., ve Korystov, Y. N., 1997. Low Doses of Ionizing Radiation and Hydrogen Peroxide Stimulate Plant Growth. Biologia Bratislava, 52, 121–4.
- Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hancock, J.T., 2002. Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide as signalling molecules in plants. J. Ex.Bot., 53, 372. (A)
- Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hancock, J. T., 2002. Nitric Oxide is a Novel Component of Abscisic Acid Signalling in Stomatal Guard Cells. P. P. 128,13-16. (B)
- Nishiyama, Y., Ikeda, H. ve Haramaki, N., 1998. Oxidative Stress is Related to Exercise in Tolerance in Patients with Heart Failure, Am. Heart. J., 135, 115.
- Nussbaum, S., Shemutz, D., ve Brunold, C., 1998. Regulation of Assimilatory Sulfate Reduction by Cadmium *Zea mays* L., Plant Physiology, 88, 1407-1407.
- Nyachiro, J. M., Briggs, K. G., Hoddinott, J. ve Johnson-Flanagan, A. M., 2001. Chlorophyll Content, Chlorophyll Fluorescence and Water Deficit in Spring Wheat. Cereal Res. Commun., 29, 135–142.
- Ouzounidou, G., Eleftheriou, E. P. ve Karataglis, S., 1992. Ecophysical and Ultrastructural Effects of Copper in *Thlaspi ochroleucum* (Cruciferae), Can. J. Bot., 70, 947-957.
- Ouzounidou, G., 1994. Root Growth and Pigment Composition in Relationship to Element Uptake in *Silene compacta* Plants Treated With Copper. J. P. N. 17, 933–943.
- Ouzounidou, G., 1995. Cu-Ions Mediated Changes in Growth, Chlorophyll and Other Ion Contents in a Cu-Tolerant *Koeleria splendens*. Biologia Plantarum, 37, 71-78.
- Ouzounidou, G., Moustakas, M. ve Eleftheriou, E. P., 1997. Physiological and Ultrastructural Effects of Cadmium on Wheat (*Triticum aestivum* L.) Leaves, Arch. En. Contam. Toxicol., 32, 154–160.
- Pastori, G. M. ve Trippi, V. S., 1992. Oxidative Stress Induces High Rate of Glutathione Reductase Synthesis in A Drought Resistant Maize Strain. Plant Cell Physiol., 33, 957-961.
- Pätsikkä, E, Kairavuo, M., Aro, E. M., 2002. Excess Copper Predisposes Photosystem II to Photoinhibition in Vivo by Outcompeting Iron and Causing Decrease in Leaf Chlorophyll. P. Physiol. 129, 1359–1367.



- Pervezny, K., Nagata, R., Richard, N., Collins, R.J., ve Carroll, A., 2001. Investigation of Seed Treatments for Management of Bacterial Leaf Spot of Lettuce. P. D. 86, 151–5.
- Pinheiro, H. A., Da Matta, F. M., Chaves, A. R. M., Fontes, E. P. B. ve Loureiro, M. E., 2004. Drought Tolerance in Relation to Protection Against Oxidative Stress in Clones of *Coffea canephora* Subjected to Long-Term Drought. Plant Sci., 167, 1307-1314.
- Polidoros, A. N., Scandalios, J. G., 1999. Role of Hydrogen Peroxide and Different Classes of Antioxidants in the Regulation of Catalase and Glutathione *S*-Transferase Gene Expression in Maize (*Zea mays* L.). Physiol Plant. 106, 112–120.
- Poschenrieder, C. H., Gunse, B., ve Barcelo, J., 1989. Water Relations and Cell Wall Elasticity in Cadmium Treated Bush Bean Plants, P. Ph., 90, 1365-1371.
- Pourakbar, L., Khayami, M., Khara, J., Farbodnia, T., 2007. Copper-Induce Change in Antioxidative System in Maize (*Zea mays* L.). P. J. B. S., 10, 20, 3662-7.
- Prasad, T., Anderson, M., Martin, B. ve Stewart, C., 1994. Evidence for Chilling-Induced Oxidative Stress in Maize Seedlings and A Regulatory Role for Hydrogen Peroxide, Plant Cell, 6, 65–74.
- Quan, L., Zhang, J., Shi, W., Li, H. Y., 2008. Hydrogen Peroxide in Plants: a Versatile Molecule of the Reactive Oxygen Species Network. J. Integr. Plant Biol. 50, 2-18.
- Qiu, N. W., Lu, Q. T. ve Lu, C. M., 2003. Photosynthesis, Photosystem II Efficiency and the Xanthophyll Cycle in The Salt-Adapted Halophyte *Atriplex centralasiatica*. New Phytol., 159, 479-486.
- Ramachandra R, A., Chaitanya, K.V., Jutur, P.P. ve Sumithra, K., 2004. Differential Antioxidative Responses to Water Stress Among Five Mulberry (*Morus alba* L.) Cultivars. Environ. Exp. Bot., 52, 33-42.
- Rama Devi S., Prasad, M.N.V., 1998. Copper toxicity in macrophyte: Response of antioxidant enzymes and antioxidants. Plant. Sc.,138:157-165.
- Ros Barcelo, A., Munoz, R. ve Sabater, F., 1987. Lupin Peroxidases: I. Isolation and Characterization of Cell Wall-Bound Isoperoxidase Activity. Physiol. Plant., 71, 448-454.
- Sairam, R. K., Shukla, D. S., Saxena, D. C., 1997/98. Stress Induced Injury and Antioxidant Enzymes in Relation to Drought Tolerance in Wheat Genotypes. B. Pl. 40, 357–364
- Sairam, R. K., Deshmuk, P. S. ve Shukla, D. S., 1997. Tolerance of Drought and Temperature Stress in Relation to Increased Antioxidant Enzyme Activity in Wheat, J. Agron. Crop Sci., 178, 171-178.

- Sairam, R. K., Deshmukh, P. S. ve Saxena, D. C., 1998. Role of Antioxidant Systems in Wheat Cultivars Tolerance to Water Stress, Biol. Plant., 41, 387-394.
- Schirmer, R. H., Krauth-Siegel, R. L. ve Schulz, G. E., 1989. Glutathione Reductase, In: Glutathione, Chemical, Biochemical and Medical Aspects, Coenzymes and Cofactors, Dolpin et. al., Ed., Wiley, New York, 187-242 s.
- Seruton, N. S., Berry, A. ve Perham, R. N., 1990. Redesign of the Coenzyme Specificity of A Dehydrogenase by Protein Engineering. Nature, 343, 38-43.
- Sgherri, C. L. M., Pinzino, C., Navari-Izzo, F., 1996. Sunflower Seedlings Subjected to Increasing Stress by Water Deficit: Changes in  $O_2^-$  Production Related to the Composition of Thylakoid Membranes. P. P. 96, 446-452.
- Shainberg, O. B., Rubin, H. D., ve Rabinowitch, E., 2001. Loading Beans With Sublethal Levels of Copper Enhances Conditioning to Oxidative Stress. J. Plant Physiol., 158, 11, 1415-1421.
- S'lesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S., ve Miszalski, Z., 2007. The Role of Hydrogen Peroxide in Regulation of Plant Metabolism and Cellular Signalling in Response to Environmental Stresses, Acta Biochim. Pol., 54, 39-50.
- Smirnoff, N., 1993. The Role of Active Oxygen in the Response of Plants to Water Deficit and Desiccation. New Phytol., 125, 27-58.
- Somashekaraiah, B. V., Padmaja K. ve Prasad, A. R. K., 1992. Phytotoxicity of Cadmium Ions on Germinating Seedlings of Mung Bean (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of Lipid Peroxides in Chlorophyll Degradation, Physiol. Plant., 85, 85-89.
- Srivalli, B., Sharma, G. ve Khanna-Chopra, R., 2003. Antioxidative Defences System in Upland Rice Cultivar Subjected to Increasing Intensity of Water Stress Followed by Recovery. Physiol. Plant., 119, 503-512.
- Stahl, W. ve Sies, H., 2002. Introduction: Reactive Oxygen Species. Research Monographs. 1 – 2 s.
- Streb, P., Michael-Knauf, A. ve Feierabend, J., 1993. Preferential Photoinactivation of Catalase and Photoinhibition of Photosystem II are Common Early Symptoms Under Various Osmotic and Chemical Stress Conditions. Physiol. Plant., 88, 590-598.
- Street, H.E. ve Öpik, H., 1984. The Physiology of Flowering Plants: Their Growth and Development. Baltimore.
- Tambussi, E. A., Bartoli, C. G., Beltrano, J., Guiamet, J. J. ve Araus, J. L., 2000. Oxidative Damage to Tylakoid Proteins in Water-Stressed Leaves of Wheat (*Triticum aestivum*), Physiol. Plant., 108, 398-404.

- Tanyolaç, D., Ekmekçi, Y. ve Ünalın, Ş., 2007. Changes in Photochemical and Antioxidant Enzyme Activities in Maize (*Zea mays* L.) Leaves Exposed to Excess Copper, Chemosphere, 67, 89-98.
- Tewari, R.K., Hahn, E.J., Paek, K.Y., 2008. Modulation of copper toxicity-induced oxidative damage by nitric oxide supply in the adventitious roots of *Panax ginseng*. P.C. Rep., 27, 171–181.
- Thompson, D.Q., R.L. Stuckey & E.B. Thompson. 1987. Spread, Impact, and Control of Purple Loosestrife (*Lythrum salicaria*) in North American Wetlands. U.S. Fish & W. Service.
- Urbanek, H., Kuzniak-Gebarowska, E. ve Herka, K., 1991. Elicitation of Defense Responses in Bean Leave By *Botrytis cinerea* Polygalacturanase, Acta Physiol. Plant., 13, 43-50.
- URL-1, <http://www.mta.gov.tr>. 11 Mart 2011.
- URL-2, <http://www.inchem.org>. 10 Şubat 2011.
- URL-3, <http://www.healthy.net>. 10 Şubat 2011.
- URL-4, <http://www.usgs.gov/Copper>. 27 Nisan 2011.
- URL-5, <http://www.usgs.gov/Copper>. 27 Nisan 2011.
- URL-6, <http://ekutup.dpt.gov.tr/madencil/metalmad/oik638.pdf>. 15 Aralık 2010.
- Vanacker, H., Carver, T.L.W. ve Foyer, C.H., 1998a. Pathogen-Induced Changes in the Antioxidant Status of the Apoplast in Barley Leaves, Plant Physiol., 117, 1103-1114.
- Van Breusegem, F., Vranová, E., Dat, J. F., ve Inze, D., 2001. The Role of Active Oxygen Species in Plant Signal Transduction. Plant Science. 161, 405-414.
- Van Camp, W., Van Montagu, M., ve Inze, D., 1998. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO:Redox Signals in Disease Resistance. Trends Plant Sci. 3, 330–334.
- Vandenabeele, S., Van Der Kelen, K., Dat, J., Rottiers, P., Slooten, L., Van Montagu M, Zabeau, M., vd., 2003. A Comprehensive Analysis of Hydrogen Peroxide-Induced Gene Expression in Tobacco. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 100, 16113–16118.
- Van Kooten, O. ve Snel, J.F.H., 1990. The Use of Chlorophyll Fluorescence Nomenclature in Plant Stress Physiology. Photosynth.Res., 25, 147–150.
- Velikova, V., Yordanov, I. ve Edreva, A., 2000, Oxidative Stress and Some Antioxidant Systems in Acid Rain-treated Bean Plants: Protective Roles of Exogenous Polyamines. Plant Sci., 151, 59-66.

- Vionella, A., ve Macri, F., 1991. Generation of Superoxide Anion and Hydrogen Peroxide at Surface of Plant. Cell J. Bioenrg. Biomemb., 23, 409-423.
- Wahida, B., A. Rahman ve C. Nabil. 2007. Antiulcerogenic Activity of *Zizyphus lotus* L., Extracts. J. Ethnopharm., 112, 228-231.
- Weser, U., Schubotz, L. M. ve Younes, M., 1979. In: Copper in the Environment, Kısım II: Health Effects, J. O. Nriagu, Ed., John Wiley ve Sons. Toronto.
- Xu, J. F., Jin, W. C., Liu, J. W., Zhang, Y. S., ve Lin, X. Y., 2011. Pretreatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Alleviates Al-induced oksidative Stress in Wheat Seedlings. J. of I. P. B. 53, 1, 44-53.
- Yruela, I., 2005. Copper in plants. Braz. J. Plant Physiol., 17,145–156.
- Zhang, J., Cui, S., Li., J ve Kirkham, M.B., 1995. Protoplasmic Factors, Antioxidant Responses, and Chilling Resistance in Maize. Plant Physiol. Biochem., 33, 567-575.
- Zhang, J. ve Kirkham, M. B., 1996. Antioxidant Responses to Drought in Sunflower and Sorghum Seedlings. New Phytol., 132, 361-373.
- Zhang, X., Zhang, L., Dong, F., Gao, J., Galbraith, D.W., Song, C.P. , 2001. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is Involved in Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure in *Vicia faba*. P. Ph. 126, 1438–1448.

## ÖZGEÇMİŞ

Nihan BİŞKİN, 10.10.1986 yılında Mardin/Nusaybin'de doğdu. İlk ve orta öğretimini İstanbul Kanarya İlköğretim Okulunda tamamladı. Lise hayatını İstanbul Çamlıca Kız Lisesi'nde tamamladı. 2003 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Rize Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimine başladı. Biyoloji Bölümünden 2007'de mezun oldu. 2008 yılı bahar döneminde Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 2009-2010 tarihleri arasında Avusturya-Viyana BodenKultur Üniversitesinde Erasmus öğrencisi olarak bulundu ve bu programı tamamladı. 2010 Eylül'de başladığı Anadolu Üniversitesi İktisat Fakültesi Uluslararası İlişkiler lisans öğrenimi devam etmekte olup, aynı zamanda K.T.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim dalında yüksek lisans öğrencisidir. İyi derecede İngilizce, Almanca ve Farsça bilmektedir.