

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BAKIR STRESİNE MARUZ BIRAKILAN HASSAS VE DAYANIKLI MISIR  
ÇEŞİTLERİNDE GLUTATYON, HİDROJEN PEROKSİT VE SALİSİLİK ASİT  
UYGULAMALARININ FOTOSENTETİK VERİM ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**Yüksek Biyolog Fuat YETİŞSİN**

**HAZİRAN 2015  
TRABZON**



**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BAKIR STRESİNE MARUZ BIRAKILAN HASSAS VE DAYANIKLI MISIR  
ÇEŞİTLERİNDE GLUTATYON, HİDROJEN PEROKSİT VE SALİSİLİK ASİT  
UYGULAMALARININ FOTOSENTETİK VERİM ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Yüksek Biyolog Fuat YETİŞSİN**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde**  
**"DOKTOR (BİYOLOJİ)"**  
**Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 11 / 05 / 2015**

**Tezin Savunma Tarihi : 10 / 06 / 2015**

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

**Trabzon 2015**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Biyoloji Anabilim Dalında  
Fuat YETİŞSİN Tarafından Hazırlanan**

**BAKIR STRESİNE MARUZ BIRAKILAN HASSAS VE DAYANIKLI MISIR  
ÇEŞİTLERİNDE GLUTATYON, HİDROJEN PEROKSİT VE SALİSİLİK ASİT  
UYGULAMALARININ FOTOSENTETİK VERİM ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 12 /05 /2015 gün ve 1602 sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda  
**DOKTORA TEZİ**  
olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Üyeleri**

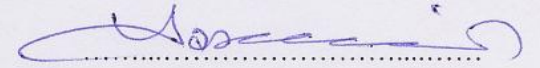
**Başkan : Prof. Dr. İsmail TÜRKAN**

**Üye : Prof. Dr. Atalay SÖKMEN**

**Üye : Doç. Dr. Rabiye TERZİ**

**Üye : Doç. Dr. Yasemin ÖZDENER KÖMPE**

**Üye : Doç. Dr. Aykut SAĞLAM**



**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

“Bakır Stresine Maruz Bırakılan Hassas ve Dayanıklı Mısır Çeşitlerinde Glutasyon, Hidrojen Peroksit ve Salisilik Asit Uygulamalarının Fotosentetik Verim Üzerine Etkilerinin Araştırılması” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Öncelikle doktora tez çalışmalarım süresince danışmanlığımı üstlenerek, her aşamada bana yol gösteren, muhterem hocam Doç. Dr. Rabiye TERZİ’ye teşekkür ederim. Ayrıca, çalışmanın birçok noktasında eleştiri, öneri ve katkılarıyla yolumuzu aydınlatan değerli hocamız Prof. Dr. Asım KADIOĞLU’na, araştırmalarım süresince laboratuvar tecrübesi, eleştiri, tartışma ve her türlü imkânıyla desteğini her zaman hissettiğim sayın hocamız Doç. Dr. Aykut SAĞLAM’a büyük bir sabır ve alaka ile beni destekledikleri için en içten şükranlarımı arz ederim. Tezin bütün aşamalarında birlikte çalıştığım arkadaşım Arş. Gör. Mehmet DEMİRALAY’a ve tezin yazım aşamasında yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Tuba ACET’e çok teşekkür ederim. Ayrıca, desteklerinden dolayı KTÜ, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bitki Fizyolojisi Araştırma Laboratuvarı araştırmacılarına ve çalışmalarına destek veren Doç. Dr. Neslihan SARUHAN, Arş. Gör. Betül ÇİÇEK, Ahmet YEDİYILDIZ, Asiye SEZGİN, Cansu HACISALİHOĞLU, Sevgi KONAR, Lokman KÜÇÜK ve Abdullah Erkam ŞAHİN’e, Arş. Gör. Nesrin ÇOLAK, Yrd. Doç. Dr. Ersan BEKTAŞ, Yrd. Doç. Dr. Mutlu GÜLTEPE, Arş. Gör. Halil İbrahim GÜLER, Arş. Gör. Çağrı BEKİRCAN, Arş. Gör. Murat E. GÜZEL, Muammer KURNAZ, Mustafa CÜCE, Zeynep ERBAŞ ve tüm KTÜ Biyoloji Bölümü çalışanlarına şükranlarımı sunarım. HPLC ile SA ve Poliamin ölçümlerinde desteklerinden dolayı Doç. Dr. Ahmet YAŞAR ve Zeynep ŞAHİNBAŞ’a, bakır konsantrasyonu ölçümlerindeki desteklerinden dolayı Doç. Dr. Gülriz Bayçu KAHYAOĞLU ve Arş. Gör. Cengiz KARAİSMAİLOĞLU’na teşekkür ederim.

Bu çalışmayı 113Z017 nolu proje ile desteklerinden dolayı TÜBİTAK’a teşekkür ederim.

Fuat YETİŞSİN  
Trabzon 2015

## **TEZ ETİK BEYANNAMESİ**

Doktora Tezi olarak sunduğum “Bakır Stresine Maruz Bırakılan Hassas ve Dayanıklı Mısır eşitlerinde Glutasyon, Hidrojen Peroksit ve Salisilik Asit Uygulamalarının Fotosentetik Verim Üzerine Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. Rabiye TERZİ'nin sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, 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. 10/05/2015

Fuat YETİŐŐİN

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ .....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	XII
TABLolar DİZİNİ.....	XVI
KISALTMALAR DİZİNİ .....	XVII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. Stres ve Stres Çeşitleri.....	4
1.2.1. Ağır Metal Stresi.....	6
1.2.2. Stres Dayanıklılığı .....	7
1.2.3. Bakır Stresine Dayanıklılık .....	8
1.3. Ağır Metaller .....	8
1.3.1. Ağır Metallerin Genel Özellikleri.....	8
1.3.2. Ağır Metallerin Biyokimyasal Özellikleri.....	9
1.3.3. Ağır Metallerin Bitkiler Tarafından Alınımı ve Taşınması.....	10
1.3.3.1. Ağır Metallerin Köklerle Alınımı .....	10
1.3.3.2. Ağır Metallerin Köklerle Taşınması.....	10
1.3.4. Bakır .....	11
1.3.4.1. Bakırın Özellikleri ve Kullanımları .....	12
1.3.4.2. Bakırın Bitkilere Toksik Etkisi .....	12
1.4.1. Bakır Stresinin Yaprak Su potansiyeli Üzerine Etkisi.....	13
1.4.2. Bakır Stresinin Kuru Ağırlık Üzerine Etkisi .....	13
1.4.3. Bakır Stresinin Fotosentetik Gaz Değişimi Üzerine Etkisi .....	14
1.4.4. Bakır Stresinin Klorofil Flüoresansı Üzerine Etkisi.....	14
1.4.5. Stresin Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Üzerine Etkisi .....	15
1.4.5.1. Serbest Radikaller .....	16
1.4.5.1.1. Süperoksit Radikali ( $O_2^{\bullet-}$ ) .....	16

1.4.5.1.2.	Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	17
1.4.5.1.2.1.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Üretiminden Sorumlu Enzim, NADPH Oksidaz .....	18
1.4.5.1.3.	Hidroksil Radikali (·OH) .....	19
1.4.5.1.4.	Singlet Oksijen ( <sup>1</sup> O <sub>2</sub> ) .....	20
1.4.5.2.	Reaktif Oksijen Türlerine Karşı Geliştirilen Savunma Mekanizmaları .....	20
1.4.5.2.1.	Antioksidan Sistem.....	21
1.4.5.2.1.1.	Antioksidan Sistemin Enzimatik Olmayan Bileşenleri .....	21
1.4.5.2.1.1.1.	Glutasyon (GSH) .....	21
1.4.5.2.1.1.2.	Salisilik Asit (SA).....	23
1.4.5.2.1.1.3.	Stresin Poliaminler (PA) Üzerine Etkisi.....	25
1.4.5.2.1.1.4.	Stresin Prolin Üzerine Etkisi .....	26
1.4.5.2.1.2.	Antioksidan Sistemin Enzimatik Bileşenleri .....	27
1.4.5.2.1.2.1.	Süperoksit Dismutaz (SOD).....	27
1.4.5.2.1.2.2.	Katalaz (CAT) .....	28
1.4.5.2.1.2.3.	Peroksidaz (POD).....	29
1.4.5.2.1.2.4.	Askorbat Peroksidaz (APX) .....	30
1.4.5.2.1.2.5.	Glutasyon Redüktaz (GR).....	31
1.4.6.	Stres ve Membran Hasarı.....	32
1.4.7.	Stres ve Absisik Asit.....	32
1.4.7.1.	Absisik Asitin Yapısı.....	33
1.4.7.2.	ABA Biyosentezi ve Katabolizması .....	33
1.5.	Mısır ( <i>Zea mays L.</i> ) Hakkında Genel Bilgiler .....	35
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	37
2.2.	Stres Parametrelerinin Belirlenmesine Yönelik Ölçümler .....	38
2.2.1.	Su Potansiyeli Belirlenmesi.....	38
2.2.2.	Fotosentetik Pigmentlerin Tayini .....	38
2.2.3.	Lipid Peroksidasyonu Tayini .....	39
2.2.4.	Prolin Tayini .....	39
2.2.5.	Poliamin Tayini .....	39
2.3.	Dıştan Uygulanan Maddelerin İçsel İçeriklerinin Belirlenmesi .....	40
2.3.1.	Bakır Analizi.....	40

2.3.2.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> İçeriğinin Belirlenmesi.....	40
2.3.3.	GSH İçeriğinin Belirlenmesi .....	41
2.3.4.	SA İçeriğinin Belirlenmesi .....	41
2.4.	Fotosentezle İlgili Parametrelerin Ölçülmesi .....	42
2.4.1.	Kuru Ağırlık.....	42
2.4.2.	Fotosentetik CO <sub>2</sub> Oranı ve Transpirasyonun Ölçülmesi .....	42
2.4.3.	Klorofil Flüoresans Analizleri.....	42
2.4.4.	Rubisco Aktivitesi ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi .....	43
2.4.4.1.	Rubisco Aktivitesi .....	43
2.4.4.2.	Rubisco Konsantrasyonu .....	44
2.5.	Enzim Aktivitelerinin Tayini.....	44
2.5.1.	Antioksidan Enzimler İçin Ekstrakt Hazırlanması .....	44
2.5.1.1	Guaiakol Peroksidaz (GPX) Aktivitesinin Tayini .....	45
2.5.1.2.	Katalaz (CAT) Aktivitesinin Tayini .....	45
2.5.1.3.	Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini.....	45
2.5.1.4.	Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesinin Tayini .....	45
2.5.1.5.	Glutatyon Redüktaz (GR) Aktivitesinin Tayini.....	46
2.5.2.	NADPH Oksidaz (NOX) İçin Ekstrakt Hazırlanması .....	46
2.5.2.1.	NADPH Oksidaz (NOX) Aktivitesinin Tayini.....	46
2.6.	Protein Tayini .....	47
2.7.	<i>NOX</i> , <i>GSHSY</i> ve <i>AAOX</i> Gen İfadelerinin Belirlenmesi.....	47
2.7.1.	Total RNA izolasyonu ve cDNA Sentezi .....	47
2.7.2.	Real Time PCR (qRT-PCR) .....	47
2.8.	İçsel ABA Tayini.....	49
2.9.	İstatistik Analizler.....	49
3.	BULGULAR.....	50
3.1.	GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA Uygulamalarının Bakır İçeriği ve Çeşitli Stres Parametreleri Üzerine Etkisi .....	50
3.1.1.	İçsel Bakır İçeriği Üzerine Etkisi .....	50
3.1.2.	Su Potansiyeli Üzerine Etkisi .....	51
3.1.3.	Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkisi .....	53



3.1.4.	İçsel Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) İçeriği Üzerine Etkisi.....	54
3.2.	GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA Uygulamalarının Fotosentetik Parametreler Üzerine Etkisi.....	56
3.2.1.	Kuru Ağırlık Üzerine Etkisi.....	56
3.2.2.	Fotosentetik Pigment İçeriği Üzerine Etkisi.....	57
3.2.2.1.	Toplam Klorofil İçeriği Üzerine Etkisi.....	57
3.2.2.2.	Karotenoid İçeriği Üzerine Etkisi.....	59
3.2.3.	Klorofil Floresans Parametreleri Üzerine Etkisi.....	60
3.2.3.1.	PSII Maksimum Kuantum Verimi (F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub> ) Üzerine Etkisi .....	60
3.2.3.2.	Fotokimyasal Verim (Φ <sub>PS2</sub> ) Üzerine Etkisi .....	62
3.2.3.3.	Fotokimyasal Olmayan Floresans Kullanımı (NPQ) Üzerine Etkisi.....	63
3.2.3.4.	Elektron Taşınım Oranı (ETR) Üzerine Etkisi .....	65
3.2.4.	Fotosentetik Gaz Değişim Parametreleri Üzerine Etkisi.....	66
3.2.4.1.	Transpirasyon Oranı (E) Üzerine Etkisi .....	66
3.2.4.2.	İçsel CO <sub>2</sub> (C <sub>i</sub> ) Miktarı Üzerine Etkisi.....	68
3.2.5.	Fotosentez Hızı (P <sub>n</sub> ) Üzerine Etkisi .....	69
3.2.6.	Rubisco Aktivitesi ve Konsantrasyonu Üzerine Etkisi.....	71
3.2.6.1.	Rubisco Aktivitesi Üzerine Etkisi .....	71
3.2.6.2.	Rubisco Konsantrasyonu Üzerine Etkisi .....	72
3.3.	GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA Uygulamalarının Antioksidan Sistem Üzerine Etkisi .....	74
3.3.1.	Antioksidan Enzimler Üzerine Etkisi .....	74
3.3.1.1.	Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Üzerine Etkisi .....	75
3.3.1.2.	Bakır Stresinin Katalaz (CAT) Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	76
3.3.1.3.	Bakır Stresinin Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	78
3.3.1.4.	Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesi Üzerine Etkisi .....	79
3.3.1.5.	Bakır Stresinin Guaikol Peroksidaz (GPX) Aktivitesi Üzerine Etkisi .....	81
3.3.2.	Antioksidan Maddeler Üzerine Etkisi .....	82
3.3.2.1.	İçsel GSH İçeriği Üzerine Etkisi .....	82
3.3.2.2.	Glutasyon Sentetaz (GSHSY) Gen İfadesi Üzerine Etkisi.....	84
3.3.2.3.	İçsel SA İçeriği Üzerine Etkisi .....	85
3.3.2.4.	Prolin İçeriği Üzerine Etkisi .....	87
3.3.2.5.	Poliamin İçeriği Üzerine Etkisi .....	88

3.4.	GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA Uygulamalarının NOX ve ABA Üzerine Etkisi.....	90
3.4.1.	NADPH Oksidaz (NOX) Aktivitesi Üzerine Etkisi .....	90
3.4.2.	NADPH Oksidaz (NOX) Gen İfadesi Üzerine Etkisi .....	91
3.4.3.	Absisik Asit (ABA) İçeriği Üzerine Etkisi.....	93
3.4.4.	Absisik Aldehit Oksidaz (AAOX) Gen İfadesi Üzerine Etkisi.....	94
4.	TARTIŞMA.....	96
5.	SONUÇLAR.....	109
6.	ÖNERİLER.....	113
7.	KAYNAKLAR.....	115
ÖZGEÇMİŞ		

Doktora Tezi

ÖZET

BAKIR STRESİNE MARUZ BIRAKILAN HASSAS VE DAYANIKLI MISIR  
ÇEŞİTLERİNDE GLUTATYON, HİDROJEN PEROKSİT VE SALİSİLİK ASİT  
UYGULAMALARININ FOTOSENTETİK VERİM ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI

Fuat YETİŞSİN

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Doç. Dr. Rabiye TERZİ  
2015, 142 Sayfa

Bu çalışmada, glutatyon (GSH), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve salisilik asit (SA) ön muamelesinin bakır stresi koşullarındaki bakıra dayanıklı (31G98) ve hassas (Akpınar) mısır çeşitlerinde antioksidan sistemin fotosentetik verim üzerindeki iyileştirici etkisi araştırılmıştır. Bu uygulamaların su potansiyeli, transpirasyon, membran hasarı, fotosentetik pigment miktarı, içsel bakır,  $H_2O_2$ , GSH ve SA seviyeleri ile kuru ağırlık, prolin miktarı, poliamin miktarı, ABA miktarı, fotosentez oranı, klorofil floresansı, rubisco aktivitesi ve konsantrasyonu üzerine etkisi spektrofotometrik ve western blot yöntemleri ile incelendi. Ayrıca süperoksit dismutaz, katalaz, askorbat peroksidaz, glutatyon redüktaz ve guaikol peroksidaz enzim aktiviteleri ile Absisik aldehit oksidaz (AAOX), glutatyon sentetaz (GSHSY) ve NADPH oksidaz (NOX) genlerinin ifadesi araştırıldı. Bakır stresinin mısır fidelerinde içsel GSH,  $H_2O_2$ , SA, ABA, poliamin, prolin, MDA içeriğini ve NOX, GSHSY, AAOX gen ifadelerini ve antioksidan sistem enzimlerinin aktivitelerini arttırdığı, rubisco içeriğini, fotosentetik aktiviteyi, transpirasyonu, su potansiyelini ve kuru ağırlığı azalttığı saptandı. GSH,  $H_2O_2$  ve SA uygulamalarının her iki çeşitte de antioksidan sistemini uyarmak suretiyle fideleri bakır stresinin olumsuz etkilerinden koruduğu ve fotosentetik verimi farklı oranlarda iyileştirdiği belirlendi. Sonuç olarak; bakır stresi koşullarında 0,05 mM GSH, 10 mM  $H_2O_2$  ve 0,01 mM SA ön muamelelerinin mısır çeşitlerinin fotosentetik verimi için iyileştirici etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Bakır Stresi, Fotosentetik Verim, Glutatyon, Hidrojen Peroksit, Klorofil floresansı, Mısır, Salisilik Asit

PhD Thesis

SUMMARY

INVESTIGATION ON THE PHOTOSYNTHETIC EFFICIENCY EFFECTS OF  
GLUTATHIONE, HYDROGEN PEROXIDE AND SALICYLIC ACID APPLICATIONS  
ON SENSITIVE AND RESISTANT MAIZE VARIETIES EXPOSED TO COPPER STRESS

Fuat YETİŞSİN

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Biology Graduate Program  
Supervisor: Associate prof. Rabiye TERZİ  
2015, 142 Pages

In this study, alleviating effects of glutathione (GSH), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and salicylic acid (SA) pre-treatments on antioxidant system enzymes, the expression of some genes and photosynthetic system of copper stressed maize varieties, 31G98 (resistant to copper) and Akpınar (sensitive to copper) were studied. Effects of these treatments on water content, stomatal conductance, membrane damage, photosynthetic pigment contents, endogenous copper, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH and SA levels, dry weight, growth inhibition, proline amount, polyamine content, ABA content, photosynthetic rate, transpiration, chlorophyll fluorescence, rubisco activity and concentration were examined via spectrophotometry and Western blot methods. In addition, the enzyme activities of superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, glutathione reductase and guaiacol peroxidase and the expression of abscisic aldehyde oxidase (*AAOX*), glutathione synthetase (*GSHSY*) and NADPH oxidase (*NOX*) genes were investigated. Copper stress was found to increase endogenous GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SA, ABA, polyamine, proline, MDA, antioxidant enzyme system and *NOX*, *GSHSY*, *AAOX* gene expression. On the other hand, the stress was decrease the rubisco concentration, photosynthetic activity, transpiration, water potential and dry weight. GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and SA application was found to mitigate negative effects of the stress by induced antioxidant system at different rates in both maize varieties. It was concluded that pretreatments of 0,05 mM GSH, 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 0,01 mM SA had alleviating effects on maize cultivars under copper stress.

**Key Words:** Copper Stress, Chlorophyll Fluorescence, Glutathione, Hydrogen Peroxide, Maize, photosynthetic efficiency, Salicylic Acid

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1. Başlıca stress çeşitleri.....	6
Şekil 2. Moleküler oksijenin indirgenmesi ile ROS oluşum basamakları.....	16
Şekil 3. Hidrojen Peroksitin (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) Moleküler Yapısı .....	18
Şekil 4. NADPH Oksidazın (NOX) Moleküler Yapısı .....	19
Şekil 5. Glutatyon (GSH) Biyosentez Yolu .....	22
Şekil 6. Glutatyonun (GSH) Moleküler Yapısı .....	23
Şekil 8. Bitkilerde prolinin çok yönlü fonksiyonları .....	27
Şekil 9. ABA'nın yapısı .....	33
Şekil 10. ABA Biyosentez Yolu.....	35
Şekil 11. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının yaprak su potansiyeli üzerine etkisi .....	52
Şekil 12. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının yaprak su potansiyeli üzerine etkisi .....	52
Şekil 13. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının lipid peroksidasyonu üzerine etkisi.....	53
Şekil 14. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının lipid peroksidasyonu üzerine etkisi.....	54
Şekil 15. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının içsel H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> içeriği üzerine etkisi .....	55
Şekil 16. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının içsel H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> içeriği üzerine etkisi .....	55
Şekil 17. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının kuru ağırlık üzerine etkisi .....	56
Şekil 18. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının kuru ağırlık üzerine etkisi .....	57
Şekil 19. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının klorofil içeriği üzerine etkisi.....	58
Şekil 20. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının klorofil içeriği üzerine etkisi.....	58
Şekil 21. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının karotenoid içeriği üzerine etkisi.....	59
Şekil 22. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının karotenoid içeriği üzerine etkisi.....	60
Şekil 23. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının Fv/Fm üzerine etkisi .....	61
Şekil 24. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının	

Fv/Fm üzerine etkisi .....	61
Şekil 25. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının ΦPS2 üzerine etkisi.....	62
Şekil 26. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının ΦPS2 üzerine etkisi.....	63
Şekil 27. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının NPQ üzerine etkisi .....	64
Şekil 28. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının NPQ üzerine etkisi .....	64
Şekil 29. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının ETR üzerine etkisi.....	65
Şekil 30. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının ETR üzerine etkisi.....	66
Şekil 31. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının transpirasyon (E) oranı üzerine etkisi .....	67
Şekil 32. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının transpirasyon oranı (E) üzerine etkisi .....	67
Şekil 33. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının içsel CO <sub>2</sub> konsantrasyonu üzerine etkisi .....	68
Şekil 34. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının içsel CO <sub>2</sub> konsantrasyonu üzerine etkisi.....	69
Şekil 35. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının fotosentez hızı (Pn) üzerine etkisi.....	70
Şekil 36. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının fotosentez hızı (Pn) üzerine etkisi.....	70
Şekil 37. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının rubisco aktivitesi üzerine etkisi.....	71
Şekil 38. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının rubisco aktivitesi üzerine etkisi.....	72
Şekil 39. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının rubisco konsantrasyonu üzerine etkisi .....	73
Şekil 40. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının rubisco konsantrasyonu üzerine etkisi .....	73
Şekil 41. Akpınar çeşidinde Rubisco western blot analizleri .....	74
Şekil 42. 31G98 çeşidinde Rubisco western blot analizleri .....	74
Şekil 43. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının SOD aktivitesi üzerine etkisi.....	75
Şekil 44. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının SOD aktivitesi üzerine etkisi.....	76
Şekil 45. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının	

CAT aktivitesi üzerine etkisi.....	77
Şekil 46. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının CAT aktivitesi üzerine etkisi.....	77
Şekil 47. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının APX aktivitesi üzerine etkisi.....	78
Şekil 48. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının APX aktivitesi üzerine etkisi.....	79
Şekil 49. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının GR aktivitesi üzerine etkisi.....	80
Şekil 50. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının GR aktivitesi üzerine etkisi.....	80
Şekil 51. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının GPX aktivitesi üzerine etkisi.....	81
Şekil 52. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının GPX aktivitesi üzerine etkisi.....	82
Şekil 53. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının içsel toplam GSH içeriği üzerine etkisi.....	83
Şekil 54. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının içsel toplam GSH içeriği üzerine etkisi.....	83
Şekil 55. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının <i>GSHSY</i> gen ifadesi üzerine etkisi.....	84
Şekil 56. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının <i>GSHSY</i> gen ifadesi üzerine etkisi.....	85
Şekil 57. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının içsel SA içeriği üzerine etkisi.....	86
Şekil 58. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının içsel SA içeriği üzerine etkisi.....	86
Şekil 59. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının prolin içeriği üzerine etkisi.....	87
Şekil 60. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının prolin içeriği üzerine etkisi.....	88
Şekil 61. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının poliamin içeriği üzerine etkisi.....	89
Şekil 62. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının poliamin içeriği üzerine etkisi.....	89
Şekil 63. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının NOX aktivitesi üzerine etkisi.....	90
Şekil 64. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının NOX aktivitesi üzerine etkisi.....	91
Şekil 65. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının	

<i>NOX</i> gen ifadesi üzerine etkisi.....	92
Şekil 66. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının <i>NOX</i> gen ifadesi üzerine etkisi.....	92
Şekil 67. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının ABA içeriği üzerine etkisi .....	93
Şekil 68. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının ABA İçeriği üzerine etkisi .....	94
Şekil 69. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının <i>AAOX</i> gen ifadesi üzerine etkisi.....	95
Şekil 70. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve SA uygulamalarının <i>AAOX</i> gen ifadesi üzerine etkisi.....	95



## TABLolar DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1. ROS ile ilgili en önemli enzimler ve antioksidanlar (Gechev, 2006). .....	21
Tablo 2. qRT-PCR Bileşenleri .....	48
Tablo 3. qRT-PCR'da kullanılan primerlerin baz dizilişleri .....	48

## KISALTMALAR DİZİNİ

AAOX	: Absisik Aldehit Oksidaz
ABA	: Absisik asit
APX	: Askorbat peroksidaz
CAT	: Katalaz
C <sub>i</sub>	: İçsel CO <sub>2</sub>
C <sub>q</sub>	: Quantification cycle
E	: Transpirasyon
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
ETR	: Elektron Transfer Oranı
F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>	: PSII Maksimum Kuantum Verimi
GPX	: Guaikol Peroksidaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: İndirgenmiş Glutasyon
GSHSY	: Glutasyon Sentetaz
GSSG	: Yükseltgenmiş Glutasyon
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen Peroksit
IRGA	: infrared Gaz Analizi
KA	: Kuru ağırlık
MDA	: Malondialdehit
MPa	: Mega Paskal
NADPH	: Nikotin Amid Adenin Dinükleotit Fosfat
NOX	: NADPH Oksidaz
NPQ	: Fotokimyasal Olmayan Sönme
NSI	: Nispi Su İçeriği

PA	: Poliamin
PAR	: Fotosentetik Aktif Radyasyon
Pn	: Fotosentez Hızı
POD	: Peroksidaz
PS II	: Foto Sistem II
Put	: Putresin
qP	: Fotokimyasal Sönme
qRT-PCR	: Quantative Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SA	: Salisilik Asit
SOD	: Süper Oksit Dismutaz
Spd	: Spermidin
Spm	: Spermin
TA	: Taze ağırlık
TAE	: Tris asetat EDTA
ΦPS2	: Fotokimyasal Verim

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Bitkiler doğal yaşamlarında çeşitli abiyotik streslere maruz kalmaktadırlar (Yılmaz vd., 2011). Bunlardan biriside ağır metal stresidir (Viehweger, 2014). Bitkilerde strese neden olan değişik ağır metaller vardır. Bakır elementi, sahip olduğu kimyasal ve biyolojik özellikleri ile bitkilerdeki ağır metal stresinin başlıca kaynaklarından birisidir (Yruela, 2005) ve bitkilerde önemli fizyolojik, biyokimyasal ve anatomik değişimlere neden olmaktadır (Güzel ve Terzi, 2013). Bakır, bitki dokularında yüksek miktarda biriktiğinde çimlenmenin (Munzuroglu ve Geçgil, 2002; Ahsan vd., 2007) ve kök, gövde büyümesinin gerilemesi (Johansson vd., 2005; Ke vd., 2007), azot ve protein metabolizmasının olumsuz etkilenmesi (Cuypers vd., 2005; Xiong vd., 2006), membran bütünlüğünün ortadan kalkması (Morelli ve Scarano, 2004; Sgherri vd., 2007) ve hormonal dengenin bozulması (Hunter ve Welkie, 1977) gibi canlılıkla ilgili çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal işlevlerin değişmesine sebep olmaktadır. Bakır stresi koşullarında, bitkilerde en çok etkilenen olaylardan biri de fotosentezdir (Mocquot vd., 1996; Frankart vd., 2002). Bakır stresi esnasında bitkilerin fotosentez hızındaki azalma iki etkiden kaynaklanabilir. Birincisi stres etkisiyle stoma kapanmasına bağlı olarak karbondioksit girişinin azalması sonucu gerçekleşen fotosentetik aktivite kaybıdır (Muller ve Whitshitt, 1996; Lima vd., 2002). Ağır metal stresi ile birlikte stoma aracılığı ile gaz geçişindeki azalma fotosentetik karbondioksit asimilasyonunu sekteye uğratar. Bitki kuru ağırlığının % 95 kadarı fotosentezden sağlandığı için fotosentez oranındaki azalmaya paralel olarak kuru ağırlıkta da bir azalma meydana gelir (Viehweger, 2014). İkincisi ise stomaya bağlı olmayan cevaplardır. Örneğin bakır stresi koşullarında bitkilerden izole edilen kloroplastlarda fotosentetik pigment içeriklerinin, fotosentetik elektron transportu ve fotofosforilasyon kapasitelerinin azaldığı gösterilmiştir (Lin ve Aarts, 2012). Yapılan çalışmalarda bakır stresinin tilakoid membranlarının ve membran proteinlerinin yıkımına sebep olduğu, bu yıkımdan fotosistemlerin özellikle fotosistem II'nin daha çok etkilendiği ve bu etkinin sistemde yer alan protein, lipid ve pigment dağılımını olumsuz etkilediği vurgulanmıştır. Ayrıca sözkonusu stres ilerledikçe fotosentetik CO<sub>2</sub> fiksasyonu daha fazla etkilenir. Bakır stresi koşulları altında

ribuloz-1,5-bifosfat karboksilaz/oksigenaz (rubisco)'da yapısal değişimler meydana gelir ve bu durum rubisco aktivitesinin azalması ile sonuçlanır (Mishra ve Dubey, 2005). Araştırmalar, bakır stresinden etkilenen en önemli fotosentetik enzimlerden birisinin rubisco olduğunu göstermiştir (Demirevska-Kepova vd., 2004).

Diğer taraftan bakır, indirgenme yükseltgenme (redoks) olaylarında aktif bir geçiş elementi olarak birçok reaktif oksijen türünün (reactive oxygen species = ROS) oluşumu için de etkili bir katalizördür (Aust vd., 1985; Maksymiec, 1997; Chen vd., 2000; Guo vd., 2007). Zararlı serbest radikallerin üretimini katalize eden en önemli ağır metallerden birisi olan bakır (Palma vd., 1987; Mazhoudi vd., 1997) bir geçiş elementi olması nedeniyle bitkilerde oksidatif strese sebep olan etmenlerin başında yer almaktadır (Aust vd., 1985, Elstner vd., 1988; Dat vd., 2000; Azevedo vd., 2007). Aşırı bakır uygulamaları bu toksik oksijen türlerinin miktarında artışa yol açarak hücrelerin yapı ve işlevlerinde ciddi zararlar meydana getirebilmekte (Pompella, 1997; Demirevska-Kepova vd., 2004; Sgherri vd., 2007), büyümenin azalmasından, organizmanın ölümüne kadar varabilen pek çok değişime neden olabilmektedir (Chen vd., 2000; Gechev vd., 2006; Azevedo vd., 2007). Hücrelerin bütün bileşenlerine zarar verebilme potansiyeline sahip olan bu moleküllerin temizlenebilmesi antioksidan sistemin enzimatik ve enzimatik olmayan bileşenlerine bağlıdır (Thounaojam vd., 2012; Rao vd., 1997; Brahim ve Mohamed, 2011). Bitkilerde tilakoid reaksiyonları sonucu oluşan ROS'ların fotosentetik mekanizmaya zarar vermemesi için antioksidan enzimler tarafından temizlenmesi gerekir (Halliwell ve Gutteridge, 2007). ROS'ların süpürülmesinde bu enzimlerin glutatyon (GSH) ve karotenoidler gibi antioksidan moleküller tarafından desteklenmesi de gerekmektedir (Gechev, 2006).

Bitkilerin bakır stresi koşullarında çeşitli osmolitler biriktirdikleri bilinmektedir. Bu kapsamda prolin ve poliaminler en iyi bilinen osmolitlerdir. Ayrıca bu bileşiklerin antioksidan olarak görev yaptıkları bazı çalışmalarla gösterilmiştir (Kadıoğlu ve Terzi, 2007; Türkan ve Demiral, 2009; Alcázar vd., 2010; Minocha vd., 2010). Örneğin bakır stresine maruz kalan bitkiler, çeşitli dokularında prolin konsantrasyonunu arttırarak strese yanıt vermektedirler. Bakır stresine maruz kalan bir çok bitkinin dokularında prolin biriktiği kaydedilmiştir (Ku vd., 2012). Yine, dıştan uygulanan poliaminlerin çeşitli abiyotik stres koşullarındaki kültür bitkilerinin toleransını arttırdığı ve böylece verimi arttırdığı bilinmektedir (Zhao ve Yang, 2008; Yang vd., 2011). Bakır ve kadmiyum stresine maruz kalan bitkilerde putresin miktarının

kontrole göre arttığı, spermidin ve spermin miktarının ise azaldığı rapor edilmiştir (Groppa vd., 2003).

Bitkiler, yukarıda belirtilen içsel mekanizmalarla bakır stresinin olumsuz etkilerini bertaraf etmek konusunda yetersiz olabilirler. Bu nedenle araştırmacılar genetik iyileştirme veya kimyasal muamelelerle stres toleransının artırılmasına yönelik çalışmalar yürütmektedirler. Bunlardan genetik mühendisliği yöntemleriyle bitki üretme stratejisi ile bitkilerde tolerans geliştirmek daha uzun zaman alan ve daha kompleks işlemlerdir (Ashraf vd., 2008). Bitki büyümesini uyaran kimyasalların bitkilere uygulanması ise stres toleransını artırmak için kolay, düşük maliyetli, düşük riskli ve etkili bir yaklaşımdır (He vd., 2009; Hamdia ve Shaddad, 2010). Söz konusu kimyasallar arasında özellikle antioksidanlar, sinyal bileşikler, bitki büyüme düzenleyicileri ve osmoprotektanlar öne çıkmaktadır. Stres koşullarında  $H_2O_2$  ve salisilik asit (SA) gibi sinyal bileşiklerin ve glutatyon (GSH) gibi antioksidanların bitkilere uygulanması, stresin büyüme ve verim üzerindeki olumsuz etkilerini azaltmak için kullanılmaktadır (Taşgın vd., 2006; Hu vd., 2009; Chen vd., 2010). Bu sebeple söz konusu uygulamaların bakır stresine maruz bırakılan mısır fidelerinde stresin olumsuz etkilerini azaltıp azaltmadığını belirlemek için bakır içeriği, yaprak su potansiyeli, lipid peroksidasyonu ve hidrojen peroksit içeriği belirlenmiştir. Bununla birlikte, bakır stresi altındaki bitkilerde  $H_2O_2$ , SA ve GSH ön muamelelerinin klorofil floresans parametreleri ve fotosentetik gaz değişimi üzerine etkileri ile ilgili literatürde sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Diğer taraftan söz konusu uygulamaların bakır stresi koşullarında fotosentetik verim üzerinde nasıl etki oluşturduğu tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada dışarıdan uygulanan  $H_2O_2$ , SA ve GSH'nın bakır stresi koşulları altında fotosentetik verimi koruyabileceğine dair bir hipotez geliştirilmiştir. Bu hipotezi test etmek için transpirasyon, içsel  $CO_2$  oranı, fotosentetik pigment içerikleri, kuru ağırlık, fotosentez hızı, klorofil floresans parametreleri ile rubisco aktivitesi ve içeriği belirlenmiştir.

Yukarıda da ifade edildiği gibi bakır stresinden kaynaklanan ve fotosenteze büyük ölçüde hasar veren, oksidatif stresin etkilerinin azaltılması çoğu zaman antioksidan sistemin etkinleştirilmesi ile gerçekleşir. GSH, SA ve  $H_2O_2$  uygulamalarının bakır stresi koşullarında antioksidan sistemi uyardıkları bazı çalışmalarla gösterilmiştir (Hayat vd, 2013). Mevcut çalışmada, söz konusu uygulamalarla fotosentetik verimde meydana gelecek artışların antioksidan sistemin uyarılmasından mı kaynaklandığını belirlemek amacıyla antioksidan

enzim aktiviteleri (süperoksit dismutaz, katalaz, askorbat peroksidaz, guaiakol peroksidaz ve glutasyon reduktaz), GSH içeriği, antioksidan özellik gösterebilen SA (Neelam vd. 2014), prolin ve poliamin içerikleri ve glutasyon sentetaz geninin ifade seviyesi belirlenmiştir. Ayrıca NADPH oksidaz (NOX) aktivitesi ile üretilen  $H_2O_2$ 'nin stres koşullarında antioksidan sistemi teşvik ettiği çeşitli çalışmalarla bildirilmiştir (Rejeb vd., 2015). Bu çalışmalardan birisi olan Rejeb vd., (2015), dışarıdan uyguladıkları bazı kimyasallarla (difenil iodyum, imidazol, dimetiltiyöüre) NADPH oksidaz aktivitesinden kaynaklanan içsel  $H_2O_2$  seviyesinin azaldığını belirlemişler ve çalışma sonucunda antioksidan enzimlerde ciddi aktivite azalması tespit etmişlerdir. Bu sebeple, mevcut çalışmada bakır stresi koşullarında dışarıdan SA, GSH ve  $H_2O_2$  uygulamaları ile NOX aktivitesi ve geninin ifade seviyeleri belirlenerek, bu genin bakır stresi altında antioksidan sistemin uyarılmasında rolü olup olmadığı araştırılmıştır. Ayrıca, NADPH oksidaz aktivitesi sonrasında üretilen ROS'ların ABA ile etkileşime girerek antioksidan sistemi etkinleştirdiği de bilinmektedir (Jiang ve Zhang, 2002). Bu nedenle mevcut çalışmada, içsel ABA içeriği ve ABA sentezinde görev alan absisik aldehit oksidaz enzimini kodlayan absisik aldehit oksisaz geninin (AAOX) ifade seviyesi de incelenmiştir.

Öte yandan bitkilerin strese dayanıklılık seviyeleri birbirinden farklı olduğu gibi aynı türün farklı varyetelerinde de bu çeşitlilik göze çarpmaktadır. Bitkilerin strese cevap mekanizmaları da değişiklik arz edebilir. Mevcut çalışmada bakır stresine karşı dayanıklı ve hassas oldukları bilinen iki farklı mısır çeşidinin tercih edilme nedeni de bakır stresine cevapta hangi mekanizmaların tercih edildiğini belirlemektir. Bu çalışma ile SA,  $H_2O_2$  ve GSH uygulamalarının bakır stresi altındaki iki farklı mısır çeşidinin fotosentetik verimi üzerine etkisi incelenerek, bu etki antioksidan sistemle ilişkilendirilmiştir. Söz konusu uygulamaların etkisi fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler çalışmalarla desteklenmiştir.

## 1.2. Stres ve Stres Çeşitleri

Canlılarda normal sistemin fonksiyonlarını inhibe etme eğiliminde olan olumsuz etkiler ya da kuvvetler stres olarak tanımlanmaktadır (Kadıoğlu, 2011). Stres terimi aynı zamanda bitkilerde hasar oluşturma potansiyelini de kapsar. Bir metabolizma bozukluğunun sonucunda oluşan bu hasarlar bitkinin büyümesinde ve veriminde azalma meydana getirirler (Hale ve

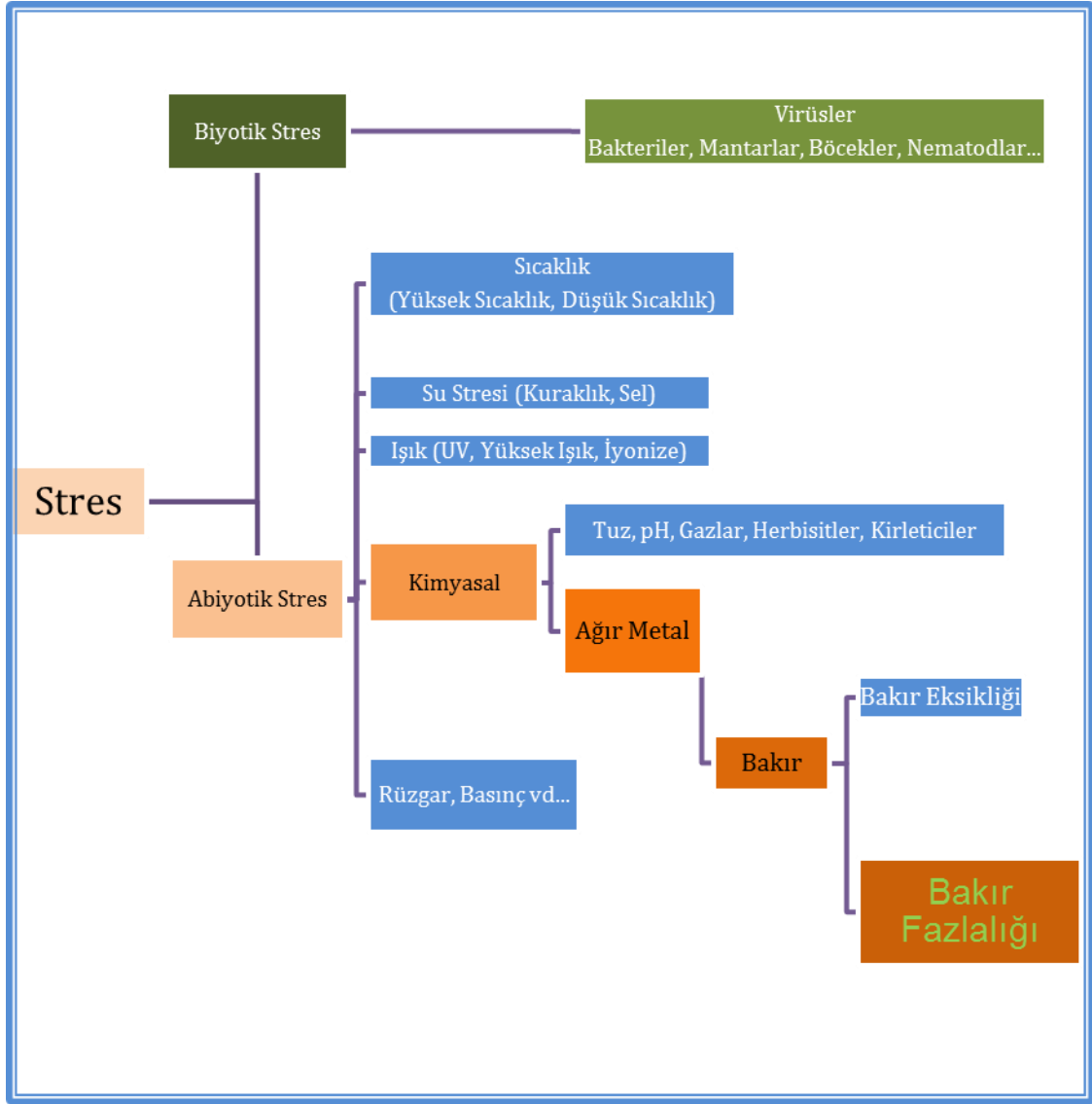
Orcutt, 1987). Stres çoğunlukla, bitkinin üzerinde olumsuz etki oluşturan dışsal bir etmen olarak tanımlanmaktadır ( Taiz ve Zeiger, 2008 ).

Bitkilerin maruz kaldığı başlıca stres faktörleri, biyotik ve abiyotik olmak üzere ikiye ayrılabilir (Şekil 1). Abiyotik stres faktörleri: soğuk, sıcak, kuraklık, tuzluluk, su fazlalığı, radyasyon, çeşitli kimyasallar, oksidatif stres, rüzgar ve besin yetersizliğinden; biyotik stres faktörleri ise: virüs, bakteri ve fungusları içeren patojenler, böcekler ve herbivorlardan oluşur (Yılmaz vd., 2011). Bütün bu faktörler bitkinin gelişimini, hayatta kalmasını, biyokütle üretimini ve ürün verimini olumsuz yönde etkilerler (Agarwall vd., 2006).

Bu stres tiplerinin etkileri birbirleri ile ilişkilidir. Örneğin yüksek sıcaklığa dayanıklılık, genellikle onunla birlikte oluşan kuraklık koşullarına dayanıklılığa bağlıdır. Benzer şekilde donmaya dayanıklılık, dokunun dehidrasyona dayanıklılığı ile önemli derecede bağlantılıdır (Hale ve Orcutt, 1987).

Stres etmenlerinin oluşturduğu zarar bitkinin çevreye genetik adaptasyon derecesine bağlı olarak değişir. Bu olgu değişik bitkilerin değişik bölgelerde en iyi şekilde yetişmelerini belirleyen temel faktördür. Strese dayanıklılık mekanizması bitkilerde iki şekilde etkili olmaktadır. Bitkiler ya geliştirdikleri önleyici mekanizmalarla stres faktörlerinin etkinliğini önlemekte ya da tolerans mekanizmalarıyla karşı koymakta ve yaşamlarını sürdürmektedirler (Url-2, 2011).





Şekil 1. Başlıca stres çeşitleri (Yılmaz vd., 2011).

### 1.2.1. Ağır Metal Stresi

Bakır, çinko, kurşun, nikel, kobalt, krom, mangan, kadmiyum, selenyum, arsenik ve alüminyum gibi metaller belirli bir miktarı aştıklarında zehir etkisi yapan kirleticilerdir. Bunların birçoğu belirli bir miktarda bitkiler için hayati öneme sahip olsalar da fazla miktarda bulunmaları birçok zarara yol açmaktadır. Ağır metaller genellikle elektron taşımında devreye girerek solunum ve fotosentez üzerine olumsuz etki yaparlar. Hayati öneme sahip

enzimleri inhibe ederler ve böylece bitkilerin enerji üretme ve kaliteli ürün oluşturma yeteneklerini de engellerler (Url-2, 2011).

Ağır metaller diğer atık maddelerle birlikte toprakları, yer altı ve yer üstü suları giderek kirletmektedir ve bu ağır metal kirliliği uzun süreli sorunlara neden olmaktadır. Organizmalarda birikerek besin zincirinde yer almakta ve zararlarını yıllarca sürdürmektedirler (Url-2, 2011). İnsan için en zehirli ağır metaller kendilerini temel minerallere benzeten civa ve kadmiyumdur. Örneğin kadmiyuma maruz kalan insanlarda emfizema ve kemik erimesinin yanı sıra akciğer, kemik ve böbreklerde geri dönüşümü olmayan ciddi hasarlara neden olabilir (Straif vd., 2009). Ağır metal stresi altındaki bitkilerde morfolojik değişiklikler, kök büyümesinde inhibisyon, yapraklarda klorozis ve biyomasta indirgenme görülür (Yadav, 2010).

### **1.2.2. Stres Dayanıklılığı**

Tüm bitkiler belirli derecelerde stres hasarlarına karşı koyma ve canlı kalabilme özelliğindedirler. Bir bitkinin bazı kısımları (tohumlar, tomurcuklar ve dormant hücreler) strese dayanıklı iken, diğer kısımları (meristemler, sukkulent organlar ve fideler) duyarlı olabilir. Ayrıca bitkiler yaşamak zorunda oldukları çevreye adapte olabilme veya tam olarak uyabilme özelliğine sahiptirler (Bidwell vd., 1974).

Strese dayanıklılık sakınma ve tolerans olmak üzere ikiye ayrılır (Lewitt, 1980). Eğer bir bitki fiziksel ya da metabolik bir engellemeyle oluşan stresi dışarıda bırakabiliyorsa, bu olay stres sakınması olarak adlandırılır. Kısaca stres sakınması bitkiye dıştan uygulanan olumsuz bir faktörün etkisini, stres oluşturmadan önleme yeteneğidir (Street ve Opik, 1984). Örneğin bir bitkinin yaprağı, transpirasyon yaparak iç sıcaklığını korur ve böylece sıcaklıktan sakınır (Ayaz, 1999). Benzer şekilde kaktüs bitkisi su stresi esnasında hücre içindeki su miktarını koruyarak kuraklıktan sakınabilir (Bidwell vd., 1987). Eğer bir bitki stres sonucu oluşan hasarları azaltabilme veya hiç hasar oluşturmama özelliğinde ise bu durum stres toleransı olarak isimlendirilir. Diğer bir deyişle stres toleransı dıştan uygulanan bir strese canlılığın dayanabilme yeteneğidir (Street ve Opik, 1984). Örneğin; birçok organizmanın yaşayamadığı sıcaklıklarda hayatlarını devam ettirebilen yosun, alg ve bakteriler sıcaklık toleransına

sahiptirler. Yukarıda belirtilen sakinme ve tolerans mekanizmaları birçok stres durumunda gelişebilir ve her ikisi de aynı bitkide bulanabilir (Bidwell vd., 1987).

### **1.2.3. Bakır Stresine Dayanıklılık**

Bitkiler ağır metal stresini bazı enzimleri sentezleyerek, ağır metalleri vakuol içerisinde biriktirerek ya da şelatlanma oluşturarak ortadan kaldırma yoluna giderler. Toksik etkili ağır metallere dayanıklı olan bir bitki ya hücreye giren ağır metalleri derhal detoksifiye etmeli ya da hücreye alınımını sınırlamalıdır (Cumming ve Taylor, 1990). Ağır metaller hücre içine alındıklarında detoksifiye edilmeleri gerekir. Bu da metale bağlı olan şelatlanma, alınımın sınırlanması ve çöktürme şeklinde olur. Örneğin, çinkonun organik asitlerle şelatlanıp vakuolde biriktirildiği tespit edilmiştir (Brooks vd., 1981). Kurşun detoksifikasyonu için ise *Brassica juncea*'nın köklerinde olduğu gibi fitoşelatınların üretildiği belirlenmiştir (Salt vd., 1995). Ayrıca, ağır metallerle kirlenmiş topraklarda yetişen bazı endemik bitkilerin asit fosfatazlar gibi ağır metale dayanıklı enzimler ürettiği görülmüştür (Thurman, 1981). Aşırı bakır birikimi ise bitki büyüme ve gelişiminde önemli sorunlara neden olabileceği gibi önemli fizyolojik süreçleri de etkileyebilir (Habiba vd., 2014). Bakır stresi altındaki mısır bitkilerinin kök aktivitesinde devamlı bir azalış gözlenmektedir. Kök hücrelerinin zarlarında hasar meydana geldikten sonra hücre içindeki iyon ve organik madde sızıntısı sonucu  $Cu^{+2}$  kök hücrelerine girer ve fizyolojik süreçlerde önemli düzensizliklere neden olur (Lui vd., 2014).

## **1.3. Ağır Metaller**

### **1.3.1. Ağır Metallerin Genel Özellikleri**

Ağır metaller atomik yoğunluğu  $5 \text{ g/cm}^3$ 'den büyük olan metal ve metaloidler grubu için kullanılan genel bir isimdir.

Bitkilerde stres oluşturan ağır metaller bakır, kadmiyum, kurşun, civa, nikel, selenyum, gümüş, çinko, talyum, antimon, arsenik, berilyum ve kromdur (Novotny, 1995). Bazı ağır metaller bitki beslenmesi için önemli oldukları halde yüksek konsantrasyonlarda

fitotoksiktirler. Bunlar bakır, demir, mangan, molibden, çinko, kobalt ve nikeldir. Bununla birlikte kadmiyum, krom, civa ve kurşun gibi ağır metaller de çeşitli yollardan tarımsal ekosisteme girerler. Bunların bitki bünyesinde ki seviyeleri konsantrasyonlarına ve çözünebilirliklerine bağlıdır (Bergmann, 1920).

Bütün atık su ve çamurlarda rastlanan ağır metallerin başlıca kaynakları endüstriyel ve ticari aktivitelerdir. Evsel atık sularda bile önemli miktarlarda metal bulunur. Endüstriden gelen en önemli metaller bakır, nikel, kurşun, çinko ve kadmiyumdur. En önemli sorun bu metallerin besin zincirine girme ve kullanma suyuna karışmaları olasılığıdır (Jamil vd., 1987). İnsanoğlunun endüstriyel faaliyetleri ve madencilik gibi etkinliklerinin sebep olduğu topraktaki ağır metal kirliliği tüm Dünya’da ciddi bir sorundur (İkenaka vd., 2010). Ağır metaller, organik kirleticiler gibi biyolojik süreçlerle yıkıma uğrayıp zararsız bileşiklere dönüşmeden uzun bir süre doğada kalabilir ve besin zincirine katılabilir (Chiban vd., 2011)

### **1.3.2. Ağır Metallerin Biyokimyasal Özellikleri**

Bu gruptaki bazı elementler yaşayan organizmaların çoğu için eser miktarda da olsa gereklidir. Şüphesiz gerekli olan bu metallerin eksikliğinde canlılar zarar görür. Hem bitki hem de hayvanlar için bakır, çinko, mangan, demir gerekli iken bunlara ek olarak yalnız hayvanlar için kobalt, krom, selenyum, iyot ve yalnız bitkiler için bor ve molibden gereklidir. Biyokimyasal işlevleri bilinmeyen, canlılar için birinci derecede önemli olmayan fakat toksik olan elementler de vardır. Bunlar arsenik, kadmiyum, kurşun, antimon, titanyum ve uranyumdur. Bunlar organizmaların toleransını aşan konsantrasyonlarda toksik etkiye neden olmaktadır (Alloway ve Ayres, 1993).

Biyokimyasal düzeyde bu metallerin aşırı konsantrasyonlarının neden olduğu olumsuz etkiler ATP ve ADP’nin fosfat gruplarıyla olan reaksiyonları, hücre membranlarının zarar görmesi, SH gruplarıyla olan reaksiyonları, iyonların yerine geçmesi ve metabolitlerle rekabet etmesidir (Alloway ve Ayres, 1993). Ağır metaller biyolojik sistemlerde özel moleküllerin yapısında kritik görevlerin gerçekleştirilmesini sağladıkları için bu moleküllerdeki en küçük değişiklik ciddi sorunlar doğurabilir.

### **1.3.3. Ağır Metallerin Bitkiler Tarafından Alınımı ve Taşınması**

Bitkilerde ağır metal alınımı ve taşınması kökler tarafından gerçekleştirilmektedir.

#### **1.3.3.1. Ağır Metallerin Köklerle Alınımı**

Topraktaki metallerin bir kısmı bitkiler tarafından alınıp depolanırken bir kısmı da toprakta kalır. Bu metalleri depo eden bitkiler öncelikle metalleri toprakta harekete geçirmelidir. İlk olarak metal şelatlandırıcı moleküller (fitosiderofor) rizosfere salınır. Bunun amacı toprağa bağlı olan metalleri topraktan koparmaktır. Örneğin mugineik asit ve avenik asit Graminea (Poaceae) familyası türlerinin fitosideroforu olarak görev yaparlar (Kinnerseley, 1993). Bu fitosideroforlar demir ve çinko eksikliğinde serbest bırakılırlar ve bakır, çinko ve manganın toprakta hareketini sağlarlar (Romheld, 1991). İkinci olarak kökler spesifik plazma membranına bağlı metal redüktazlar ile metal iyonlarını azaltabilirler. Üçüncü olarak da bitki kökleri saldıkları protonlar ile toprak ortamını asitleştirerek ağır metalleri çözebilirler. Düşük pH toprak içindeki bağlı metal iyonlarının serbest kalmasına neden olur. Kök içine intraselüler veya ekstraselüler yollarla giren metal iyonları spesifik veya genel iyon taşıyıcıları vasıtasıyla ya da kanallarla bitki hücrelerine girerler (Clarkson ve Luttge, 1989). Bitki için gerekli olmayan ağır metaller de aynı transmembran taşıyıcılarını kullandıklarından dolayı aralarında rekabet ederler (Salt vd., 1995). Rizosferdeki ağır metal çözünürlüğü pH, kation değişim kapasitesi, organik bileşiklerin konsantrasyonu, metal şelatlayan bileşikler, minerallerin özellikleri ve mikro organizma aktivitesi tarafından etkilenmektedir (Ghosh ve Singh, 2005).

#### **1.3.3.2. Ağır Metallerin Köklerle Taşınması**

Metal iyonları köke girdiğinde ya kökte biriktirilirler ya da sürgünlere taşınırlar. Sürgünlere metal taşınımı ksilem veya floem yoluyla gerçekleşebilir (Stephan ve Scholz, 1993). Ksilem kanallarına metal iyonları girmeden önce, ilk olarak endodermis ve epidermisi bölen kaspari şeridine girerler. Kaspari şeridi nedeniyle ekstraselüler geçiş bloke edildiğinden suyun hareketi engellenir ve metal iyonları intraselüler olarak hareket ederler (Salt vd., 1995).

*Brassica juncea* (Czernajew, 1871) gibi belirli metal akümülatörü olan bitkilerin ksilem özlerinin analizi yapıldığında metal geçişinde organik asitlerin ilişkisi olduğu ortaya çıkmıştır (Baker ve Brooks, 1989). Floemde de metaller ya organik asitlerle şelatlı olarak ya da fitoşelatinlerle veya metalotiyoninlerle taşınabilirler (Salt vd., 1995). Ağır metaller birkaç yolla simplasta girebilir. Basit difüzyonla, kanal proteinleri aracılığıyla pasif taşıma ile ve kanal proteinleri aracılığıyla aktif taşıma ile söz konusu kanal proteinler farklı metallere farklı ilgi göstererek arzulanan temel metallerin alınmasını teşvik ederken, istenmeyen ağır metallerin taşınımını membran üzerindeki bazı düzenlemelerle engellemektedir (Lin ve Aarts, 2012). *A. thaliana*'da bakırın alınmasından ve biriktirilmesinden sorumlu olan altı (COPT1-6) taşıyıcı protein ailesi tanımlanmaktadır (Puig, 2014).

#### 1.3.4. Bakır

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 üretilen bakır, M.Ö. 3000 yılından itibaren (Bronz Çağı) Anadolu, Yunanistan ve Hindistan'da mekanik özellikleri alaşımlandırma yolu ile artırılarak kullanılmıştır. Doğada 200'den fazla bakır minerali bulunmakla beraber sadece 20 tanesi bakır cevheri olarak endüstriyel öneme sahiptir. Dünya bakır rezervlerinin % 68'i Şili, ABD, Sovyetler Birliği, Zambiya, Peru, Zaire ve Kanada, % 32'si ise diğer ülkeler de olmak üzere yaklaşık  $650 \times 10^6$  ton olduğu tahmin edilmektedir. Yıllık üretim miktarı, 14 milyon ton (2001 yılı) civarındadır (Habashi, 1997).

Bakır, çeşitli kaya ve minerallerde bol bulunan esansiyel mikrobesein elementlerinden biridir ve hem prokaryot hem de ökaryotlardaki metabolik süreçlerin geniş bir yelpazesi için gereklidir (Bowen, 1985). Oksijen taşıyıcıları (hemosiyanın) ya da redoks katalizörleri (sitokrom oksidaz, nitrat redüktaz) gibi fonksiyonları olan, bilenen en az 30 tane bakır içeren enzim vardır (Weser, 1979; Whitacre, 2011). 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).

#### 1.3.4.1. Bakırın Özellikleri ve Kullanımları

Endüstride bakırın önemli rol oynamasının ve çeşitli alanlarda kullanılmasının nedeni çok farklı özelliklere sahip olmasıdır. Bakırın en önemli özelliklerinin arasında yüksek elektrik ve ısı iletkenliği, korozyon ve aşınmaya direnci, çekilebilme ve dövülebilme özellikleri sayılabilir. Ayrıca alaşımları çok çeşitli olup endüstride (otomotiv, basınçlı sistemler, borular, vanalar, elektrik santralleri ve elektrik, elektronik vb.) değişik amaçlı kullanılmaktadır (Url-1, 2011).

#### 1.3.4.2. Bakırın Bitkilere Toksik Etkisi

Yapraklardaki klorozis, bakır toksisitesinin yaygın başlangıç belirtilerinden birisidir (Taylor ve Foy, 1985). Klorozis genellikle krem rengi veya beyaz noktalar ya da lezyon halini alır (Lee vd., 1996). Artan stres etkiyle birlikte, yaprak uçları ve kenarlarında nekrotik alanlar oluşabilir (Taylor ve Foy, 1985). Aşırı bakır toksisitesinde, yapraklarda nekroz olmadan önce solgunluk olabilir (Yau vd., 1991). Ayrıca bakır toksisitesi yaprakların morlaşmasıyla da alakalı olabilir (Choi vd., 1996) ama bu semptomlar bütün türlerde belirgin değildir (O'Sullivan vd., 1997).

Toksik miktardaki bakırın, dikotil fidelerde kısa radikulaya, koyu kahverengi-siyah renklenmeye (nekrotik), küt uçlara ve mantar saldırılarına karşı bir eğilime sebep olduğu görülmüştür (Patterson ve Olson, 1983). *Citrus paradisi* ve *Poncirus trifoliata* hibrit tohumlarının bakır stresine maruz bırakıldığında birkaç tane yeni kök ürettiği ve kalın bir kazık köke sahip olduğu belirtilmiştir (Zhu ve Alva, 1993). Kök kalınlaşması *Pinus* fidelerinde de görülmüştür (Arduini vd., 1995). *Betula papyrifera* ve *Lonicera tatarica* fidelerinde ise aşırı bakır konsantrasyonunda saçak kök oluşumunun inhibe edildiği rapor edilmiştir (Patterson ve Olson, 1983). Diğer taraftan, aşırı bakır varlığında demir alınımının azaldığı belirlenmiştir (Lexmond ve Van der Vorm, 1981). Bakır toksisitesinin yaşandığı bitkinin genç yaprakları üzerindeki klorotik semptomların demir eksikliğiyle ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Luo ve Rimmer, 1995). Ayrıca, aşırı bakır bulunan ortamda büyütülen *Banksia ericifolia*, *Casuarina distyla* ve *Eucalyptus eximia* da klorozis görülmüştür (Mitchell vd., 1988). Ağır

metaller biyolojik sistemlerde özel moleküllerin yapısında kritik görevlerin gerçekleştirilmesini sağladıkları için bu moleküllerdeki en küçük değişiklik ciddi sorunlar doğurabilir. Örneğin klorofil molekülünün merkezi atomu olan  $Mg^{+2}$  iyonunun yerine  $Cu^{+2}$  iyonunun yerleşmesi, fotosentezde suyun parçalanmasını sağlayan enzimin kofaktörü olan  $Mn^{+2}$  yerine  $Cu^{+2}$  iyonunun bağlanması veya rubisco enziminin üç boyutlu yapısının oluşmasını sağlayan disülfid bağlarının kırılarak  $Cu^{+2}$  iyonunun o bölgelere bağlanması fotosentetik aktivite üzerine ciddi olumsuz etkiler meydana getirebilir (Mishra ve Dubey, 2005).

#### **1.4.1. Bakır Stresinin Yaprak Su potansiyeli Üzerine Etkisi**

Stresle ilgili çalışmalarda yaprak su potansiyelinin ölçülmesi önemlidir. Büyüme periyodundaki mısır bitkisinde yaprak su potansiyelinin -0,6 ile -0,7 MPa'dan düşük olmaması gerektiği ileri sürülmüştür (Padurariu vd., 1969). Örneğin, şekerpancarında bu değer -0,5 MPa olarak kaydedilmiştir. Yaprak su potansiyeline en fazla etki eden olaylardan biri transpirasyondur. Kobalt, nikel ve kadmiyum etkisi altında lahana bitkisinde, su stresinin gelişmesini gösteren yayılma direncindeki artışla ilişkili olarak transpirasyon hızı ve su potansiyeli azalmıştır (Pandey ve Sharma, 2002). Karnabahar bitkisinde de bakır stresi koşulları altında transpirasyon hızında ve su potansiyelinde önemli ölçüde azalma gözlenmiştir (Chatterjee ve Chatterjee, 2002).

#### **1.4.2. Bakır Stresinin Kuru Ağırlık Üzerine Etkisi**

Stres esnasında kuru ağırlık miktarındaki azalış birçok çalışmada rapor edilmiştir. Örneğin; bakır stresine maruz bırakılan mısır bitkisinin kuru ağırlık miktarında azda olsa azalma görülmüştür (Mocquot vd., 1996). Kadmiyum, nikel ve kurşuna maruz bırakılan bitkilerde kuru ağırlığın artan stres yoğunluğuyla önemli derecede azaldığı gözlenmiştir (Ewais, 1997). Soya fasulyesinin yapraklarında kuru ağırlık, nikel stresinin varlığıyla önemli derecede azalmıştır (Ewais, 1997). Genç mısır bitkisi kadmiyum stresiyile birlikte önemli derecede kuru ağırlık kaybetmiştir (Lagriffoul vd., 1998).



### 1.4.3. Bakır Stresinin Fotosentetik Gaz Değişimi Üzerine Etkisi

Ağır metallere biri olan bakır (Cu), düşük konsantrasyonda bitki büyüme ve gelişimini artırırken, belirli konsantrasyonun üzerinde bitkiler için toksik olabilmektedir (Moustakas vd., 1994; Yruela, 2005). Aşırı bakırın klorofilin fotosentetik membranlarla birleşmesini engellediği (Kupper vd., 1996), elektron transportu ve fotosentezin primer reaksiyonları üzerine toksik etkiye sahip olduğu, hücre sayısını ve fotosentezi inhibe ederek biyomas ve verimin azalmasına neden olduğu bildirilmiştir (Moustakas vd., 1994; Ouzounidou vd., 1995; Ouzounidou vd., 1997). Ayrıca aşırı bakıra maruz bırakılan maş fasülyesi fidelerinin CO<sub>2</sub> gaz değişiminde, stomatal iletkenlikte ve fotosentetik pigmentlerde önemli bir indirgenmeye neden olduğu rapor edilmiştir (Ahmad vd., 2008).

### 1.4.4. Bakır Stresinin Klorofil Flüoresansı Üzerine Etkisi

Bir klorofil molekülü tarafından absorbe edilen her bir foton bir elektronu temel durumdan uyarılmış duruma getirir. Klorofil molekülleri tarafından absorbe edilen bu ışık enerjisi fotosentetik işlemleri yürütmek için kullanılır. Fazla enerji ise ısı olarak dağıtılır ya da klorofil floresansı olarak adlandırılan kırmızı ışık olarak yansıtılır. Bu üç işlem eş zamanlı olarak meydana gelir, bir tanesinin etkinliğindeki artış, diğer ikisinin verimliliğini azaltır. Bu sebeple klorofil floresansın verimliliğini ölçerek fotokimyasal etkinlik ve ısı dağılımı hakkında bilgi edinmek mümkündür. Klorofil floresans spektrumu absorbe edilen ışığından farklı ve daha uzun dalga boyludur. Klorofil floresansı absorbe edilen toplam ışığın %1-2 kadar olmasına rağmen, klorofil floresansını ölçmek bu sebeple nispeten kolaydır. Floresansın verimi yaprağı belirli dalga boyunda ışıkla muamele ederek ve yansıtılan uzun dalga boylu ışığı ölçerek değerlendirilebilir (Maxwell ve Johnson, 2000).

Aşırı bakırın fotosentezin etkili bir inhibitörü olduğu bildirilmiştir. Bakır stresine maruz kalan bitkiler üzerine yapılan çoğu çalışmada bakırın fotosentezin primer reaksiyonları ve elektron transportu üzerine toksik etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Ouzounidou vd., 1997). Aşırı bakırın fotosentezdeki primer etkisi fotosistem II reaksiyon merkezidir. PSII bakır stresine PSI'den daha hassastır (Ouzounidou vd., 1997). PSII'nin donör ve akseptör

bölgelerinin Cu inhibitör yerlerine sahip olduğu bildirilmiştir (Yruela, 2005). Aşırı bakır donordaki oksijen açığa çıkaran kompleks proteinine (Patsikka vd., 2001) ve PSII'nin akseptör yerleri olan QB bağlanma yeri (Mohanty vd., 1989) ve Feofitin-Fe-QA (Yruela vd., 1996)'a zarar verir ve böylece PSII'nin kuantum veriminde bir azalma meydana gelir (Maksymiec vd., 1994). PSII'nin fotokimyasal aktivitesinin azalması tilakoid membranların değişime uğramasına neden olur (Lidon vd., 1993). Bakır stresinin mısır fidelerinde Fo değerini artırdığı, Fm, FV/Fm, ΦPSII, qP ve ETR değerlerini ise azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca floresans değerlerinde bakır dayanıklı ve bakır hassas çeşitler arasında farklılıkların olabileceği rapor edilmiştir (Tanyolaç vd., 2007).

#### 1.4.5. Stresin Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Üzerine Etkisi

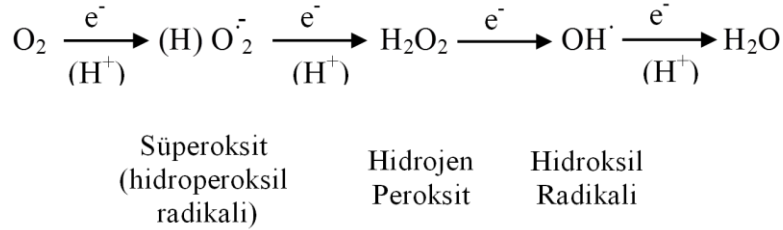
Bitkiler çeşitli abiyotik streslere maruz kaldığı zaman, süperoksit ( $O_2^{\bullet -}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikalleri ( $\bullet OH$ ), singlet oksijen ( $^1O_2$ ) gibi bazı reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu başlatılır (Şekil 2). ROS üretimi oksidatif stresin en önemli zararlı etkisi olan lipid peroksidasyonu ile sonuçlanır (Kadioğlu vd., 2011; Yazıcı vd., 2007).

Bitkilerde ROS oluşumuna neden olan birçok kaynak bulunmaktadır. ROS'ların başlıca üretildiği bölge kloroplast tilakoidlerindeki PSI ve PSII reaksiyon merkezleridir. Bunun dışında mitokondriyal solunum sırasında ROS oluşumu meydana gelir. Ayrıca peroksizomlar ve glikozomlar da fotorespirasyon ve yağ asiti oksidasyonu sırasında ROS oluşumuna katılırlar (Gechev, 2006). Diğer taraftan, son yıllarda NADPH oksidazlar, amin oksidazlar ve hücre duvarı bağlantılı peroksidazların da ROS oluşumuna katkıda bulunduğu belirlenmiştir (Mittler, 2002).

Suyun kısıtlı olduğu durumlarda, bitki su kaybını engellemek için stomalarını kapatır. Bu durumda kloroplastlarda Calvin döngüsü ile  $CO_2$  fiksasyonu ve  $NADP^+$  yenilenmesi sınırlanır,  $CO_2/O_2$  oranı düşer (Özfidan, 2010). Bu durum kuantum veriminde azalmaya sebep olur. Böylece fotosentezdeki elektron akseptörü  $NADP^+$  kısıtlı hale gelir ve ferrodoksin  $NADP$  yerine oksijeni redükler ve PS I'in elektronları  $O_2$ 'ye transferi sonucunda reaktif süperoksit radikali ( $O_2^{\bullet -}$ ) üretilir (Mehler reaksiyonu) (Tambussi vd., 2000). Süperoksit tek başına çok fazla reaktif olmayıp,  $H_2O_2$  ve Hidroksil ( $\bullet OH$ ) radikallerini oluşturmak suretiyle

etkili olur (Halliwell ve Gutteridge, 1989). Süperoksit ve hidrojen peroksitin hidroksil radikalini oluşturmak üzere tepkimesi sırasında (Haber-Weiss reaksiyonu), artan demir ya da bakır gibi diğer geçiş metalleri, bu reaksiyonları hızlandırmak suretiyle oksidatif hasarı daha da artırabilir (Fenton reaksiyonu) (Smirnoff, 1993).

Serbest radikallerin hem indirgen hem de yükseltgen olarak bazen de her iki etkiyi birlikte göstererek hücre hasarına neden olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, bitki gelişiminde önemli rol oynayan hormonal sinyal iletiminde, hücre duvarı polimer yapısının değişiminde, bitkiyi abiyotik ve biyotik streslerden korumada, gen ekspresyonlarında, metabolik ve fizyolojik düzenlemelerde kritik rol üstlendiği ve oksidatif bir sinyal molekülü gibi hareket ettiği belirtilmiştir (Swanson ve Gilroy, 2010).



Şekil 2. Moleküler oksijenin indirgenmesi ile ROS oluşum basamakları (Gechev vd., 2006)

### 1.4.5.1. Serbest Radikaller

#### 1.4.5.1.1. Süperoksit Radikali ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ )

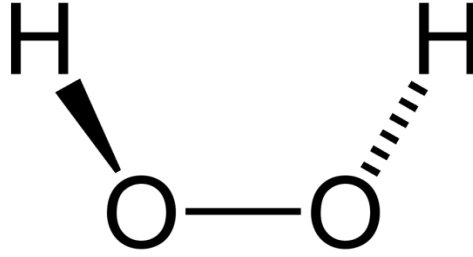
Süperoksit radikali ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), oksijene bir elektronun aktarılmasıyla oluşur. Bu reaksiyon enzimatik olarak çeşitli organellerde meydana gelebilir. Oksidatif fosforilasyon esnasında NADPH-oksidaz veya ksantin-oksidaz gibi enzimlerin katalizörlüğünde moleküler oksijenden süperoksit radikali meydana gelir. Süperoksit radikalının yarılanma ömrü hücrelerin farklı yerlerinde bulunan süperoksit dismutaz enziminin varlığına bağlıdır (Stahl ve Sies, 2002). Ayrıca indirgeyici moleküler oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksit radikali oluşur. Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler gibi yüzlerce

molekül aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit oluşumuna neden olurlar. Çeşitli dehidrogenazlar ve 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). Ayrıca süperoksit enzimatik olmayan reaksiyonlarla, örneğin kloroplast, mitokondri ve plazma membranındaki elektron transport sisteminin yeterince düşük redoks potansiyeline sahip bileşenleri ve ferrodoksin tarafından da üretilir. Ayrıca kloroplastlarda PS I ve PS II tarafından süperoksitin üretildiği kaydedilmiştir (Elstner ve Osswald, 1994). Süperoksit radikali oldukça reaktiftir ve lipidlerin yanı sıra diğer biyokimyasal bileşenlerin de oksidasyonuna sebep olur. Bu radikalın lipid peroksidasyonu, membran hasarı, hücrel toksisite ve DNA'daki tek zincir kırıklarıyla ilişkisi olduğu belirtilmiştir (Fridovich, 1995). Ayrıca, süperoksit radikali, yüksek katalitik etkiye sahip süperoksit dismutaz (SOD) enziminin etkisiyle dismutasyona girerek konsantrasyonu azalır. SOD tarafından katalizlenen bu reaksiyon dismutasyon tepkimesi olarak adlandırılır (Halliwell, 1984).

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

Moleküler yapısı şekil 3'teki gibi olan hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), canlı sistemde oksijenin enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik veya enzimatik olmayan dismutasyon tepkimeleri sonucu oluşur. Süperoksitin olduğu yerlerde önemli miktarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de üretilir. Fotosentetik elektron transport zinciri H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin üretiminden sorumludur. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin üretildiği başka bir kaynak fotorespirasyonla glikolatın oksidasyonunun meydana geldiği peroksizomlardır. Ayrıca biyokimyasal olarak oksijenin iki elektronlu indirgenmesinin gerçekleştiği solunum işlemleri sırasında ve genellikle flavoproteinlerle gerçekleştirilen reaksiyonlarla da oluşturulur. Diğer taraftan, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin üretildiği diğer önemli kaynaklar ise plazma membranı ve ekstrasellular matrikstir (Slesak vd., 2007). Bu yolların dışında apoplastik bakır amin oksidaz enziminin ABA tarafından uyarılarak putresini parçalaması sonucu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimi gerçekleştirilebilmektedir (An vd., 2008). Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz. Ayrıca, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biyotik ve abiyotik stres altında bitki savunma mekanizmalarını harekete geçiren bir sinyal olarak kabul

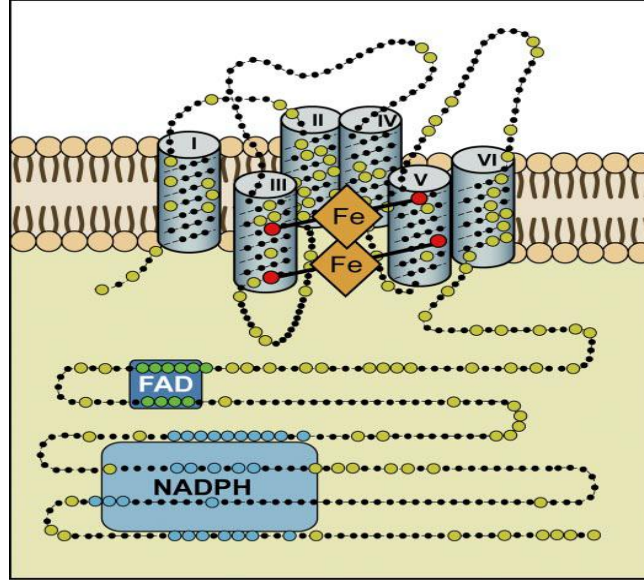
edilmektedir (Doke vd., 1994; Prasad vd., 1994; Foyer vd., 1997). Düşük konsantrasyonda uygulanan  $H_2O_2$ 'in bitkilerde strese karşı toleransı uyardığı rapor edilmiştir. Örneğin, düşük konsantrasyonlarda  $H_2O_2$  uygulamasının *Vigna radiata*'da yüksek sıcaklığa toleransı arttırdığı ileri sürülmüştür (Yu vd., 2002; Yu vd., 2003). Aynı şekilde düşük konsantrasyonlarda uygulanan  $H_2O_2$  'nin mısır fidelerinde aşırı bakır stresine karşı iyileştirme sağladığı rapor edilmiştir (Güzel ve Terzi, 2013).



Şekil 3. Hidrojen Peroksitin ( $H_2O_2$ ) Moleküler Yapısı

#### 1.4.5.1.2.1. $H_2O_2$ Üretiminden Sorumlu Enzim, NADPH Oksidaz

Strese maruz kalan bitki hücrelerinde oksidatif patlamanın meydana geldiği ve oluşan ROS'ların hem sinyal moleküller olarak hemde hücreyi oluşturan bütün bileşenler için tehdit olduğu bilinmektedir. Hücre içinde üretilen ROS'ların hem stressiz hemde stresli şartlar altında hücre zarına yerleşik (Şekil 4) NOX enzimi tarafından kontrollü olarak üretilmektedir (Foreman vd., 2003). Klebanoff (1970)'te fagosit hücrelerinde meydana gelen oksidatif patlamanın NADPH oksidaz tarafından gerçekleştirildiğini ifade etmiştir. Babior vd., (1973)'te NADPH oksidaz aktivitesi sonucu oluşan ilk ürünün hidrojen peroksit değil de süperoksit molekülünün olduğunu rapor etmişlerdir. Hayvanlar aleminde NOX enzimini ifade eden dokuz gen (Bedard ve Krause., 2007), bitkilerde ise çeltik fideleri üzerine yapılan bir çalışmada onbir NOX enzimi kodlayan gen olduğu rapor edilmiştir (Wang vd., 2013).



Şekil 4. NADPH Oksidazın (NOX) Moleküler Yapısı (Bedard ve Krause., 2007)

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

Hidroksil radikali, en aktif ve en toksik oksijen radikali olup üretildiği her yerde birçok molekül ile reaksiyon verir. 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). Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan  $\cdot\text{OH}$ , su dahil rastladığı her molekülle tepkimeye girebilir. Bütün bu tepkimeler  $\cdot\text{OH}$ 'ın paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır (Halliwell, 1984).

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 zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilir (Nishiyama vd., 1998).

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

Singlet oksijen, moleküler oksijenin yüksek enerji ile uyarılmış formu olup biyolojik sistemlerde fotosentez reaksiyonları sırasında oluşur. Bitkilerde  $^1\text{O}_2$ 'nin başlıca kaynağı fotosentetik elektron transport sistemindeki klorofil pigmentleridir (Foyer vd., 1997). Ayrıca singlet oksijen çok çeşitli yollarla kimyasal veya fotokimyasal olarak da üretilebilir. Oksijenin bu formunun reaktivitesi çok yüksektir. Singlet oksijenin yarılanma ömrü  $10^{-6}$  ile  $10^{-5}$  saniye arasında olup karbon-karbon bağları ile tepkimeye girme eğilimi yüksektir (Stahl ve Sies, 2002).

#### 1.4.5.2. Reaktif Oksijen Türlerine Karşı Geliştirilen Savunma Mekanizmaları

Stresli ortamlar bitkilerde süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumunu tetikler. Bununla birlikte süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon redüktaz (GR), peroksidaz (POD), gibi enzimatik antioksidan sistem ve askorbat (Asc), glutatyon (GSH),  $\alpha$ -tokoferol, fenolik birleşikler ve karotenoidler gibi metabolitler ROS'ların etkilerine karşı koruma sağlarlar (Mittler, 2004; Chinnusamy vd., 2005; Kadioğlu vd., 2012). Antioksidan enzimler değişen çevresel şartlar altında aktifleşirler ve birçok bitkide stres toleransı ile ilişkilidirler (Kadioğlu ve Terzi, 2007). Antioksidan enzimlerin, fonksiyonları ve buldukları kısımlar Tablo 1'de özetlenmiştir (Gechev, 2006).

Aşırı bakır süperoksit, hidrojen peroksit, singlet oksijen ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına sebep olur (Tie vd., 2012). SOD, POX ve CAT gibi antioksidan enzimler ise ROS'ların süpürülmesine katkıda bulunurlar (Halliwell ve Gutteridge, 2007).

Tablo 1. ROS ile ilgili en önemli enzimler ve antioksidanlar (Gechev, 2006).

Enzimler/ Antioksidanlar	Fonksiyon	Lokalizasyon
SOD	$O_2^{\cdot-}$ 'nin dismutasyonu ile $H_2O_2$ oluşumunu sağlar.	sit, klo, mit, per
CAT	İndirgeyiciye gereksinim duymadan $H_2O_2$ 'i detoksifiye eder.	mit, per, gli
APX	İndirgeyici olarak askorbat ile $H_2O_2$ detoksifikasyonu sağlar.	sit, klo, mit, per
MDHAR	İndirgeyici olarak NAD(P)H ile monodehidroaskorbat radikallerini indirger.	sit, klo, mit
DHAR	İndirgeyici olarak GSH ile dehidroaskorbat radikallerini indirger.	sit, klo, mit
GR	İndirgeyici olarak NADPH ile yükseltgenmiş glutatyonu indirger.	sit, klo, mit, per
POX	İndirgeyici olarak çeşitli substratları kullanarak $H_2O_2$ 'i detoksifiye eder; hücre duvarı polimerleri ile etkileşim içindedirler.	hd, sit, mit, vak
GPX	İndirgeyici olarak GSH kullanarak lipitleri hidroperokside eder ve $H_2O_2$ 'i detoksifiye eder.	sit, klo, mit, er
GST	Lipit hidroksiperoksitleri detoksifiye eder ve DHAR aktivitesi sergiler.	apo, cit, klo, mit, nuk
Askorbat	APX'in substratıdır, $H_2O_2$ 'i detoksifiye eder.	apo, sit, klo, mit, per, vak
Glutasyon	Glutasyon transferazlar ve glutasyon redüktazların substratıdır. $H_2O_2$ ve diğer hidroksiperoksitleri detoksifiye eder.	apo, sit, klo, mit, per, vak
$\alpha$ -tokoferol	Membran lipitlerini peroksidasyondan korur, lipit peroksitlerini detoksifiye eder ve $^1O_2$ giderir.	membranlar
Karotenoidler	$^1O_2$ giderir, ABA'nın haberci molekülüdür, fotosentezde etkindir.	klo, kro, ami
Flavonoidler	Direk olarak $H_2O_2$ 'i temizler.	vak

hd: hücre duvarı, apo: apoplast, sit: sitosol, klo: kloroplast, kro: kromoplast, ami: amiloplast, mit: mitokondri, er: endoplazmik retikulum, vak: vakuol, per: peroksizom, gli: glioksizom, nuk: nukleus

### 1.4.5.2.1. Antioksidan Sistem

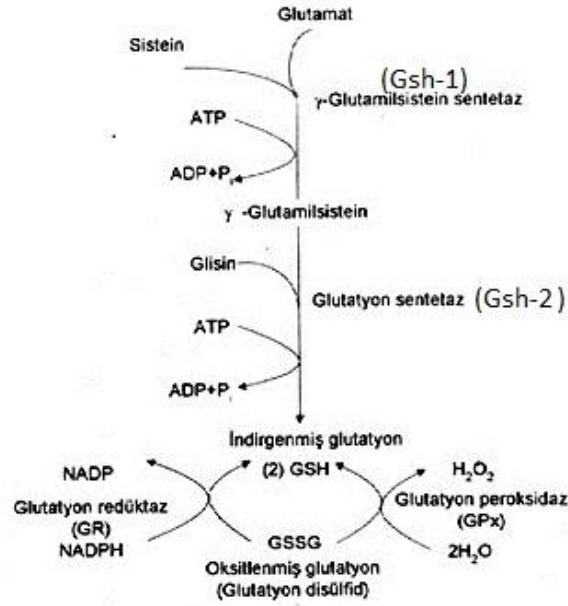
#### 1.4.5.2.1.1. Antioksidan Sistemin Enzimatik Olmayan Bileşenleri

##### 1.4.5.2.1.1.1. Glutasyon (GSH)

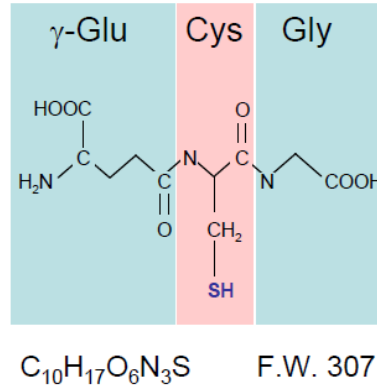
Glutasyon (GSH) glutamik asit ve sistein amino asitlerinden  $\gamma$ - Glutamil sistein sentetaz enziminin katalizörlüğünde  $\gamma$ - Glutamilsistein sentezledikten sonra bu moleküle glutasyon sentetaz enziminin aracılığıyla glisin amino asidinin eklenmesiyle oluşur. İki peptid bağı, iki karboksilik asit grubu, bir amino grubu ve bir tiol grubundan oluşmuş bir moleküldür (Şekil 5) ve bitki savunma mekanizmasında önemli rol oynayan endojen antioksidanlardan biridir.



GSH'nin metabolizmada ve metabolizmanın düzenlenmesinde önemli rolü olduğu belirlenmiştir. GSH, DNA sentezinde ve hasarlı DNA parçalarının onarılmasında, metabolik fonksiyonların yerine getirilmesinde, zehirli maddelerin inaktif hale dönüştürülmesinde ve serbest radikallerin olası hasarlarının önlenmesinde görev yapmaktadır. GSH, kimyasal olarak singlet oksijen, süperoksit, hidroksil radikalleri ile reaksiyona girer ve böylece direkt olarak serbest radikal temizleyicisi olarak görev yapar (Foyer vd., 1994; Creissen vd., 1996). Lipid peroksidasyon reaksiyonlarıyla oluşan açıl peroksitlerini uzaklaştırarak membran yapısını kararlı kılar (Price vd., 1990). GSH'nin özellikle lignin ve fitoaleksinin biyosentezi ile bağlantılı savunucu gen ürünlerinin miktarlarını yükselttiği belirlenmiştir (Wingate vd., 1988). GSH küçük peptidler olan fitoşelatinlerin yapısına da katılır (Singla-Pareek vd., 2006). Birçok bitkide metal stresine cevap olarak GSH içeriğinin arttığı kaydedilmiştir (Wang ve Oliver 1996). *Arabidopsis*'te artan GSH içeriğinin artan askorbik asit içeriği ile birlikte aşırı bakırın uyardığı oksidatif hasarları iyileştirdiği bildirilmiştir (May vd., 1998; Maksymiec vd., 2007).



Şekil 5. Glutatyon (GSH) Biyosentez Yolu (Ulakoğlu vd.,).



Şekil 6. Glutatyonun (GSH) Moleküler Yapısı (Noctor vd.,).

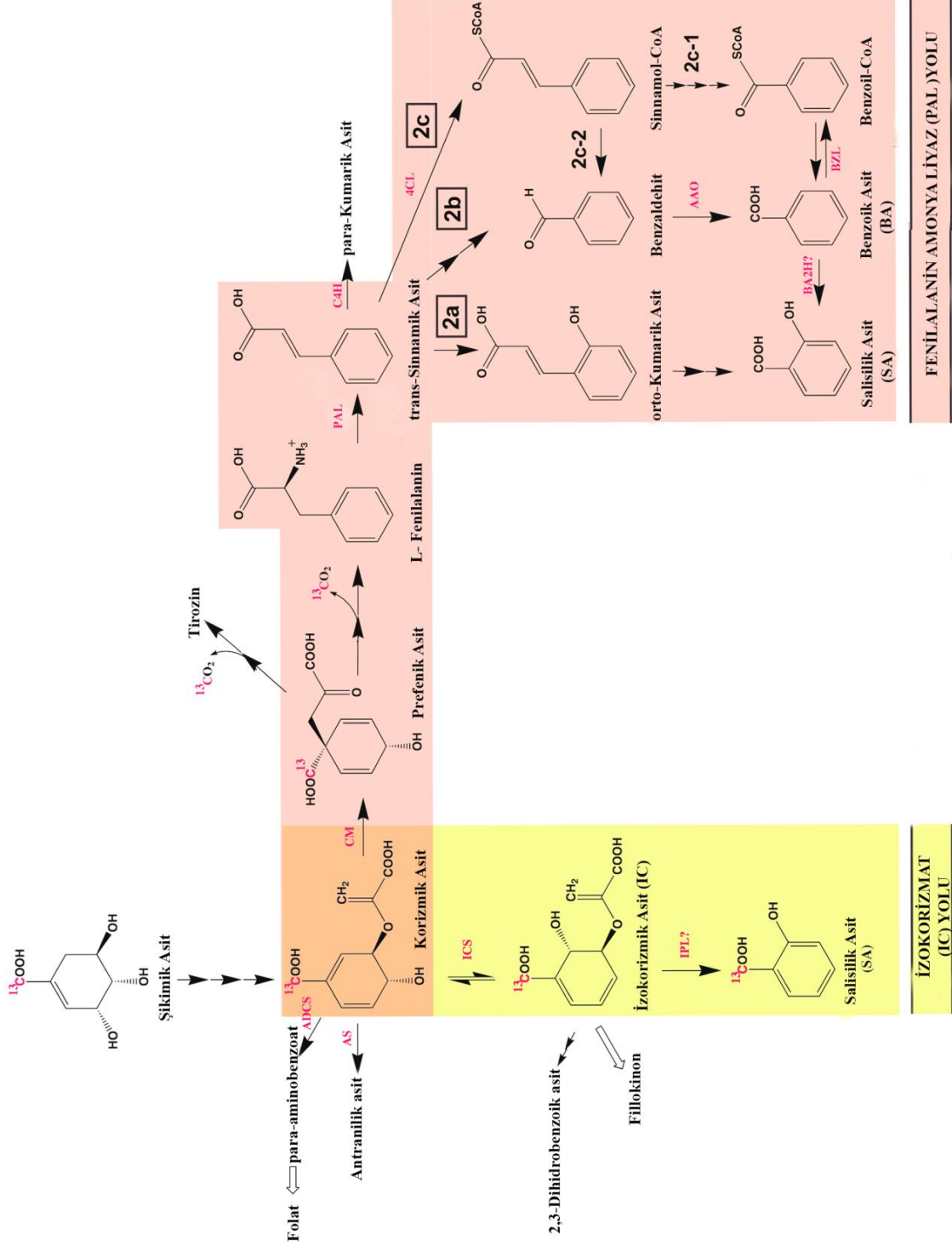
*A. thaliana* bitkisinde glutatyon metabolizması ile ilişkili yüz yirmi dokuz genin olduğu bilinmektedir. Bu genlerden beş tanesi glutatyonun yıkımı, iki gen (Şekil 5) ise sentezi üzerine etkilidir. Glutatyon sentezinin son aşamasını glutatyon sentetaz 2 enzimi katalize etmektedir (Noctor vd., 2011).

#### 1.4.5.2.1.1.2. Salisilik Asit (SA)

Vasküler bitkilerde yaygın olarak bulunan salisilik asit bitki büyüme ve gelişiminin düzenlenmesinde ve bitkilerin çevresel streslere cevabında önemli bir rol oynamaktadır (Senaratna vd., 2000). SA etilen sentezini geciktirir, membran depolarizasyonunu etkiler, fotosentezi, protein sentezini uyarır ve klorofil içeriğini artırır (Khan vd., 2003; Shakirova vd, 2003). Dıştan SA uygulamasının verimi artırabildiği bildirilmiştir (Raskin, 1992). Ayrıca SA'nın ağır metal, herbisist, düşük sıcaklık ve tuzluluk gibi bazı abiyotik strese karşı bazı alışma cevaplarına aracılık ettiği rapor edilmiştir (Janda vd., 1999; Metwally vd., 2003). SA muamelesi arpa ve mısır bitkilerinde kadmiyum toksikliğini hafifletebilmektedir (Metwally vd 2003; Krantev vd., 2008). *A. thaliana*'da iki farklı SA sentez yolundan ilki izokorismat (IC) yolu, ikinci yol ise fenilalanin amonya-liyaz (PAL) yoludur (Şekil 7).

Stres altındaki bitkilerin kullandığı SA sentez yolu IC yolu olup kloroplastta SA sentezlenirken, PAL yolu aracılığı ile çok az ölçüde SA sentezlenmektedir. SA'nın biyosentezi

şikimik asit üzerinden 16 farklı enzimin koordineli çalışması ile gerçekleştirilebilmektedir (Dempsey vd.,2011).



Şekil 7. Salisilik asit (SA)'in Biyosentez Yolu (Dempsey vd., 2011).

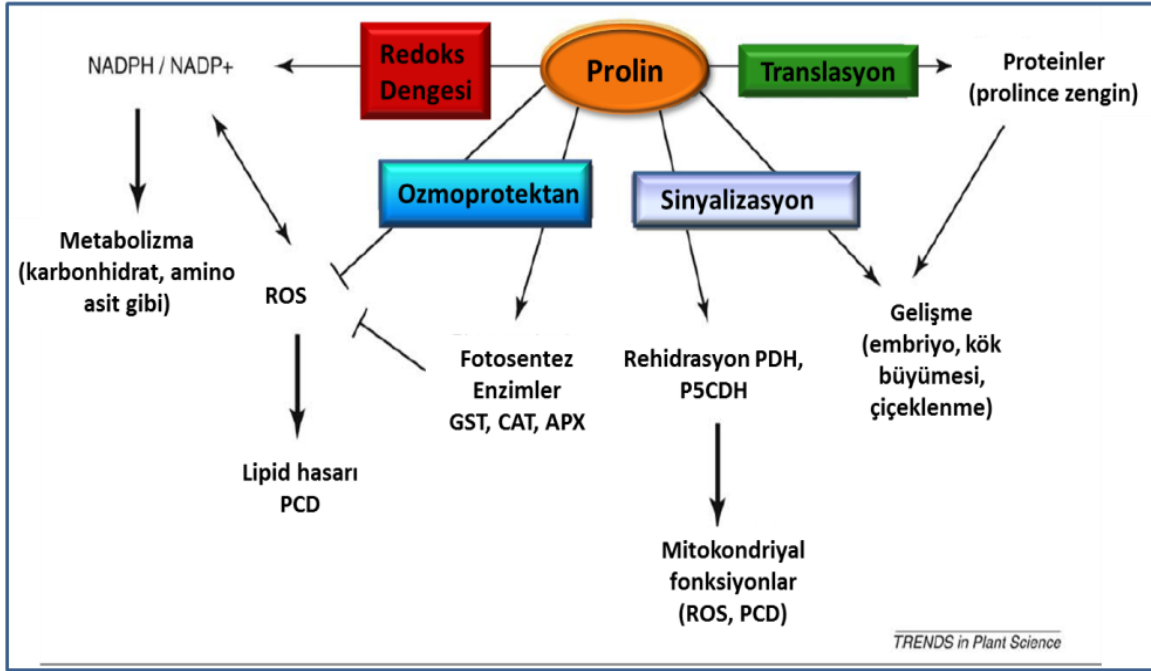
### 1.4.5.2.1.1.3. Stresin Poliaminler (PA) Üzerine Etkisi

Poliaminler (PA) bütün bitki hücrelerinde bulunurlar ve biyotik ve abiyotik stres koşullarında savunmada rol oynadıkları kadar büyüme ve gelişim işlemlerine de karışırlar (Alcázar vd., 2010; Minocha vd., 2010). PA'ların hücre bölünmesi, DNA replikasyonu, hücre farklılaşması gibi birçok olayda ve sinyal iletiminde ikincil mesajcı olarak rol oynadıkları bilinmektedir (Galston ve Sawhney, 1990). Bitkilerde poliaminlerin ağır metal (Groppa vd., 2001) stresiyle ilgili olduğu kaydedilmiştir. Yüksek bitkilerdeki yaygın poliaminler bir diamin olan putresin (Put), triamin spermidin (Spd) ve tetramin spermin (Spm)'dir. PA'lar serbest formda bulunabileceği gibi fenolik bileşikler gibi küçük moleküllere kovalent olarak bağlanarak çözünebilir formda veya çözünemeyen bağlı formda bulunabilirler. Çözünemeyen bağlı formdaki PA'lar genellikle nükleik asitler ve proteinler gibi makromoleküllere bağlanırlar (Gill vd., 2010). Bitkilerde PA sentezinin anahtar enzimleri arginin dekarboksilaz (ADC), ornitin dekarboksilaz (ODC) ve S-adenozil metionin dekarboksilaz (SAMDC)'dir. Putresin, arginaz ve ODC'ın katalizlediği ornitin yoluyla veya sırasıyla ADC, agmatin imino hidrolaz ve N-karbamoilputresin amidohidrolaz'ın katalizlediği üç ardışık reaksiyonla agmatin yoluyla sentezlenir. Spd ve Spm ise SAMDC'nin aktivitesiyle dekarboksile olmuş SAM'daki aminopropil gruplarının ilavesiyle sentezlenir. PA degradasyonu ise diamin oksidaz ve poliamin oksidaz tarafından katalizlenir (Kusano vd., 2008; Tavladoraki vd., 2012). PA biyosentezi, katabolizması, bağlanması, ara bileşikleri ve taşınımı birlikte PA hemoztazına katkıda bulunur. Ayrıca PA katabolizması ve ara bileşikleri özellikle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi ROS'lar üretirler. Bitkilerin stresi kontrol etme kabiliyetinin PA sentezleyebilme potansiyeli ile ilişkili olduğu da ileri sürülmüştür (Gupta vd., 2013). Yine, dıştan uygulanan PA'ların çeşitli abiyotik stres koşullarındaki kültür bitkilerinin toleransını artırdığı ve böylece verimi iyileştirdiği bilinmektedir (Zhao ve Yang, 2008; Yang vd., 2011). Bakır ve kadmiyum stresine maruz kalan bitkilerde putresin miktarının kontrole göre arttığı, spermidin ve spermin miktarının ise azaldığı rapor edilmiştir (Groppa vd., 2003).

#### 1.4.5.2.1.1.4. Stresin Prolin Üzerine Etkisi

Prolinin esas olarak sitoplazmada ve son yıllarda az da olsa kloroplastlarda sentezlendiği gösterilmiştir (Szekely vd., 2008). Bir ozmolit olan prolin yüksek yapılı bitkilerde glutamat veya ornitinden sentezlenir. *Arabidopsis thaliana*'da glutamat yoluyla prolin biyosentezi, çift işlevli  $\Delta$ 1-pirolin-5-karboksilat sentaz (P5CS) enzimi tarafından denetlenir. P5CS enzimi glutamik asiti fosforile ederek glutamil-5-semialdehit (G5SA)'e dönüştürür. Bu enzimin P5CS1 ve P5CS2 olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. Prolin, G5SA'den pirolin-5-karboksilat (P5C) aracılığıyla  $\Delta$ 1-pirolin-5-karboksilat-redüktaz (P5CR) enzimi katalizörlüğünde sentezlenir (Delauney ve Verma, 1993). Bu reaksiyonun hızını belirleyen basamak, P5CS enziminin  $\gamma$ -glutamil kinaz aktivitesidir. Prolin katabolizması ise prolin dehidrogenaz (PDH) ile parçalanır (Özfidan 2010).

Prolin birikiminin, abiyotik streslerin olumsuz etkilerine karşı bitkilerde ozmotik ayarlamaya katkıda bulunduğu, membranların, proteinlerin ve enzimlerin kararlılığını sağladığı ve serbest radikalleri temizlediği kaydedilmiştir (Kadioğlu ve Terzi, 2007; Türkan ve Demiral, 2009). Prolin birikimi stres toleransını Şekil 8'de olduğu gibi birçok yoldan etkileyebilir (Szabados ve Savoure', 2010). Yapılan çalışmalarda birçok bitki çeşidinde strese toleranslı bitkilerde hassas olanlara göre prolin miktarı fazla bulunmuştur (Ashraf, 2007). Ayrıca prolin kuraklıkta lipid peroksidasyonun önlenmesinde de rol oynamaktadır (Molinari vd., 2007). Bakır stresine maruz kalan bitkiler, çeşitli dokularında prolin konsantrasyonunu artırarak strese yanıt vermektedirler. Bakır stresine maruz bırakılan bir çok bitkinin dokularında prolin biriktirdiği rapor edilmektedir (Ku vd., 2012).



Şekil 8. Bitkilerde prolinin çok yönlü fonksiyonları (Szabados ve Savoure, 2010).

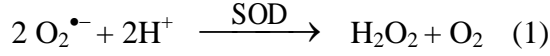
Xiong vd., (2001), bitkilerdeki prolin birikiminin ABA'ya bağımlı veya ABA'dan bağımsız olabileceğini belirtmişlerdir. Bunun yanı sıra, bitkilerde ozmotik strese cevapta ABA birikiminin P5CS gen ekspresyonunu regule ettiği rapor edilmiştir.

#### 1.4.5.2.1.2. Antioksidan Sistemin Enzimatik Bileşenleri

##### 1.4.5.2.1.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) süperoksit serbest radikalının hidrojen peroksit ve oksijene dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir (Fridovich, 1986; Elstner, 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 reaksiyonuyla hidroksil radikalının oluşum riskini azaltır. SOD, süperoksit anyonlarını uzaklaştırmasına rağmen toksik bir oksijen türevini

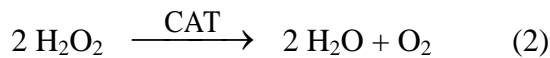
(O<sup>2•-</sup>) diğerine (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dönüştürür (Mehlhorn vd., 1996). Bu reaksiyon sonucu oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fotosentezin güçlü bir inhibitörüdür ve kloroplast fonksiyonu için risk oluşturur. Bu toksik ürün peroksidazlar tarafından temizlenebilir.



SOD bütün aerobik organizmalarda ve aktifleşmiş oksijen üreten bütün hücre alt yapılarında bulunduğu için oksidatif strese karşı savunmada merkezi bir rolünün olduğu düşünülmektedir (Bowler vd., 1992). SOD aktivitesinin su stresine cevabı türlere ve stresin süresine bağlı olarak değiştiği (Fu ve Huang, 2001) ve bu değişimlerin oksidatif strese dirençlilikle bağlantısı olduğu rapor edilmiştir (Foyer vd., 1994). *Lolium perenne* L. bitkisinin köklerinde SOD aktivitesinin bakır konsantrasyonundaki artışa paralel olarak uyarıldığı bildirilmiştir (Zhao vd., 2010). Yapılan çalışmalarda SOD aktivitesinde tek başına meydana gelen artışların reaktif oksijen türlerine karşı yeterli koruma sağlayamayacağı ve oksidatif stresi tek başına engelleyemeyeceği ileri sürülmüştür (Pitcher vd., 1991). Diğer taraftan, SOD'un hücre membran proteinleriyle ilişkisi olduğu düşünülmektedir (Ogawa vd., 1997).

#### 1.4.5.2.1.2.2. Katalaz (CAT)

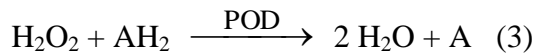
Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6), tabiatta çok yaygın dağılım göstermektedir. Bu enzim, aerobik mikroorganizmaların hepsinde, omurgalılarda, omurgasızlarda, bitkilerde ve mantarlarda bulunmaktadır (Bergmeyer ve Grabl, 1983). Katalaz yüksek konsantrasyonlardaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin iki elektronunu kullanarak su ve oksijene indirgenmesini katalizleyen tetramerik demir porfirin içeren yüksek molekül ağırlığına sahip bir enzimdir. Aynı zamanda katalaz, düşük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonlarında alkoller, askorbat ve fenol içeren indirgenmiş substratları kullanarak peroksidatif aktivite gösterebilir (Chaudiere ve Ferrari-Iliou, 1999). 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 affinitesi bu enzimin etkinliğini kısıtlamaktadır (Foyer vd., 1994). Katalazın büyük bir kısmı peroksizomlarda çok az miktarda da mitokondri matriksinde bulunur. Katalazın bitki dokusunda  $H_2O_2$ 'in uzaklaştırılmasında önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Patykowski ve Urbanek, 2003). Katalazın temel fonksiyonu, moleküler oksijen mevcudiyetinde  $H_2O_2$ 'in ve ROOH gibi bir peroksitin radikalliğini gidererek, özellikle membranlarda oluşturabilecekleri geri dönüşümsüz hasarları engellemektir (Chaudiere ve Ferrari-Ilioui, 1999). Bakır stresi altındaki *Spirodela polyrhiza* (Upadhyay ve Panda, 2010), *Atriplex halimus* (Brahim ve Mohamed, 2011) ve fasulye (Andrade vd., 2010) bitkilerinde CAT aktivitesinin uyarıldığı bildirilmektedir.

#### 1.4.5.2.1.2.3. Peroksidaz (POD)

Peroksidazlar (POD, EC 1.11.1.17) bitkilerde yaygın olarak bulunan ve hem grubu ihtiva eden oksidaz grubu enzimlerdir. POD'lar çoklu moleküler formlara ve geniş bir hücre altı dağılımına sahiptirler. Bitki hücrelerinde POD esas olarak, hücre çeperinde, vakuollerde, membrana bağlı ribozomlarda ve bitki dokularının ekstrasellular alanlarında bulunurlar. 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 ilişkisinin olmasının yanı sıra en önemli fonksiyonu  $H_2O_2$ 'nin parçalanmasını katalizleyerek antioksidan savunma sistemine katkı sağlamalarıdır.



Stres altındaki bitkilerde peroksidaz aktivitesinin arttığı bilinmektedir (Gaspar vd., 1991). Örneğin *Arabidopsis* bitkisinde yapılan bir çalışmada, kuraklık stresine maruz bırakılan



bitkilerde peroksidaz aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Peroksidaz aktivitesi, dış kaynaklı sinyallere ve zor çevre koşullarına cevap olarak hızlı bir şekilde değişebilir. Peroksidazlar, hidrojen vericisi olarak birçok organik ve inorganik substratı kullanarak  $H_2O_2$ 'yi temizlerler ve H vericisi olarak kullandıkları substrata göre isimlendirilirler. Guaiakol peroksidazlar guaiakole olan yüksek spesifikliklerine rağmen başka birçok substratı elektron vericisi olarak kullanabilirler. Çeşitli stres koşullarında bitkilerde guaiakol peroksidaz aktivitesindeki değişimler kaydedilmiştir. Örneğin, pamuk bitkisinde guaiakol peroksidaz enziminin tuz stresi altında arttığı bildirilmiştir (Parida ve Das, 2005). Benzer şekilde orta şiddette kuraklık stresine maruz bırakılan çeltik bitkisinde guaiakol peroksidaz aktivitesinin kontrole göre arttığı, fakat ağır kuraklık koşullarında aktivitenin azaldığı belirlenmiştir (Sharma ve Dubey, 2005). *L. perenne* bitkisinde düşük bakır konsantrasyonlarında POD aktivitesi artmasına rağmen, aşırı bakır konsantrasyonu altında POD aktivitesinin uyarılmadığı rapor edilmiştir (Zhao vd., 2010).

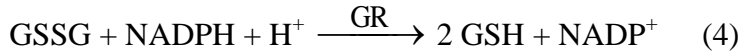
#### **1.4.5.2.1.2.4. Askorbat Peroksidaz (APX)**

Hidrojen peroksiti parçalarken substrat olarak askorbatı kullanan enzimler, askorbat peroksidazlar (APX, EC 1.11.1.11) olarak adlandırılırlar. APX'lerin bitki hücrelerinin sitoplazma ve kloroplastlarındaki  $H_2O_2$ '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). Askorbat peroksidazlar guaiakol peroksidazlara benzemesine rağmen  $H^+$  vericisi olarak askorbata olan yüksek spesifikliklerinden dolayı aralarında farklılıklar vardır (Nakano ve Asada, 1987). Sitoplazmada bulunan askorbat peroksidazlar, kloroplastakine benzer ancak askorbat yokluğunda daha fazla kararlı olup askorbattan başka elektron vericilerini de kullanabilir. Su stresine maruz kalan duyarlı buğday çeşitlerinde askorbat peroksidaz aktivitesinin uyarıldığı, toleranslı buğdayda ise sadece yüksek stres yoğunluğunda arttığı kaydedilmiştir (Sgherri vd., 2000). Uzun süre bakır muamelesine

maruz bırakılan *Solanum lycopersicon* bitkilerinde APX aktivitesinde önemli bir azalma olduğu rapor edilmiştir (Chamseddine vd., 2009).

#### 1.4.5.2.1.2.5. Glutasyon Redüktaz (GR)

Glutasyon redüktaz (GR, EC 1.6.4.2) elektron verici olarak NADPH'ı kullanan oksitlenmiş glutasyonun (GSSG), indirgenmesini (GSH) katalizleyen bir enzimdir (Scruton 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 birçok bitkide çalışılmıştır (Creissen vd., 1994). GSH'nin antioksidan özelliğinden dolayı, glutasyon redüktaz hücrenin antioksidan kapasitesinin 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). GR diğer enzimlerle birlikte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin temizlenmesinde de görev alır. Hayvanlarda substrat olarak GSH'ı kullanan glutasyon peroksidazla birlikte GR, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in temizlenmesine katılır (Schirmer vd., 1989). Glutasyon 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 glutasyon peroksidaz enziminin substratı yeniden oluşur. GR'nin benzer bir fonksiyonu bitkilerde mevcuttur. Oksitlenmiş askorbik asiti (dehidroaskorbat) tekrardan askorbik asite indirgeyen dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) enzimi de GSH'ı 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 büyük bir adım olarak kabul edilmekte (Creissen vd., 1996) ve oksidatif strese karşı korunmada GR'nin önemli bir

enzim olduğu düşünülmektedir (Aono vd., 1995). Nitekim, yapılan çeşitli çalışmalarda oksidatif stres durumunda bu enzim aktivitesinin arttığı kaydedilmiştir (Mehlhorn vd., 1987; Pastori ve Trippi, 1992; Edwards vd., 1994). Farklı bakır konsantrasyonlarına maruz bırakılan mısır bitkisinde GR aktivitesinin önemli miktarda arttığı belirlenmiştir (Tanyolaç vd., 2007).

#### **1.4.6. Stres ve Membran Hasarı**

Stres etkisiyle oluşan serbest radikaller bitkilerde lipid peroksidasyonunu başlatabilir (Thompson vd., 1987). Lipid peroksidasyonunun bitkilerin strese toleransı ile ilişkili olduğu bilinir. 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 oksidasyonu iki veya üç kat artabilir. Örneğin, su stresine maruz bırakılmış buğday ve mısır çeşitlerinde su stresi şartları altında MDA içeriği artarken hassas genotiple karşılaştırıldığında strese toleranslı genotiplerde düşük oranda lipid peroksidasyonu meydana gelir (Pastori ve Trippi, 1992; Sairam vd., 1998). Szafranska vd., (2011)'de farklı bakır konsantrasyonları ile muamele ettikleri *Daucus carota* bitkisinde, belirli bir konsantrasyona kadar (10 µM) lipid peroksidasyon seviyesinin kontrole göre azaldığını, sonraki konsantrasyonlarda ise önemli miktarda arttığını rapor etmişlerdir.

#### **1.4.7. Stres ve Absisik Asit**

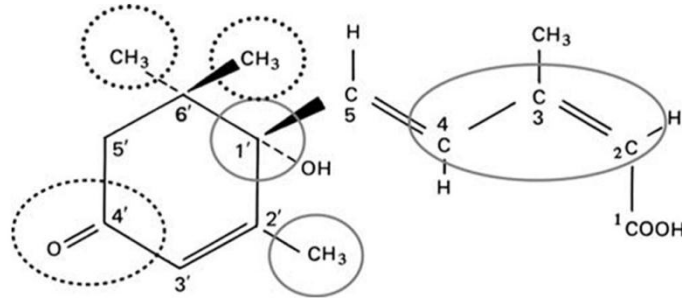
Bitki gelişimi ve üretkenliği pek çok abiyotik stres etmenleri tarafından olumsuz etkilenmektedir ve bitkiler bu olumsuz etkilerle başa çıkabilmek için çok geniş çapta adaptasyon mekanizmaları geliştirmişlerdir. Absisik asit, bitkilerde tohum dormansisi, çimlenmesi, olgunlaşması, çiçeklenme, senesens ve vejetatif gelişme gibi çeşitli biyolojik süreçlerde, ayrıca stomaların kapanması ve çeşitli genlerin ekspresyonu gibi abiyotik stres cevaplarında rol oynayan başlıca bitkisel hormondur (Kuhn ve Schroeder, 2003; Umezawa vd., 2011; Finkelstein, 2013). Ayrıca ABA, brassinosteroidler, etilen, giberellin, sitokin ve

oksin gibi diğer bitkisel hormonlarla etkileşerek bitki gelişiminin diğer pek çok özelliğini etkilemektedir (Taiz ve Zeiger, 2008).

Bugüne kadar ABA ile ilgili birçok çalışma yapılmış ve ABA'nın kuraklık (Iuchi vd., 2001) soğuk (Kumar vd., 2008), donma (Zhou vd., 2006), ağır metal (Hsu vd., 2006) ve tuz stresi (Etehadnia vd., 2008; Özfıdan vd., 2013) gibi farklı abiyotik streslere karşı koruyuculuk özelliği olduğu rapor edilmiştir.

#### 1.4.7.1. Absisik Asitin Yapısı

ABA'nın *cis* ve *trans* olmak üzere iki tane geometrik izomeri vardır. ABA'nın 2 nolu karbonundaki karboksil grubunun yerleşimi ABA'nın *cis* ya da *trans* izomerlerini belirler. Doğal olarak oluşan ABA, *cis* formundadır. C15 atomu içeren ABA, izoprenoidler (terpenoidler) olarak bilinen metabolitlerin bir sınıfına sahiptir (Özfıdan, 2010). ABA'nın yapısı Şekil 9'da gösterilmiştir.



Şekil 9. ABA'nın yapısı (Finkelstein, 2013).

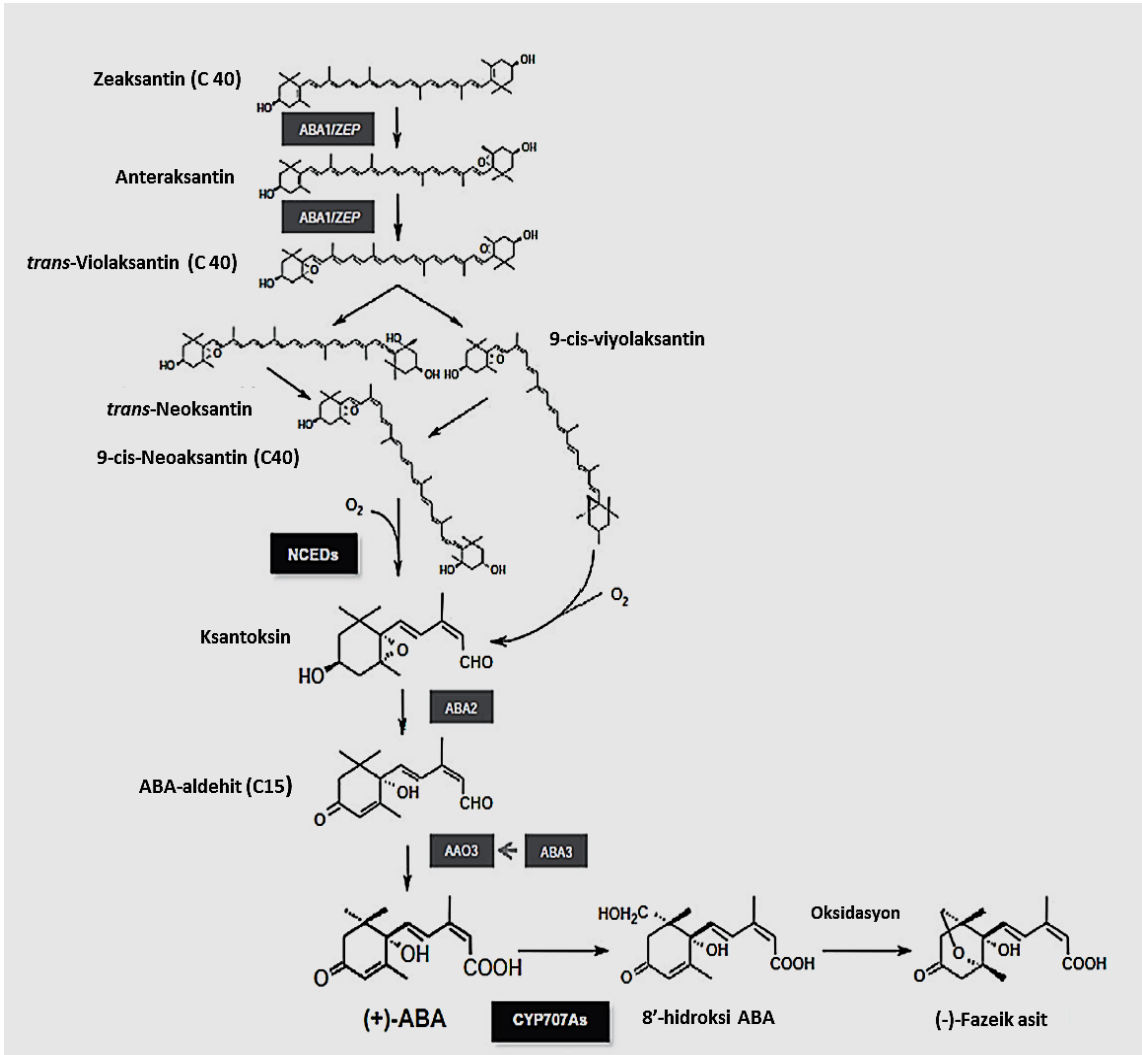
#### 1.4.7.2. ABA Biyosentezi ve Katabolizması

ABA'nın yaprak, kök, gövde, tohum ve meyve dokularında mevalonik asitten sentezlendiği belirtilmiştir. Bu dokularda ABA'nın büyük bir çoğunluğu plastidlerde sentezlenmektedir (Kadıoğlu, 2011). Yüksek bitkilerde, ABA biyosentezi C40 formundaki karotenoid yapısının bir seri enzimatik basamak sayesinde ayrılması ile başlatılır (Soto vd., 2013). Violaksantin sentezi, zeaksantin epoksidaz (ZEP) enzimi ile katalizlenir (Chernys ve

Zeevaart, 2000). Bu enzimin *Arabidopsis*'te ABA1 lokusu tarafından kodlandığı bulunmuştur. Violaksantin bir C40 bileşiği olan 9'-cis-neoksantine dönüştürülerek, daha sonra C15 bileşiği olan ksantoksalı oluşturmak için ortasından ikiye ayrılır. Ayrılma 9-cis epoksikarotenoid dioksigenaz (NCED) tarafından katalizlenir (Taiz ve Zeiger, 2008). Ksantoksinin absisik asit aldehite dönüşümü ise, kısa zincirli bir dehidrogenaz/redüktaz benzeri enzim tarafından katalizlenir ve *Arabidopsis*'te ABA2 lokusu tarafından kontrol edilmektedir. Absisik aldehit ABA'yı oluşturur ve bu son basamak kofaktör olarak molibdene ihtiyaç duyan aldehit oksidaz (AAO) tarafından katalizlenmektedir. *aba3* mutantları da AAO yokluğunda ABA sentezleyemez (Daszkowska-Golec ve Szarejko, 2013; Finkelstein, 2013).

ABA sentezine ek olarak, katabolizması da ABA düzeyinin regülasyonu için önemli bir mekanizmadır. *Arabidopsis* başlıca iki katabolizma yolu kullanmaktadır: : 1) ABA'nın P-450 tip monoksigenaz ile hidroksilasyonu ile faseik asitin izomerizasyonu (8'-OH-ABA'nın kararsız formu), 2) ABA'nın bir monosakkaritle kovalent bağ kurarak, serbest yapıdan ABA- $\beta$ -D-glukozil esterine (ABA-GE) dönüşerek inaktivasyonudur. Serbest ABA sitoplazmada yerleşmişken, ABA+GE ise vokuollerde birikmektedir (Schroeder ve Nambara, 2006).

*Arabidopsis*'te ABA katabolizmasında görev alan ABA-8'-hidroksilazı kodlayan genler *At CYP707A 1, 2, 3 ve 4* (CYTOCHROME P450, FAMILY 707, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 1, 2, 3, 4) olarak tanımlanmıştır (Daszkowska-Golec ve Szarejko, 2013). Bu genler, *Arabidopsis* bitkisi dışında çeltik (Saika vd., 2007), arpa (Millar vd., 2006), buğday (Ji vd., 2011) ve soya fasulyesinde de (Zheng vd., 2012) belirlenmiştir. ABA'nın biyosentez ve katabolizma yolları Şekil 10'da özetlenmiştir.



Şekil 10. ABA Biyosentez Yolu (Umezawa vd., 2011).

### 1.5. Mısır (*Zea mays L.*) Hakkında Genel Bilgiler

Mısır (*Zea mays L.*), 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. Mısır bitkisi 2009 yılında genetik sekansı tamamlanan,  $2n=20$  kromozumlu diploid bir bitki olmasına rağmen 10 tane haploid kromozomu üzerinde yerleşmiş 39469 gen bulunduran ve 2,4 milyar bazdan oluşan büyük bir genoma sahiptir (Schnable vd., 2009; Zhang vd., 2009). Geniş adaptasyon kabiliyeti nedeniyle Dünya'nın

farklı bölgelerinde kültürü yapılabilir. 50° kuzey enleminden 50° güney enlemlerine, deniz seviyesi ile 3000 m'ye kadar olan yüksekliklerde ve ayrıca birçok toprak tipinde tarımı yapılabilir (Morris, 2002).

Gelişmekte olan dünyada, mısır üçüncü önemli besin kaynağıdır. 2020 yılına kadar gelişmekte olan ülkelerde mısıra olan talebin buğday ve pirincin önüne geçmesi ve yıllık mısır ihtiyacının 837 milyon tona kadar artması beklenmektedir (Rosegrant vd., 2001). Artan ihtiyacın çoğu, mevcut işlenebilir topraklardaki yoğunlaştırılmış üretim ile yerel kaynaklardan karşılanacaktır (Rosegrant ve Cline, 2003). 2013 yılı verilerine göre Dünya'daki mısır üretimi yaklaşık olarak 1.016,4 milyon tona ulaşmıştır. A.B.D. 353,7 milyon ton mısır üretimi ile Dünya birincisi olmuşken, Çin 217,7 milyon ton ve Brezilya 80,5 milyon ton mısır üretimi gerçekleştirmişlerdir (Url-3, 2015). Türkiye, 2010 yılında yaklaşık 9 milyon dekar alanda 17 milyon ton mısır üretimi gerçekleştirmiş, 2014 yılında ise mısır üretimi 10,7 milyon dekar alanda 24,77 milyon tona ulaşarak mısır üretimini her yıl kademeli olarak artırmıştır (Url-4, 2015). 2011 yılı verilerine göre, Dünya'da hasadı yapılan mısırın %32'sinin genetik yapısı değiştirilmişken, A.B.D.'de bu oranın %86'yı bulduğu ve 25 mısır çeşidinin ticari olarak üretiminin yapıldığı ifade edilmektedir (Url-3, 2015).

Mısır, geniş bir kullanım alanı olması nedeni ile diğer tahıllara göre oldukça farklı bir konuma sahiptir. İçerdiği zengin besin maddeleri ile mısır, hem insan hem de hayvan beslenmesinde kullanılabilir. Hayvan beslenmesinde yem hammaddesi olarak kullanılan mısır, insan beslenmesinde ise doğrudan kullanımının yanı sıra birçok gıda maddesinin üretiminde hammadde olarak kullanılmaktadır. Mısır danesinin yapısında ticari değere sahip birçok kimyasal bileşik vardır. Olgun bir dane %70-75 nişasta, % 8-10 protein ve % 4-5 yağ içerir (Earle vd., 1946).

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

Mısır (*Zea mays*) çeşitlerine ait bakıra dayanıklı (31G98) ve bakıra hassas (Akpınar) tohumlar, Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü ve Pioneer özel tohumculuk şirketinden temin edildi. Tohumlar toprak içeren 25×18×12 cm'lik saksılara ekilerek, kontrollü koşullarda (22 °C gündüz/18 °C gece sıcaklığında, %60–65 bağıl nemde ve 400  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğunda) bitki büyütme odasında büyütüldü. Bu amaçla saksılara yaklaşık 8'er tohum ekildi ve fideler topraktan çıktıktan 1 hafta sonra seyreltme işlemi yapıldı. Sağlıklı olanlar seçilerek fide sayısı her bir saksıda dörde indirildi. Bitkiler, dört yapraklı aşamaya kadar büyütüldükten sonra, toprak üstü kısımlarından kesilerek, ortama adaptasyonları için, içerisinde saf su bulunan tüpler içerisine aktarıldı ve 1 saat saf suda bekletildi.

Deneysel çalışmaların ilk aşamasında her iki mısır çeşidine uygulanacak olan bakır konsantrasyonunu tespit etmek için 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 ve 1 mM'lık beş farklı bakır ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) konsantrasyonu 12, 18 ve 24 saat süreyle kesilmiş fidelere uygulandı.  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve MDA içeriğindeki değişimler belirlenerek bitkilere 0,5 mM konsantrasyondaki bakırın 12 saat süreyle uygulanmasına karar verildi. GSH,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve SA'nın muamele konsantrasyonlarının belirlenmesi için ise fidelere 0,01; 0,05; 0,1 ve 0,5 mM GSH, 1, 5, 10 ve 20 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve 0,005; 0,01; 0,1 ve 0,5 mM SA 6 saat uygulandıktan sonra, fideler 12 saat bakır stresine maruz bırakıldı. Yine örneklerin  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve MDA içeriğine bakılarak 0,05 mM GSH, 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve 0,01 mM SA'nın stres etkisini iyileştirici etki yaptığı görüldü ve sonraki denemeler için bu konsantrasyonların kullanılmasına karar verildi.

Uygulamalar Güzel ve Terzi (2013) ve Tanyolaç vd., (2007)'e benzer olarak yapıldı. Daha sonra saksılar her bir çeşit için 8 gruba ayrıldı. Birinci grup; toplam 18 saat saf suda bekletildi ve "Kontrol" grubu olarak adlandırıldı. İkinci grup ise yine 6 saat saf suda bekletildikten sonra, 12 saat 0,5 mM  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  içeren solüsyonda tutuldu. Bu gruptaki bitkiler "Cu" grubu olarak isimlendirildi Üçüncü grup; 6 saat 0,05 mM GSH solüsyonunda tutulduktan sonra 12 saat saf suda bekletildi ve bu gruptaki bitkiler "GSH" grubu olarak adlandırıldı. Dördüncü grup bitkiler, 6 saat 0,05 mM GSH ön muamelesinden sonra, 12 saat 0,5 mM bakır içeren solüsyonda bekletildi ve "GSH+Cu" grubu olarak adlandırıldı. GSH



uygulamalarına benzer olarak, beşinci grup bitkiler 6 saat, 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonunda tutulduktan sonra 12 saat saf suda bekletildi ve bu gruptaki bitkiler “H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>“ grubu olarak adlandırıldı. Altıncı gruptakiler ise 6 saat 10 mM “H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>” ön muamelesinden sonra, 12 saat 0,5 mM bakır içeren solüsyonda bekletildi ve “H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Cu” grubu olarak adlandırıldı. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve GSH ön muamelelerine benzer olarak yedinci ve sekizinci gruptaki bitkiler 0,01 mM SA uygulamaları için kullanıldı ve yedinci grup SA grubu, sekizinci grup “SA+Cu” grubu olarak adlandırıldı.

Örnekleme için üstten 3. ve 4. yapraklar seçildi. Su potansiyeli, klorofil floresansı ve gaz değişim parametreleri aynı yapraklar kullanılarak, yapraklar bitkilerden koparılmadan ölçüldü.

## **2.2. Stres Parametrelerinin Belirlenmesine Yönelik Ölçümler**

### **2.2.1. Su Potansiyeli Belirlenmesi**

Yaprak su potansiyeli C52 termocouple psikometre cihazı ile belirlendi (Wescor, Inc., Logan, UT USA). Yaprakların geniş yüzeyinden 6 mm çapında alınan diskler, cihazın C52 sensörüne yerleştirildi. Numunelerin yaprak su potansiyelleri belirlenmeden önce cihaz 45 dakika kalibre edildi.

### **2.2.2. Fotosentetik Pigmentlerin Tayini**

Fotosentetik pigmentler karotenoid ve klorofil tayini Arnon (1949)’a göre belirlendi. Taze yaprak örnekleri (0.25 g) 5 ml % 80 aseton içerisinde homojenize edildi. Homojenat 5000 g’de oda sıcaklığında 5 dk santrifüj edildi. Süpernatantın absorbansı 663, 645 ve 450 nm’ lerde spektrofotometrede (Nicolet evolution 100, Thermo Scientific, USA) ölçüldü. Pigment içeriklerinin belirlenmesi için Lichtenthaler (1987), tarafından geliştirilen denklemler kullanıldı.

### 2.2.3. Lipid Peroksidasyonu Tayini

Lipid peroksidasyon seviyesi, lipid peroksidasyonun bir ürünü olan malondialdehid içeriğine dayanarak Heath ve Packer (1968), metodunu takiben ölçüldü. Ekstraksiyon % 0.1 trikloro asetik asit (TCA) içerisinde yapıldı. Homojenat 15,000 g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatantın 1 ml'sine 4 ml, % 20 TCA içerisinde hazırlanmış % 0.5 tiobarbiturik asit (TBA) ilave edildikten sonra, süpernatantın absorbanansı 532 nm de kaydedildi. 600 nm de spesifik olmayan absorpsiyon için okunan değer hesaptan çıkarıldı. Elde edilen sonuç formülde ( $A = E.c.1$ ) yerine konularak malondialdehit (MDA) konsantrasyonu hesaplandı. ( $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

### 2.2.4. Prolin Tayini

Kurutulmuş numunelerden (0,2 g) alınarak 10 ml % 3'lük sülfosalisilik asit ile homojenizasyonun ardından filtre edildi. Süzüntü 22 °C'de 5,000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısımlarından 1 ml alınarak üzerine 1 ml asetik asit ve 1 ml ninhidrin konuldu. Ninhidrin, asetik asit ve orto-fosforik asit kullanılarak hazırlandı. Daha sonra tüplere konulan örnekler 1 saat 100 °C'de su banyosunda tutuldu ve reaksiyon buzda sonlandırıldı. Soğuyan örneklerin üzerine 3 ml toluen eklenerek, vorteksle karıştırıldı. Ağzı kapaklı tüplere alınan örnekler 4.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pipetle üst faz sarsılmadan küvete alındı ve 520 nm'de spektrofotometrede okundu (Bates vd., 1973). Sonuçlar gram taze ağırlık (TA) başına  $\mu\text{g}$  olarak ifade edildi.

### 2.2.5. Poliamin Tayini

Poliamin içeriği Flores ve Galston (1982) metoduna göre ölçüldü. Taze yaprak dokusu (5 g) 10 ml 0,4 M perklorik asit ile homojenize edildi. Homojenat, 4 °C de 3000 g de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant toplandı, üzerine 10 ml 0,4 M perklorik asit ilave edildi ve tekrar santrifüjlendi. Süpernatantlar birleştirildi ve son hacim perklorik asit ile 25 ml'e tamamlandı. Süpernatant Whatmann filtre kağıdı ile süzüldü. Süpernatantın 1 ml'si üzerine 200  $\mu\text{l}$  1 M

NaOH ve 300 µl sodyum hidrojen karbonat ilave edildi ve karışım 30 saniye vorteksle karıştırıldı. Bu karışımın üzerine 2 ml dansil klorit ilave edildi. Karışım 40 °C sıcaklığında 45 dk inkübe edildi. Reaksiyon 100 µl % 25 amonyum hidroksit ile durduruldu. Karışım 30 dk oda sıcaklığında bekledikten sonra hacim asetonitril ile 5 ml'e tamamlandı. Bu karışım 2500 g' de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant 0,22 µm'lik filtrelerden geçirildi ve HPLC'ye yüklendi. Poliamin içeriği UV/VIS detektör ile HPLC cihazıyla (Shimadzu, LC 20 AT/Prominence, Japan) okundu. Çözücü miktarları amonyum asetat: asetonitril (65:35 v/v), akış hızı 0,70 ml dk<sup>-1</sup> ve 50 °C biçiminde olacak şekilde kullanıldı. 20 µl ekstre, C18 (4.6 × 250 mm) kolonuna enjekte edildi ve 254 nm dalga boyunda belirleme yapıldı. Piklerin alanları kaydedildi ve bir bilgisayar yazılımı ile putresin, spermin ve spermidin konsantrasyonları hesaplandı. Sonuçlar gram taze ağırlık başına µg olarak ifade edildi.

### **2.3. Dıştan Uygulanan Maddelerin İçsel İçeriklerinin Belirlenmesi**

#### **2.3.1. Bakır Analizi**

Yaprak numuneleri fırında kurutulup toz haline getirildi. Toz halindeki numuneler 550 °C'ye ayarlı fırında 4 saat tutularak kül haline getirildi. Kalan bakiye 1 M HNO<sub>3</sub> ile standart bir hacime getirildi. Ekstrakttaki Cu konsantrasyonu atomik absorpsiyon spektrofotometresiyle belirlendi (Unicam, 929 AAS)

#### **2.3.2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> İçeriğinin Belirlenmesi**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriği Velikova vd., (2000), metoduna göre belirlendi. Yaprak numunelerinden 0,25 g alınarak 0,1 g aktif kömür ile birlikte 5 ml % 0,1 TCA içerisinde homojenize edildi. Homojenat 15.000 g'de 4 °C'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatanttan 1000 µl alınarak üzerine 1000 µl 10 mM potasyum fosfat tamponu ve 1500 µl 1 M KI ilave edildikten sonra oluşan sarı renk 390 nm'de spektrofotometredeki kayıtlı standart grafikten okundu.

### 2.3.3. GSH İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ

GSH içeriğinin belirlenmesi için öncelikle GSH ekstraksiyonu yapıldı. Alınan numuneler (0,5 g) sıvı azotta toz haline getirildikten sonra, 5 ml 1 mM EDTA içeren % 5'lik metafosforik asit içerisinde ekstrakte edildi. Ekstrakt 4 °C'de 10.000 g'de 10 dk santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant GSH içeriğinin belirlenmesi için kullanıldı.

Glutasyon içeriği spektrofotometrik olarak Griffith (1980) yöntemine göre belirlendi. Glutasyon (GSH+GSSG) 250 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,5), 200 µM NADPH, 600 µM DTNB, 25 µl ekstrakt ve 0,3 U GR içeren reaksiyon karışımının kullanılmasıyla ölçüldü. 412 nm'de absorbanstaki değişim 3 dakika boyunca ölçüldü. GSSG içeriğini belirlemek için 25 µl ekstrakt 2-vinylpyridine ile 25 °C'de 1,5 saat boyunca inkübe edildi. Glutasyon konsantrasyonu 0-5 µM konsantrasyonlarda GSH'ın kullanılmasıyla elde edilen standart grafik üzerinden hesaplandı.

### 2.3.4. SA İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ

Salisilik asit miktarı Raskin vd., (1989), metoduna göre belirlendi. Numuneler (0,5 g), 3 ml % 90'lık methanolde homojenizer (IKA labortechnik, Ultraturrax T25) ile homojenize edildi. Elde edilen ekstrakt 12.000 g'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant 5 dk 68 °C'de evapore edildi. Süpernatanttan geriye kalan kısım 2,5 ml % 5'lik trikloroasetik asit (TCA)'de çözüldü ve 12.000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatanta 5 ml etilasetat, siklopentan ve isopropanol (100:99:1 w/w) eklendi. Süpernatant 10 dk 90 °C'de evapore edildikten sonra süpernatanttan geriye kalan kısım 2,5 ml % 20 metanolde çözüldü ve bundan 100 µl HPLC sistemine enjekte edildi. SA analizi için HPLC pompası, mikro vakum degasser'ı (MVD), termostadlı kolon bölümü (TTC), refraktif (RID) dedektör, floresans dedektör standart mikro ve preparatif otomatik numune yükleyici modüler sistemden kurulu LC 20 AT/Prominence (Shimadzu, Japan) marka yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı kullanılarak yapıldı. SA tanımlanması ve ayırımı, Lichrosorb SI-60 (250 mm x 4.0 mm i.d., 5 µm particle size, Teknorama, Barcelona, Spain) kolon kullanılarak metanol/su, 50:50, (v/v) mobil fazında izokritik olarak 1ml/dk akış hızında belirlendi. SA miktarı yukarıda belirtilen şartlarda

otentik standartlar yardımıyla onların alıkonma zamanları kullanılarak karşılaştırma yoluyla tanımlandı. SA'nın uygun konsantrasyonları hazırlanıp sulandırma yoluyla belirlenen farklı konsantrasyonları kolona enjekte edilerek pik alanları Shimadzu LC solution Software yardımıyla belirlendi.

## **2.4. Fotosentezle İlgili Parametrelerin Ölçülmesi**

### **2.4.1. Kuru Ağırlık**

Alınan numunelerden kuru ağırlık ve büyüme inhibisyonunun ölçümü Güzel ve Terzi (2013)'e göre yapıldı. Büyüme inhibisyonu (Bİ) ölçümü için aşağıdaki formül kullanılarak bütün muameleler kontrol grubuyla karşılaştırıldı (kontrol için Bİ=0, yani %100 büyüme).

$Bİ = [(C-T) / C] \times 100$  (C; kontrolün kuru ağırlığı, T; muamele yapılan bitkilerin kuru ağırlığı)

### **2.4.2. Fotosentetik CO<sub>2</sub> Oranı ve Transpirasyonun Ölçülmesi**

Mısır bitkilerinin fotosentez oranı ve transpirasyon bir infrared gaz analizörü vasıtası ile ölçüldü (KU vd., 1977). Ölçümler için yapraklar, fotosentez sisteminin yaprak küveti arasına yerleştirildi.

### **2.4.3. Klorofil Flüoresans Analizleri**

Klorofil floresans ölçümleri OS1-FL, florometre ile Nar vd., (2009)'a göre gerçekleştirildi. (OptiScience Corporation, Tyngsboro, MA, USA). Ölçümler, karanlık adaptasyon klipsi ile 20 dakika karanlığa maruz bırakılan 6 farklı yapraktan alındı. Minimum klorofil floresansı (F<sub>0</sub>) modüle edilmiş, zayıf ışık ( $\lambda 660$ ,  $<0,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) altında ölçüldü. Maksimum klorofil floresansı (F<sub>m</sub>), PS2 yi doyuran  $\lambda 690$  beyaz ışığın ( $8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), 0,8 s uygulanması ile elde edildi. Karanlık ölçümlerinin ardından, yapraklara güneş ışığı ile beraber aktinik ışık ( $5,5 \text{ W}$ 'a halogen lamp, ML S990, Micron, Tokyo, Japan) uygulanarak

kararlı hal klorofil floresansı ( $F_s$ ) elde edildi. Aktinik ışığın yoğunluğu  $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  di. Aydınlıktaki maksimum klorofil fluresansını ( $F_{m'}$ ) belirlemek için doyurucu beyaz ışık ( $8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), 0,8 s süreyle uygulandı. Klorofil floresans parametrelerinin tanımları Van Kooten ve Snel (1990) tarafından belirtildiği gibi kullanıldı.  $F_v/F_m$  ve  $\Phi_{PS2}$ , sırasıyla PS2'nin maksimum ve etkili kuantum verimliliğidir. NPQ  $(F_m - F_{m'})/F_{m'}$  denklemi ile Bilger ve Bjorkman (1990)'a göre hesaplandı.  $F_v/F_m$  ve  $\Phi_{PS2}$  ise florometre cihazı tarafından,  $(F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$  ve  $\Phi_{PS2} = (F_{m'} - F_s)/F_{m'})$  denklemleri kullanılarak Genty vd., (1989)'a göre hesaplandı. ETR, özel bir Fotosentetik Aktif Radyasyon (PAR) klipsi ile ölçüldü ve  $\text{ETR} = (\Phi_{PSII} \times \text{PAR} \times 0.5 \times 0.84)$  formülüne göre hesaplandı. Böylece flüoresans ile ilgili olarak fotosistem hakkında bakır stresi ve ön muamele koşullarında değerlendirmeler yapıldı.

#### **2.4.4. Rubisco Aktivitesi ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi**

Rubisco ekstraksiyonu için alınan numuneler sıvı azot ve insoluble polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) ile toz haline getirildikten sonra ekstraksiyon, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , % 12 gliserol, % 0,1  $\beta$ -merkaptoetanol ve % 1 PVPP-40 (soluble PVPP) içeren ekstraksiyon tamponu kullanılarak yapıldı.

##### **2.4.4.1. Rubisco Aktivitesi**

Rubisco aktivitesi radyoaktif  $^{14}\text{C}$  kullanılmasına ihtiyaç duymayan bir metot olan Sawada vd., (2003)'e göre belirlendi. 100 mM Bisin (PH 8,2), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 5 mM kreatin fosfat, 1 mM ATP-2Na, 0.2 mM NADH, 0.6 mM RuBP, 10 Unite fosfokreatin kinaz, 10 unite gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz ve 10 unite fosfogliserat kinaz içeren reaksiyon ortamında  $25^\circ\text{C}$  de ölçüldü. Enzimatik aktivitenin doğruluğu RuBP içermeyen reaksiyon ortamında  $340\text{nm}$  de absorbanstaki azalış yolu ile belirlendi. Başlangıç aktivitesi reaksiyon ortamına homojenat ilave edilmesi ile yapıldı. Rubisco, 75 mM HEPES-KOH (pH 7,8), 10 mM  $\text{MgCl}_2$  ve 10 mM  $\text{NaHCO}_3$  içeren ortamda,  $0^\circ\text{C}$  de 20 dk aktive edildi. Maksimum aktivite süpernatantın 0,5 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  içerisinde 30 dk  $0^\circ\text{C}$  de inkübasyondan sonra belirlendi.

#### **2.4.4.2. Rubisco Konsantrasyonu**

Rubisco konsantrasyonu Rubisco quantitasyon kiti (Agrisera) ile belirlendi. Yaklaşık 20 µg/20µl total protein, rubisco standard (0,5 µg/20 µl) ve protein moleküler ağırlık standardı (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) poliakrilamid jele yüklendi. Elektroforez Laemmli, (1970)' e göre SDS varlığında gerçekleştirildi. Yığma jelinin akrilamid konsantrasyonu % 5 iken, ayırma jelinin konsantrasyonu ise % 12,5 olacak şekilde ayarlandı (Ferreira vd., 1996). Jel 80 mA'de 30-40 dk elektroforez tamponunda koşturuldu. Proteinler, elektroblotting tamponu (12 mM Tris base, 96 mM glisin, ve % 20 metanol) ile poliviniliden florid (PVDF) membrana transfer edildi. Immun belirleme için blotlanmış membran, durdurma solüsyonuna (% 5 yağsız kuru süt, 24,8 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, 2,7 mM KCl, ve % 0,5 Tween 20 [TBST]) alındı. Membran sallayıcıda 30 dk boyunca 5 dk aralıklarla 4 kez TBST ile yıkandı. Ardından 1 saat süre ile poliklonal tavşan anti rubisco antikoru (Agrisera) ile inkübe edildi. TBST ile 2,5 dk 4 yıkamanın ardından blot, alkalın fosfataz bağlı keçi anti tavşan immunoglobulin G (IgG) poliklonal antikoru ile 30 dk muamele edildi. İki buçuk dakikalık 4 yıkamanın ardından, ortama, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium chloride (BCIP/NBT) substratı eklendi ve reaksiyon için yaklaşık olarak 15 dk beklendi. Blot su ile 2 dk aralıklarla 3 kez yıkandı. Blotlanmış membran, temiz filtre kağıtları arasında kurutuldu ve -20 °C de saklandı. Protein bantlarının Western Blot görüntüleri, jel görüntüleme sistemi (BIO-RAD) ile elde edildi.

### **2.5. Enzim Aktivitelerinin Tayini**

#### **2.5.1. Antioksidan Enzimler İçin Ekstrakt Hazırlanması**

Yapraklardan 0,1 g'lık alınan numuneler sıvı azot içerisinde toz haline getirildi. Daha sonra 5 ml ekstraksiyon tamponu (50mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA pH 7,0, % 1 PVPP) içerisinde ekstrakte edildi. Ekstrakt 4 °C'de 20000 g'de 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant enzim aktivitesinin tayini için kullanıldı.

### **2.5.1.1 Guaiakol Peroksidaz (GPX) Aktivitesinin Tayini**

Guaiakol peroksidaz (EC 1.11.1.7) 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 dakika süreyle ölçülmesiyle belirlendi. Guaiakol peroksidaz (GPX) aktivitesi  $\epsilon=26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ekstraksiyon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı.

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

Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) aktivitesi, Aebi (1983)'nin yöntemine göre belirlendi. Enzim aktivitesi, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 20 µl enzim ekstraktı içeren 1 ml'lik reaksiyon karışımının 240 nm'de 5 dakika süreyle ölçülmesiyle belirlendi. Katalaz aktivitesi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> için  $\epsilon=39,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ekstraksiyon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı.

### **2.5.1.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini**

Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) aktivitesi, Beauchamp ve Fridovich (1971) metoduna göre belirlendi. 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,8), 0,1 mM EDTA, 13 mM metiyonin, 75 µM nitro blue tetrazolyum ve 50 µl ekstrakt ihtiva eden 1 ml reaksiyon ortamına 2 µM riboflavin ilave edilerek reaksiyon başlatıldı, bu karışım 10 dakika boyunca 375 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> şiddetinde beyaz ışığa maruz bırakıldıktan sonra 560 nm'de absorbans değerleri belirlendi.

### **2.5.1.4. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesinin Tayini**

Askorbat peroksidaz (APX, EC 1.11.1.11) aktivitesi, 290 nm'de absorbansdaki azalışa bağlı olarak belirlendi (Nakano ve Asada, 1981). Enzim aktivitesi, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 250 µM ASC, 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 20µl enzim ekstraktı içeren 1 ml'lik



reaksiyon karışımının ölçülmesiyle belirlendi. Askorbat peroksidaz aktivitesi, 290 nm’de ASC için  $\epsilon=2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ekstrikasyon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı.

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

Glutasyon redüktaz (GR, EC 1.6.4.2) 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 enzim 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’in oksidasyonu 340 nm’de 5 dakika boyunca azalmanın ölçülmesiyle belirlendi.

#### **2.5.2. NADPH Oksidaz (NOX) İçin Ekstrakt Hazırlanması**

Yapraklardan 0,1 g alınan numuneler sıvı azot içerisinde toz haline getirildikten sonra 1,8 ml ekstraksiyon tamponu (100 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 mM EDTA pH 7,0, % 0,1 Triton) içerisinde ekstrakte edildi. Ekstrakt 4 °C’de 15000 g’de 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant enzim aktivitesinin tayini için kullanıldı.

##### **2.5.2.1 NADPH Oksidaz (NOX) Aktivitesinin Tayini**

NADPH oksidaz (EC 1.6.3.1) aktivitesi NADPH’in 340 nm’deki ( $\epsilon=6.2 \text{ mM cm}^{-1}$ ) oksidasyonuna göre (Cakmak ve Marschner, 1988) belirlenmiştir. Enzim aktivitesi, 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 0,1 mM EDTA ve 100  $\mu\text{M}$  NADPH’den oluşan reaksiyon ortamında 3 dakika süreyle absorbandsdaki azalışa bağlı olarak belirlendi.

## 2.6. Protein Tayini

Protein tayini Bradford (1976)'a göre spektrofotometrik olarak yapıldı. Bovin serum albumin (BSA) standartları hazırlanarak, Coomassie Brilliant Blue G250 boyar maddesi ile proteinlerin oluşturduğu kompleks 595 nm ölçüldü. Protein konsantrasyonu mg cinsinden hesaplanarak, enzim aktivitelerinin belirlenmesinde kullanıldı.

## 2.7. *NOX*, *GSHSY* ve *AAOX* Gen İfadelerinin Belirlenmesi

### 2.7.1. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

İçlerinde iki tane metal bilye olan ependorflara konulan doku hemen sıvı azota atıldı ve doku parçalayıcı cihaza (Qiagen, Germany) konularak 4 dakika boyunca parçalanması sağlandı. RNAeasy plant mini kiti (Qiagen, Germany) ile üretici firmanın talimatlarına göre yapıldı.

RNA konsantrasyonu bir Nano Drop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) cihazı kullanılarak ölçüldü ve gerekli hesaplamalar yapılarak, bütün RNA konsantrasyonlarının eşitlenmesi sağlandı. cDNA sentezi için her bir örnek için, 1 µg total RNA kullanıldı. RNA bir tek zincir cDNA sentez kiti (Applied, USA) ile sentromer primerleri kullanılarak, üretici firmanın talimatlarına göre revers transkribe edildi.

### 2.7.2. Real Time PCR (qRT-PCR)

Elde edilen cDNA'lar Solis BioDyne 5x HOT FIRE Pol EvaGreen qPCR Süper Mix (low ROX) (Medibena, Austria) kullanılarak gerçekleştirildi ve gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için CFX96 connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA) qRT-PCR cihazı kullanıldı. Real time PCR için 95,0 °C'de 12 dakika, 95,0 °C'de 0:15 için 45 döngü, 60,0 °C'de 0:30, 72,0 °C'de 0:30, melt curve için 65,0 °C'den 95 °C'ye 0,5 °C'lik artışlarla program gerçekleştirildi. Her biyolojik tekerrür 2 teknik tekerrür şeklinde analiz edildi. Ortalama teknik hata 0,5(±1) Cq değerleri şeklinde bulundu.

Ayrıca, bu metodda kontrol geni olarak Aktin (ACT1Zm-F: GAAGATCACCCCTGTGCTGCT ve ACT1Zm-R: ACCAGTTGTTTCGCCACTAG) housekeeping geni kullanıldı. Çıkan sonuçlar kullanılan CFX96 connect Real-Time PCR cihazının Bio-Rad CFX Manager programı ile gen ekspresyonu seviyesinde kıyaslanarak, normalize edilmiş Cq değerleri üzerinden bir grafik oluşturuldu.

qRT-PCR metodunda *AAOX*, *NOX*, *GSHSY* genleri test edildi.

Tablo 2. qRT-PCR Bileşenleri

Reaksiyon Bileşeni	Miktarı (µl)
Süper Miks	4
Forward Primer	1
Reverse Primer	1
cDNA	1
Nükleaz içermeyen su	13
Toplam	20

Tablo 3. qRT-PCR’da kullanılan primerlerin baz dizilişleri

Primerler	Primer Dizilimleri	İşlevi
<b>1-) Absisik Aldehit oksidaz</b> <i>Zea mays</i> LOC542228 (cl1856_2(520)), mRNA (Genbank, AC number: NM_001111838.1)	<b>AAOXZmF:</b> “CCTGACAAGAAGCGTGTCT” <b>AAOXZmR:</b> “GAATGTGACGGCGGATTCG”	ABA biyosentezinde görevli gen
<b>2-)Glutatyon sentetaz:</b> <i>Zea mays</i> clone 324517 glutathione synthetase mRNA, complete cds ( Genbank, AC number: EU968846.	<b>GSHSYZmF:</b> “TCTCGTTCGTGGTGGTGTTT” <b>GSHSYZmR:</b> “TACGCCACCTTCGTCTGATG”	GSH Sentezinde görevli gen
<b>3-) NADPH Oksidaz (NOX)</b> (Genbank, AC number: NM_001062650)	<b>NOXZmF:</b> “GGGCCAGTACTTCGGTGAAA” <b>NOXZmR:</b> “AAGCTTCACCAGGCTACGAC”	NADPH oksidaz sentezinde görevli gen

## **2.8. İçsel ABA Tayini**

100 mg taze yaprak rneği 3 saat liyofilize edildi. Liyofilize rnekler, MilliQ (Su/doku oranı ratio 50:1, v/w) içerisinde 16 saat boyunca 4  C'de ekstre edildi. Kantitatif ABA analizleri Phytodetek ABA ELISA kiti ile gerçekleştirildi. (±) cis-trans ABA (Sigma, St. Louis), standart olarak kullanıldı. Sonuçlar gram taze ağırlık başına pmol olarak ifade edildi.

## **2.9. İstatistik Analizler**

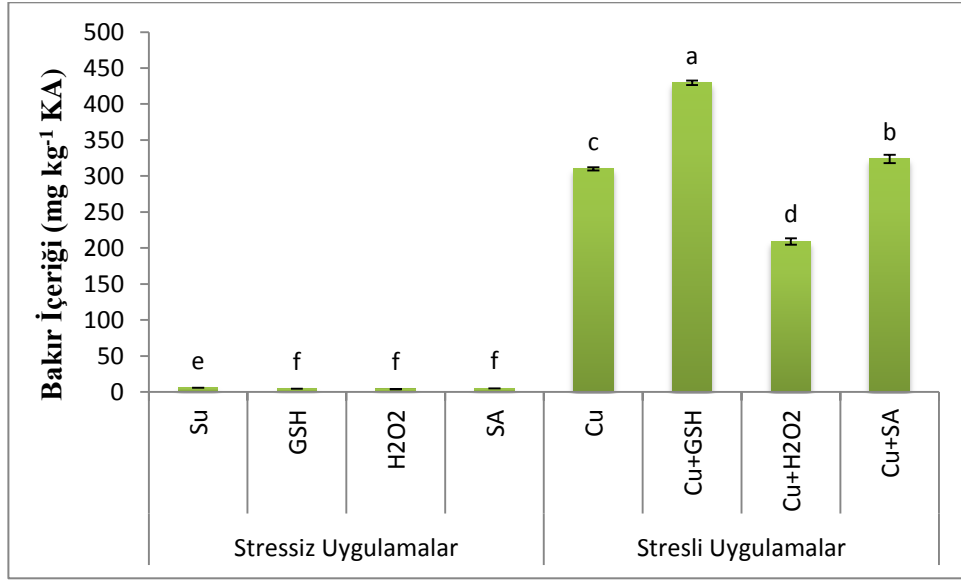
Denemeler, tesadüf parseller deneme deseni planında kurulmuş olup, 3 paralel ve en az 3 tekrarlı olarak yapıldı. Stres ve n muamele işlemlerine bağlı olarak yapılan örneklemeler ve ekstraksiyonlar sonucu elde edilen sayısal ve oransal değerler, Windows tabanlı, lisanslı bir paket program olan Statistic Package for Social Sciences (SPSS for Windows 17.0) paket programı içerisinde yer alan Duncan oklu Karşılaştırma Testine göre belirlendi.

### 3. BULGULAR

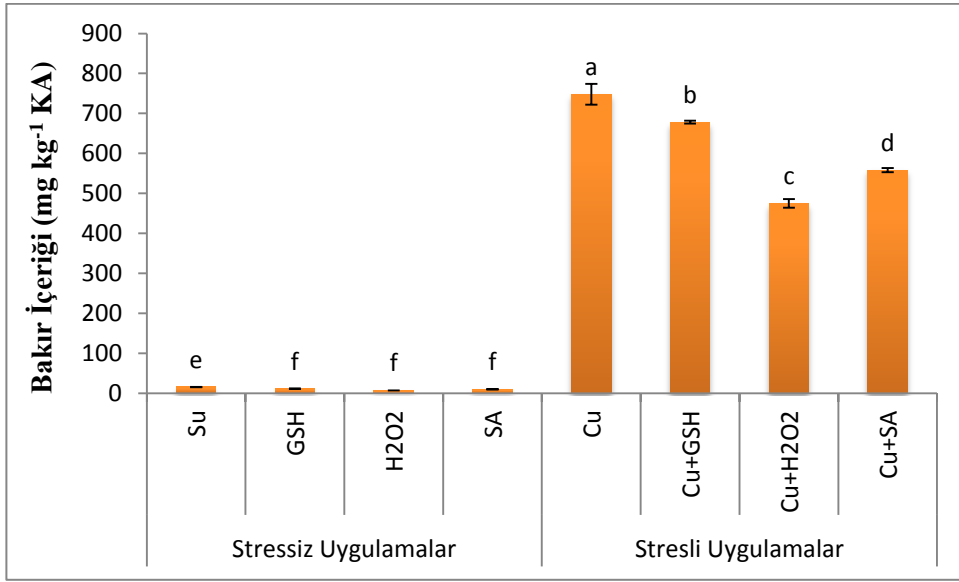
#### 3.1. GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA Uygulamalarının Bakır İçeriği ve Çeşitli Stres Parametreleri Üzerine Etkisi

##### 3.1.1. İçsel Bakır İçeriği Üzerine Etkisi

Bakır stresi koşullarında her iki mısır çeşidinde de içsel bakır içeriğinde önemli artışların olduğu belirlendi. 31G98 çeşidindeki içsel bakır içeriğinin Akpınar çeşidine göre çok daha fazla arttığı görüldü. Akpınar çeşidinde GSH+Cu ve SA+Cu uygulanan fideler bakır uygulanan fidelerle kıyaslandığında, bakır içeriğinin daha fazla arttığı bulundu. Her iki çeşitte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Cu uygulamasında bakır içeriğinin kontrole göre (bakır uygulaması) azaldığı belirlendi (Şekil 11-12).



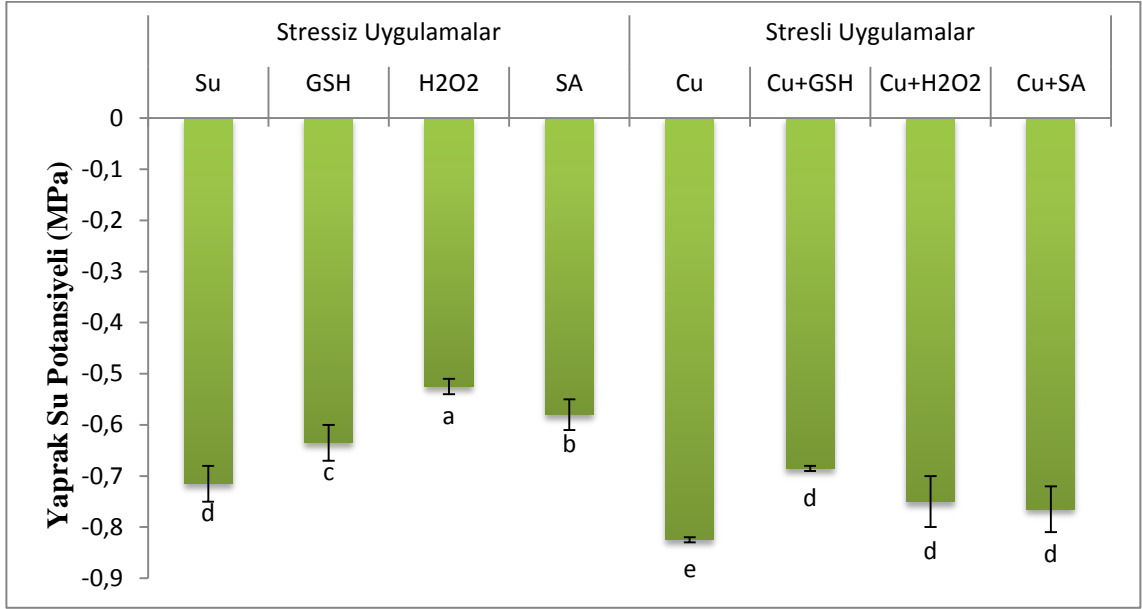
Şekil 11. Akpınar çeşidinde GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının içsel bakır içeriği üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.



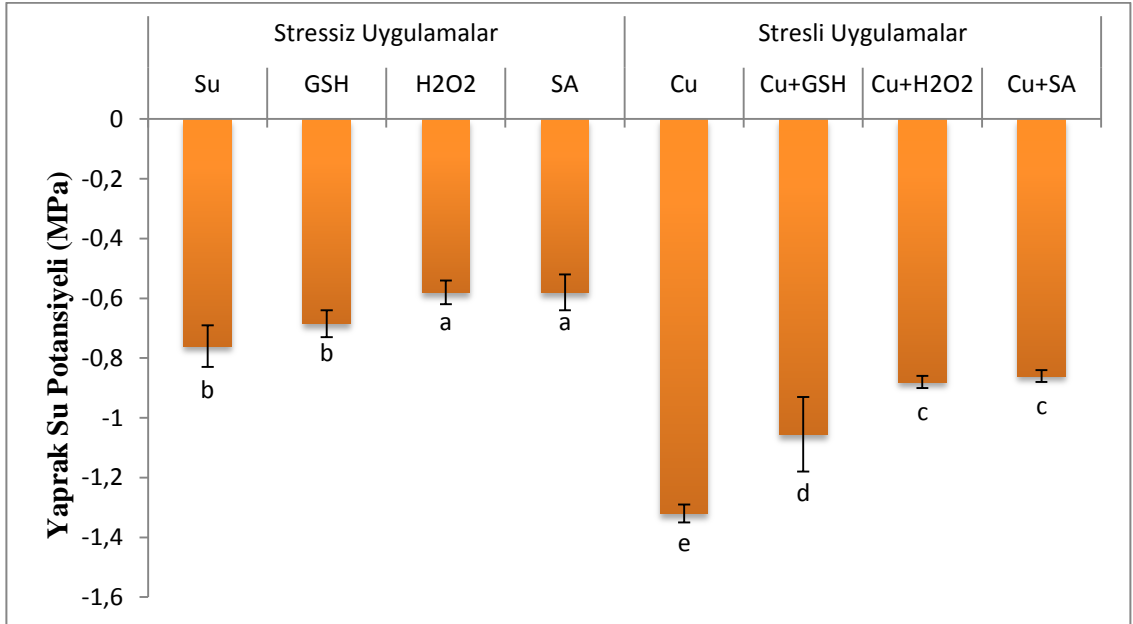
Şekil 12. 31G98 çeşidinde GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının içsel bakır içeriği üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

### 3.1.2. Su Potansiyeli Üzerine Etkisi

Bakır stresi koşullarında her iki mısır çeşidinde yaprak su potansiyelinin ( $\Psi$ ) kontrollerine göre istatistiki açıdan önemli derecede azaldığı belirlendi. Söz konusu azalışın 31G98 çeşidinde çok daha fazla olduğu gözlemlendi. Yine her iki mısır çeşidinde GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya SA uygulamalarının kontrollerine göre bitkilerin su potansiyelini ( $\Psi$ ) farklı oranlarda arttırdığı gözlemlendi. Su potansiyeli üzerine her iki çeşitte GSH uygulamasının, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarına göre daha etkili olduğu görüldü (Şekil 13-14).



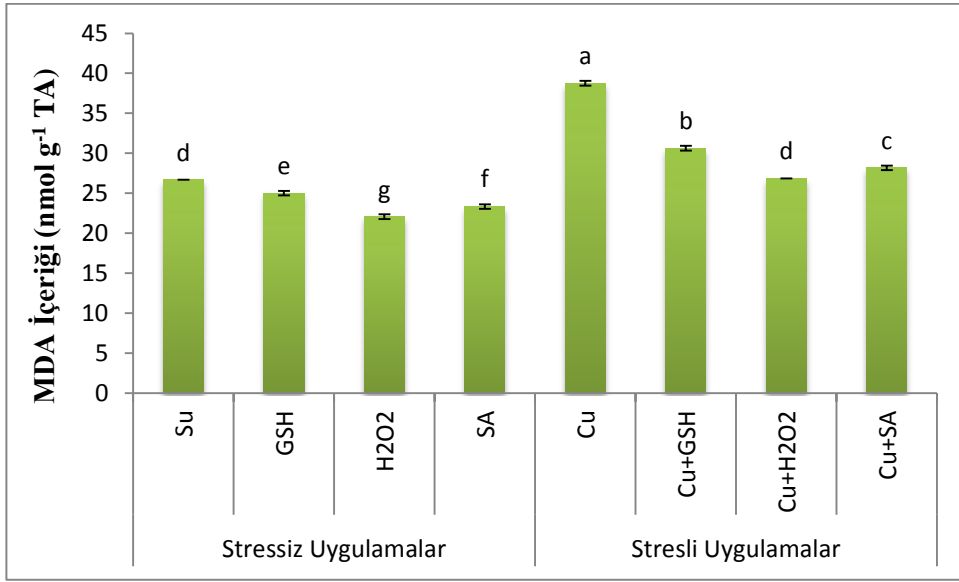
Şekil 11. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının yaprak su potansiyeli üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar, standart sapmadır (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.



Şekil 12. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının yaprak su potansiyeli üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

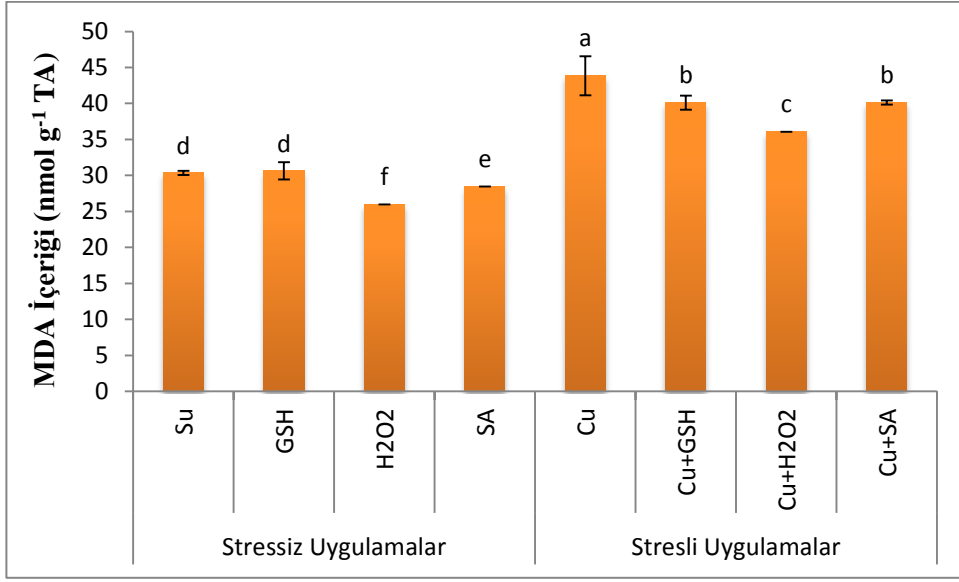
### 3.1.3. Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkisi

Bakır stresi koşullarında her iki mısır çeşidinin lipid peroksidasyonunda kontrollerine göre önemli artışlar belirlendi. Her iki mısır çeşidinde lipid peroksidasyon durumu gerek stresli gerekse de stressiz koşullarda GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya SA uygulamalarıyla kontrollerine göre önemli ölçüde azaldığı görüldü. Her iki mısır çeşidinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasının GSH ve SA uygulamalarına göre lipid peroksidasyonu üzerine daha etkili olduğu bulundu (Şekil 15, 16).



Şekil 13. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının lipid peroksidasyonu üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir (TA= Taze Ağırlık).

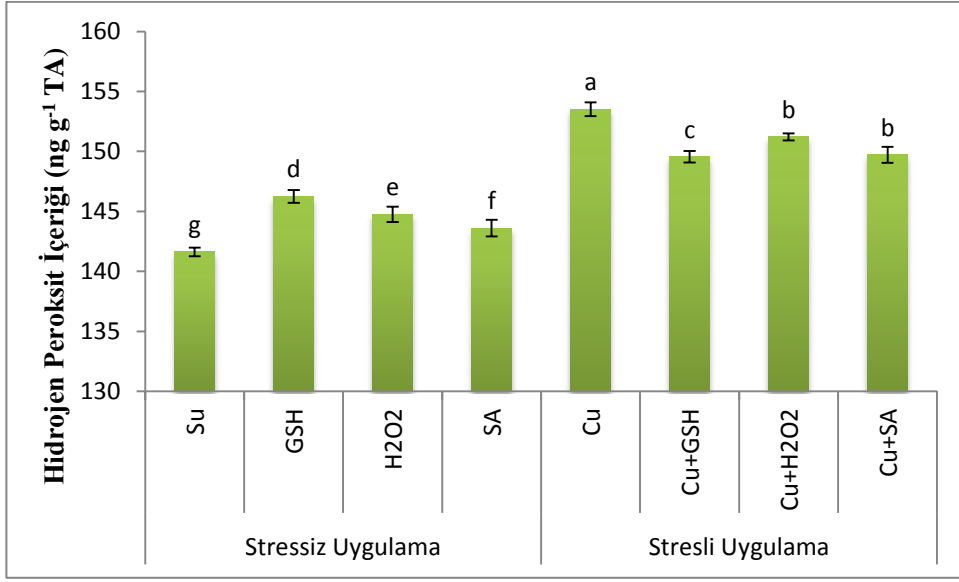




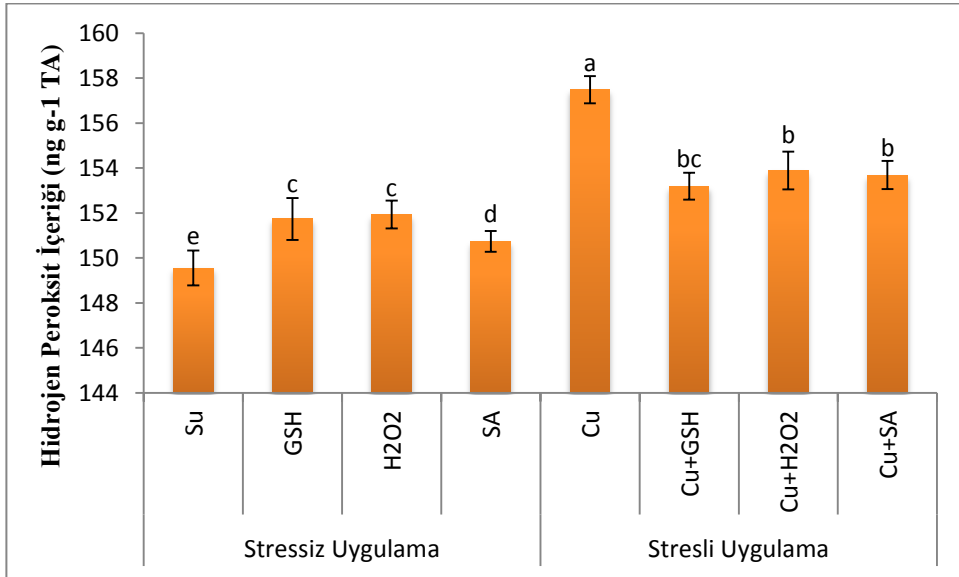
Şekil 14. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının lipid peroksidasyonu üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

### 3.1.4. İçsel Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) İçeriği Üzerine Etkisi

Her iki mısır çeşidinde de bakır stresi koşullarında içsel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğinin kontrole göre istatistik olarak arttığı belirlendi. Stressiz GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarında her iki çeşitte de içsel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğinde kontrole göre (saf su uygulaması) önemli artışlar gözlemlendi. Bakır stresli GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarında ise içsel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriklerinin kontrole göre (bakır uygulaması) önemli miktarda azaldığı bulundu. GSH uygulamasının diğer uygulamalara göre daha etkili olduğu gözlemlendi (Şekil 17-18).



Şekil 15. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının içsel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriği üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

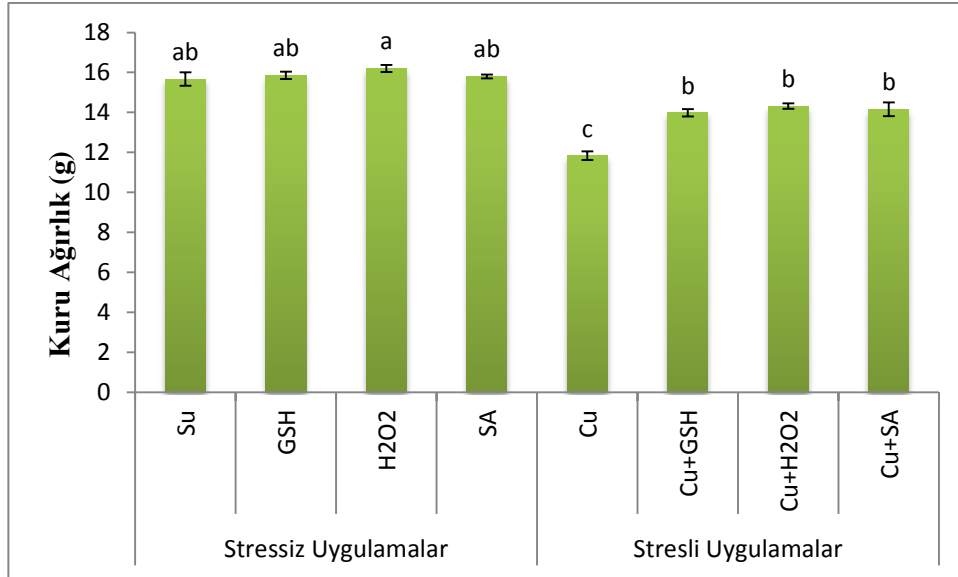


Şekil 16. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının içsel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriği üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

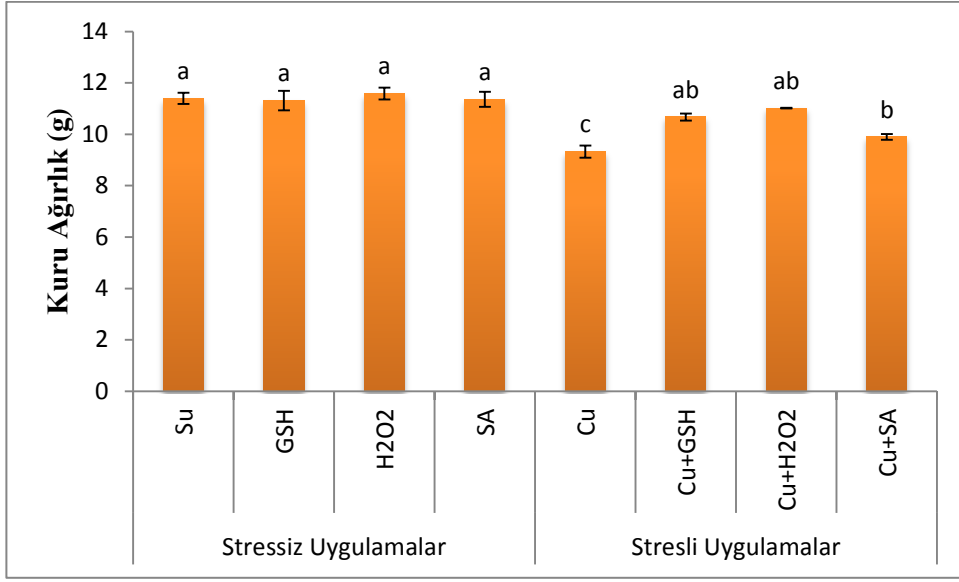
### 3.2. GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA Uygulamalarının Fotosentetik Parametreler Üzerine Etkisi

#### 3.2.1. Kuru Ağırlık Üzerine Etkisi

Yapılan kuru ağırlık ölçümlerinde bakır stresinin her iki çeşitte de kuru ağırlık miktarını kontrole göre önemli miktarda azalttığı, bakır stresi altındaki her iki çeşidin fidelerinde ise GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya SA uygulamalarının kuru ağırlık miktarını kontrole göre (bakır uygulaması) önemli miktarda arttırdığı bulundu. Stresiz GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya SA uygulamalarında ise kontrole göre (saf su uygulaması) önemli bir değişiklik belirlenemedi (Şekil 19, 20).



Şekil 17. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının kuru ağırlık üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

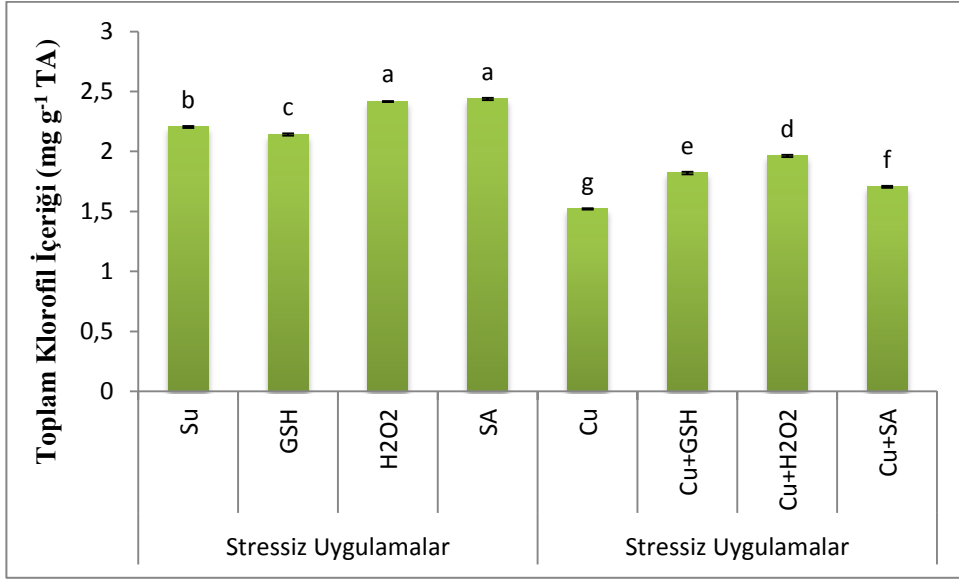


Şekil 18. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının kuru ağırlık üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

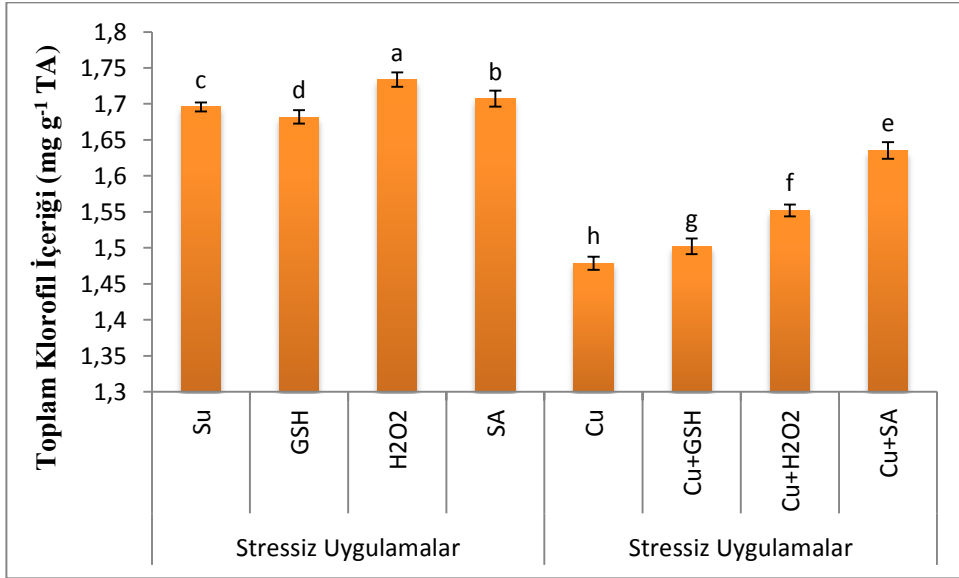
### 3.2.2. Fotosentetik Pigment İçeriği Üzerine Etkisi

#### 3.2.2.1. Toplam Klorofil İçeriği Üzerine Etkisi

Bakır stresi koşullarında yapılan analizler sonucunda toplam klorofil içeriğinde her iki mısır çeşidinin kontrollerine göre önemli azalışların olduğu belirlendi. GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının her iki çeşidin toplam klorofil içeriğini stresli koşullarda kontrollerine göre önemli miktarda arttırdığı gözlemlendi. Stresiz koşullarda ise GSH toplam klorofil içeriğini azaltırken H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA'nın kontrollerine göre önemli miktarda arttırdığı gözlemlendi (Şekil 19, 20).



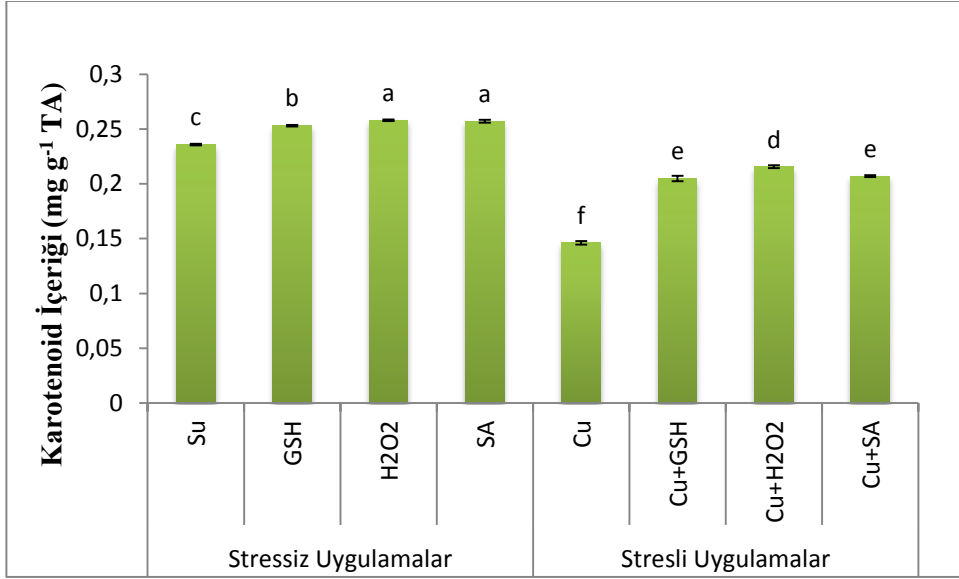
Şekil 19. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının klorofil içeriği üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.



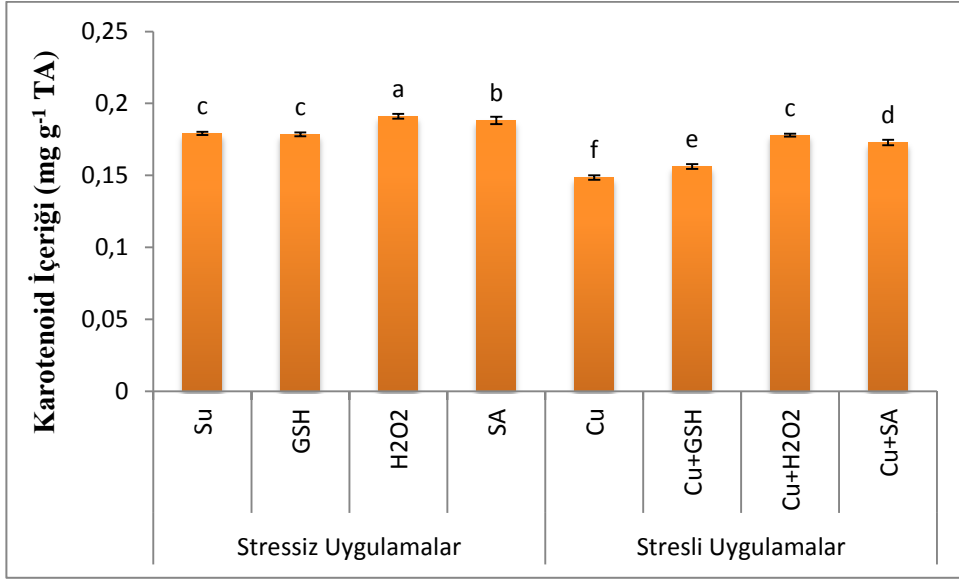
Şekil 20. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının klorofil içeriği üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

### 3.2.2.2. Karotenoid İçeriği Üzerine Etkisi

Bakır stresi koşullarında toplam klorofil içeriğine benzer olarak, toplam karotenoid içeriğinde her iki çeşitte kontrole göre önemli bir azalışın olduğu belirlendi. Stresli koşullarda GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının her iki çeşidin karotenoid içeriğini kontrollerine göre arttırmasına rağmen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasının diğer uygulamalara göre daha etkili olduğu görüldü. 31G98 çeşidinde Akpınar çeşidine göre karotenoid içeriği bakımından daha az dalgalanma görüldü (Şekil 21, 22).



Şekil 21. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının karotenoid içeriği üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

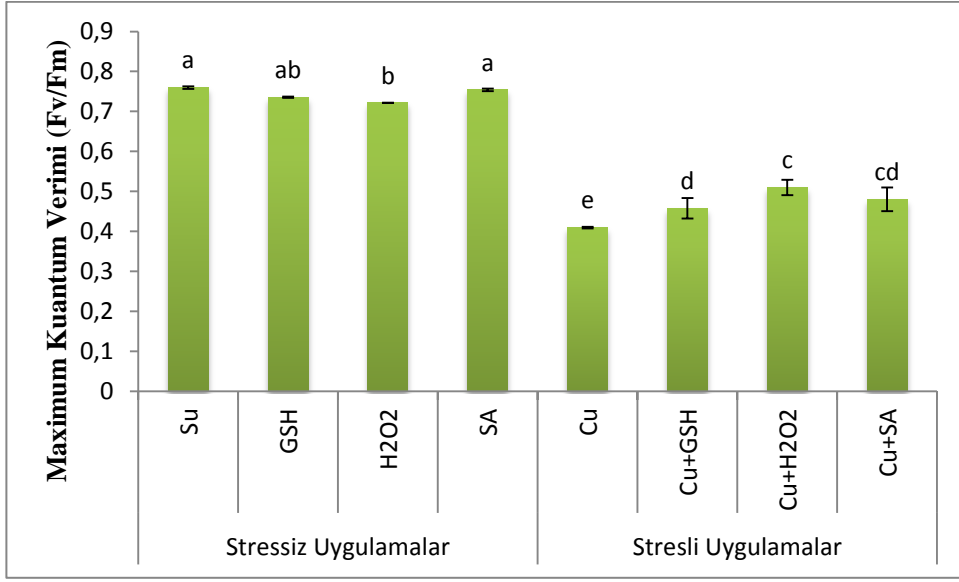


Şekil 22. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının karotenoid içeriği üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

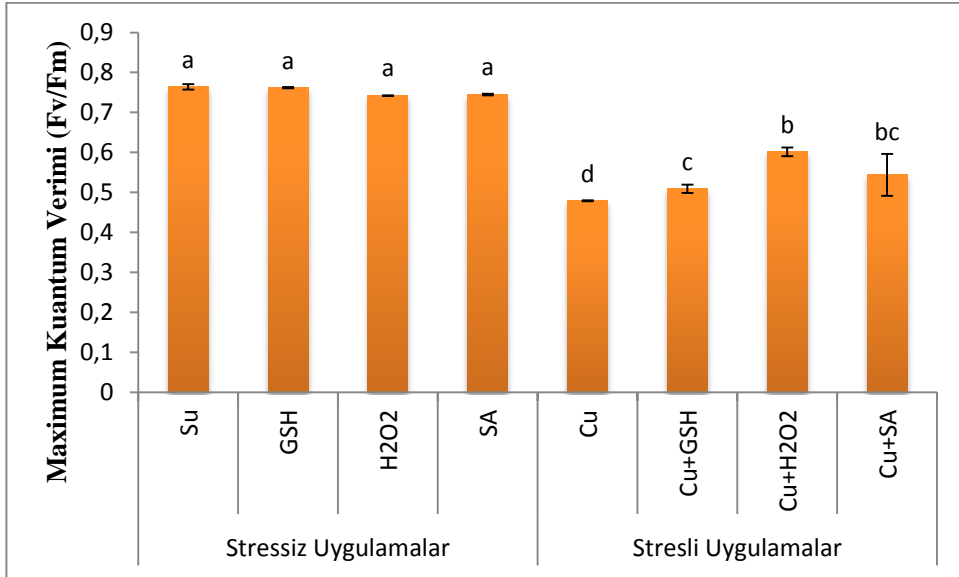
### 3.2.3 Klorofil Floresans Parametreleri Üzerine Etkisi

#### 3.2.3.1. PSII Maksimum Kuantum Verimi (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>) Üzerine Etkisi

Bakır stresi koşullarında her iki çeşitte PSII maksimum kuantum veriminde (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>) kontrole göre önemli azalmalar kaydedildi. Bakır stresi altındaki GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya SA uygulamalarında her iki çeşitte de bu azalışları değişik oranlarda arttırdığı bulundu. Stressiz GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya SA uygulamalarında ise Akpınar'daki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması dışında kontrole göre önemli farklar kaydedilemedi (Şekil 23, 24).



Şekil 23. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının Fv/Fm üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

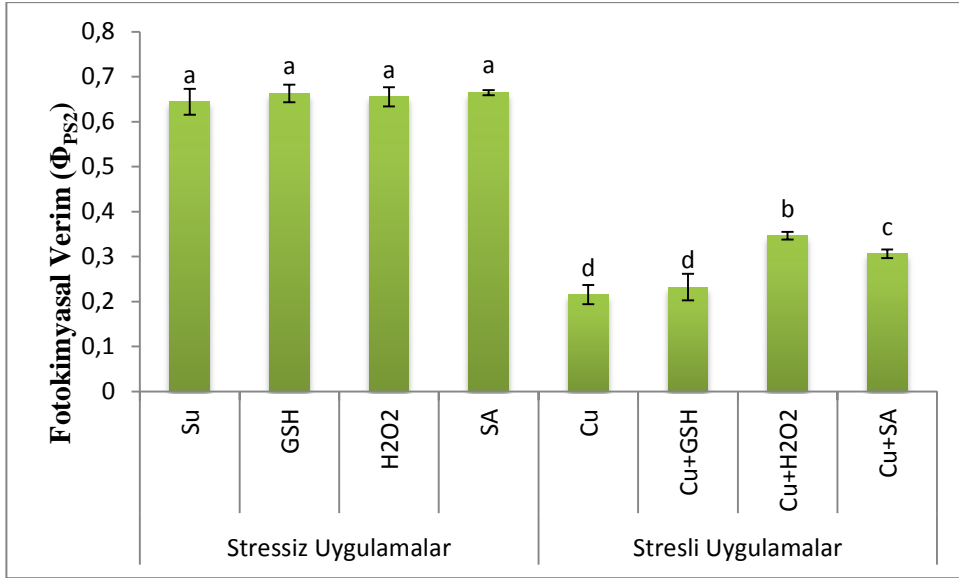


Şekil 24. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının Fv/Fm üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

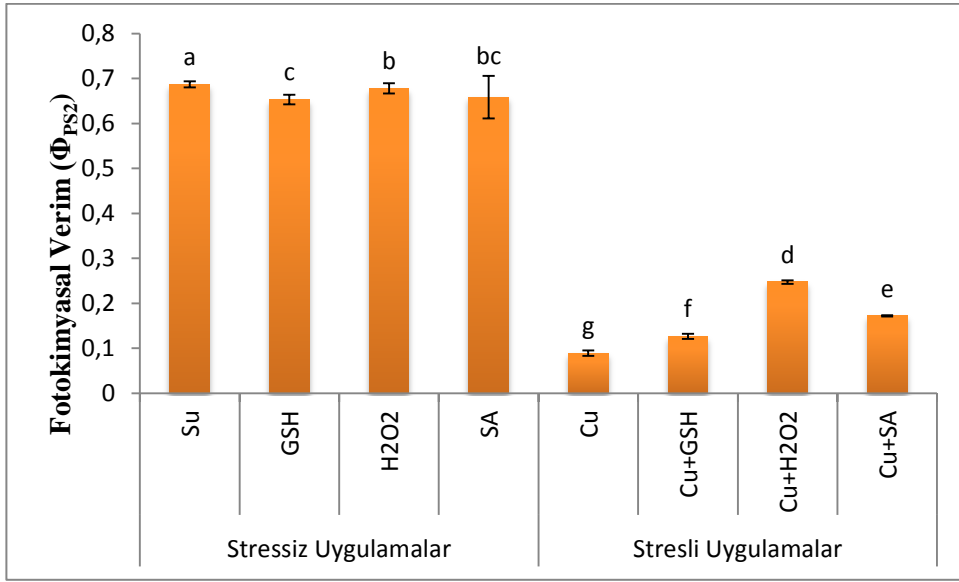


### 3.2.3.2. Fotokimyasal Verim ( $\Phi_{PS2}$ ) Üzerine Etkisi

Bakır stresi koşullarında fotokimyasal Verim ( $\Phi_{PS2}$ )’de her iki çeşitte de kontrollerine göre önemli bir azalış bulundu. Bakır stresi altındaki her iki çeşidin fidelerinde ise  $H_2O_2$ , GSH veya SA uygulamalarının fotokimyasal verimi kontrollerine göre arttırdığı saptandı. Her iki çeşitte fotokimyasal verim üzerine  $H_2O_2$  uygulamasının GSH ve SA uygulamalarından daha etkili olduğu görüldü. Stressiz  $H_2O_2$ , GSH veya SA uygulamalarında Akpınar çeşidinde kontrole göre (saf su uygulaması) istatistiki olarak önemli bir farklılık belirlenemedi (Şekil 25, 26).



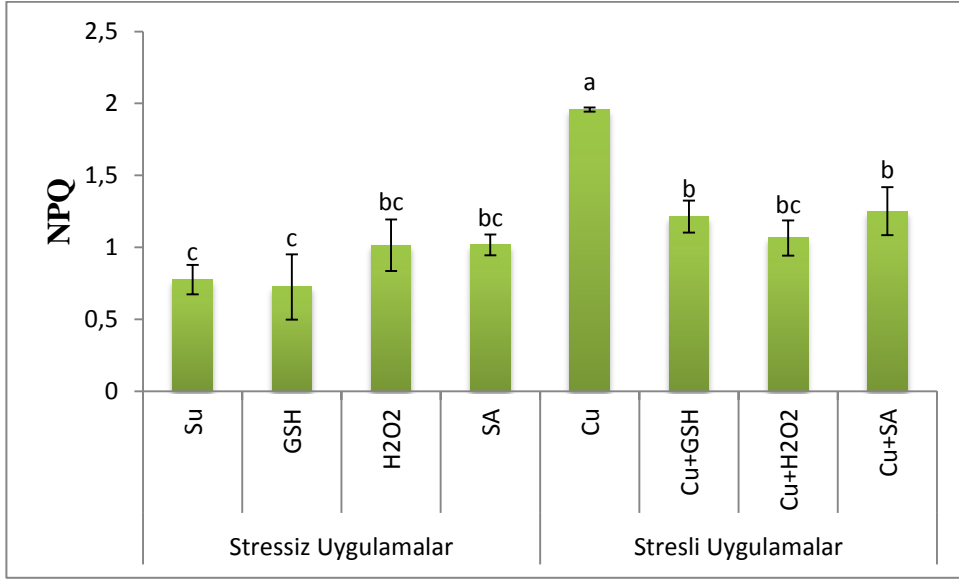
Şekil 25. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH,  $H_2O_2$  ve SA uygulamalarının  $\Phi_{PS2}$  üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ( $P<0.05$ ) seviyesinde önemsizdir.



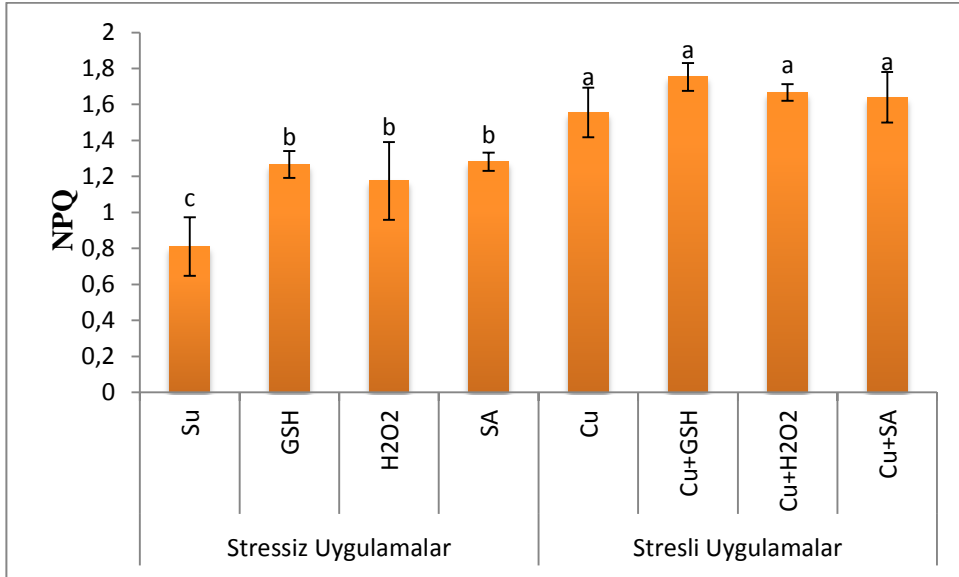
Şekil 26. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının  $\Phi_{PS2}$  üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

### 3.2.3.3. Fotokimyasal Olmayan Floresans Kullanımı (NPQ) Üzerine Etkisi

Bakır stresi koşullarında fotokimyasal olmayan floresans kullanımının (NPQ) Akpınar ve 31G98 çeşidinde kontrole göre önemli oranda arttığı kaydedildi. Akpınar'da bu artışların H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH veya SA uygulamalarıyla önemli oranda azalmasına rağmen, 31G98'de önemli bir değişiklik belirlenemedi. Stressiz GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya SA uygulamalarında ise fotokimyasal olmayan floresans kullanımında kontrole göre hafif artışlar meydana geldiği kaydedildi (Şekil 27, 28).



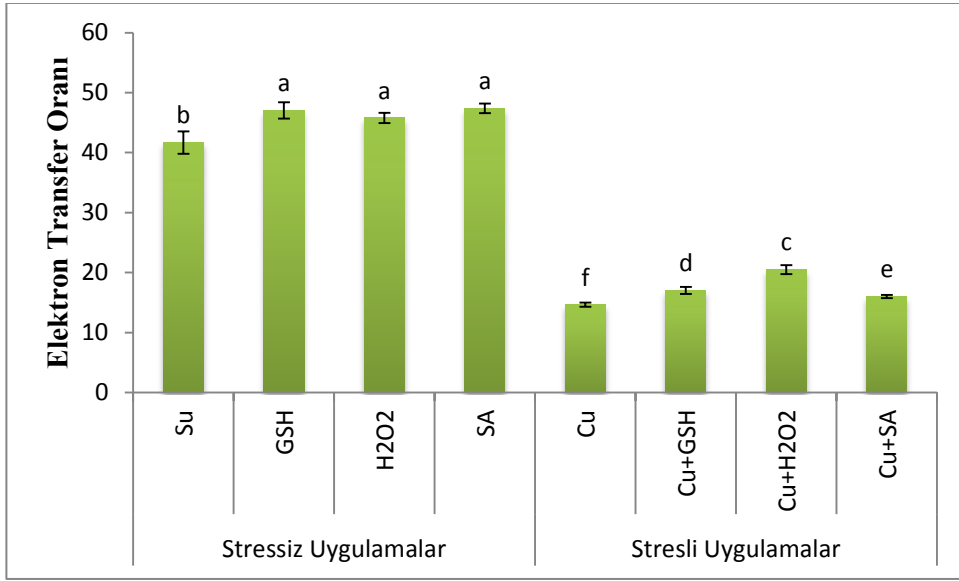
Şekil 27. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının NPQ üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.



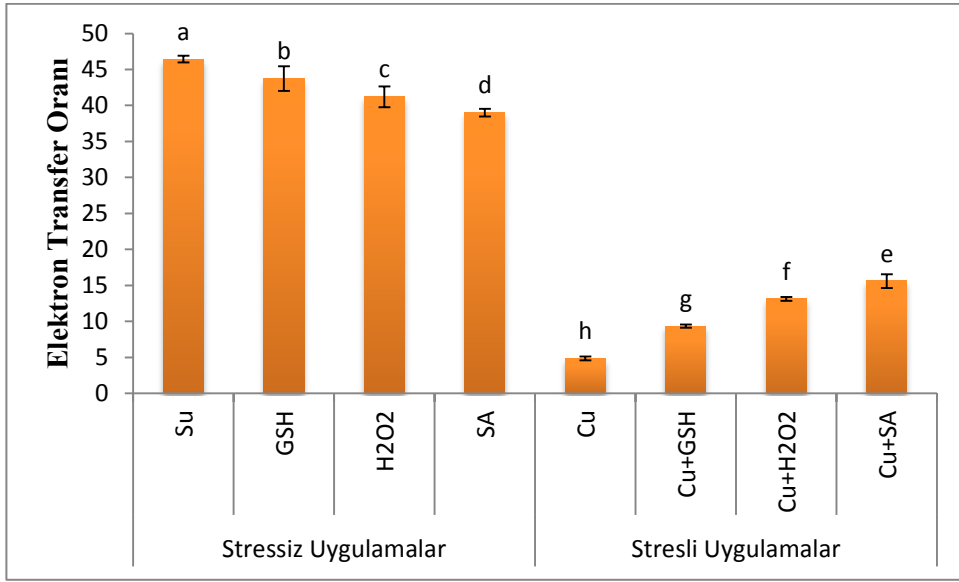
Şekil 28. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının NPQ üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

### 3.2.3.4. Elektron Taşınım Oranı (ETO) Üzerine Etkisi

Elektron taşınım oranı (ETO)'nın bakır stresi koşullarında her iki çeşitte de kontrole göre önemli oranda azaldığı saptandı. Her iki mısır çeşidinde stres şartlarında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH ve SA uygulamalarında ETO değerinin kontrole göre daha yüksek olduğu belirlendi. 31G98 çeşidinde ilginç olarak stressiz koşullarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH veya SA uygulamaları ETO değerini kontrole göre değişik oranlarda düşürmesine rağmen Akpınar çeşidinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH veya SA uygulamalarının ETO değerini arttırdığı saptandı (Şekil 29, 30).



Şekil 29. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının ETO üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

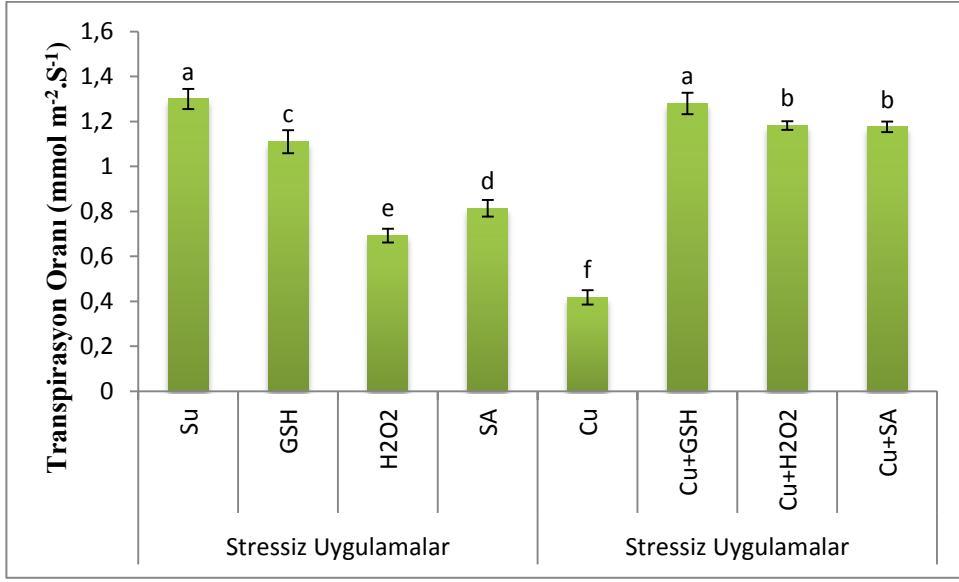


Şekil 30. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının ETO üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

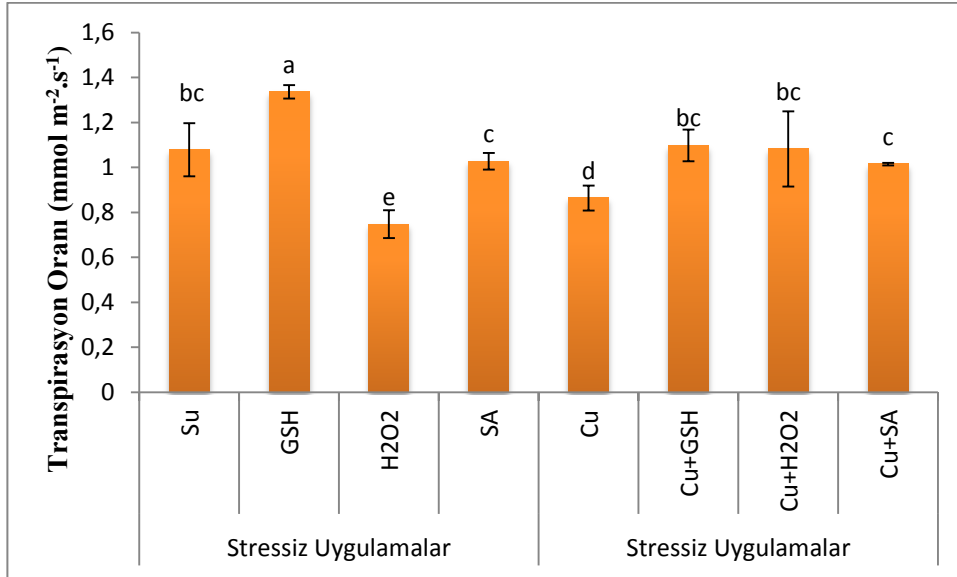
### 3.2.4. Fotosentetik Gaz Değişim Parametreleri Üzerine Etkisi

#### 3.2.4.1. Transpirasyon Oranı (E) Üzerine Etkisi

Bakır stresi koşullarında yapılan analizler sonucu, her iki mısır çeşidinde de transpirasyon oranında kontrole göre önemli ölçüde azalmalar kaydedildi. Stresiz koşullarda özellikle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uygulamasında her iki çeşitte de transpirasyon oranının kontrole göre (saf su uygulaması) önemli oranda azaldığı saptandı. Stresle birlikte GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya SA uygulanması ise transpirasyon oranını bakır uygulamasına göre önemli seviyede arttırdığı kaydedildi (Şekil 31, 32).



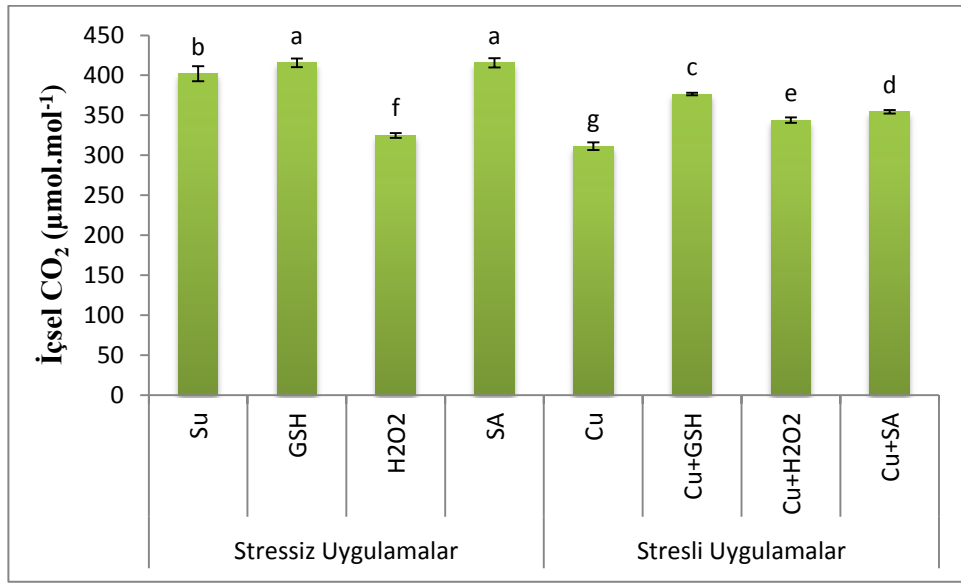
Şekil 31. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının transpirasyon (E) oranı üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.



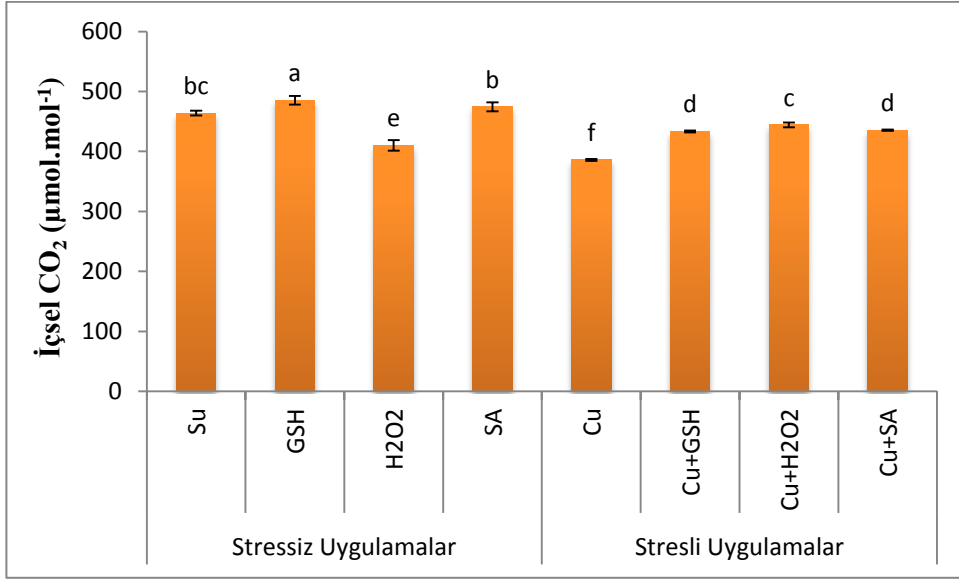
Şekil 32. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının transpirasyon oranı (E) üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

### 3.2.4.2. İçsel CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>) Miktarı Üzerine Etkisi

İçsel CO<sub>2</sub> miktarında bakır stresi koşullarında hem Akpınar'da hemde 31G98 çeşidinde kontrollerine göre önemli azalışlar kaydedildi. Her iki mısır çeşidinde bu azalışların dıştan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH veya SA uygulamalarıyla arttığı görüldü. Her iki çeşitte de stressiz GSH veya SA uygulamalarında içsel CO<sub>2</sub> miktarı üzerinde hafif bir artış belirlenmesine rağmen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasında kontrole göre (saf su uygulaması) önemli bir azalış gözlemlendi (Şekil 33, 34).



Şekil 33. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının içsel CO<sub>2</sub> konsantrasyonu üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

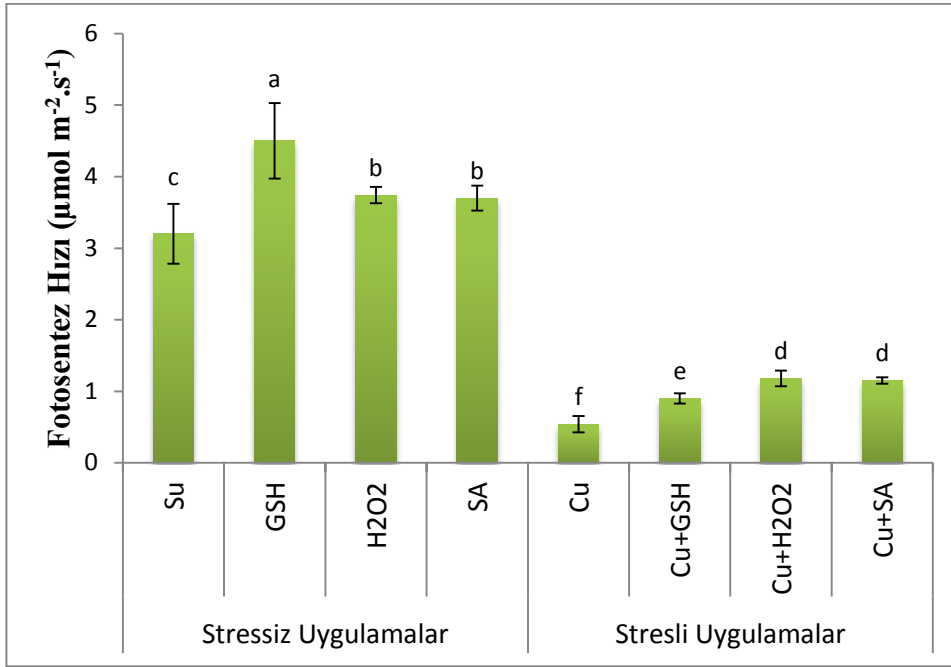


Şekil 34. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının içsel CO<sub>2</sub> konsantrasyonu üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

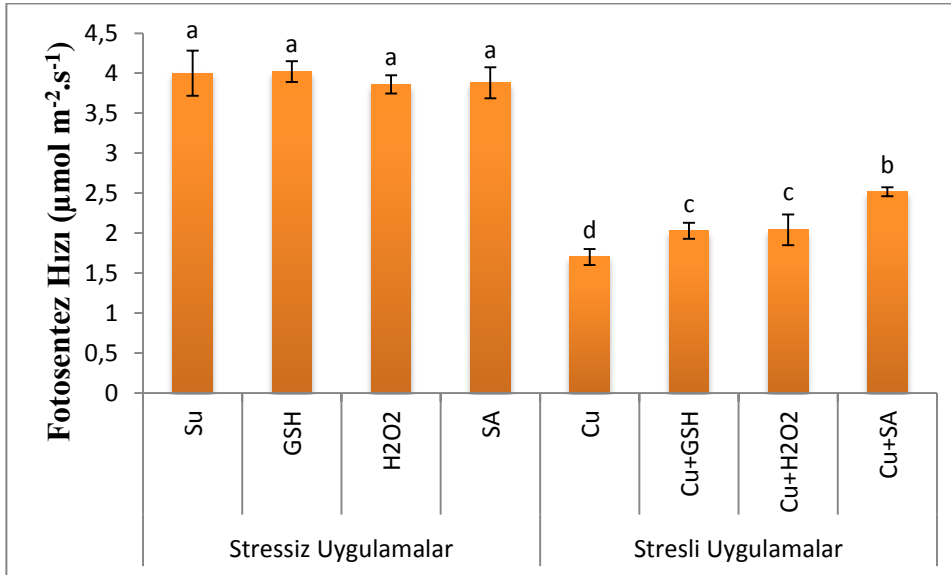
### 3.2.5. Fotosentez Hızı (Pn) Üzerine Etkisi

Fotosentez hızının bakır stresinin etkisiyle her iki mısır çeşidinde kontrole göre önemli ölçüde azaldığı gözlemlendi. Bununla beraber GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya SA uygulamaları sonucunda her iki mısır çeşidinin fotosentez hızında istatistiki olarak önemli artışlar görüldü. Stressiz GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya SA uygulamaları ise Akpınar'ın fotosentez hızı üzerinde önemli bir artışa neden olurken 31G98'de herhangi bir değişiklik belirlenemedi (Şekil 35, 36).





Şekil 35. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının fotosentez hızı (Pn) üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

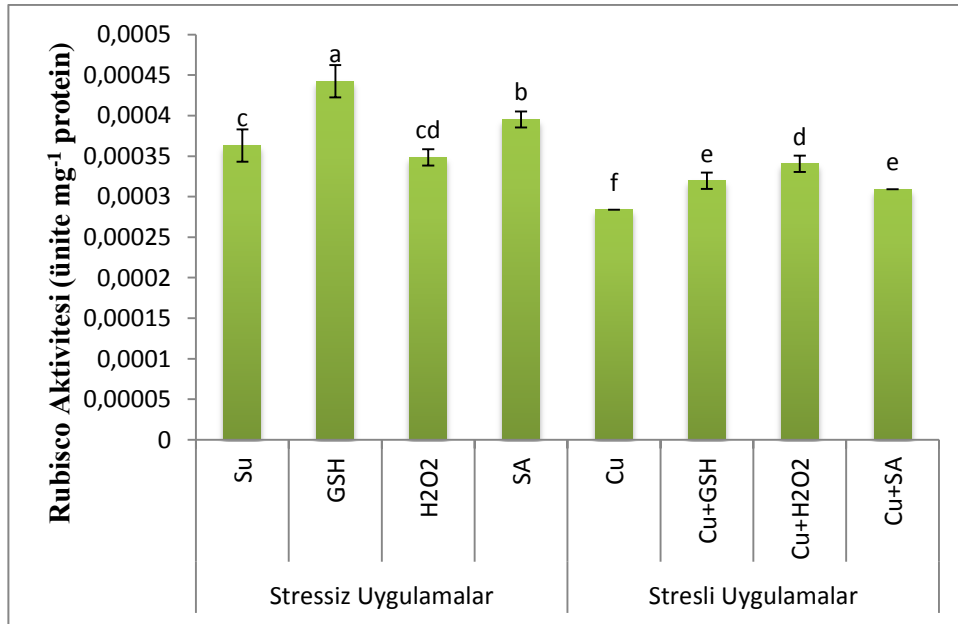


Şekil 36. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının fotosentez hızı (Pn) üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

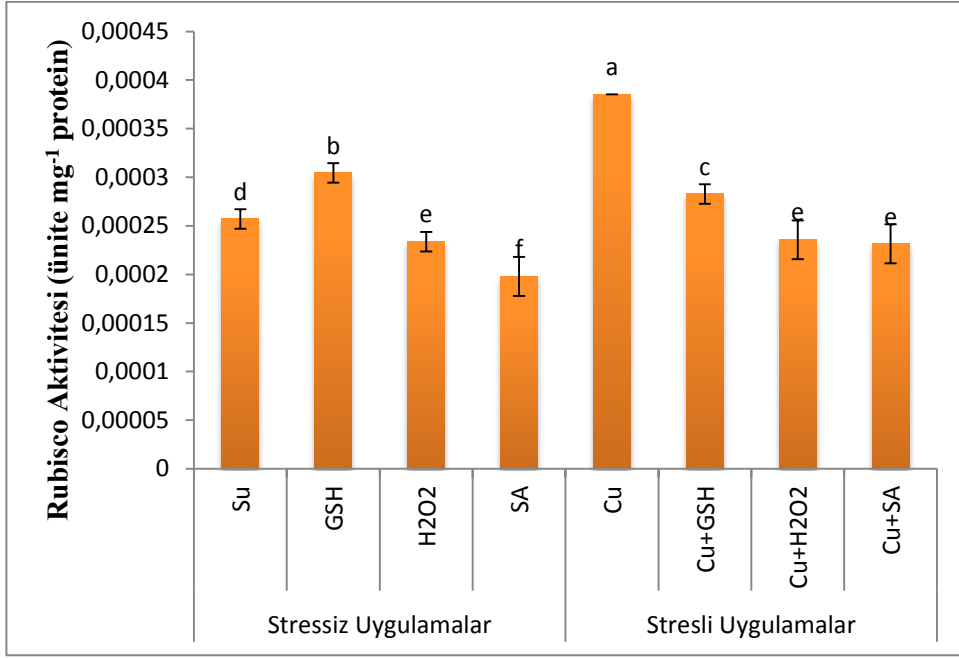
### 3.2.6. Rubisco Aktivitesi ve Konsantrasyonu Üzerine Etkisi

#### 3.2.6.1. Rubisco Aktivitesi Üzerine Etkisi

Yapılan analizlerde, rubisco aktivitesinin bakır stresinin etkisiyle Akpınar'da kontrole göre önemli ölçüde azaldığı, 31G98'de ise kontrole göre önemli ölçüde arttığı belirlendi. Bakır stresi altında Akpınar çeşidinde ki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH ve SA uygulamalarının rubisco aktivitesini kontrole göre arttırdığı gözlemlendi. 31G98 çeşidinde ise GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının rubisco aktivitesini kontrole göre (bakır uygulaması) azalttığı belirlendi. Stressiz Akpınar çeşidinde GSH ve SA uygulamalarındaki rubisco aktivitesi kontrole göre (saf su uygulaması) artmakla beraber, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasında rubisco aktivitesinin azaldığı belirlendi. 31G98 çeşidinde ise GSH uygulamasında aktivite artarken, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarında ise rubisco aktivitesinin kontrole göre (saf su uygulaması) azaldığı gözlemlendi (Şekil 37, 38).



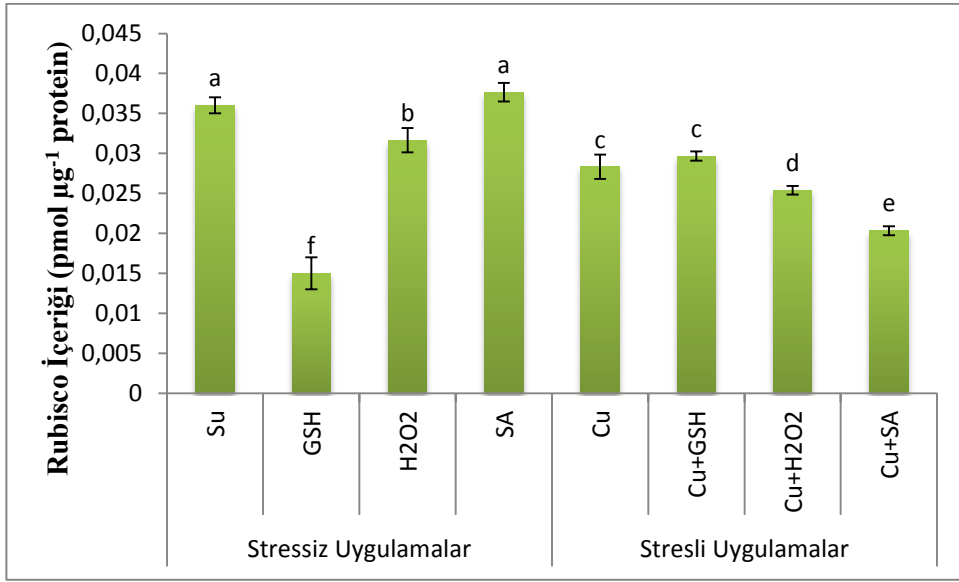
Şekil 37. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının rubisco aktivitesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.



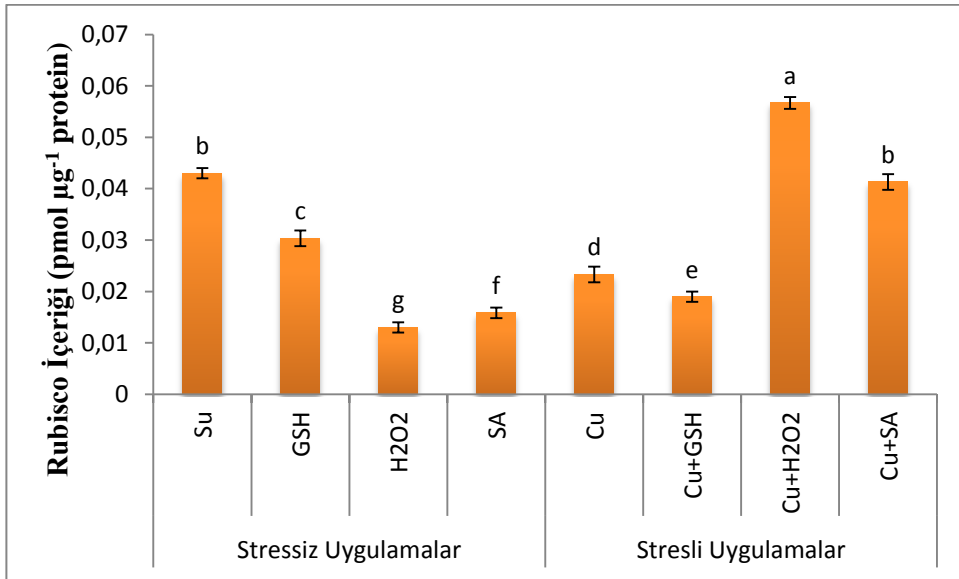
Şekil 38. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının rubisco aktivitesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

### 3.2.6.2. Rubisco Konsantrasyonu Üzerine Etkisi

Rubisco içeriğinin her iki mısır çeşidinde bakır stresi ile kontrole göre önemli ölçüde azaldığı belirlendi. Akpınar çeşidinde özellikle GSH'nın bakır stresi koşullarında iyileştirici etkiye sahipken stressiz koşullarda olumsuz etkiye sahip olduğu, stresli koşullarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamaları rubisco içeriğini olumsuz etkilerken stressiz koşullarda SA uygulamasının kontrole göre olumlu etkilediği görüldü. 31G98'de ise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA'nın bakır stresi koşullarında iyileştirici etkiye sahipken stressiz koşullarda olumsuz etkiye sahip olduğu GSH'nın ise her iki durumda da olumsuz etki yaptığı tespit edildi (Şekil 39, 40).

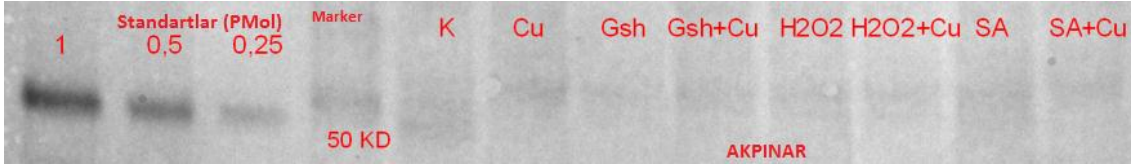


Şekil 39. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının rubisco konsantrasyonu üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

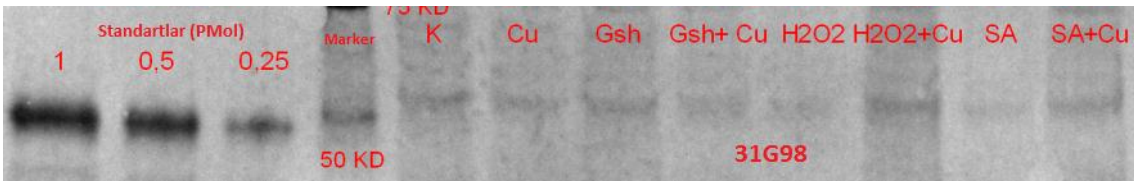


Şekil 40. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının rubisco konsantrasyonu üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

Rubisco'nun bakır stresi, GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarında değişimini gösteren western blot analizleri de Şekil 41 ve 42'de görülmektedir.



Şekil 41. Akpınar çeşidinde Rubisco western blot analizleri.



Şekil 42. 31G98 çeşidinde Rubisco western blot analizleri.

### 3.3. GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA Uygulamalarının Antioksidan Sistem Üzerine Etkisi

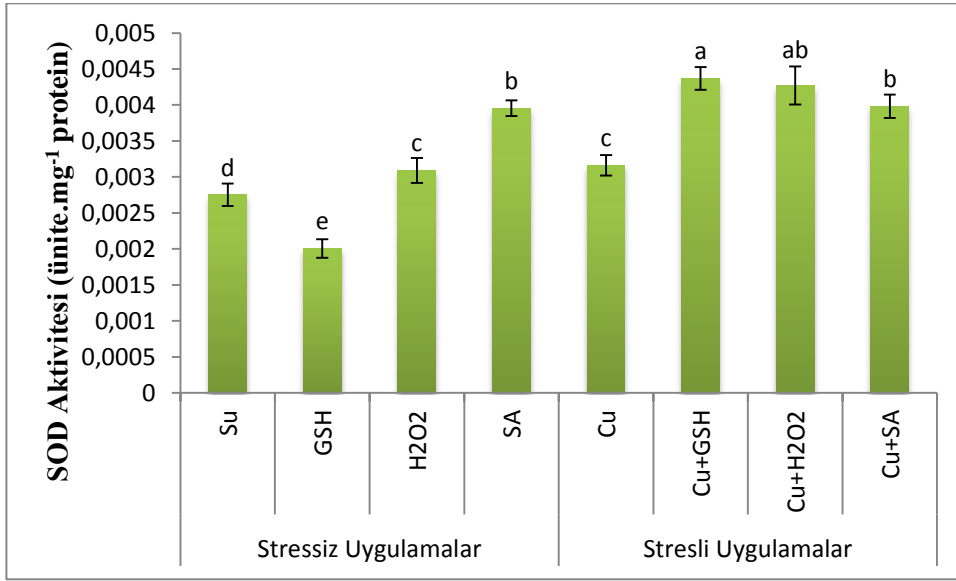
Antioksidan sistem hücrelerin mitokondri, kloroplast ve stoplazmasında meydana gelen metabolik reaksiyonlar sonucu oluşan ROS'ların süpürülmesinden ve hücre içi moleküllerin korunmasından sorumlu önemli bir sistemdir. Bu sistemin enzimatik bileşenleri SOD, CAT, APX, GPX ve GR gibi önemli enzimlerdir. Enzimatik olmayan bileşenler ise GSH ve antioksidan özellikleri son çalışmalarla ortaya konulan SA, prolin ve poliaminlerdir.

#### 3.3.1. Antioksidan Enzimler Üzerine Etkisi

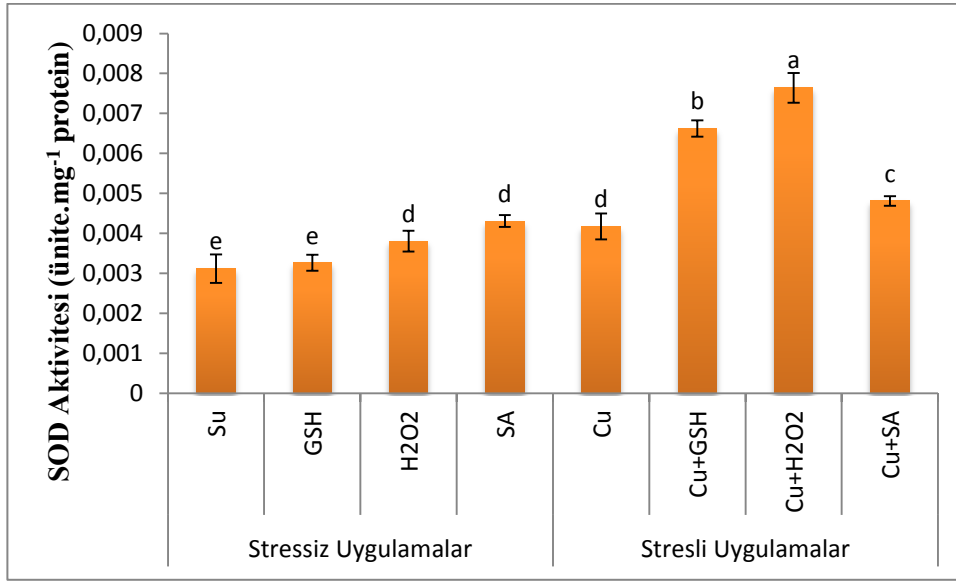
Mevcut çalışmamızda bakır stresi altında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz, katalaz, askorbat peroksidaz, glutatyon redüktaz ve guaikol peroksidaz enzimlerinin aktivitelerini nasıl etkilediğine bakılarak fotosentetik verim üzerine etkileri ortaya konulacaktır.

### 3.3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Üzerine Etkisi

SOD aktivitesinin bakır stresinin etkisiyle her iki çeşitte kontrolle göre önemli ölçüde arttığı belirlendi. Bakır stresi koşullarında her iki mısır çeşidindeki  $H_2O_2$ , GSH ve SA uygulamalarının bitkilerdeki SOD aktivitesinde kontrolle göre (bakır uygulaması) önemli bir artışa neden olduğu gözlemlendi. Akpınar'ın stressiz GSH uygulamasında SOD aktivitesi kontrolle göre (saf su uygulaması) önemli ölçüde azalırken,  $H_2O_2$  ve SA uygulamalarında aktivitenin önemli oranda arttığı gözlemlendi. 31G98'in stressiz  $H_2O_2$  ve SA uygulamasında SOD aktivitesi saf su uygulamasına göre önemli ölçüde artarken, GSH uygulamasında aktivitede istatistik olarak önemli bir farkın olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 43, 44).



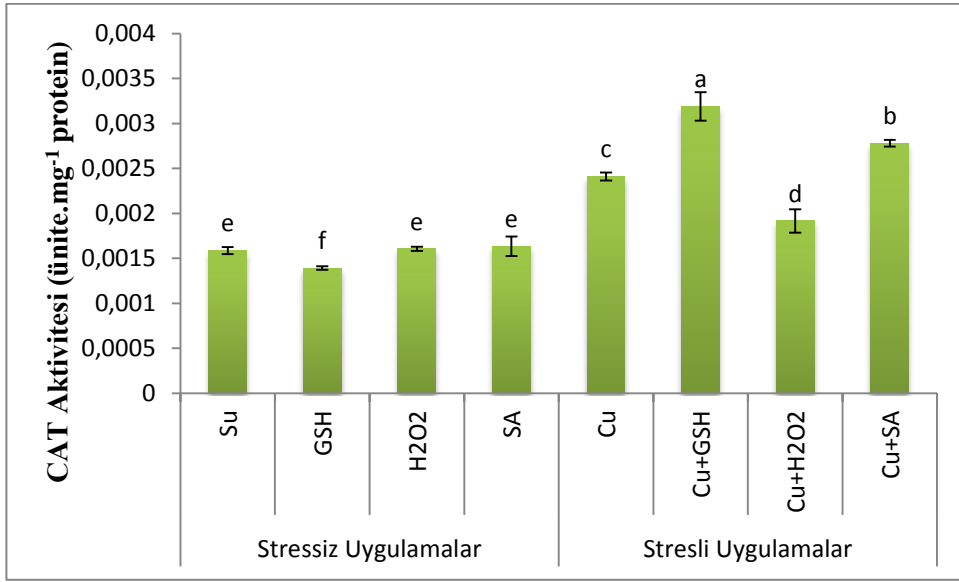
Şekil 43. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH,  $H_2O_2$  ve SA uygulamalarının SOD aktivitesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 ( $P<0.05$ ) seviyesinde önemsizdir.



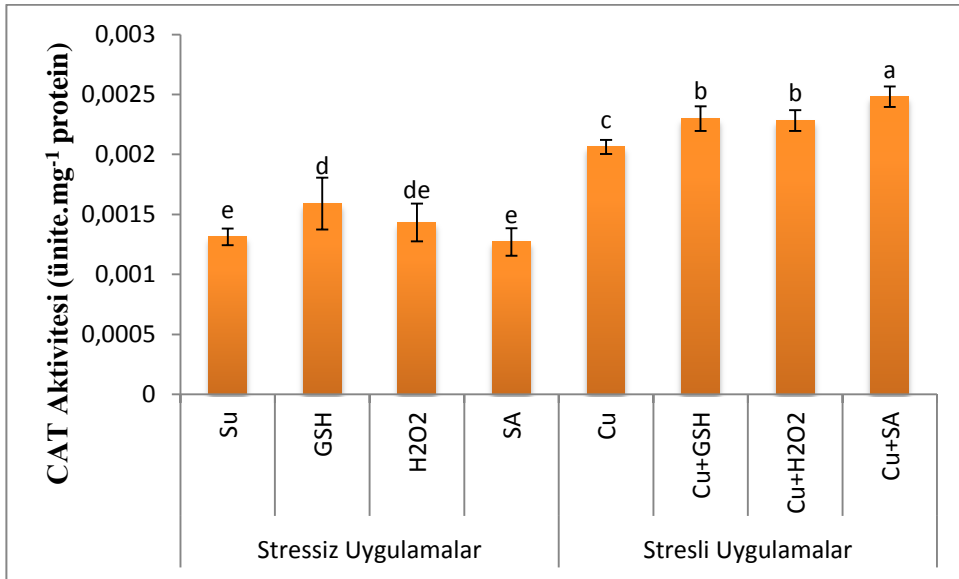
Şekil 44. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının SOD aktivitesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

### 3.3.1.2. Bakır Stresinin Katalaz (CAT) Aktivitesi Üzerine Etkisi

Yapılan analizlerde, CAT aktivitesinin bakır stresi koşullarında her iki çeşitte de kontrole göre önemli ölçüde arttığı belirlendi. Akpınar'da bakır stresi koşullarında GSH ve SA uygulamalarının CAT aktivitesini bakır uygulamasına göre arttırmasına rağmen, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasının azalttığı gözlemlendi. 31G98'de ise GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamaları sonucunda CAT aktivitesinin kontrole göre önemli oranda arttığı gözlemlendi. Akpınar'da stressiz GSH uygulamasında CAT aktivitesinde önemli bir azalma gözlenirken, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarında CAT aktivitesinin saf su uygulamasına göre değişmediği belirlendi. 31G98'de ise GSH uygulamasında CAT aktivitesi kontrole göre artarken H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamaları sonucunda CAT aktivitesinde istatistik olarak fark olmadığı saptandı (Şekil 45, 46).



Şekil 45. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının CAT aktivitesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

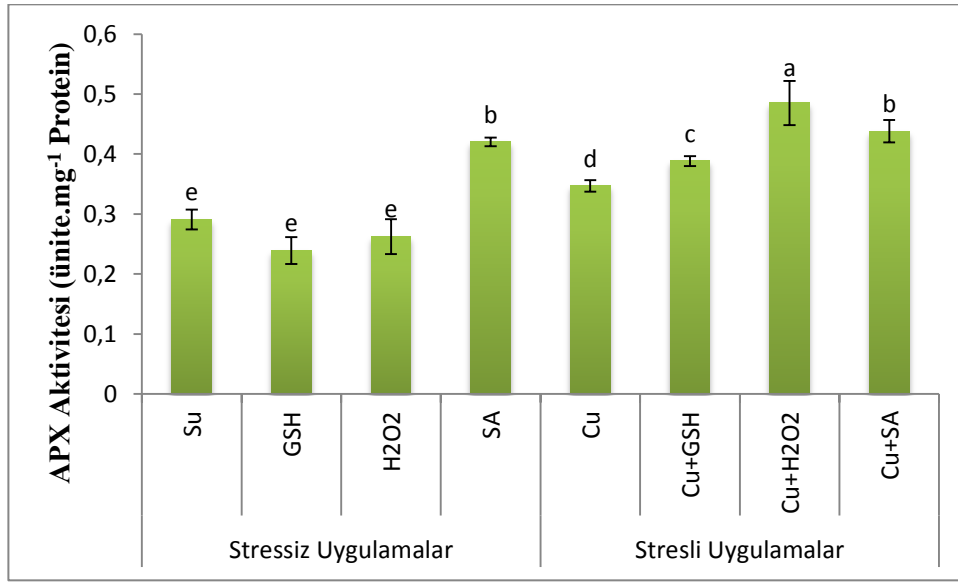


Şekil 46. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının CAT aktivitesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

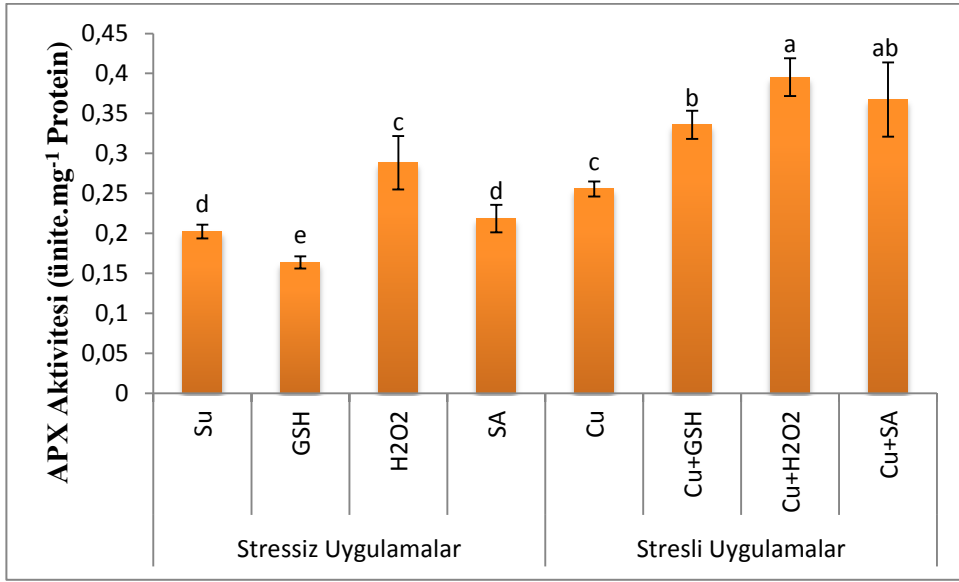


### 3.3.1.3. Bakır Stresinin Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi Üzerine Etkisi

Yapılan ölçümlerde, APX aktivitesinin bakır stresinin etkisiyle Akpınar ve 31G98’de su uygulamasına göre önemli ölçüde arttığı belirlendi. Bakır stresi koşullarında, her iki mısır çeşidinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH ve SA uygulamalarının APX enzim aktivitesini bakır uygulamasına göre önemli oranda arttırdığı gözlemlendi. Akpınar çeşidinin stressiz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve GSH uygulamaları APX aktivitesinde su uygulamasına göre istatistiki olarak önemli bir değişikliğe neden olmazken, SA uygulamasının APX aktivitesini arttırdığı saptandı. 31G98 çeşidinde ise su uygulamasına göre APX enzim aktivitesinin GSH uygulamasıyla azaldığı, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasıyla arttığı ve SA uygulamasıyla da istatistiki olarak değişmediği kaydedildi (Şekil 47, 48).



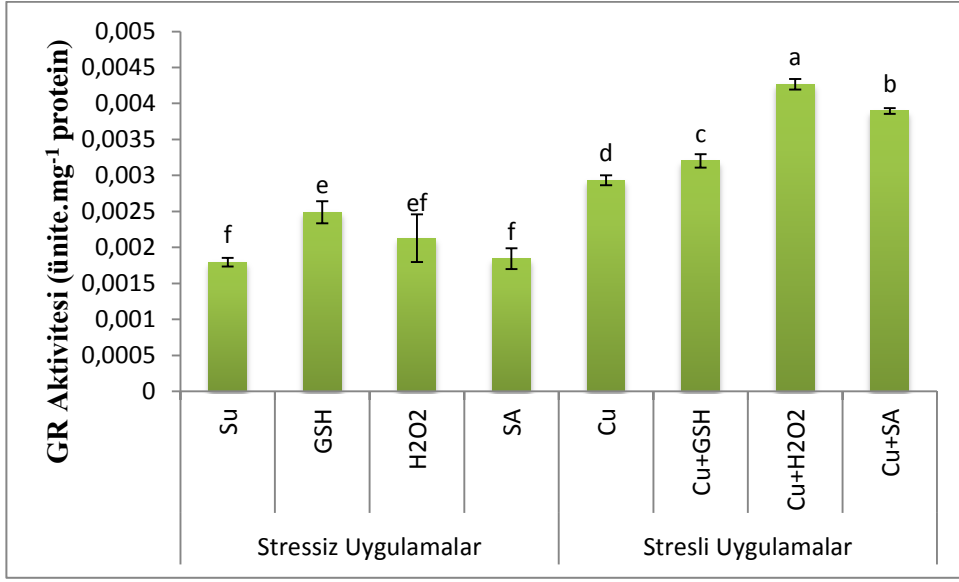
Şekil 47. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının APX aktivitesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.



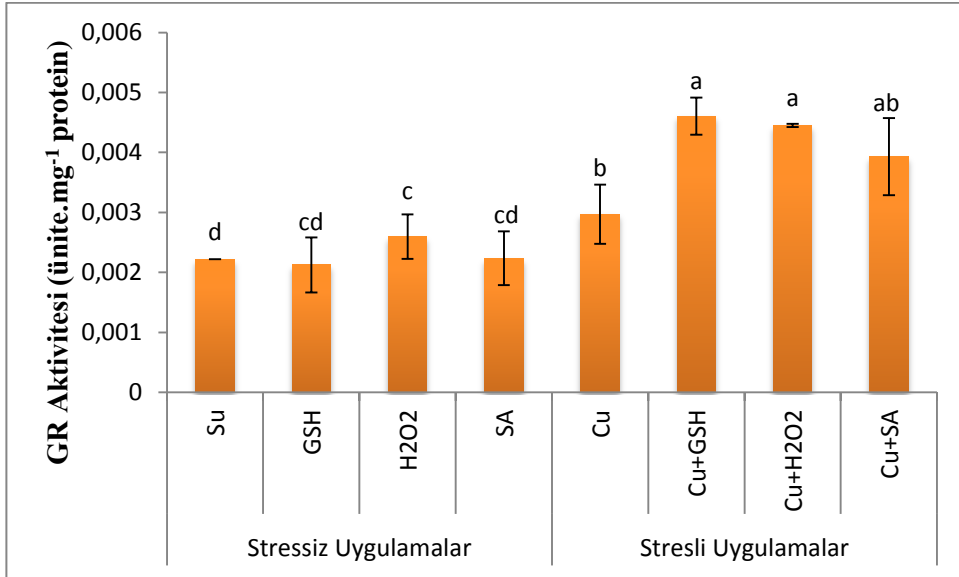
Şekil 48. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının APX aktivitesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

#### 3.3.1.4. Glutatyon Redüktaz (GR) Aktivitesi Üzerine Etkisi

Yapılan analizlerde, GR enzim aktivitesinin bakır stresinin etkisiyle Akpınar ve 31G98'de kontrollerine göre önemli ölçüde arttığı belirlendi. Bakır stresi koşullarında her iki mısır çeşidinde de SA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve GSH uygulamalarında kontrole göre (bakır uygulaması) GR enzim aktivitesinde önemli bir artış belirlendi. Stressiz uygulamalarda Akpınar çeşidinin GSH uygulaması ile 31G98 çeşidinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasında görülen aktivite artışı dışındaki diğer stressiz uygulamalar arasında kontrollerine göre istatistiki olarak önemli bir farkın olmadığı tespit edildi (Şekil 49, 50).



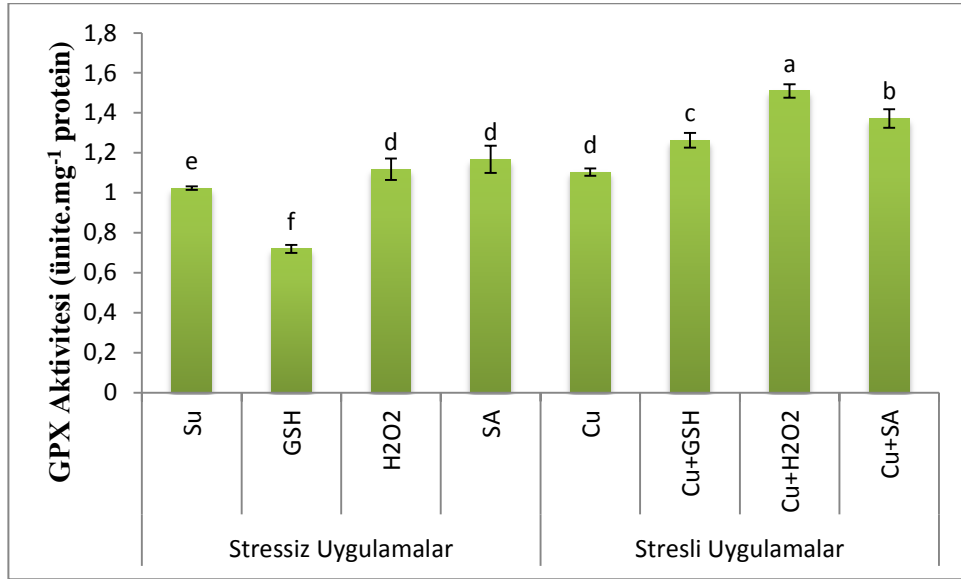
Şekil 49. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının GR aktivitesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.



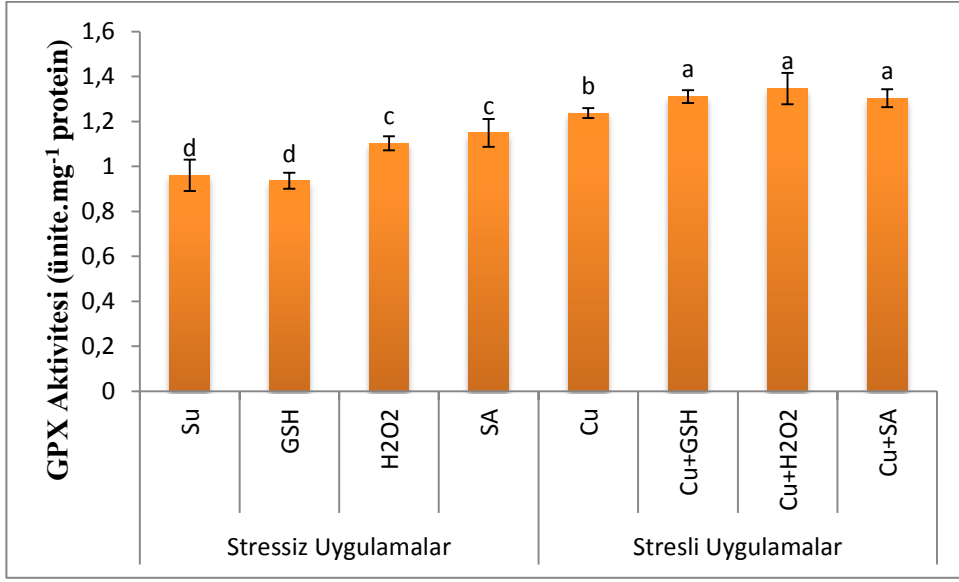
Şekil 50. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının GR aktivitesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

### 3.3.1.5. Bakır Stresinin Guaikol Peroksidaz (GPX) Aktivitesi Üzerine Etkisi

Yapılan analizlerde, GPX aktivitesinin bakır stresinin etkisiyle Akpınar ve 31G98'de kontrole göre önemli ölçüde arttığı belirlendi. Akpınar çeşidinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının stressiz koşullarda kontrole göre GPX aktivitesini arttırdığı, GSH uygulamasının ise GPX aktivitesini azalttığı gözlemlendi. 31G98 çeşidinin stressiz koşullarında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA'nın kontrole göre aktiviteyi arttırdığı, GSH uygulamasında ise değişmediği belirlendi. Buna karşın bakır stresi koşullarında yapılan GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının her iki çeşitte de GPX enzim aktivitesini kontrole göre (bakır uygulaması) arttırdığı belirlendi (Şekil 51, 52).



Şekil 51. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının GPX aktivitesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

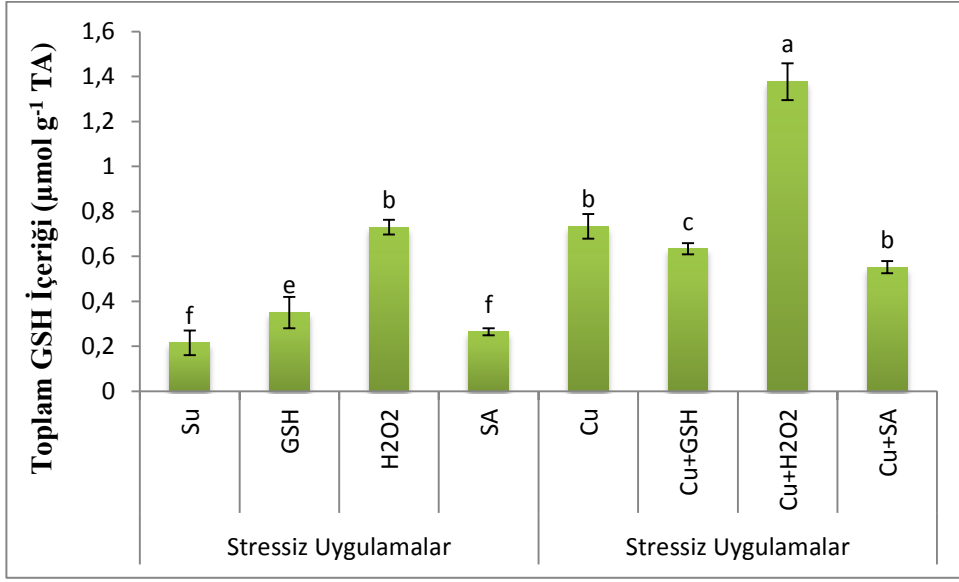


Şekil 52. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının GPX aktivitesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

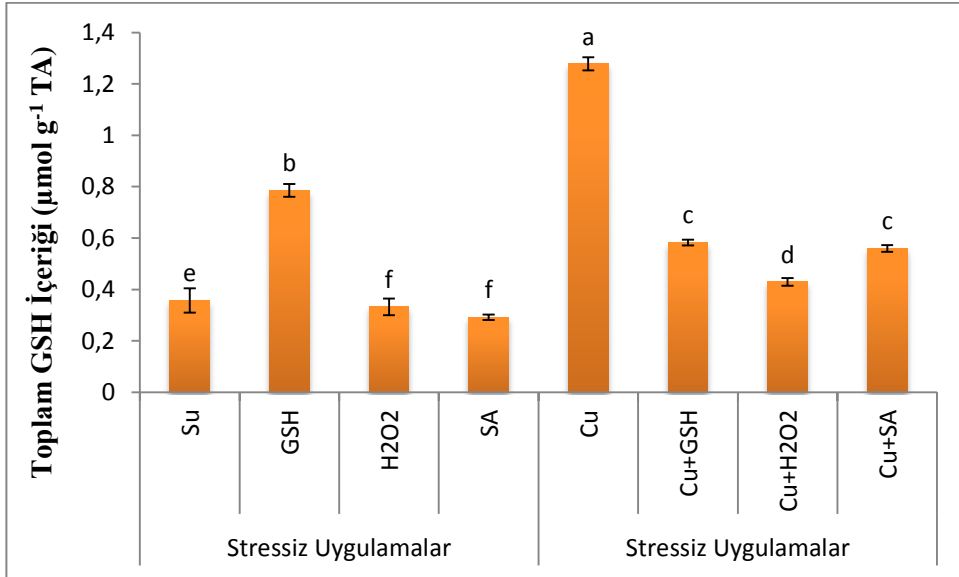
### 3.3.2. Antioksidan Maddeler Üzerine Etkisi

#### 3.3.2.1. İçsel GSH İçeriği Üzerine Etkisi

Her iki mısır çeşidinde bakır stresi koşullarında içsel GSH içeriğinin kontrole göre (bakır uygulaması) önemli seviyede arttığı görüldü. Her iki mısır çeşidinde içsel GSH seviyesinde farklı değişimler gözlemlendi. Akpınar'da gerek stresli gerekse de stressiz koşullarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan fidelerde içsel GSH içeriğinin kontrollerine göre arttığı, 31G98'de ise azaldığı bulundu. Stres altındaki her iki mısır çeşidinde GSH veya SA uygulamalarının ise kontrole göre içsel GSH seviyesini düşürdüğü saptandı (Şekil 53, 54).



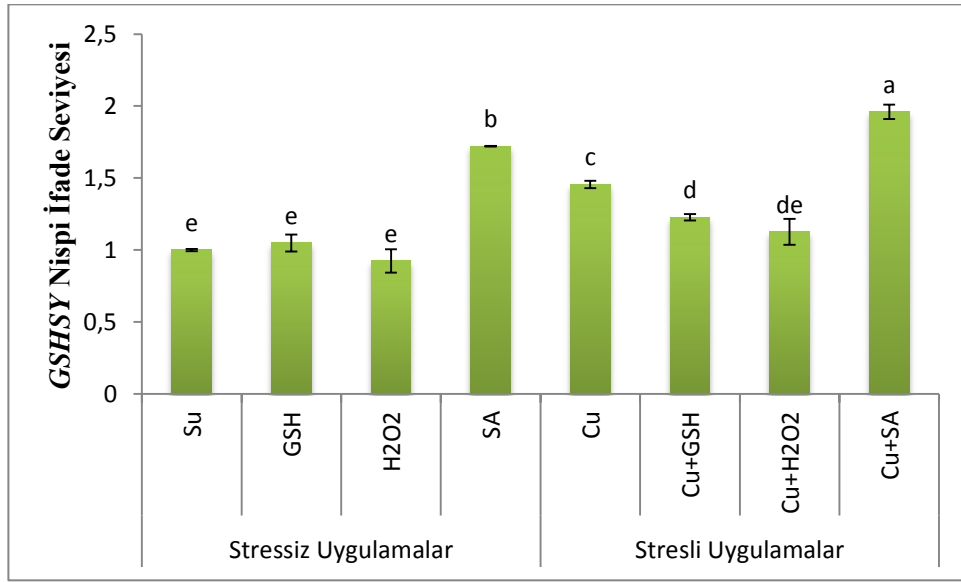
Şekil 53. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının içsel toplam GSH içeriği üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.



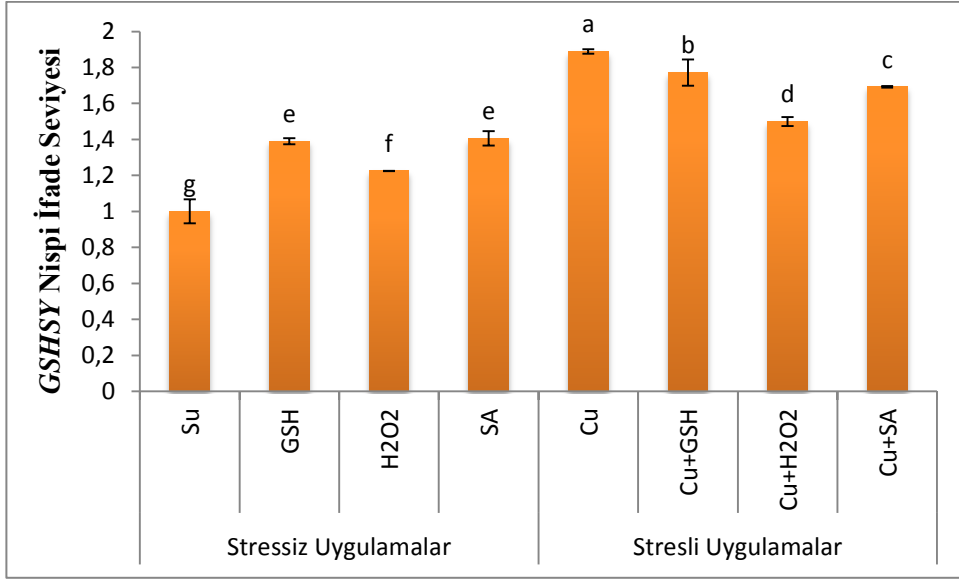
Şekil 54. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının içsel toplam GSH içeriği üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

### 3.3.2.2. Glutatyon Sentetaz (*GSHSY*) Gen İfadesi Üzerine Etkisi

Yapılan qPCR analizlerinde, bakır stresinin etkisiyle *GSHSY* gen ifadesinin Akpınar ve 31G98’de kontrole göre önemli ölçüde arttığı belirlendi. Bakır stresine maruz kalan Akpınar fidelerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve GSH uygulamalarında ve 31G98 fidelerinin her üç uygulamasında *GSHSY* gen ifadesi kontrole göre (bakır uygulaması) önemli oranda azalırken, SA uygulamasında gen ifade seviyesinde beklenenden daha fazla artış olduğu gözlemlendi. Akpınar çeşidinin stressiz GSH ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamalarında kontrole göre istatistiki olarak önemli bir farkın olmadığı, SA uygulamasının gen ifadesinde önemli bir artış belirlendi. 31G98 çeşidinde ise GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarında önemli artışlar saptandı (Şekil 55, 56).



Şekil 55. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının *GSHSY* gen ifadesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

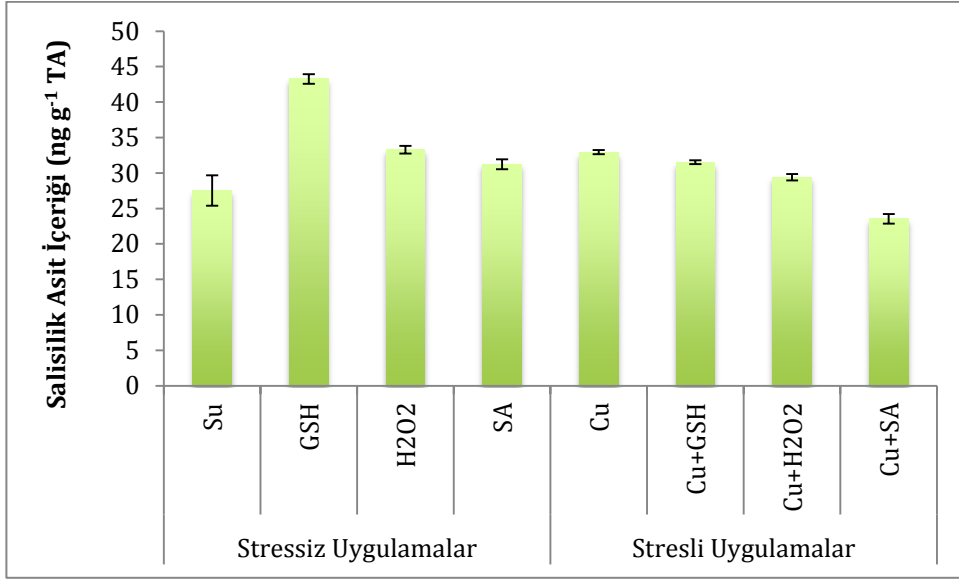


Şekil 56. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının *GSHSY* gen ifadesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

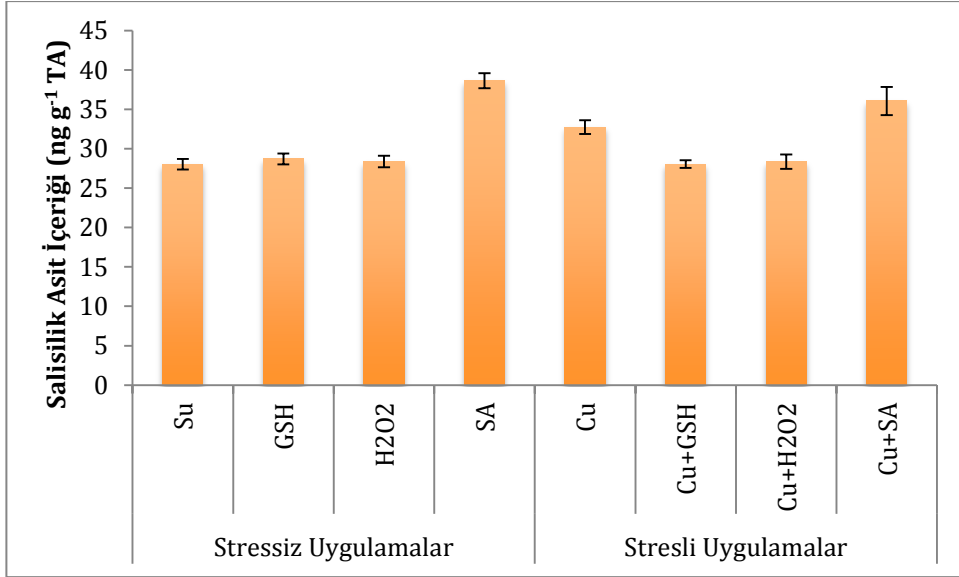
### 3.3.2.3. İçsel SA İçeriği Üzerine Etkisi

Her iki mısır çeşidinde bakır stresinin içsel SA içeriğini kontrole göre istatistiki olarak önemli miktarda arttırdığı gözlemlendi. Bununla beraber stressiz koşullarda uygulanan GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA'nın Akpınar'da, SA uygulamasının ise 31G98'de içsel SA içeriğini kontrole göre (saf su uygulaması) önemli miktarda arttırdığı görüldü. Akpınar'da özellikle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya SA, 31G98'de ise özellikle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya GSH uygulamalarının içsel SA seviyesindeki artışları giderdiği belirlendi (Şekil 57, 58).





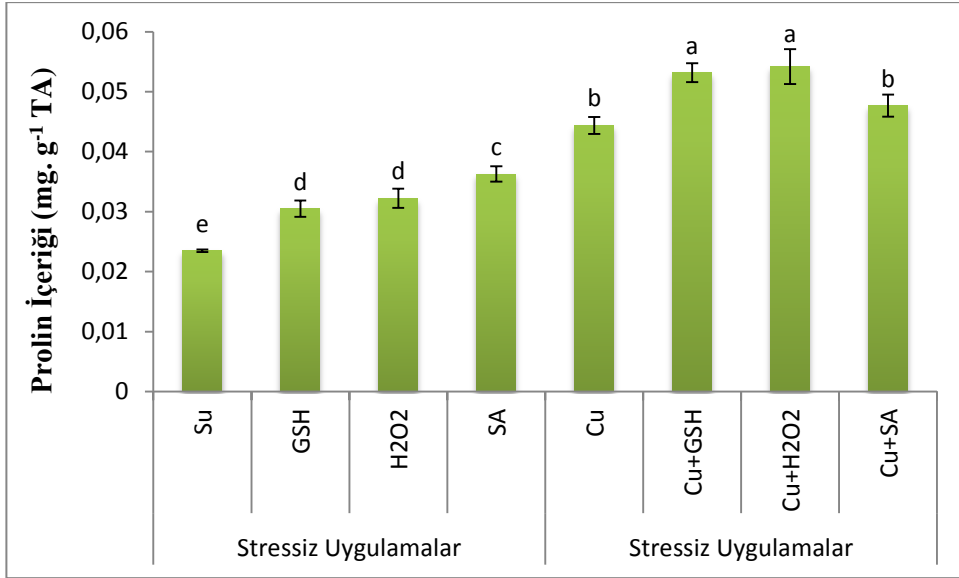
Şekil 57. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının içsel SA içeriği üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.



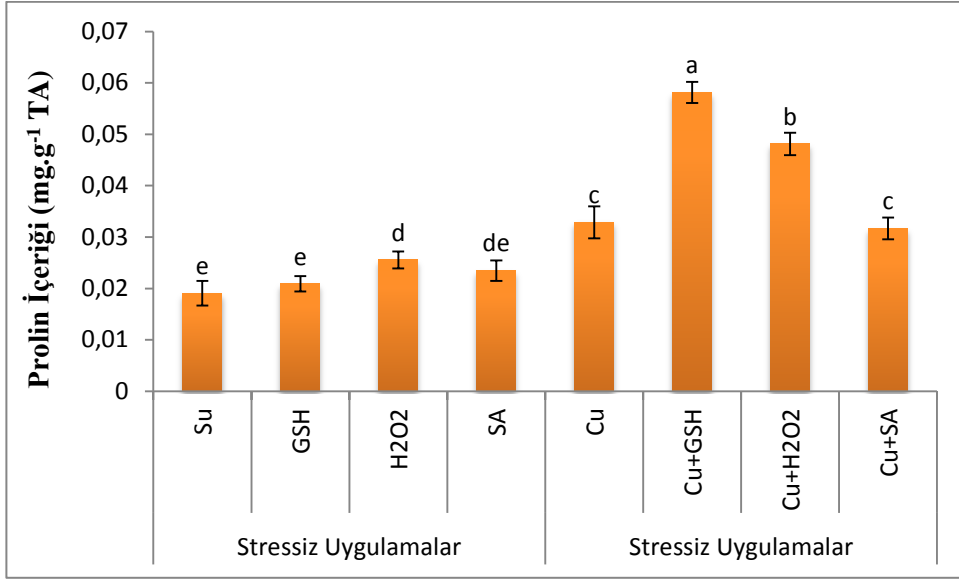
Şekil 58. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının içsel SA içeriği üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

### 3.3.2.4. Prolin İçeriği Üzerine Etkisi

Yapılan ölçümlerde, prolin içeriğinin bakır stresinin etkisiyle Akpınar ve 31G98'de kontrole göre (saf su uygulaması) önemli ölçüde arttığı belirlendi. Stressiz GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının Akpınar çeşidinde prolin içeriğini istatistiki olarak kontrole göre (saf su uygulaması) önemli miktarda arttırdığı, 31G98 çeşitinde ise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasında prolin içeriğinin arttığı bulundu. Her iki çeşitte bakır stresli GSH ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamalarında prolin içeriği kontrole göre (bakır uygulaması) önemli miktarda artarken, SA uygulamasında önemli bir farkın olmadığı gözlemlendi (Şekil 59, 60).



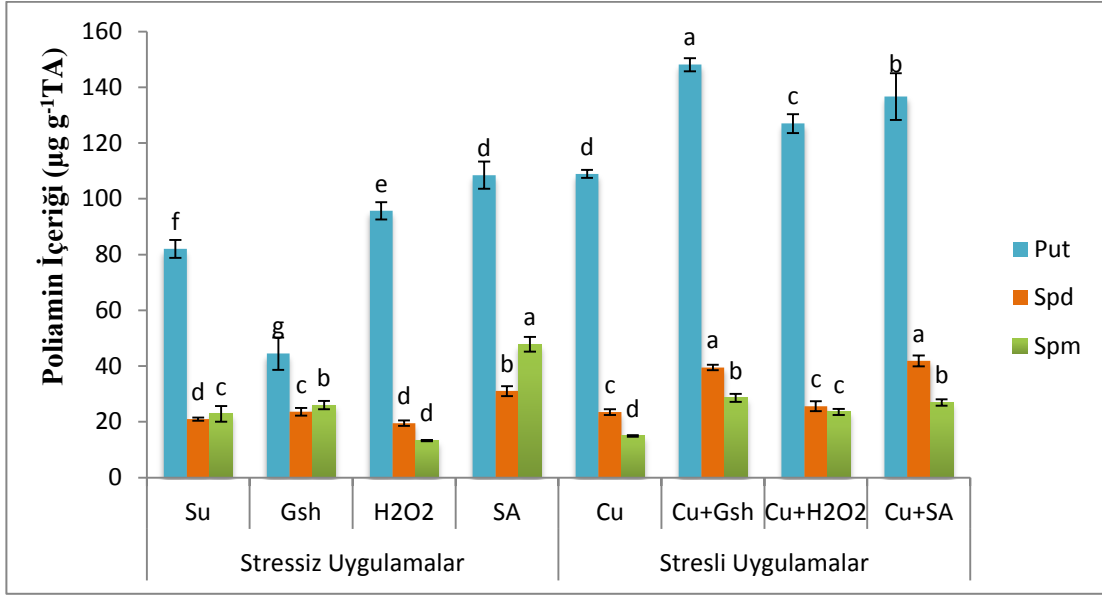
Şekil 59. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının prolin içeriği üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.



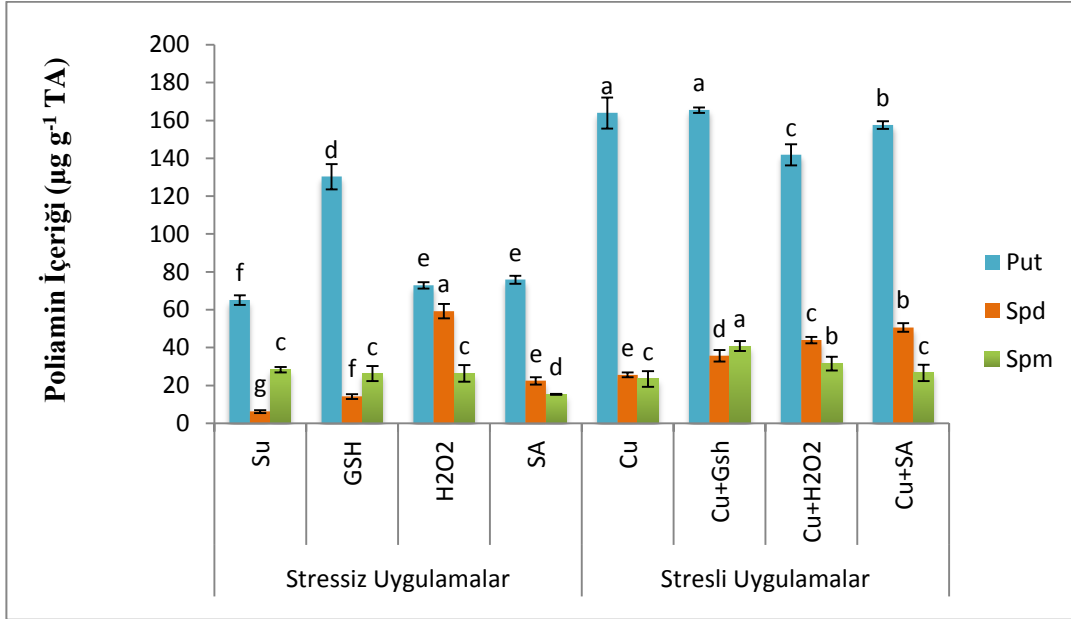
Şekil 60. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının prolin içeriği üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

### 3.3.2.5. Poliamin İçeriği Üzerine Etkisi

Bakır stresi altındaki Akpınar çeşidinde poliaminlerden putresin ve spermidin içeriğinin kontrole göre önemli ölçüde arttığı, spermin içeriğinin ise azaldığı gözlemlendi. Stresli GSH uygulamasında her üç poliamin miktarının kontrole göre (bakır uygulaması) arttığı, stresli H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasında putresin ve spermin miktarı artarken spermidin miktarının kontrole göre değişmediği, stresli SA uygulamasında ise her üç poliamin içeriğinin kontrole göre önemli miktarda arttığı belirlendi. Bakır stresi altındaki 31G98 çeşidinde putresin ve spermidin içeriğinin kontrole göre istatistik olarak önemli ölçüde arttığı, spermin içeriğinin ise değişmediği belirlendi. Stres altındaki GSH uygulamasında putresin miktarının kontrole göre (bakır uygulaması) istatistik olarak değişmediği, spermin ve spermidin miktarının ise arttığı tespit edildi. Stresli H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasında putresin miktarının azaldığı, spermin ve spermidin miktarının kontrole göre arttığı, stresli SA uygulamasında ise kontrole göre putresinin azaldığı, spermidinin arttığı ve spermin miktarının ise değişmediği gözlemlendi (Şekil 61, 62).



Şekil 61. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının poliamin içeriği üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

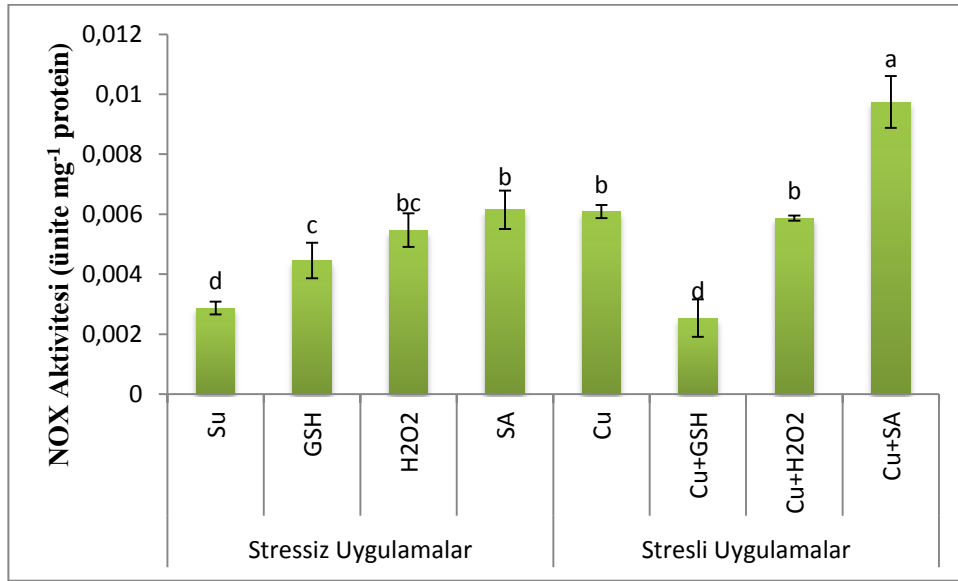


Şekil 62. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının poliamin içeriği üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

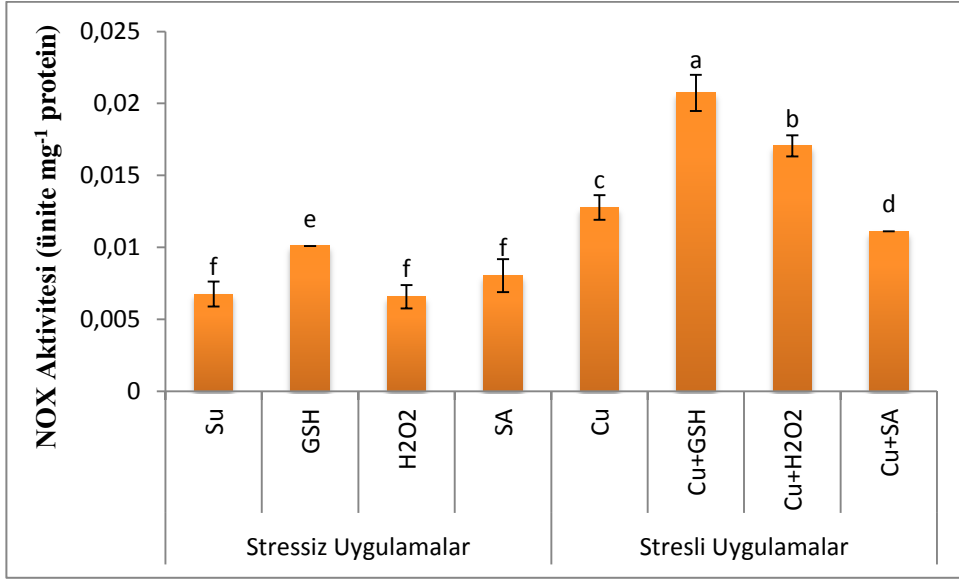
### 3.4. GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA Uygulamalarının NOX ve ABA Üzerine Etkisi

#### 3.4.1. NADPH Oksidaz (NOX) Aktivitesi Üzerine Etkisi

Yapılan ölçümlerde, NOX aktivitesinin bakır stresinin etkisiyle Akpınar ve 31G98'de kontrole göre önemli ölçüde arttığı belirlendi. Bakır stresi koşullarındaki Akpınar çeşidinde GSH uygulamasında NOX aktivitesi azaldı, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasında NOX aktivitesi değişmezken, SA uygulamasında NOX aktivitesinin kontrole göre arttığı belirlendi. 31G98 çeşidinde ise GSH ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamalarında NOX aktivitesi artarken, SA uygulamasında NOX aktivitesinin kontrole göre azaldığı gözlemlendi. Akpınar'da stressiz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH ve SA uygulamalarında NOX aktivitesinin kontrole göre (saf su uygulaması) önemli ölçüde arttığı gözlemlendi. 31G98'de ise GSH uygulamasında aktivitenin arttığı, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarında istatistiki olarak önemli bir farkın olmadığı gözlemlendi (Şekil 63, 64).



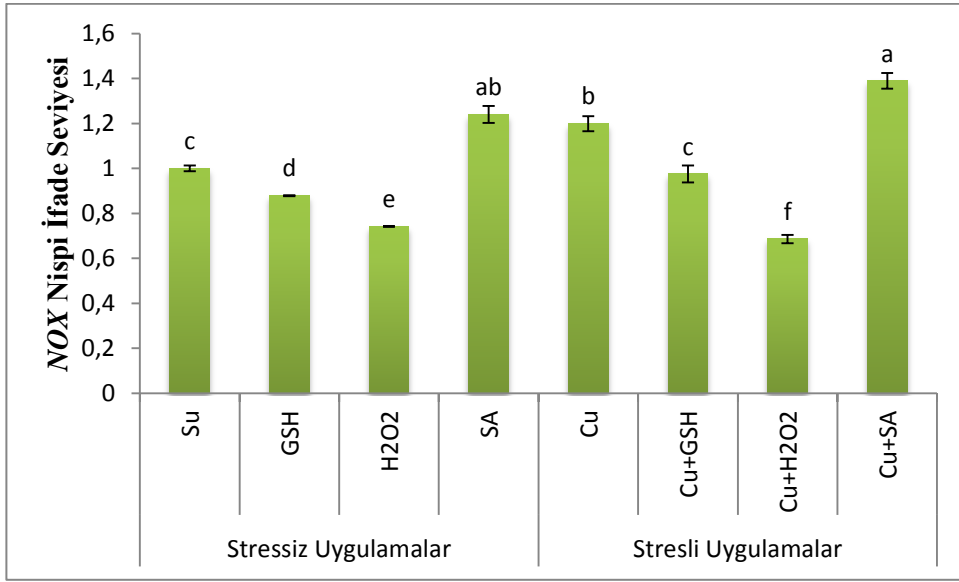
Şekil 63. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının NOX aktivitesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.



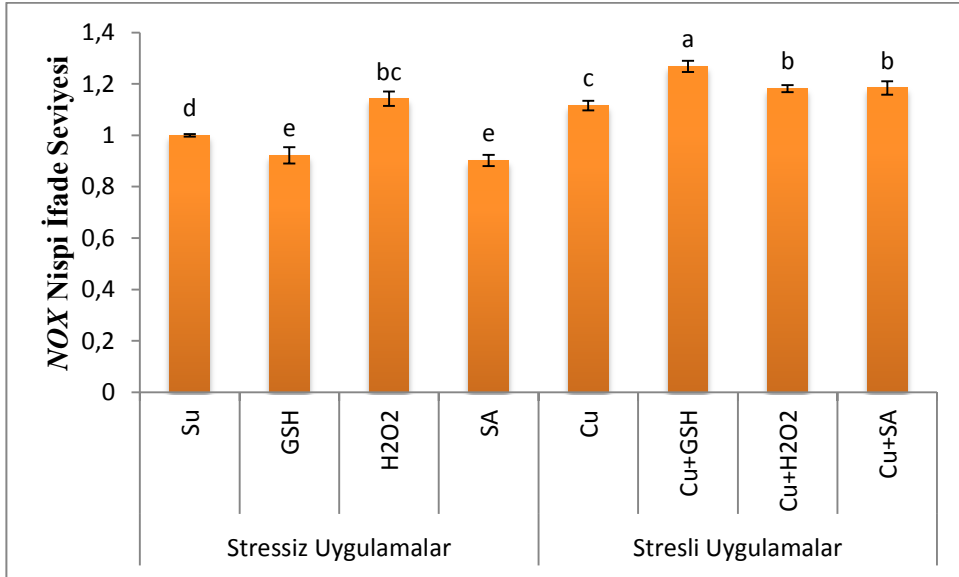
Şekil 64. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının NOX aktivitesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

### 3.4.2. NADPH Oksidaz (NOX) Gen İfadesi Üzerine Etkisi

Yapılan qPCR analizlerinde, bakır stresinin etkisiyle *NOX* gen ifadesinin Akpınar ve 31G98'de kontrollerine göre önemli ölçüde arttığı belirlendi. Bakır stresi koşullarındaki Akpınar çeşidinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve GSH uygulamalarında *NOX* gen ifadesi kontrole göre önemli oranda azalırken, SA uygulamasının gen ifade seviyesinde kontrolden daha fazla artış meydana geldiği gözlemlendi. 31G98 çeşidinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH ve SA stresli uygulamalarının kontrole göre gen ifade seviyesinde artış olduğu gözlemlendi. Akpınar stressiz GSH ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamalarında *NOX* gen ifadesi kontrole göre (saf su uygulaması) önemli oranda azalırken, SA uygulamasının gen ifade seviyesinde kontrolden daha fazla artış gözlemlendi. 31G98'in stressiz GSH ve SA uygulamalarında gen ifade seviyesi azalırken H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasında artış belirlendi (Şekil 65, 66).



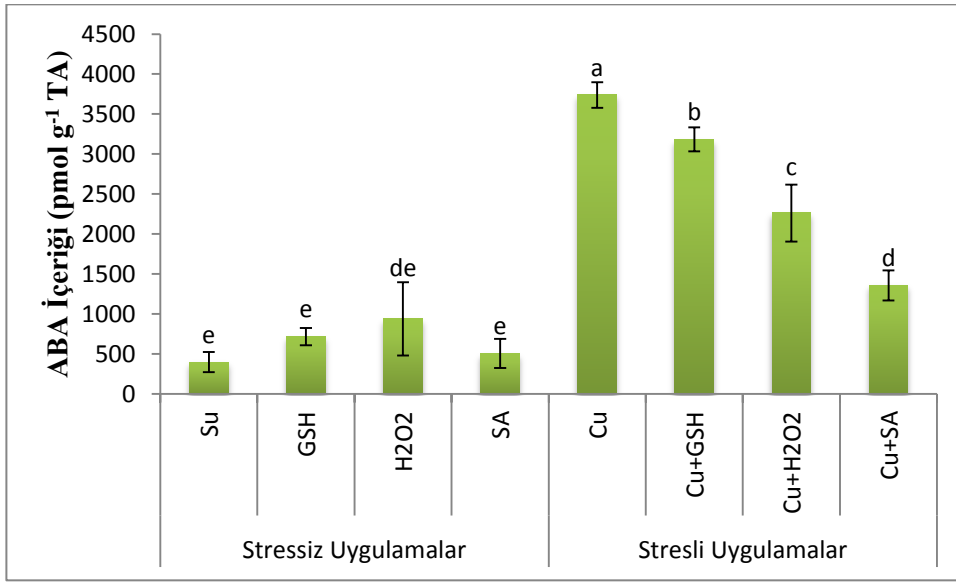
Şekil 65. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının NOX gen ifadesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.



Şekil 66. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının NOX gen ifadesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

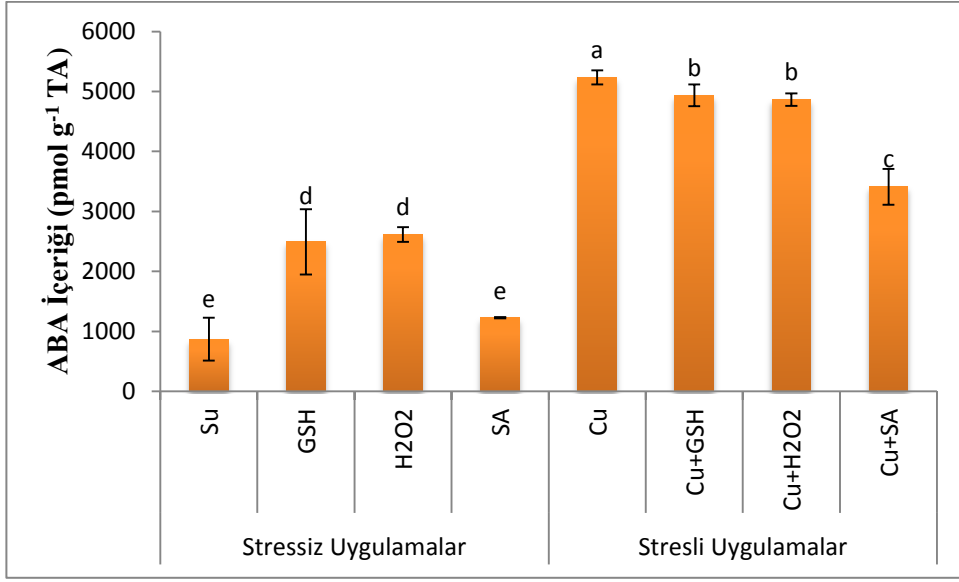
### 3.4.3. Absisik Asit (ABA) İçeriği Üzerine Etkisi

Yapılan ölçümlerde ABA içeriğinin bakır stresinin etkisiyle Akpınar ve 31G98'de kontrole göre önemli ölçüde arttığı belirlendi. Bakır stresi koşullarında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH ve SA uygulamalarının her iki çeşitte de ABA içeriğindeki artışı kontrole göre (bakır uygulaması) hafiflettiği gözlemlendi. Stresiz koşullardaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH ve SA uygulamalarının Akpınar fidelerinin ABA içeriğinde kontrole göre (saf su uygulaması) istatistiki olarak önemsiz artışlar oluşturduğu belirlendi. 31G98'in SA uygulamasında istatistiki olarak önemli bir fark gözlenemezken GSH ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamalarının ABA içeriğinde önemli bir artış kaydediti (Şekil 67, 68).



Şekil 67. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının ABA içeriği üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

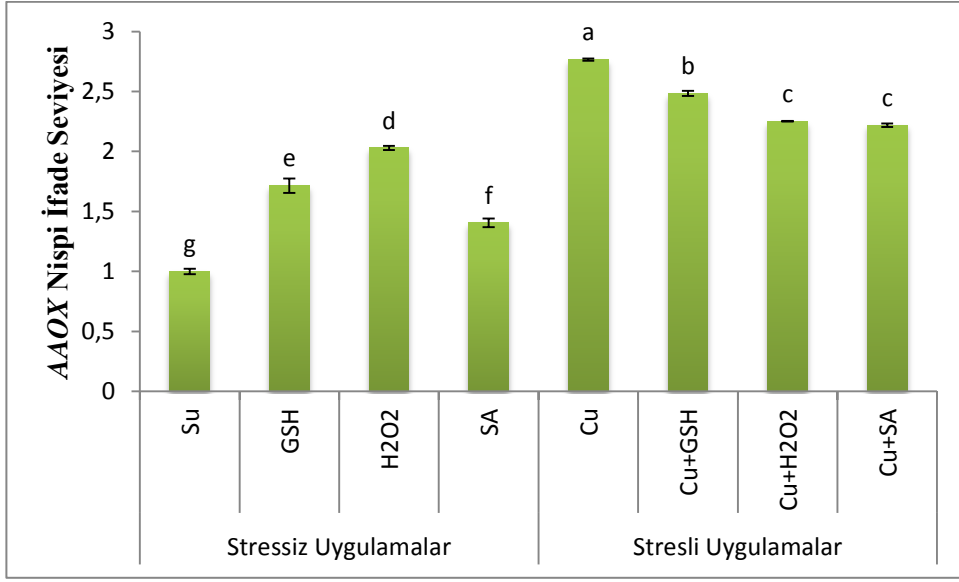




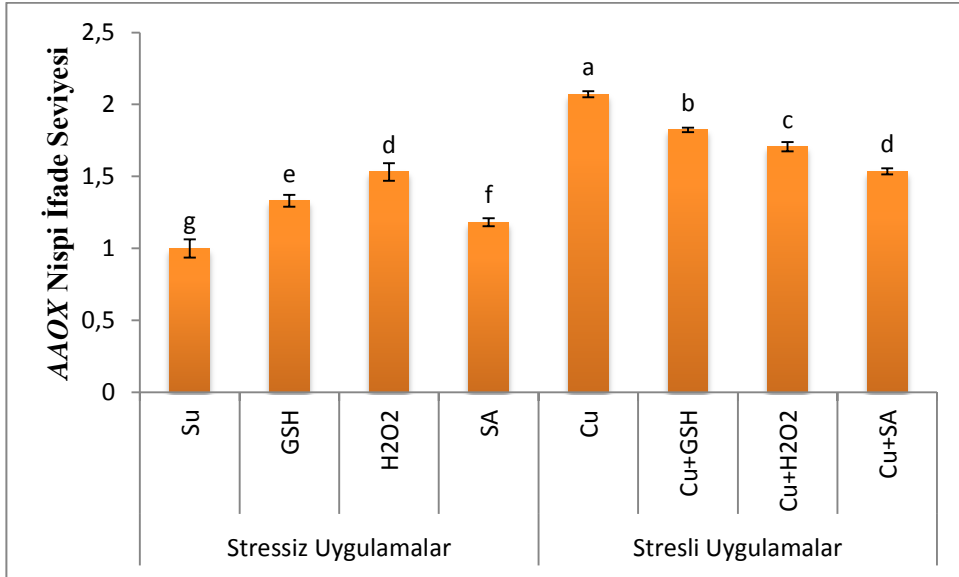
Şekil 68. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının ABA İçeriği üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir

#### 3.4.4. Absisik Aldehit Oksidaz (AAOX) Gen İfadesi Üzerine Etkisi

Yapılan qPCR analizlerinde, bakır stresinin etkisiyle *AAOX* gen ifadesinin Akpınar ve 31G98'de kontrole göre önemli ölçüde arttığı belirlendi. Bakır stresi koşullarındaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH ve SA uygulamalarında ise *AAOX* gen ifadesindeki artışın kontrole göre önemli oranda hafiflediği gözlemlendi. Stres altında olmayan her iki mısır çeşidi fidelerinde de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH ve SA uygulamalarında *AAOX* gen ifadesinde saf su uygulamasına göre önemli artışların olduğu kaydedildi (Şekil 69, 70).



Şekil 69. Akpınar çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının AAOX gen ifadesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.



Şekil 70. 31G98 çeşidinde bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının AAOX gen ifadesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir (n=3). Aynı harfle gösterilen sütunlar arasındaki fark %5 (P<0.05) seviyesinde önemsizdir.

#### 4. TARTIŞMA

Bakır stresinin fotosentetik verim üzerindeki olumsuz etkilerinin  $H_2O_2$ , GSH ve SA ön muameleleri ile azaltılmasının konu alındığı bu tez çalışmasında; söz konusu uygulamaların bakır stresinin etkilerini azaltıp azaltmadığını tespit etmek amacıyla bazı stres parametreleri ölçülmüştür. Bu parametrelerden birisi bakır birikimidir. Bakır birikiminin bitkilerde toksik etkileri olduğu bilinmektedir (Lin ve Aarts, 2012). Bakır uygulaması, mısır fidelerinde bakır birikimini artırırken, GSH,  $H_2O_2$  veya SA uygulamalarının içsel bakır seviyesini kontrole göre azalttığı görülmüştür. Tanyolaç vd., (2007), bakır stresine maruz bırakılan mısır fidelerinin kök ve yapraklarında içsel bakır içeriğinin arttığını rapor etmişlerdir. Benzer biçimde Lin vd. (2003) *Helianthus annuus* L. bitkisinin kök, hipokotil, kotiledon ve yapraklarındaki bakır birikimini rapor etmişlerdir. Diğer taraftan, ağır metal (Cd) stresine maruz bırakılan çeltik fidelerine  $H_2O_2$  uygulamasının sürgünlerdeki ağır metal içeriğini azalttığı kaydedilmiştir (Hu vd., 2009). Çalışmamıza benzer olarak kadmiyum stresi koşullarındaki çeltik fidelerine GSH uygulamasının Cd alınımını belirgin şekilde azalttığı belirlenmiştir (Cai vd., 2010). Ayrıca çalışmamızda bakır stresine maruz kalan 31G98 fidelerinin Akpınar'a göre çok daha fazla bakır biriktirdiği görülmüştür. Bu durum 31G98'in vakuollerinde bakır biriktirme, Akpınar'ın ise bakır alımını engelleyen bir mekanizmaya sahip olabileceğini düşündürmektedir. Diğer taraftan, Akpınar çeşidinde GSH uygulanan fideler Cu uygulanan fidelerle kıyaslandığında, bakır içeriğinin daha fazla arttığı belirlenmiştir. Bakır stresi altındaki GSH uygulanan fidelerdeki bu artışın muhtemelen GSH'ın bakırı şelatlayarak alınımını arttırdığı söylenebilir. Sonuç olarak uygulamalar bakır birikimini azaltarak stresin etkisini hafifletmiştir.

Çevresel streslerden en çok etkilenen parametre su potansiyelidir. Bakır stresinin su potansiyelinde azalmaya sebep olduğu daha önceki çalışmalarla bildirilmiştir (Chatterjee ve Chatterjee, 2000). Mevcut çalışmada dışarıdan yapılan uygulamaların bakır stresinin etkilerini hafifletip etmediğini belirlemek için yaprak su potansiyeli ölçülmüştür. Bakır stresi ile su potansiyelinin azaldığı,  $H_2O_2$ , GSH ve SA uygulamalarının bakır stresi koşullarında hem Akpınar hem de 31G98 çeşidinde yaprak su potansiyelini artırdığı belirlenmiştir. Su potansiyelinde gözlenen bu artış, osmotik birikiminin bu uygulamalarla artırılması sonucu meydana gelen osmotik düzenleme ile ilgili olabilir. Nitekim Güzel ve Terzi (2013), bakır

stresine maruz bıraktıkları mısır fidelerinde  $H_2O_2$  ön muamelesi sonucu biriken bazı osmotik düzenleyicilerin mısır bitkilerinin yaprak su potansiyelini arttırdığını ileri sürmüşlerdir.

Bitkilerin stres durumunun diğer bir indikatörü lipid peroksidasyonudur. Çalışmamızda bakır stresi koşullarında her iki mısır çeşidinde de lipid peroksidasyonunun arttığı tespit edilmiştir. Aşırı bakıra maruz kalan bitkilerde lipid peroksidasyonunun arttığı bilinmektedir (Szafranska vd., 2011). Diğer taraftan, çalışmamızda dışarıdan yapılan uygulamaların MDA içeriğini azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca,  $H_2O_2$ 'nin yüksek konsantrasyonlarda lipid peroksidasyonuna ve hücre membranlarında hasara yol açtığı bilinmektedir (Munne-Bosch vd., 2001). Bununla beraber, çalışmamızda dıştan uygulanan düşük konsantrasyondaki  $H_2O_2$  ile GSH ve SA'nın aşırı bakır koşullarında lipid peroksidasyonunu iyileştirdiği belirlenmiştir. Bu iyileştirmenin antioksidan sistemin uyarılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer sonuçlar aşırı krom stresine maruz bırakılan ve GSH uygulanmış çeltik fidelerinde (Zeng vd., 2012), kadmiyum stresi koşullarında  $H_2O_2$  uygulanmış çeltik fidelerinde (Hu vd., 2009) ve kadmiyum stresine maruz bırakılan SA uygulanmış buğdayda (Moussa ve El-Gamal, 2010) ve mısır bitkilerinde (Krantev vd., 2006) gözlenmiştir. Son yıllarda yapılan bir çalışmada ise kadmiyum stresine maruz bırakılan çeltik fidelerinde Cd'un neden olduğu lipid peroksidasyonunun GSH veya SA uygulamasıyla giderildiği rapor edilmiştir (Cao vd., 2013).

Yukarıdaki veriler değerlendirildiğine dışarıdan uygulanan SA, GSH ve  $H_2O_2$ 'nin bakır stresinin olumsuz etkilerini azalttığı sonucuna varılabilir. Bu uygulamaların fotosentetik verim üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla öncelikle bakır stresinden en çok etkilenen fotosentetik pigment içeriği belirlenmiştir. Çalışmalarımızda, bakır stresi koşullarında fotosentetik pigment içeriğinin her iki mısır çeşidinde azaldığı,  $H_2O_2$ , GSH veya SA uygulamalarının ise bakırın pigment içeriği üzerine olumsuz etkilerini hafiflettiği görülmüştür. Örneğin Tanyolaç vd., (2007), aşırı bakıra maruz bırakılan mısır fidelerinde klorofil ve karotenoid içeriğinin azaldığını rapor etmişlerdir. Ayrıca, aşırı bakırın pigmentlerin ve membran lipidlerinin peroksidatif bozulması ve pigment içeriğinin azalması nedeniyle yaprak klorozisini uyardığı belirlenmiştir (Shainberg vd., 2001; Pätsikkä vd., 2002). Bakırın fotosistemlerdeki anten kompleksi ve reaksiyon merkezindeki klorofillerde bulunan magnezyum atomunun yerini alabildiği ve böylece klorofilin yapı ve fonksiyonuna hasar verdiği kaydedilmiştir (Kupper vd., 1996). Diğer taraftan, çalışmamıza benzer olarak Moussa ve El-Gamal (2010), Cd stresine maruz bırakılan buğday fidelerinde fotosentetik pigmentlerin

azaldığını, bununla beraber SA uygulamasının stresin pigment içeriği üzerine olumsuz etkilerini azalttığını ileri sürmüşlerdir. Son vd., (2014), kadmiyum ve bakır gibi ağır metal stresi koşullarındaki tütün bitkilerinde klorofil içeriğinin azaldığını, GSH uygulamasının ise bitkilerin klorofil içeriğini arttırdığını ifade etmişlerdir. Cao vd., (2013), ise aşırı Cd koşullarındaki çeltik fidelerine GSH veya SA uygulamasının fotosentetik pigmentleri uygulama yapılmamış fidelere göre artırdığını rapor etmişlerdir. Mevcut çalışmada fidelere uygulanan  $H_2O_2$  ve SA'nın GSH gibi doğrudan bakıra bağlanarak klorofilin porfirin halkasının merkezi atomu olan  $Mg^{+2}$  yerine  $Cu^{+2}$ 'nin daha fazla bağlanmasını engelleyebildiği söylenebilir (Mishra ve Dubey, 2005). Ayrıca, bu uygulamaların bakır birikimini sağlayan bakır taşıyıcılarının aktivitelerini azaltmak veya ROS süpürücülerini aktive ederek lipid peroksidasyonunu azaltmak suretiyle fideleri stresin etkilerinden koruyabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda SA,  $H_2O_2$  ve GSH uygulamaları sonucu karotenoid içeriklerinin arttığı da tespit edilmiştir. Bilindiği gibi karotenoidler ROS'ları temizleyerek fotosentetik sistemi koruyabilirler.

Çalışmamızda dışarıdan yapılan uygulamaların PSII üzerindeki etkilerini incelemek için bakır stresi altındaki mısır fidelerinde PSII'nin maksimum fotokimyasal etkinliği (Fv/Fm) ölçülmüştür. Fv/Fm'deki değişim bakır stresi altında fotosentetik aygıtın durumunu gösterir. Bakır ve çeşitli ağır metal streslerinin Fv/Fm'yi azalttığı pek çok çalışmada gösterilmiştir (Tanyolaç vd., 2007; Ekmekçi vd., 2008). Mevcut çalışmada dışarıdan yapılan uygulamalar bakır stresinde önemli derecede azalan Fv/Fm değerini arttırmıştır. Bu da söz konusu uygulamaların bakır stresi altında fotosentetik aygıtı koruduğunu göstermektedir. Çalışmamıza benzer olarak, GSH uygulanan çeltik bitkilerinde Fv/Fm'nin arttığı rapor edilmiştir (Cai vd., 2011).

Çalışmamızda ölçülen başka bir klorofil floresans parametresi ise NPQ'dur. Bakır stresinin NPQ'da artışa neden olduğu bilinmektedir (Tanyolaç vd., 2007). Çalışmamızda bakır stresi ile beraber artan NPQ, foto-hasarı engellemek için yapraklar üzerindeki enerji yükünün termal olarak dağılmasına işaret edebilir. Nitekim artan NPQ'nun, fotosistemi bakır stresinin olumsuz etkilerinden koruyucu fonksiyon gördüğü rapor edilmiştir (Tanyolaç vd., 2007). Diğer taraftan, karotenoidlerin (ksantofil) fotosistem üzerindeki enerji yükünün dağıtılmasına katkı sağladıkları bilinmektedir (Demmig-Adams ve Adams, 1992). SA, GSH ve  $H_2O_2$  uygulamaları ile NPQ daki azalma ve karotenoid içeriğindeki artış, enerji yükünün

dağıtıldığını ve fotokimyasal enerjinin fotosentetik reaksiyonların devamı için kullanıldığını göstermektedir. Bu durum; SA, GSH ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamalarının fotosistemi koruyucu bir rol üstlendiğini desteklemektedir.

Çalışmamızda PSII'nin fotokimyasal verimi (ΦPS2)'nin bakır stresi ile azaldığı belirlendi. ΦPS2'deki azalmanın NPQ ilişkili olabileceği bilinmektedir. Çalışmamızda bakır stresi ile NPQ'da meydana gelen artış fotokimyasal verimin azalmasında rol oynayabilir. Nitekim Qiu vd. (2003) artan NPQ ile fotosistemdeki yükün ısı ile dağıtılmasının fotosentetik verimi düşürerek sistemi ışık hasarından koruduğunu ileri sürmüştür. Bununla beraber, çalışmamızda dışarıdan yapılan uygulamalar ile fotokimyasal verimin daha fazla arttığı gözlenmiştir. Bu durum elektron taşınım oranı (ETO)'ndaki artışla ilgili olabilir. Bakırın PSII ye zarar vererek fotosentetik elektron transportunu engellediği bilinmektedir. Çalışmamızda GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamaları ise ETO'yi bakır stresi koşullarında arttırmıştır. Bu artış, söz konusu uygulamaların bakırın PSII'ye verdiği zararı azalttığı fikrini desteklemektedir.

SA, GSH ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamalarının fotosentetik karbon fiksasyonunu etkileyerek verimi koruyup korumadığının belirlenebilmesi için fotosentetik gaz değişimi parametreleri incelendi. Bilindiği gibi, stoma kapanması, strese verilen ilk cevaplar arasındadır ve CO<sub>2</sub> alınımını sınırlandırdığı için azalan fotosentezin temel nedenlerinden birisi olarak kabul edilir (Chaves, 1991; Zanella vd., 2004). Çalışmamızda fotosentez hızında bakır stresi ile beraber azalış olduğu belirlenmiştir. Fotosentez hızındaki düşüşle beraber transpirasyon oranının da azalışlar meydana gelmiştir. Akpınar çeşidinde transpirasyon oranının (E) bakır stresi koşullarında önemli miktarda azaldığı, 31G98 çeşidinde ise istatistiki olarak önemli bir fark olmadığı görüldü. Benzer olarak Vasilev vd., (2003), arpa bitkisi üzerine yaptıkları çalışmada Akpınar çeşidindeki sonuçlara benzer olarak bakır stresinin transpirasyon oranını önemli miktarda azalttığını rapor etmişlerdir. Ayrıca çalışmamızda Akpınar çeşidinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH ve SA uygulamalarının transpirasyon oranını strese göre önemli seviyede arttırdığı belirlendi. Bu artışın, sözkonusu uygulamaların poliamin ve prolin içeriğini artırarak osmoregülasyon etkisiyle stomaların açılmasını uyararak sağladığı söylenebilir.

Mevcut çalışmada ayrıca bakır stresinin net fotosentez hızını (Pn) ve içsel CO<sub>2</sub> içeriğini heriki mısır çeşidinde belirgin bir şekilde düşürdüğü, dıştan GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya SA uygulamalarının ise bu düşüşü hafiflettiği belirlenmiştir. Çeşitli ağır metallerin fotosentez hızını olumsuz etkilediği bilinmektedir. Örneğin kadmiyum stresine maruz bırakılan çeltik

fidelerinde stres etkisiyle net fotosentez hızının azaldığı rapor edilmiştir (Cai vd., 2011). Benzer olarak çeşitli bakır konsantrasyonlarına maruz bırakılan arpa bitkilerinde konsantrasyon artışına paralel olarak net fotosentez oranının azaldığı rapor edilmiştir (Vasilev vd., 2003). Bununla beraber, stres koşullarında çeşitli uygulamalarla stresin fotosentez hızı üzerindeki olumsuz etkilerinin giderilebileceği de belirlenmiştir. Örneğin, elde edilen verilerimize benzer olarak Cd toksikliğine maruz kalan mısır bitkilerine SA uygulamasının CO<sub>2</sub> fiksasyon hızını artırdığı ileri sürülmüştür (Krantev vd., 2006). Yine çalışmamıza benzer olarak Gondim vd., (2013), tuz stresine maruz bırakılan mısır bitkilerinde içsel CO<sub>2</sub> konsantrasyonunun azaldığını ancak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> muamelesi yapılan fidelerde bu azalışın çok daha düşük olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamızda dışarıdan yapılan uygulamalarla, tüm gaz değişim parametrelerinde (Pn, gs, Ci ve E) bakır stresine maruz kalan fidelere göre önemli artışların olması, SA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve GSH'ın fotosentetik verimi koruyucu bir fonksiyon gösterdiği fikrini desteklemektedir.

Bakır stresi koşullarında SA, GSH ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamalarının fotosentetik verimdeki iyileşmeyi karbondioksit fiksasyon enzimlerinin aktivitelerini etkileyerek gerçekleştirdiğinin belirlenebilmesi için çalışmamızda rubisco aktivitesi ve içeriği çalışılmıştır. Aşırı bakır stresine maruz kalan Akpınar çeşidinde rubisco aktivitesi kontrole göre azalırken, 31G98 çeşidinde rubisco aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Bununla birlikte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH veya SA uygulamalarının bakır stresi altında her iki çeşitte de iyileşme sağladığı görülmüştür. Bakır toksisitesi tarafından rubisconun karboksilaz ve oksijenaz aktivitesi inhibe edilmektedir (Lidon ve Henriques, 1991). Bu etkinin rubisco enziminin yapısındaki sistein aminoasitlerinin uyarılmış metallere etkileşiminden kaynaklandığını ifade edilmiştir (Sibirova, 1998). Schafer vd., (1992)'de aşırı bakır stresi altındaki bitkilerde rubisco aktivitesinin Akpınar çeşidindeki gibi azaldığını belirlemişlerdir. Bu durumun tersi olarak Son vd., (2014), 31G98 çeşidindeki bulguya benzer olarak bakır stresi altındaki tütün bitkisinde rubico içeriğinin azalmasına rağmen rubisco aktivitesinin arttığını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda hassas çeşitte aktivite azalmasının, rubiconun Cu<sup>+2</sup> iyonlarının disülfid bağlarını kırması sonucunda ya da enzimin yapısında yer alan Mg<sup>+2</sup> iyonları ile yer değiştirmesi sonucunda oluşabileceği, bununla birlikte dirençli çeşidin bu olumsuz etkinin üstesinden gelebilecek savunma mekanizmasının etkili olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda her iki mısır çeşidinde stres esnasında rubisco içeriğinin azaldığı, dıştan uygulamaların ise her iki mısır çeşidini farklı şekilde etkilediği

belirlenmiştir. Bakır stresi altındaki arpa yaprağında rubisco içeriğinin azaldığı ifade edilmiştir (Simova-Stoilova vd., 2002). Akpınar'daki bulgularımıza benzer olarak son yıllarda yapılan bir çalışmada, aşırı kadmiyum ve bakıra maruz kalan tütün bitkilerinde GSH ve ağır metallerin rubisco içeriğini azalttığı ve ağır metaller nedeniyle azalan rubisco içeriğinin GSH muamelesi ile giderildiği ileri sürülmüştür (Son vd., 2014). Ağır metal koşullarında SA muamelesi üzerine yapılan bir çalışmada da 31G98 çeşidine benzer şekilde, stresin rubisco aktivitesi üzerindeki inhibitör etkisinin SA uygulamasıyla ortadan kaldırıldığı belirlenmiştir (Moussa vd., 2010). Öte yandan Rubisco aktivitesinin ve içeriğinin azalışı, bakır stresinin neden olduğu stoma kapanması sonucunda da olabilir. Zira çalışmamızda bakır stresi sonucu transpirasyondaki azalış bunu desteklemektedir. Çünkü stoma kapanması dokunun fazla ısınmasına, fotosentetik ürünlerde ve içsel CO<sub>2</sub> (Ci) konsantrasyonunda azalmaya yol açabilir (Baczek-Kwinta vd., 2010). Düşük seviyedeki Ci rubisconun deaktivasyonuna ve sukroz fosfat sentazın baskılanmasına yol açabilir (Chaves ve Oliveira, 2004). Çalışmamızda Ci miktarında bakır stresi altında meydana gelen azalma da bu fikri destekler niteliktedir. Öte yandan dışarıdan yapılan uygulamalarla gerek rubisco aktivitesinde ve gerekse içeriğinde bakır stresine maruz kalan bitkilere kıyasla meydana gelen dikkate değer artışlar, SA, GSH ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin Calvin devri enzimleri üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH ve SA'nın antioksidan sistemi etkileyerek fotosentezi koruyup korumadığını anlayabilmek için ROS'ları süpüren antioksidan enzim sisteminin önemli bileşenlerinden olan GPX, CAT, SOD, GR ve APX aktiviteleri araştırılmıştır. ROS'ların birikimi hücrelerin zarar görmesine neden olur (Mittler, 2002). ROS'ların sitotoksik etkilerinden hücre ve hücre alt yapılarını korumada ve bitkinin çevresel streslere dayanıklılığında antioksidan enzimlerdeki değişimlerin etkili olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte bitkinin strese dayanıklılığı ROS üretimi ve hücrenin antioksidan yeteneğiyle denge halindedir (Pastori ve Trippi, 1993). Bitkileri oksidatif hasardan korumak için ROS'ların antioksidan sistem tarafından kontrol altında tutulması gerekir (Ros Barcelo vd., 1987).

Mevcut çalışmada kontrole (su uygulaması) göre bakır stresi altındaki mısır fidelerinde GPX enziminin aktivitesi oluşan aşırı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi süpürmek için önemli miktarda artmıştır. Benzer şekilde, GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya SA uygulamaları GPX aktivitesini bakır uygulamasına göre önemli oranda artırmıştır. Mevcut bulguları destekler nitelikte, Thounaojam vd., (2012), bakır



stresi altındaki çeltik fidelerinde GPX aktivitesinde önemli bir artışın olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca Tanyolaç vd., (2007) bakır stresi altındaki mısır fidelerinde peroksidaz enzim aktivitesinin arttığını ifade etmişlerdir.

Bakır stresi altında CAT aktivitesinin her iki çeşitte arttığı saptanırken Akpınar çeşidinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasıyla azalmıştır. Bu düşüşün H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile CAT enziminin inhibisyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarında her iki çeşitte de bakır stresine göre önemli artışlar belirlendi. Xu vd., (2011) alüminyum stresi altındaki buğday fidelerinde CAT aktivitesinin çalışmamızdaki gibi arttığını ifade etmektedirler. Hu vd., (2009) kadmiyum stresi altındaki çeltik fidelerinde CAT aktivitesinin azaldığını ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasının stresin olumsuz etkisini iyileştirdiğini rapor etmişlerdir. Bir başka çalışmada kadmiyum stresine maruz kalan arpa fidelerinde katalazı kodlayan genlerin ifade seviyesi kontrole göre artmıştır. Ayrıca GSH uygulamasının genin ifade seviyesindeki artışı azalttığı ifade edilmiştir (Chen vd., 2010). Dolayısıyla çalışmamızda içsel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında uygulamalar sonucu meydana gelen azalış CAT aktivitesinde görülen artıştan kaynaklanabilir.

Mevcut çalışmada bakır stresi altındaki mısır fidelerinde SOD aktivitesinin her iki çeşitte kontrole göre istatistiki olarak önemli oranda arttığı belirlendi. Bu durumun NADPH oksidaz tarafından üretilen süperoksit molekülünün üretiminin artışına bağlı olarak SOD aktivitesinin de artmasına neden olduğunu düşündürmektedir. Bakır stresinin çeşitli konsantrasyonlarına maruz bırakılan mısır bitkisinde çalışmamıza benzer olarak SOD aktivitesinin bakır konsantrasyonunun artışına paralel olarak arttığı rapor edilmiştir (Tanyolaç vd., 2007). Hu vd., (2009) da yaptıkları çalışmada kadmiyum stresine maruz bırakılan çeltik fidelerinde ise çalışmamızda kullandığımız Akpınar ve 31G98 çeşitlerine benzer olarak SOD aktivitesinin önemli oranda arttığı, ayrıca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasının stresin olumsuz etkilerini iyileştirdiği ifade edilmiştir. Benzer bir çalışmada aşırı bakırın çeşitli konsantrasyonlarına maruz bırakılan çeltik fidelerinde ise hem kökte hem de gövdede bakır konsantrasyon artışına paralel olarak SOD aktivitesinde de bir artışın olduğu belirtilmiştir (Thounaojam vd., 2012).

Çeşitli bakır konsantrasyonlarına maruz bırakılan çeltik ve mısır fidelerinde bakır konsantrasyon artışına paralel olarak APX aktivitesinde de artışın olduğu rapor edilmiştir (Thounaojam vd., 2012; Tanyolaç vd., 2007). Bakır stresine uzun süre maruz kalan *Solanum lycopersicum* bitkisinde ise APX aktivitesinin azaldığı ifade edilmiştir (Chamseddin vd.,

2009). Mevcut çalışmamızda ise bakır stresi altında mısır fidelerinin her iki çeşidinde de APX aktivitesinin istatistiki olarak önemli oranda arttığı belirlenmiştir. Ayrıca GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya SA uygulamalarının APX aktivitesini önemli oranda artırdığı görülmüştür. Bu sonuçlar bakır stresi koşullarında APX aktivitesinin koruyucu ve oksidatif hasarı azaltıcı bir rol üstlendiğini göstermektedir.

Mevcut çalışmada askorbat-glutasyon siklusunun diğer bir antioksidan enzimi olan GR aktivitesinde meydana gelen değişimler araştırılmıştır. GR, GSSG'nin GSH'a indirgenmesine aracılık eder ve GSH'ın GSSG'ye oranının yüksek kalmasını sağlayarak oksidatif hasara karşı kloroplastların korunmasında önemli bir rol oynar (Gamble ve Burke, 1984; Pilon-Smits vd., 2000). Çalışmamızda bakır stresi altındaki mısır fidelerinin her iki çeşidinde de kontrole göre GR aktivitesinde artış belirlenmiştir. GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya SA uygulamalarının ise GR aktivitesinde önemli oranda artış sağladığı görülmüştür. Dolayısıyla stres altında askorbat-glutasyon yoluna GSH sağlamak ve GSH/GSSG oranının yüksek tutulması için GR aktivitesinde artış olması bir ihtiyaç olabilir. Diğer taraftan, GR aktivitesindeki artış, glutasyon seviyesinin artmış olmasından kaynaklanabilir. Nitekim mevcut çalışmamızda stres altındaki mısır bitkisinin her iki çeşidinde GSH seviyesinin arttığı bulunmuştur. Diğer taraftan kullandığımız her iki çeşitte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH veya SA uygulamalarının GR aktivitesi üzerine olumlu etkisi olduğu belirlendi. Benzer olarak, Thounaojam vd., (2012) ve Tanyolaç vd., (2007) bakırın çeşitli konsantrasyonlarına maruz bırakılan çeltik ve mısır fidelerinde bakır konsantrasyon artışına paralel olarak GR aktivitesinde de artışın olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamıza paralel olarak alüminyum stresine maruz kalan buğday fidelerinde de GR aktivitesinin arttığı ifade edilmiştir (Xu vd., 2011). Bu sonuçlar bakır stresi koşullarında APX'e benzer olarak GR'nin de koruyucu ve oksidatif hasarı azaltıcı bir rol üstlendiğini göstermektedir.

Mevcut çalışmamızda her iki mısır çeşidinde bakır stresi koşullarında içsel GSH içeriğinin arttığı, stres koşullarında GSH uygulamasının ise içsel GSH seviyesini azalttığı görülmüştür. Çalışmamıza benzer olarak, Chen vd., (2010), aşırı Cd'a maruz bırakılan arpa fidelerinde GSH içeriğinin kontrole göre arttığını ve stresle birlikte GSH uygulamasının (Cd+GSH) uygulama yapılmamış fidelere göre GSH içeriğini azalttığını ileri sürmüşlerdir. Ayrıca stressiz koşullarda dıştan uygulanan GSH'ın da kontrole göre GSH içeriğini artırdığı belirtilmiştir. Diğer taraftan, çalışmamızda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasının Akpınar'da stressiz ve stresli

koşullarda GSH içeriğini artırdığı, aksine 31G98'de ise stressiz ve stresli koşullarda GSH içeriğini azalttığı görülmüştür. Akpınar çeşidindeki verilere uygun olarak, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğindeki artışlar birçok bitki türünde GSH birikimini tetiklediği rapor edilmiştir (Smith vd., 1984; May ve Leaver.,1993; Willekens vd., 1997; Queval vd., 2009). Çalışmamızda ayrıca SA uygulamasının stres koşullarında artan GSH içeriğini azalttığı belirlenmiştir. Elde ettiğimiz verilerden farklı olarak tuz veya kuraklık stresi koşullarındaki buğday fidelerine SA (0.5 mM) uygulamasının fidelerin abiyotik stres toleransını uyardığı ve GSH içeriğini artırdığı ileri sürülmüştür (Kang vd., 2013; Li vd., 2013). GSH içeriğindeki azalışın nedeni muhtemelen glutasyon sentetaz geninin dışarıdan yapılan uygulamalarla baskılanmasından kaynaklanmış olabilir. Bu fikrimizi test etmek için glutasyon sentezinin son aşamasındaki GSHSY-2 enzimini ifade eden *GSHSY-2* geninin ifade seviyesi ölçüldü. Yapılan ölçümler sonucunda bakır stresi altındaki her iki mısır çeşidinde de *GSHSY-2* genin ifadesinin önemli oranda arttığı (up-regülasyon) belirlendi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH veya SA uygulamalarında ise iki çeşitte aynı genin ifadesinde azalmalar tespit edildi. Bilindiği gibi ağır metaller tarafından uyarılan glutasyon sentez genlerinin transkriptleri çok belirgin şekilde uyarılmaktadırlar (Xiang ve Oliver., 1998; Sung vd., 2009). Birçok bitki türünde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> artışının glutasyon birikimini tetiklediği bilinmektedir (Smith vd., 1984; May ve Leaver, 1993; Willekens vd., 1997; Queval vd., 2009). Bununla birlikte *Arabidopsis* bitkisi ile yapılan çalışmalarda dıştan uygulanan ve içsel üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin glutasyon sentezinden sorumlu olan *GSHSY-1* ve *GSHSY-2* genlerinin ifadelerinde herhangi bir artışa sebep olmadığı rapor edilmiştir (Xiang ve Oliver, 1998; Sanchez-Fernandez vd., 1998; Queval vd., 2009).

Çalışmamızda yukarıda belirtilen SA, GSH ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamalarının fotosentez üzerinde oluşturdukları olumlu etkinin hem antioksidan hem de osmotik düzenleyici role sahip prolin ve poliaminler tarafından gerçekleştirilip gerçekleştirilmediğini belirlemek amacı ile prolin ve poliamin içerikleri belirlenmiştir. Prolin içeriğinin her iki mısır çeşidinde bakır stresinin etkisiyle belirgin bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. İlave olarak GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya SA uygulamalarının da kontrole göre prolin içeriğini önemli miktarda artırdığı saptanmıştır. Ayrıca bakır stresi varlığında her iki mısır çeşidinde de GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya SA uygulamalarının kontrole göre (bakır uygulaması) prolin içeriğini önemli miktarda artırdığı belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlarımızı destekler nitelikte yapılan çalışmalarda kadmiyum stresine maruz bırakılan mısır bitkilerinde stres etkisiyle prolin içeriğinin arttığı rapor edilmiştir (Boussama

vd., 1999). Ayrıca osmotik strese maruz kalan Duaçiçeği (*Ctenanthe setosa*) bitkilerine SA uygulamasının prolin içeriğini artırdığı ileri sürülmüştür (Demiralay vd., 2013). Yine çalışmamıza benzer olarak Thounaojam vd., (2012), bakır stresinin çeşitli konsantrasyonlarına maruz bırakılan çeltik bitkilerinde prolin içeriğinin bakır konsantrasyonunun artışına paralel olarak arttığını rapor etmişlerdir. Bu durum, GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya SA uygulamalarının bakır stresi altındaki mısır bitkilerinde prolini uyararak ROS'ların süpürülmesini sağladıkları söylenebilir. Buna ilaveten prolin birikimiyle stres koşullarında bir osmotik düzenleme de yapılmış olabilir. Nitekim prolin birikiminin, abiyotik streslerin olumsuz etkilerine karşı bitkilerde ozmotik ayarlamaya katkıda bulunduğu, membranların, proteinlerin ve enzimlerin kararlılığını sağladığı ve serbest radikalleri temizlediği kaydedilmiştir (Kadioğlu ve Terzi, 2007; Türkan ve Demiral, 2009).

Ağır metal stresleri sırasında biriktirilen diğer bir osmotik düzenleyici poliaminler, SA, GSH ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> muamelelerini takiben mısır bitkilerinde ölçülmüştür. Çalışmamızda Akpınar çeşidinde putresin içeriğinin, GSH'ın stressiz uygulaması dışında kalan bütün uygulamalarda kontrole (saf su uygulaması) göre yükseldiği, GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya SA'nın stresli uygulamalarının ise kontrole (bakır uygulaması) göre arttığı, 31G98 çeşidinde ise bakır stresi uygulamasında putresin içeriğinin en fazla arttığı diğer uygulamalarda ise nispeten azaldığı gözlenmiştir. Spermidin içeriğinin her iki çeşitte de kontrole göre önemli miktarda arttığı belirlenmiştir. Spermin içeriğinin ise her iki çeşitte de uygulamalara bağlı olarak dalgalanmalar gösterdiği saptanmıştır. Genellikle bitkilerin kuraklık gibi abiyotik stres koşullarında poliamin biyosentezini artırma kapasitesine sahip oldukları kaydedilmiştir (Erdei vd., 1996). Çalışmamızda bakır stresi koşullarında vejetatif aşamada GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA ön muamelelerinin yaygın poliaminlerin içeriğini genel olarak artırdığı tespit edilmiştir. Benzer olarak, Abass ve Mohamed (2011) fasülye tohumlarına yapılan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> muamelesinin kuraklık koşullarında sürgünlerin poliamin içeriğini uyardığını ileri sürmüşlerdir. Çalışmamızda GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya SA uygulamalarının sonucu olarak, artan poliamin içeriğinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi ROS'ları temizleyerek membranları koruyabileceği ifade edilebilir. Nitekim poliaminlerin antioksidan veya ROS temizleyicisi olarak rol oynadığı, protein ve hücre yapısının kararlılığına katkıda bulunduğu ve böylece bitkilerin stres dayanıklılığını artırdığı bilinmektedir (Bartels ve Sunkar, 2005). Ayrıca çalışmamıza benzer olarak bakır ve kadmiyum stresine maruz kalan ayçiçeği ve buğday bitkileri kontrolleri ile karşılaştırıldığında buğdayda putresin miktarının arttığı,

ayçiçeğinde ise putresin, spermin ve spermidin miktarlarının azaldığı rapor edilmiştir (Groppa vd., 2003). Mevcut çalışmamızda GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının ardından bakır stresi altındaki bitkilerin içsel poliamin miktarlarını artırma eğiliminde olması, bitkilerin ozmotik düzenleyici ve/veya ROS temizleyicisi olarak poliaminleri tercih ettiğini göstermektedir.

İçsel SA'nın çeşitli stres koşullarında arttığı bilinmektedir (Scott vd., 1999). Diğer taraftan, tütün yapraklarında özellikle 6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonunun etkili bir şekilde SA birikimini artırdığı kaydedilmiştir (Leon vd., 1995). Benzer şekilde çalışmamızda her iki çeşitte de aşırı bakırın içsel SA seviyesini artırdığı bulunmuştur. Bakır stresi koşullarında uygulanan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin ise içsel SA seviyesini her iki mısır çeşidinde azalttığı gözlenmiştir. Bu azalmalar, muhtemelen daha önce ifade edildiği gibi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasının, antioksidan sistemi uyararak bakır stresine tolerans sağladığı, böylece SA seviyesinin artışına gerek duyulmadığı şeklinde açıklanabilir.

Hücre içi moleküler atmosferde ROS'ların konsantrasyonunu transkripsiyonel ve aktivite artışındaki düzenlemelerle kontrol altında tutan en önemli merkezlerden biri de hücre zarında integral bir enzim kompleksi olduğu bilinen NADPH oksidaz (NOX)'dır. Moleküler oksijene redoks tepkimesiyle elektron eklenmesi sonucu oluşan süperoksit molekülü zincirleme tepkimelerle çeşitli ROS'lara dönüşebilmektedir (Vionella ve Macri, 1991). Mevcut çalışmada bakır stresi altındaki her iki mısır çeşidinde NOX aktivitesinin istatistiki olarak önemli oranda arttığı ve bu sonucun içsel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonuyla uyumlu olduğu belirlendi. Her iki çeşitte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH veya SA uygulamalarının NOX aktivitesi üzerine etkilerinde farklılıklar gözlemlendi. Akpınar çeşidinde stres altındaki SA uygulamasında ciddi aktivite artışı gözlenirken, 31G98 çeşidinde stres altındaki GSH uygulamasında diğer uygulamalara göre önemli bir aktivite artışı saptandı. Duaçiçeği ile yapılmış bir çalışmada kuraklık stresine maruz bırakılan bitkilerde SA uygulamasının NOX aktivitesini önemli oranda artırdığı rapor edilmiştir (Demiralay vd., 2013). Ayrıca Türkan vd., (2013), aşırı su ve tuzluluk kombine stresine maruz bıraktıkları kazdili bitkisinin (*Plantago spp.*) iki türünün, strese rağmen NOX aktivitesinde istatistiki olarak bir fark olmadığını ifade etmişlerdir. Lubaina vd., (2013), zamana bağlı olarak kuraklık stresine maruz bıraktıkları karayosununda NOX aktivitesinin stres boyunca kademeli olarak arttığını rapor etmişlerdir. Bunların dışında kuraklığında dahil olduğu birçok stres koşulları altında NOX aktivitesinin uyarıldığı kaydedilmiştir (Duan vd., 2009).

Bakır stresi altındaki mısır bitkilerinde  $H_2O_2$ , GSH veya SA uygulamalarının absisik aldehit oksidaz (*AAOX*), glutasyon sentetaz-2 (*GSHSY-2*) ve NADPH oksidaz (*NOX*) genleri üzerindeki etkileri belirlenerek, bu genlerin ifadesi sonucu oluşan ürünlerinin birlikte değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Absisik aldehit oksidaz (*AAOX*), ABA sentezini son aşamada katalileyen bir enzimdir. Bu nedenle bu gen aktivitesinin yanısıra ABA içeriği de ölçülmüştür. Yapılan analizlerde bakır stresine maruz kalan her iki mısır çeşidinde de içsel ABA içeriğinin istatistiki olarak önemli oranda arttığı belirlendi. Stres altındaki  $H_2O_2$ , GSH veya SA uygulamalarında ise içsel ABA artışının azaldığı görüldü. Benzer olarak Zengin ve Kırbağ (2007) bakır stresi altındaki ayçiçeği fidelerinde ABA içeriğinin arttığını ifade etmişlerdir. Ayrıca bakır stresi uygulanan buğday tohumlarında içsel ABA içeriğinin önemli oranda arttığı gösterilmiştir (Munzuroğlu vd., 2008). İlave olarak bakır stresine maruz kalan tütün fidelerinin yapraklarında ABA içeriğindeki artışın metal alınımını azalttığını rapor etmişlerdir (Ku vd., 2012). Bakır stresi altında her iki çeşitte artan ABA içeriği ile *AAOX* gen ifadesi arasındaki paralel artışların ve GSH,  $H_2O_2$  veya SA uygulamalarından elde edilen sonuçlarla uyum içinde olması bakır stresi, *AAOX* gen ifadesi, ABA içeriği ve uygulamalar arasında güçlü bir etkileşimin olduğunu göstermektedir.

NADPH oksidaz aktivitesi sonrasında üretilen ROS'ların ABA ile etkileşime girerek antioksidan sistemi etkinleştirdiği bilinmektedir (Jiang ve Zhang, 2002). Mevcut çalışmadan elde edilen veriler ışığında bakır stresi altındaki GSH,  $H_2O_2$  veya SA uygulamalarının antioksidan sistemi uyararak fidelerin genel durumunu iyileştirmek suretiyle *AAOX* gen ifadesini etkilediği ve içsel ABA içeriğini azalttığı söylenebilir. Çalışmamızda bakır stresi altındaki her iki mısır çeşidinde de *AAOX* gen ifadesinin istatistiki olarak önemli oranda arttığı (up-regülasyon) ve her iki çeşitte de gen ifadesindeki artışa paralel olarak içsel ABA konsantrasyonunun arttığı görüldü. Ayrıca stres altındaki her iki mısır çeşidinde  $H_2O_2$ , GSH veya SA uygulamalarında da kontrole göre *AAOX* gen ifadesinin artışını azalttığı belirlendi. Çalışmamızdaki verileri destekler nitelikte bakır stresine maruz bırakılan çeltik fidelerinin yapraklarında yapılan mikro-array çalışmasında 305 genden 159 genin ifadesi azalırken (Down-regülasyon), 146 genin ifadesinin arttığı ve ABA sentezinden sorumlu genin ifadesinin yaklaşık iki kat arttığı rapor edilmiştir (Sudo vd., 2008).

NADPH oksidaz (*NOX*) aktivitesi ile üretilen  $H_2O_2$ 'nin stres koşullarında antioksidan sistemi teşvik ettiği çeşitli çalışmalarla bildirilmiştir (Rejeb vd., 2015). Örneğin Wang vd.,

(2013), çeltik fidelerindeki *NOX* geninin aktivitesi üzerine yapmış oldukları moleküler bir çalışmada 11 farklı *NOX* geninden dokuzunun tipik *NOX*, ikisinin de arkeik *NOX* olduğu ve kuraklık stresi altındaki çeltik fidelerinde beş gen ifadesinin arttığı (*NOX 1, 2, 9* ve *OsFRO-1* ve *7*) bir gen ifadesinin azaldığı (*NOX-6*), yüksek sıcaklık stresi altında iki gen ifadesinin arttığı (*NOX-5* ve *9*) ikisinin de gen ifadesinin azaldığı (*NOX-1* ve *3*), tuz stresi altında dört gen ifadesinin arttığı (*NOX-2* ve *8* ile *OsFRO-1* ve *7*) dördünde gen ifadesinin azaldığını (*NOX-1, 3, 5* ve *6*) rapor etmişlerdir. Mevcut çalışmamızda bakır stresine maruz kalan her iki mısır çeşidinde de *NOX* geninin ifadesinin kontrole göre önemli oranda arttığı belirlendi.  $H_2O_2$ , GSH veya SA uygulamalarında ise *NOX* geninin ifadesi mısır çeşitlerinde oldukça farklı yanıtlar elde edildi. Hassas çeşitte *NOX* gen ifadesi kontrole göre önemli oranda azaldı. Bununla birlikte dirençli çeşitte ise gen ifadesi arttı. Bilindiği üzere hidrojen peroksit ve süperoksitler, enzimatik olarak NADPH oksidaz tarafından indirgenmesi sonucunda oluşurlar (Torres vd., 2005). Çalışmamızda  $H_2O_2$  içeriği ele alındığında  $H_2O_2$ , GSH veya SA uygulamaları sonucunda içsel  $H_2O_2$  miktarı her iki çeşitte de azalmıştır. Akpınar'daki bu azalış *NOX* gen ifadesi ile uyum içindedir. Bununla birlikte 31G98 çeşidinde *NOX* gen ifadesi artmıştır. 31G98 çeşidinde içsel  $H_2O_2$  miktarındaki azalmanın nedeni antioksidan sistemin uyarılması olabilir.

Sonuç olarak bakır stresine maruz bırakılan mısır fidelerinde  $H_2O_2$ , GSH veya SA uygulamalarının antioksidan sistemi ve bazı osmotik düzenleme mekanizmalarını uyararak stresin olumsuz etkilerini azalttığı sonucuna varılmıştır. Elde ettiğimiz verilere göre bu uygulamaların antioksidan sistemi ve osmotik mekanizmayı düzenleyerek fotosentetik verimin devamlılığını sağladığı söylenebilir. Ayrıca çalışmamızda dıştan  $H_2O_2$ , GSH veya SA uygulamasının bakıra dayanıklı ve hassas mısır çeşitlerinde, incelenen parametreler açısından konsantrasyon bağımlı olarak farklı şekilde etkileyebileceği belirlenmiştir.

## 5. SONUÇLAR

1. Bakır stresi koşullarında yaprak su potansiyelinin olumsuz etkilendiği, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH ve SA uygulamalarının hem Akpınar hem de 31G98 çeşidinde yaprak su potansiyelini iyileştirdiği ve iki mısır çeşidini kendi içinde karşılaştırdığımızda ise 31G98 çeşidinde yaprak su potansiyelinin bakır stresinden daha fazla etkilendiği gözlemlendi.

2. Aşırı bakır koşullarında fotosentetik pigment içeriğinin her iki mısır çeşidinde azaldığı, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH veya SA uygulamalarının ise bakırın pigment içeriği üzerine olumsuz etkilerini hafiflettiği belirlendi.

3. Bakır stresi koşullarında her iki mısır çeşidinde de lipid peroksidasyonunun arttığı ve dıştan uygulanan düşük konsantrasyondaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH veya SA'nın aşırı bakır koşullarında lipid peroksidasyonunu iyileştirdiği sonucuna varıldı.

4. Prolin içeriğinin bakır stresinin etkisiyle Akpınar ve 31G98'de saf su uygulamasına göre önemli ölçüde arttığı belirlendi. Her iki çeşitte bakır stresli GSH ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamalarında prolin içeriği kontrole göre (bakır uygulaması) önemli miktarda artarken, SA uygulamasında önemli bir farkın olmadığı sonucuna ulaşıldı.

5. Akpınar çeşidinde putresin içeriğinin, GSH'ın stressiz uygulaması dışında kalan bütün uygulamalarda kontrole göre arttığı, GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya SA'nın stresli uygulamalarının ise kontrole göre arttığı, 31G98 çeşidinde ise bakır stresi uygulamasında putresin içeriğinin en fazla arttığı diğer uygulamalarda nispeten azaldığı gözlemlendi. Spermidin içeriğinin her iki çeşitte de kontrole göre önemli miktarda arttığı belirlendi. Spermidin içeriğinin ise her iki çeşitte de uygulamalara bağlı olarak dalgalanmalar gösterdiği sonucuna varıldı.

6. Bakır stresi koşullarında GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya SA uygulamalarının içsel bakır seviyesini azalttığı görüldü. Bakır stresine maruz kalan 31G98 fidelerinin Akpınar'a göre çok daha fazla bakır biriktirdiği görüldü. Akpınar çeşidinde GSH+Cu uygulanan fideler Cu uygulanan fidelerle kıyaslandığında, bakır içeriğinin daha fazla arttığı belirlendi.

7. Her iki mısır çeşidinde bakır stresi koşullarında içsel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğinin arttığı, dıştan GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya SA uygulamalarının ise bu artışı hafiflettiği kaydedildi.



**8.** Her iki mısır çeşidinde bakır stresi koşullarında içsel GSH içeriğinin arttığı, stres koşullarında GSH uygulamasının ise içsel GSH seviyesindeki artışı hafiflettiği belirlendi. Dıştan stressiz koşullarda uygulanan GSH'ın da kontrole göre GSH içeriğini artırdığı tespit edildi. Diğer taraftan, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasının Akpınar'da stressiz ve stresli koşullarda GSH içeriğini artırdığı, aksine 31G98'de ise stressiz ve stressli koşullarda GSH içeriğini azalttığı görüldü.

**9.** Her iki çeşitte de aşırı bakırın içsel SA seviyesini artırdığı bulundu. Stressiz koşullarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan fidelerde özellikle Akpınar'da içsel SA içeriğinin arttığı görüldü. Bakır stresi koşullarında uygulanan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin ise içsel SA seviyesini her iki mısır çeşidinde azalttığı gözlemlendi.

**10.** Bakır stresi biyomas artışında önemli azalışlara neden olmakla birlikte, GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya SA ön muameleleri kontrole göre biyomas artışında önemli iyileştirmelere neden olduğu belirlendi.

**11.** Akpınar çeşidinde Transpirasyon oranının (E) aşırı bakır koşullarında önemli miktarda azaldığı, 31G98 çeşidinde ise istatistiki olarak önemli bir fark olmadığı görülmüştür. Akpınar çeşidinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH ve SA uygulamalarının transpirasyon oranını strese göre önemli seviyede iyileştirdiği belirlendi.

**12.** Bakır stresinin fotosentez hızını (Pn) ve içsel CO<sub>2</sub> içeriğini her iki mısır çeşidinde belirgin bir şekilde düşürdüğü, dıştan GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya SA uygulamalarının ise bu düşüşü hafiflettiği sonucuna varıldı.

**13.** Bakır stresi altında mısır bitkisinin her iki çeşidinde de PSII'nin maksimum fotokimyasal etkinliğinin (Fv/Fm), fotokimyasal verimin ( $\Phi_{PS2}$ ) ve elektron taşınım oranının (ETR) azaldığı, fotokimyasal olmayan flüoresans (NPQ) kullanımında ise artışa neden olduğu belirlenmiştir. Bakır stresine maruz kalan GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya SA uygulamalarının ise kontrole göre istatistiki olarak önemli iyileştirmeler sağladığı gözlemlendi.

**14.** Aşırı bakır stresine maruz kalan Akpınar çeşidinde rubisco aktivitesi kontrole göre azalırken, 31G98 çeşidinde rubisco aktivitesinin arttığı belirlendi. Bununla birlikte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH veya SA uygulamalarının bakır stresi altında her iki çeşitte de iyileştirme sağladığı sonucuna varıldı.

**15.** Her iki mısır çeşidinde bakır stresi esnasında rubisco konsantrasyonunun azaldığı, dıştan uygulamaların ise her iki mısır çeşidini farklı şekilde etkilediği belirlendi.

**16.** GPX aktivitesinin bakır stresinin etkisiyle Akpınar ve 31G98'de kontrole göre önemli ölçüde arttığı belirlendi. Buna karşın bakır stresi koşullarında yapılan GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamalarının her iki çeşitte de GPX enzim aktivitesini kontrole göre (bakır uygulaması) arttırdığı sonucuna varıldı.

**17.** CAT aktivitesinin bakır stresi koşullarında her iki çeşitte de kontrole göre önemli ölçüde arttığı belirlendi. Akpınar'da bakır stresi koşullarında GSH ve SA uygulamalarının CAT aktivitesini bakır uygulamasına göre arttırmasına rağmen, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasının azalttığı gözlemlendi. 31G98'de ise GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SA uygulamaları sonucunda CAT aktivitesinin kontrole göre önemli oranda arttığı gözlemlendi.

**18.** SOD aktivitesinin bakır stresinin etkisiyle her iki çeşitte de kontrole göre önemli ölçüde arttığı belirlendi. Bakır stresi koşullarında her iki mısır çeşidindeki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH ve SA uygulamalarının bitkilerdeki SOD aktivitesinde kontrole göre (bakır uygulaması) önemli bir artışa neden olduğu belirlendi.

**19.** APX aktivitesinin bakır stresinin etkisiyle Akpınar ve 31G98'de su uygulamasına göre önemli ölçüde arttığı belirlendi. Bakır stresi koşullarında, her iki mısır çeşidinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH ve SA uygulamalarının APX enzim aktivitesini bakır uygulamasına göre önemli oranda arttırdığı kaydedildi.

**20.** GR enzim aktivitesinin bakır stresinin etkisiyle Akpınar ve 31G98'de kontrollerine göre önemli ölçüde arttığı belirlendi. Bakır stresi koşullarında her iki mısır çeşidinde de SA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve GSH uygulamalarında kontrole göre (bakır uygulaması) GR enzim aktivitesinde önemli bir artış belirlendi.

**21.** Bakır stresi altındaki her iki mısır çeşidinde NOX aktivitesinin istatistiki olarak önemli oranda arttığı belirlendi. Her iki çeşitte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH veya SA uygulamalarının NOX aktivitesi üzerine etkilerinde farklılıklar gözlemlendi. Akpınar çeşidinde stres altındaki SA uygulamasında ciddi aktivite artışı gözlenirken, 31G98 çeşidinde stres altındaki GSH uygulamasında diğer uygulamalara göre önemli bir aktivite artışı kaydedildi.

**22.** Bakır stresi altındaki her iki mısır çeşidinde de AAOX gen ifadesinin istatistiki olarak önemli oranda arttığı (up-regülasyon) ve her iki çeşitte de içsel ABA konsantrasyonu ile uyumlu olduğu görüldü. Stres altındaki her iki mısır çeşidinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH veya SA uygulamalarında da AAOX gen ifadesinin artışını hafiflettiği belirlendi. Bununla birlikte

stressiz bitkilerdeki  $H_2O_2$ , GSH veya SA uygulamalarının, *AAOX* gen ifadesini önemli oranda artırması dikkate değer bir veri olarak tespit edildi.

**23.** Bakır stresi altındaki her iki mısır çeşidinde de *GSHSY-2* genin ifadesinin önemli oranda arttığı (up-regülasyon) belirlendi.  $H_2O_2$ , GSH veya SA uygulamalarında iki çeşitte farklı sonuçlar elde edildi.

**24.** Bakır stresine maruz kalan her iki mısır çeşidinde de *NOX* geninin ifadesinin kontrole göre önemli oranda arttığı belirlendi.  $H_2O_2$ , GSH veya SA uygulamalarında ise *NOX* geninin ifadesi mısır çeşitlerinde oldukça farklı yanıtlar kaydedildi.

**25.** Bakır stresine maruz kalan mısır bitkisinin her iki çeşidinde de içsel ABA içeriğinin istatistiki olarak önemli oranda arttığı belirlendi. Stres altındaki  $H_2O_2$ , GSH veya SA uygulamalarında ise içsel ABA artışının hafiflediği görüldü. Stres altında olmayan her iki mısır çeşidinde  $H_2O_2$ , GSH veya SA uygulamalarında da içsel ABA içeriğinin kontrole göre artış eğiliminde olduğu belirlendi.

## 6. ÖNERİLER

Dünya nüfusunun artışına paralel olarak oluşan sağlıklı besin ihtiyacının karşılanması insanoğlunun günümüzde ve gelecekte üstesinden gelmesi gereken en önemli problemlerden birisi olarak güncelliğini korumaktadır. İnsanoğlunun çeşitli faaliyetleri sonucu atmosfer, hava, su ve toprakta oluşan kirliliğin ekilebilir alanların gittikçe azalmasına neden olduğu bilinmektedir. Mısır, içerdiği zengin besin maddelerinden dolayı hem insan hem de hayvan beslenmesinde kullanılan ve çok geniş alanlarda tarımı yapılan önemli bir bitki ile madencilik ve endüstriyel faaliyetler sonucu birçok bölgede toprak kirliliğinin nedenlerinden olan ağır metallerden bakırın aşırı konsantrasyonu ile etkileşimi sonucu oluşan cevapların anlaşılması önemlidir. Bununla birlikte bitkilerin metabolizmasında önemli fonksiyonları olduğu bilinen  $H_2O_2$ , GSH veya SA'nın belirli konsantrasyonlarda dıştan muamelesinin bakır stresinin olumsuz etkilerini iyileştirdiği mevcut çalışma ile belirlendi. Bakır eser miktarda bitkiler için önemli bir metal olmasından dolayı bitkiler geliştirdikleri savunma, sakınma ve tolerans mekanizmaları ile bir dereceye kadar bakır toksisitesi koşullarında yaşamlarını sürdürebilirler. Her bitki metabolizmasında  $H_2O_2$ , GSH veya SA konsantrasyonlarının farklılığından dolayı  $H_2O_2$ , GSH veya SA muamelesinin iyileştirici konsantrasyonları belirlendikten sonra zirai amaçlar için kullanımı önerilmektedir. Günümüzde biyoteknolojik yaklaşımlarla stres toleransında yer alan genlerin özellikle tarımsal değeri olan başka bitkilere aktarımına olanaklar imkân vermektedir. Bu amaçla içsel  $H_2O_2$ , GSH veya SA konsantrasyonlarının artırılmasını sağlayacak moleküler veya genetik düzenlemelerle stres toleransının artırılması önerilmektedir.

Mevcut çalışma ile bakır stresi altındaki mısır fidelerinde aşırı bakır birikimi gözlemlendiği için  $H_2O_2$ , GSH veya SA muamelesi sonucu oluşan yanıtların birçoğu aydınlatılmış olmasına rağmen, mekanizmaların altında yatan sebepleri daha iyi anlamak için kök ve sürgünlerde bakır taşınımını sağlayan kanal proteinlerin microarray ve transkriptomik analizleri önerilebilir. Ayrıca ağır metal stresine maruz kalan bitkilerin ağır metali vakoullerde zararsız hale getirmeye çalıştıkları bilinmesine rağmen, Vakouller üzerinde bakırın içeri alınmasını sağlayan kanal proteinlerin gen ifade seviyesinin çalışılması önerilmektedir.

Çalışmamızda kullanılan 31G98 çeşidinin yüksek miktarda bakır biriktirme potansiyelinden dolayı alınan bakırın meyveye taşınıp taşınmadığının araştırılması, eğer yüksek miktarda taşınıp biriktiriliyorsa tarımının yapılmasının insan sağlığı açısından engellenmesi tavsiye edilmektedir.

Bakırın sitoplazma ve vakuolde depolanmasını sağlayan fitoşelatin sentaz enziminin aktivitesine ve gen ifade seviyesine bakılması önerilmektedir.

Biyogiderim çalışmalarında topraktaki ağır metalin daha fazla emilerek bitki bünyesinde depolanmasını sağlamak için GSH uygulamasının yapılması tavsiye edilmektedir.

Mevcut çalışmanın sonucu olarak, bakır stresi altında mısırın her iki çeşidi üzerinde belirlenen konsantrasyonlarda ki  $H_2O_2$ , GSH veya SA uygulamasının incelenen parametreler açısından iyileştirici etkisi olduğu söylenebilir.

## 7. KAYNAKLAR

- Abass, M.S. ve Mohamed, H.I., 2011. Alleviation of Adverse Effects of Drought Stress on Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by Exogenous Application of Hydrogen Peroxide, *Bangladesh Journal of Botany*, 40, 75–83.
- Aebi, H.E., 1983. Catalase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer, H.U., Ed., Verlag Chemie, Weinheim, 273-286.
- Agarwal, P.K., Agarwal, P., Sudhir, M.K.R. ve Sopory, K., 2006. Role of DREB Transcription Factors in Abiotic and Biotic Stress Tolerance in Plants, *Plant Cell Reports*, 25, 1263-1274.
- Ahmad, M.S.A., Hursain, M., Ijaz, S. ve Alvi, A.K., 2008. Photosynthetic Performance of Two Mung Bean (*Vigna radiata* L.) Cultivars under Lead and Copper Stress, *International Journal of Agriculture and Biology*, 10, 167-172.
- Ahsan, N., Lee, D.G., Lee, S.H., Kang, K.Y., Lee, J.J., Kim, P.J., Yoon, J.S. ve Lee, B.H., 2007. Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds, *Chemosphere*, 67, 1182-1193.
- Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., P. Carrasco. ve Tiburcio, A.F., 2010. Polyamines: Molecules with Regulatory Functions in Plant Abiotic Stress Tolerance, *Planta*, 231, 1237-1249.
- Al-Hakimi, A.B.M. ve Hamada, A.M., 2011. Ascorbic Acid, Thiamine or Salicylic Acid Induced Changes in Some Physiological Parameters in Wheat Grown under Copper Stress, *Plant Protection Science*, 47, 92-108.
- Allen, J.F., 2002. Plastoquinone Redox Control of Chloroplast Thylakoid Protein Phosphorylation and Distribution of Excitation Energy between Photosystems: Discovery, Background, Implications, *Photosynthesis Research*, 73, 139-48.
- Alloway, B.J. ve Ayres, D.C., 1993. *Chemical Principles of Environmental Pollution*, Chapman & Hall, U.K., Pp: 291.
- An, Z., Jing, W., Lui, Y. ve Zhang, W., 2008. Hydrogen Peroxide Generated by Copper Amine Oxidase is involved in abscisic acid-Induced Stomatal Closure in *Vicia faba*, *Journal of Experimental Botany*, 59, 815-825.
- Andrade, S.A.L., Gratao, P.L., Azevedo, R.A., Silveira, A.P.D., Schiavinato, M.A., Mazzafera, P., 2010. Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations. *Environmental and Experimental Botany*, 68, 198-207.

- Aono, M., Saji, H., Fujiyama, S. ve Sugita, M., 1995. Decrease in Activity of Glutathione Reductase Enhances Paraquat Sensitivity in Transgenic *Nicotiana tabacum*, Plant Physiology, 107, 645-648.
- Arduini, I., Godbold, D.L. ve Onnis, A., 1995. Influence of Copper on Root Growth and Morphology of *Pinus pinea* L. and *Pinus pinaster* Ait. Seedlings, Tree Physiology, 15, 411-415.
- Arnon, D.I., 1949. Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, Plant Physiology, 24, 1-15.
- Asada, K., 1992. Ascorbate Peroxidase-Hydrogen Peroxide Scavenging Enzyme in Plants, Physiologia Plantarum, 85, 235-241.
- Asada, K., 1994. Production and Action of Active Oxygen Species in Photosynthetic Tissues, In: Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants, Foyer, C.H., Mullineaux, P.M., Ed., CRC Press, Boca Raton, 77-104.
- Ashraf, M. ve Foolad, M.R. 2007. Roles of Glycine Betaine and Proline in Improving Plant Abiotic Stress Resistance, Environmental and Experimental Botany, 59, 206-216.
- Aust, S.D., Marehouse, C.E. ve Thomas, C.E., 1985. Role of metals in oxygen radical reactions, Journal of Free Radical and Biological Medicine, 1, 1-3.
- Azevedo, M.M., Carvalho, A., Pascoal, C., Rorigues, F. ve Cassio, F., 2007. Responses of antioxidant defenses to Cu and Zn stress in two aquatic fungi, Science of the Total Environment, 377, 233-243.
- Babior, B.M., Kipnes, R.S. ve Curnutte, J.T., 1973. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent, The Journal of Clinical Investigation, 52, 741-744.
- Baczek-Kwinta, R., Adamska, A., Seidler-Lozykowska, K. ve Tokarz, K., 2010. Does The Rate of German Chamomile Growth and Development Influence The Response of Plants to Soil Drought?, Biologia, 65, 837-842.
- Bartels, D. ve Sunkar, R., 2005. Drought and Salt Tolerance in Plants, Critical Reviews in Plant Sciences, 24, 23-58.
- Bates, L.S., Waldren, R.P. ve Teare, I.D., 1973. Rapid Determination of Free Proline for Water Stress Studies, Plant Soil., 39, 205-207.
- Beauchamp, C. ve Fridovich, I., 1971. Superoxide Dismutase: Improved Assays and An Assay Applicable to Acrylamide Gels, Analytical Biochemistry, 44, 276-287.

- Bedard K. ve Krause, K-H., 2007. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology, Physiological Reviews, 87, 245–313.
- Belkadhi, A., Hediji, H., Abbes, J., Djebali, W. ve Chaibi, W., 2012. Influence of Salicylic Acid Pre-treatment of Cadmium Tolerance and Its Relationship with Non-Protein Thiol production in Flax Root, African Journal of Biotechnology, 11, 9788-9796.
- Bergmann, W., 1992. Nutritional Disorders of Plants: Development, Visual and Analytical Diagnosis, Gustav Fischer Verlag, New York, 695.
- Bergmeyer, J. ve Grabl, M., 1983. Methods of Enzymatic Analysis, Third Edition, Germany, 190-302.
- Bernstein, N., Silk, W.K. ve Lauchli, A., 1995. Growth and Development of Sorghum Leaves under Conditions of NaCl Stress: Possible Role of Some Mineral Elements in Growth Inhibition, Planta, 196, 699-705.
- Bidwell, R.G.S., 1974. Plant Physiology, Macmillan Publishing Com. Inc., New York, Pp: 643.
- 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*, Photosynthesis Research, 25, 173-185.
- Boussama, N., Ouariti, O., Suzuki, A. ve Ghorbal, M. H., 1999. Cd stress on nitrogen assimilation, Journal of Plant Physiology, 155, 310–317.
- Bowen, H.J.M., 1985. The Natural Environment and The Biogeochemical Cycles, in: The Handbook of Environmental Chemistry, ed: Hutzinger D., Springer-Verlag, New York, 1-26.
- Bowler, C., Van Maontague, M. ve Inze, D., 1992. Superoxide Dismutase and Stress Tolerance, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology., 43, 83-116.
- Brahim, L. ve Mohamed, M., 2011. Effects of copper stress on antioxidative enzymes, chlorophyll and protein content in *Atriplex halimus*, African Journal of Biotechnology, 50, 10143-10148.
- Brooks, A., Collins, C.J. ve Thurman, D.A., 1981. The Mechanism of Zinc Tolerance in Grasses, Journal of Plant Nutrition, 3, 695-705.
- Cai, Y, Lin, L., Cheng, W., Zhang, G. ve Wu, F., 2010. Genotypic Dependent Effect of Exogenous Glutathione on Cd-Induced Changes in Cadmium and Mineral Uptake and Accumulation in Rice Seedlings (*Oryza sativa*), Plant Soil Environment, 56, 516-525.



- Cai, Y., Cao, F., Cheng, W., Zhang, G. ve Wu, F., 2011. Modulation of Exogenous Glutathione in Phytochelatins and Photosynthetic Performance against Cd Stress in The Two Rice Genotypes Differing in Cd Tolerance, Biological Trace Element Research, 143, 1159-1173.
- Cao, F., Liu, L., Ibrahim, W., Cai, Y. ve Wu, F., 2013. Alleviating Effects of Exogenous Glutathione, Glycinebetaine, Brassinosteroids and Salicylic Acid on Cadmium Toxicity in Rice Seedlings (*Oryza sativa*), Agrotechnology, 2, 107.doi: 10.4172/2168-9881.1000107.
- Castillo, FJ., 1996. Antioxidative Protection in The Inducible Cam Plant *Sedum album* L. Following The Imposition of Severe Water Stress and Recovery, Oecologia, 107, 469-477.
- Chamseddine, M., Wided, B.A., Guy, H., Marie-Edith, C. ve Fatma, J., 2009. Cadmium and copper induction of oxidative stress and antioxidative response in tomato (*Solanum lycopersicon*) leaves, Plant Growth Regulation, 57,89-99.
- Chatterjee, J. ve Chatterjee, C., 2000. Phytotoxicity of Cobalt, Chromium and Copper in Cauliflower, Environmental Pollution, 109, 69-74.
- Chaudiere, J. ve Ferrari-Iliou, R., 1999. Intracellular Antioxidants from Chemical to Biochemical Mechanisms, Food and Chemical Toxicology., 37, 949-962.
- Chaves, M.M., 1991. Effects of Water Deficits on Carbon Assimilation, Journal of Experimental Botany, 42, 1-16.
- Chaves, M.M. ve Oliveira, M.M., 2004. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture, Journal of Experimental Botany, 407, 2365-2379.
- Chen, C.T., Chen, L., Lin, C.C. ve Kao, C.H., 2001. Regulation of Proline Accumulation in Detached Rice Leaves Exposed to Excess Copper, Plant Science, 160, 283-290.
- 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 Physiology, 30, 987-998.
- Chen, L.M., Lin, C.C. ve Kao, C.H., 2000. Copper toxicity in rice seedlings: changes in antioxidative enzyme activities, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level, and cell wall peroxidase activity in oats, Botanical Bulletin- Academia Sinica Taipei, 41, 99-103.

- Chen, J., Zhu, C., Li, L.P., Sun, Z.Y. ve Pan, X.B., 2007. Effect of Exogenous Salicylic Acid on Growth and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Metabolizing Enzymes in Rice Seedlings under Lead Stress, Journal of Environmental Sciences, 19, 44-49.
- Chen, F., Wang, F., Wu, F., Mao, W., Zhang, G. ve Zhou, M., 2010. Modulation of Exogenous Glutathione in Antioxidant Defense System against Cd Stress in The Two Barley Genotypes Differing in Cd Tolerance, Plant Physiology and Biochemistry, 48, 663-672.
- Chernys, J.T. ve Zeevaart, J.A.D., 2000. Characterization of the 9-Cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase Gene Family and the Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis in Avocado, Plant Physiology, 124, 343-354.
- Chiban, M., Soudani, A., Sinan, F., Tahrouch, S. ve Persin, M., 2011. Characterization and Application of Dried Plants to Remove Heavy Metals, Nitrate, and Phosphate Ions from Industrial Wastewaters, Clean – Soil, Air, Water, 39, 376–383.
- Chinnusamy, V., Jagendorf, A. ve Zhu, J.K., 2005. Understanding and Improving Salt Tolerance in Plants, Crop Sciences, 45, 437-448.
- Choi, J., Pak, C. ve Lee, C.W., 1996. Micronutrient Toxicity in French Marigold, Journal of Plant Nutrition, 19, 901-916.
- Clarkson, D.T. ve Luttge, U., 1989. Mineral Nutrition: Divalent Cations, Transport and Compartmentalization, Progress in Botany, 51, 93-112.
- 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., Ed., Mullineaux, P.M., CRC Press, Boca Raton, 343-364.
- Creissen, G., Broadbent, P., Stevens, R., Welburn, A.R. ve Mullineaux, P.M., 1996. Manipulation of Glutathione Metabolism in Transgenic Plants, Journal of Biochemistry, 24, 465-472.
- Cumming, J.R. ve Taylor, G.J., 1990. Mechanism of Metal Tolerances in Plants: Physiological Adaptation for Exclusion of Metal Ions from The Cytoplasm, in: Stres Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms, eds: Alscher R.G., Cumming J.R., Wiley-Liss, Inc., 329-359.
- Cuyppers, A., Koistinen, K.M., Kokko, H., Karenlampi, S., Auriola, S. ve Van Gronsveld, J., 2005. Analysis of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins affected by copper stress, Journal of Plant Physiology, 162, 383-392.
- Çakmak, I. ve Marschner, H., 1988. Enhanced superoxide radical production in roots of zinc deficient plants. Journal of Experimental Botany, 39, 1449-1460.

- Dalton, D.A., Harus, F.J., Russell, S.A. ve Evans, H.J., 1987. Purification, Protection ve Distribution of Ascorbate Peroxidase in Legumen Root Nodules, Plant Physiology., 83, 789-794.
- Daszkowska-Golec, A. ve Iwona Szarejko, I., 2013. The Molecular Basis of ABA-Mediated Plant Response to Drought, Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture, Dr. Kouros Vahdati (Ed.), ISBN: 978-953-51-1024-8, InTech, DOI: 10.5772/53128.
- Dat, J., Vandenbeebe, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D. ve Van Breusegm, F., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses, Cellular and Molecular Life Sciences, 57, 779-795.
- Delauney, A.J. ve Verma, D.P.S., 1993. Proline Biosynthesis and Osmoregulation in Plants, Plant Journal, 4, 215-23.
- Demiralay, M., Saglam, A. ve Kadioglu, A., 2013. Salicylic Acid Delays leaf Rolling by Inducing Antioxidant Enzymes and Modulating Osmoprotectant Content in *Ctenanthe setosa* under Osmotic Stress, Turkish Journal of Biology, 37, 49-59.
- Demirevska-Kepova, K., Simova-Stoilova, L., Stoyanova, Z., Hölzer, R. ve Feller, U., 2004. Biochemical Changes in Barley Plants after Excessive Supply of Copper and manganese, Environmental and Experimental Botany, 52, 253-266.
- Demming-Adams, B. ve Adams, W.W., 1992. Photoprotection and Other Responses of Plants to High Light Stress, Annual Review of Plant Biology, 43, 599-626.
- Dempsey, D.A., Vlot, A.C., Wildermuth, M.C. ve Klessig, D.F. 2011. Salicylic Acid Biosynthesis and Metabolism, The Arabidopsis Book, doi/full/10.1199/tab. 0156.
- Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P. ve Thorpe, T.A., 1981/82. Leaf Senescence Correlated with Increased Levels of Membrane Permeability and Lipid Peroxidation, and Decreased Levels of Superoxide Dismutase and Catalase, Journal of Experimental Botany, 32, 93-101.
- Doke, N., Miura, Y., Leandro, M. ve Kawakita, K., 1994. Involvement of Superoxide in Signal Transduction: Responses to Attack by Pathogens, Physical and Chemical Shocks, and UV Radiation, in: Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants, ed: Foyer C.H., Mullineaux P.M., CRC, Boca Raton, 177-197.
- Duan, Z.Q., Bai, L., Zhao, Z.G., Zhang, G.P., Cheng, F.M., Jiang, L.X. ve Chen, K.M., 2009. Drought-stimulated activity of plasma membrane nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and its catalytic properties in rice, Journal of Integrative Plant Biology, 51, 1104–1115.

- Earle, F.R., Curtis, J.J. ve Hubbard, J.E., 1946. Composition of The Component Parts of The Kernel, Cereal Chemistry, 23, 504-511.
- Edwards, E.A., Enard, C., Creissen, G.P. ve Mullineaux, P.M., 1994. Synthesis and Properties of Glutathione Reductase in Stressed Peas, Planta, 192, 137-143.
- Ekmekçi, Y., Tanyolaç, D. ve Aykan, B., 2008. Effect of Cadmium on Antioxidant Enzyme and Photosynthetic Activities in Leaves of Two Maize Cultivars, Journal of Plant Physiology, 165, 600-611.
- Elstner, E.F., 1987. Metabolism of Activated Oxygen Species, In: The Biochemistry of Plants, D.D. Davies, Ed., Academic Press, USA, 253-315.
- Elstner, E.F. ve Osswald, W., 1994. Mechanisms of Oxygen Activation During Plant Stress, P. Royal Soc. Edinburg, 103, 131-154.
- Elstner, E.F., Wagner, G.A. ve Schütz, W., 1988. Activated oxygen in green plants in relation to stress situation, Current topics in plant biochemistry and physiology, 7, 159–187.
- Erdei, L., Szegletes, Z., Barabas, K. ve Pestenacz, A. 1996. Responses in Polyamine Under Osmotic and Salt Stress in Sorghum and Maize Seedlings, Journal of Plant Physiology, 147, 599-603.
- Etehadnia, M., Waterer, D.R. ve Tanino, K.K., 2008. The Method of ABA Application Affects Salt Stress Responses in Resistant and Sensitive Potato Lines, Journal of Plant Growth Regulation, 27, 331–341.
- Ewais, E.A., 1997. Effects of Cadmium, Nickel and Lead on Growth, Chlorophyll Content and Proteins of Weeds, Biologia Plantarum, 39, 403-410.
- 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 Physiology, 100, 1554-1561.
- Ferreira, R.B., Franco, E. ve Teixeira, A.R., 1996. Covalent Dimerization of Ribulose Bisfosphate Carboxylase Subunits by UV Radiation, Biochemical Journal, 318, 227-34.
- Finkelstein, R., 2013. Abscisic Acid Synthesis and Response, The Arabidopsis Book, e0166. doi: 10.1199/tab.0166.
- Flores, H.E. ve Galston, A.W., 1982. Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography, Plant Physiology, 69, 701–706.

- Flower, D.J. ve Ludlow, M.M., 1986. Contribution of Osmotic Adjustment to The Dehydration Tolerance of Water Stressed Pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) Millsp. Leaves, Plant Cell Environment, 9, 33-40.
- Forstner, U. ve Wittmann, G.T.W., 1979. Metal Pollution in The Aquatic Environment. Springer-Verlag, Berlin, Pp: 386.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C. ve Jones, J.D. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth, Nature, 422, 442-446.
- 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.
- Foyer, C.H., Descouvieres, P. ve Kunert, K.J., 1994. Protection against Oxygen Radicals: An Important Mechanism Studied in Transgenic Plants, Plant Cell Environment, 17, 507-523.
- Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F. ve Scot, I.M., 1997. Hydrogen Peroxide and Glutathione Associated Mechanisms of Acclimatory Stress Tolerance and Signalling, Physiologia Plantarum, 100, 241-254.
- Frankart, C., Eullaffroy, P. ve Verner, G., 2002. Photosynthetic responses of *Lemna minor* exposed to xenobiotics, copper, and their combinations, Ecotoxicology and Environmental Safety, 53, 439-445.
- Fridovich, L., 1986. Biological Effect of Superoxide Radical, Archives of Biochemistry and Biophysics, 247, 1-11.
- Fridovich, I., 1995. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases, Annual Review of Biochemistry, 64, 97-112.
- Fu, J. ve Huang, B., 2001. Involvement of Antioxidants and Lipid Peroxidation in the Adaptation of Two Cool-Season Grasses to Localized Drought Stress, Environmental and Experimental Botany, 45, 105-114.
- Gajewska, E., Skłodowska, M., Słaba, M. ve Mazur, J., 2006. Effect of Nickel on Antioxidative Enzyme Activities, Proline and Chlorophyll Contents in Wheat Shoots, Biologia Plantarum, 50, 653-659.
- Galston, A.W. ve Sawhney, R.K., 1990. Polyamines in Plant Physiology, Plant Physiology, 94, 406-410.
- Gamble, P.E. ve Burke, J.J., 1984. Effect of Water Stress on the Chloroplast Antioxidant System, I. Alterations in Glutathione Reductase Activity, Plant Physiology, 76, 615-621.

- Gaspar, T., Penel, C., Hagege, D. ve Greppin, H., 1991. Peroxidases in Plant Growth Differentiation and Development Processes, Univ. M. Curie-Sklodowska, Lublin, Poland and Univ., Geneva, Switzerland.
- Gechev, S.T., Breusegem, F.B., Stone, J.M., Denev, I. ve Laloi, C., 2006. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death, BioEssays, 28, 1091–1101.
- Genty, B., Briantais, J.M. ve Baker, N.R., 1989. The Relationship between The Quantum Yield of Photosynthetic Electron Transport and Quenching of Chlorophyll Fluorescence, Biochimica Et Biophysica Acta, 990, 87-92.
- Gill, S.S. ve Tuteja, N., 2010. Polyamines and Abiotic Stress Tolerance in Plants, Plant Signaling & Behavior, 5, 26-33.
- Gondim, F.A., de Souza Miranda, R., Gomes-Filho, E. ve Prisco, J.T., 2013. Enhanced Salt Tolerance in Maize Plants Induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Leaf Spraying is Associated with Improved Gas Exchange Rather Than with Non-Enzymatic Antioxidant System, Experimental Plant Physiology, 25, 251-260.
- Griffith, O.W., 1980. Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide Using Glutathione Reductase and 2-Vinylpyridine, Analytical Biochemistry, 106, 207-12.
- Groppa, M.D., Tomaro, M.L. ve Benavides, M.P., 2001. Polyamines as Protectors Against Cadmium or Copper-Induced Oxidative Damage in Sunflower Leaf Discs, Plant Science, 161, 481-488.
- Groppa, M.D., Tomaro, M.L. ve Benavides, M.P., 2003. Polyamine metabolism in sunflower and wheat leaf discs under cadmium or copper stress, Plant Science, 164, 293-299.
- Gupta, K., Dey, A. ve Gupta, B., 2013. Plant Polyamines in Abiotic Stress responses, Acta Pyhsiologiae Plantarum, 35, 2015-2036.
- Guo, T.R., Zhang, G.P. ve Zhang, Y.H., 2007. Physiological changes in barley plants under combined toxicity of aluminum, copper and cadmium, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 57, 182-188.
- Güzel, S. ve Terzi, R., 2013. Exogenous Hydrogen Peroxide Increases Dry Matter Production, Mineral Content and Level of Osmotic Solutes in Young Maize Leaves and Alleviates Deleterious Effects of Copper Stress, Botanical Studies, 54, 1-10.
- Habashi, F., 1997. Handbook of Extractive Metallurgy, Wiley-VCH, Germany.

- Habiba, U., Ali, S., Farid, M., Shakoor, M.B., Rizwan, M., Ibrahim, M., Abbasi, G.H., Hayat, T. ve Ali, B., 2014. EDTA enhanced plant growth, antioxidant defense system, and phytoextraction of copper by *Brassica napus* L., Environmental Science and Pollution Research, doi: 10.1007/s11356-014-3431-5.
- Hale, M.G. ve Orcutt, D.M., 1987. *The Physiology of Under Stress*, John Wiley and Sons, New York.
- Halliwell, B., 1984. Toxic Effects of Oxygen 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.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free radicals in biology and medicine*: Oxford University Press, New York, 888.
- Hayat, S., Ahmad, A. ve Alyemeni, M.N., 2013. *Salicylic Acid: Plant Growth and Development*, Springer Dordrecht Heidelberg New York London pp:189. DOI 10.1007/978-94-007-6428-6, ISBN 978-94-007-6427-9.
- He, L., Gao, Z. ve Li, L., 2009. Pretreatment of Seed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Enhances Drought Tolerance of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Seedlings, African Journal of Biotechnology, 8, 6151-6157.
- Heath, R.L. ve Packer, L., 1968. Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts. I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation, Archives in Biochemistry and Biophysics, 125, 189-98.
- Hooper, J.K. ve Eggink, L.L., 1999. Assembly of Light-Harvesting Complex II and Biogenesis of Thylakoid Membranes in Chloroplasts, Photosynthesis Research, 61, 197-215.
- Hsu, Y. T., Kuo, M.C. ve Kao, C. H., 2006. Cadmium-induced ammonium ion accumulation of rice seedlings at high temperature is mediated through abscisic acid, Plant and Soil, 287, 267-277.
- Hu, Y., Ge, Y., Zhang, C., Ju, T. ve Wangda, C., 2009. Cadmium Toxicity and Translocation in Rice Seedlings are Reduced by Hydrogen Peroxide Pretreatment, Plant Growth Regulation, 59, 51-61.
- Hunter, R. ve Welkie, G.W., 1977. Growth of copper-treated corn roots as affected by EDTA, IAA, succinic acid-2,2-dimethyl hydrazide, vitamins and potassium, Environmental and Experimental Botany, 17, 19-26.

- 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 Ethylene Evolution, Physiologia Plantarum, 84, 67-72.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. ve Shinozaki, K., 2001. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis, The Plant Journal, 27, 325–333.
- Jamil, K., Madhavendra, S.S., Jamil, M. ve Rao, P.V.R., 1987. Studies on Water Hyacinth as A Biological Filtre for Treating Contaminants from Agricultural Waste and Industrial Effluents, Journal of Environmental Science and Health, 22, 103-112.
- Janda, T., Szalai, G., Tari, I. ve Paldi, E., 1999. Hydroponic Treatment with Salicylic Acid Decreases The Effects of Chilling Injury in Maize (*Zea mays* L.) plants, Planta, 208, 175-180.
- Ji, X., Dong, B., Shiran, B., Talbot, M.J., Edlington, J.E., Hughes, T., White, R.G., Gubler, F. ve Dolferus, R., 2011. Control of abscisic acid catabolism and abscisic acid homeostasis is important for reproductive stage stress tolerance in cereals, Plant Physiology, 156, 647-662.
- Jiang, M., ve Zhang, J., 2002. Involvement of plasma membrane NADPH oxidase in abscisic acid and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings, Planta, 215, 1022-1030.
- Jimenez-Bremont, J.F., Ruiz, O.A. ve Rodriguez-Kessler, M., 2007. Modulation of Spermidine and Spermine Levels in Maize Seedlings Subjected to Long-Term Salt Stress, Plant Physiology and Biochemistry, 45, 812–821.
- Johansson, L., Xydas, C., Messios, N., Stolts, E. ve Greger, M., 2005. Growth and Cu accumulation by plants grown on Cu containing mine tailing in Cyprus, Applied Geochemistry, 20, 101–107.
- Kadioğlu, A. ve Terzi, R., 2007. A dehydration avoidance mechanism: leaf rolling, The Newyork Botanical Garden, Botanical Review 73, 290-302.
- Kadioğlu, A., 2011. Bitki Fizyolojisi, ISBN: 978-605-4361-06-9, Beşinci baskı, Gündüz Ofset Matbaacılık, Trabzon.
- Kadioglu, A., Saruhan, N., Sağlam, A., Terzi, R. ve Acet, T., 2011. Exogenous salicylic acid alleviates effects of long term drought stress and delays leaf rolling by inducing antioxidant system, Plant Growth Regulation, 64, 27–37.



- Kadioğlu, A., Terzi, R., Saruhan, N. ve Sağlam, A., 2012. Current advances in the investigation of leaf rolling caused by biotic and abiotic stress factors, Plant Science, 182, 42–48.
- Kang, G.Z., Li, G.Z., Liu, G.Q., Xu, W., Peng, X.Q., Wang, C.Y., Zhu, Y.J. ve Guo, T.C., 2013. Exogenous Salicylic Acid Enhances Wheat Drought Tolerance by Influence on The Expression of Genes Related to Ascorbate-Glutathione Cycle, Biologia Plantarum, 57, 718-724.
- Ke, W., Xiong, Z.T., Chen, S. ve Chen, J., 2007. Effects of copper and mineral nutrition on growth, copper accumulation and mineral element uptake in two *Rumex japonicus* populations from a copper mine and an uncontaminated field sites, Environmental and Experimental Botany, (1), 59-67.
- Khan, W., Prithiviraj, B. ve Smith, D.L., 2003. Photosynthetic Responses of Corn and Soybean to Foliar Application of Salicylates, Journal of Plant Physiology, 50, 1-8.
- Kinnersely, A.M., 1993. The Role of Phytochelates in Plant Growth and Productivity, Plant Growth Regulation, 12, 207-217.
- Klebanoff, S.J., 1970. Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes, Science, 169, 1095–1097.
- Kramer, D.M., Johnson, G., Kiirats, O. ve Edwards, G.E., 2004. New Fluorescence Parameters for The Determination of Q(A) Redox State and Excitation Energy Fluxes, Photosynthesis Research, 79, 209-218.
- Krantev, A., Yordanova, R. ve Popova, L., 2006. Salicylic Acid Decreases Cd Toxicity in Maize Plants, General and Applied Plant Physiology, 1, 45-52.
- Krantev, A., Yordanova, R., Janda, T., Szalai, G. ve Popova, L., 2008. Treatment with Salicylic Acid Decreases The Effect of Cadmium on Photosynthesis in maize Plants, Journal of Plant Physiology, 165, 920-931.
- Ku, S.B., Edwards, G.B. ve Tanner, C.B., 1977. Effects of Light, Carbon Dioxide, and Temperature on Photosynthesis, Oxygen Inhibition of Photosynthesis, and Transpiration in *Solanum tuberosum*, Plant Physiology, 59, 868-72.
- Ku, H.M., Tan, C.W., Su, Y.S., Cy, C., Chen, C.T. ve Jan, F.J., 2012. The effect of water deficit and excess copper on proline metabolism in *Nicotiana benthamiana*, Biologia Plantarum, 56, 337-343.
- Kuhn, J.M. ve Schroeder, J.I., 2003. Impacts of altered RNA metabolism on abscisic acid signaling, Current Opinion in Plant Biology, 6, 463–469.

- Kumar, S., Kaur, G. ve Nayyar, H., 2008. Exogenous Application of Abscisic Acid Improves Cold Tolerance in Chickpea (*Cicer arietinum L.*), Journal of Agronomy and Crop Science, 194, 449–456.
- Kumar, P., Tewari, R.K. ve Sharma, P.N., 2008. Modulation of Copper Toxicity-Induced Oxidative Damage by Excess Supply of Iron in Maize Plants, Plant Cell Reports, 27, 399-409.
- Kupper, H. , Kupper, F. ve Spiller, M., 1996. Environmental Relevance of Heavy Metal-Substituted Chlorophylls Using The Example of Water Plants, Journal of Experimental Botany, 47, 259-266.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C. ve Takahashi, Y., 2008. Polyamines: Essential Factors for Growth and Survival, Planta, 228, 367-381.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during The Heat of Bacteriophage T4, Nature, 227, 680-85.
- Legocka, J. ve Kluk, A., 2005. Effect of Salt and Osmotic Stress on Changes in PolyamineB Content and Arginine Decarboxylase Activity in Lupinus luteus Seedlings, Journal of Plant Physiology. 162, 662–668.
- Lagriffoul, A., Mocquot, B., Mench, M. ve Vangronsveld, J., 1998. Cadmium Toxicity Effects on Growth, Mineral and Chlorophyll Contents, and Activities of Stress Related Enzymes in Young Maize Plants (*Zea mays L.*), Plant and Soil, 200, 241-250.
- Lee, C.W., Jackson, M.B., Duysen, M.E., Freeman, T.P. ve Self, J.R., 1996. Induced Micronutrient Toxicity in 'Towndown' Kentucky Bluegrass, Crop Science, 36, 705-712.
- Leon, J., Lawton, M.A. ve Raskin, J., 1995. Hydrogen Peroxide Stimulates Salicylic Acid Biosynthesis in Tobacco, Plant Physiology, 108, 1673-1678.
- Lewitt, J., 1980. Responses of Plants to Environmental Stresses, Academic Press, New York.
- Lexmond, T.M. ve Van der Vorm, P.D.J., 1981. The Effect of pH on Copper Toxicity to Hydroponically Grown Maize, Netherlands Journal of Agricultural Science, 29, 209-230.
- Li, G., Peng, X., Wei, L. ve Kang, G., 2013. Salicylic Acid Increases The Contents of Glutathione and Ascorbate and Temporally Regulates The Related Gene Expression in Salt-Stressed Wheat Seedlings, Gene, 529, 321-325.
- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes, Methods in Enzymology, 148, 350-382.

- Lidon, F.C. ve Henriques, F.S., 1991. Limiting step on photosynthesis of rice plants treated with varying copper levels, Journal of Plant Physiology, 138, 115-118.
- Lidon, F.C., Ramalho, J.C. ve Henriques, F.S., 1993. Copper Inhibition of Rice Photosynthesis, Journal of Plant Physiology, 142, 12-17.
- Lima, A.L.S., DaMatta, F.M., Pinheiro, H.A., Totola, M.R. ve Loureiro, M.E., 2002. Photochemical Responses and Oxidative Stress in Two Clones of *Coffea canephora* Under Water Deficit Conditions, Environmental and Experimental Botany, 47, 239-247.
- Liu, Z.J., Guo, Y.K. ve Bai, J.G., 2010. 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.
- Lubaina, A. S., Meenu Krishnan, V. G. ve Murugan K., 2013. Induction of Oxidative Stress and Antioksidative Response Mechanisms in *Octoblepharum Albidum* Hedw. A Bryophyte Under Desiccation– Rehydration Stress, Indian Journal of Plant Sciences, 2(3), 12-22.
- Luo, Y. ve Rimmer, D.L., 1995. Zinc-Copper Interaction Affecting Plant Growth on a Metal-Contaminated Soil, Environmental Pollution, 88, 79-83.
- Lutz, C., Navakoudis, E., Seidlitz, H.K. ve Kotzabasis, K. 2005. Simulated Solarirradiation with Enhanced UV-B Adjust Plastid- and Thylakoid-Associated Polyamine Changes for UV-B Protection, Biochimica et Biophysica Acta , 1710, 24–33.
- Makino, A., Miyake, C. ve Yokota, A., 2002. Physiological Function of The Water-Water Cycle (Mehler reaction) and The Cyclic Electron Flow around PSI in Rice Leaves, Plant and Cell Physiology., 43, 1017-1026.
- Maksymiec, W., Russa, R., Urbanik-Sypniewska, T. ve Baszynski, T., 1994. Effect of Excess Cu on The Photosynthetic Apparatus of Runner Bean Leaves Treated at Two Different Growth Stages, Physiologia Plantarum, 91, 715-721.
- Maksymiec, W., 1997. Effect of copper on cellular processes in higher plants, Photosynthetica, 34, 321–342.
- Maksymiec, W., Wojcik, M. ve Krupa, Z., 2007. Variation in Oxidative Stress and Photochemical Activity in *Arabidopsis thaliana* Leaves Subjected to Cadmium and Exces Copper in The Presence or Absence of Jasmonate and Ascorbate, Chemosphere, 66, 421-427.
- Maxwell, K. ve Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll Fluorescence-A Practical Guide, Journal of Experimental Botany, 51, 659-68.

- May, M.J. ve Leaver, C.J., 1993. Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures, Plant Physiology, 103, 621-627.
- May, M.J, Vernou, T., Sanchez-Fernandez, R., Van Montagu, M. ve Inze, D., 1998. Evidence for Posttranscriptional Activation of Gamma-Glutamylcysteine Synthetase during Plant Stress Responses, Proceedings of the National Academy of Sciences, 95, 12049-12054.
- Mazhoudi, S., Chaoui, A., Gharbal, M.H. ve El Ferjani, E., 1997. Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.), Plant Science, 127, 129-137.
- Mc Dermitt, D.K., 1990. Sources of Error in The Estimation of Stomatal Conductance and Transpiration from Porometer Data, Horticultural Science, 25, 1538-48.
- 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 research communications, 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 Letters, 378, 203-206.
- 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, Biochemical Journal, 29, 108-115.
- Metwally, A., Finkermeier, I., Georgi, M. ve Dietz, K.J., 2003. Salicylic Acid Alleviates The Cadmium Toxicity in Barley Seedlings, Plant Physiology, 132, 272-281.
- Millar, A.A., Jacobsen, J.V., Ross, J.J., Helliwell, C.A., Poole, A.T., Scofield, G., Reid, J.B. ve Gubler, F., 2006. Seed dormancy and ABA metabolism in *Arabidopsis* and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase, Plant Journal, 45, 942-54.
- Minocha, R., Long, S., Thangavel, P., Minocha, S.C., Eagar, C. ve Driscoll, C.T. 2010. Elevation Dependent Sensitivity of Northern Hardwoods to Ca-addition at HubbardBrook Experimental Forest, NH, USA, Forest Ecology and Managment, 260, 2115-2124
- Mitchell, R.L., Burchett, M.D., Pulkownik, A. ve McCluskey, L., 1988. Effects of Environmentally Hazardous Chemicals on The Emergence and Early Growth of Selected Australian Native Plants, Plant and Soil, 112, 195-199.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, Trends In Plant Science, 7, 405-410.

- Mittler, R., Vveerauwera, S., Gollery, M. ve Breusegem, F.V., 2004. Reactive Oxygen Gene Network of Plants, Trends in Plant Science, 9, 490-498.
- 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 Physiology, 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 Physiology, 37, 423-430.
- Mocquot, B., Vangronsveld, J., Clijsters H. ve Mench, M., 1996. Copper Toxicity in Young Maize (*Zea mays* L.) Plants: Effects on Growth, Mineral and Chlorophyll and Enzyme Activities, Plant and Soil, 182, 287-300.
- Mohanty, N., Vass, I. ve Demeter, S., 1989. Copper Toxicity Affects photosystem II Electron Transport at The secondary Quinone Acceptor QB, Plant Physiology, 90, 175-179.
- Molinari, H.B.C., Marur, C.J., Daros, E., De Campos, M.K.F., De Carvalho, J.F.R.P., Filho, J.C.B., Pereira, L.F.P. ve Vieira, L.G.E. 2007. Evaluation of The Stress-Inducible Production of Proline in Transgenic Sugarcane (*Saccharum* spp.): Osmotic Adjustment, Chlorophyll Fluorescence and Oxidative Stress, Physiologia Plantarum, 130, 218-229.
- Morelli, E. ve Scarano, G., 2004. Copper-induced changes of nonprotein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Plant Science, 167, 289-296.
- Morris, M.L., 2002. Impacts of International Maize Breeding Research in Developing Countries, DF:Cimmyt, Mexico, Pp: 1966-1998.
- Moskova, I., Todorova, D., Alexieva, V., Sergiev, I., 2009. "Effect of Exogenous Hydrogen Peroxide on Enzymatic and Nonenzymatic Antioxidants in Leaves of Young Pea Plants Treated with Paraquat", Plant Growth Regulation, 57, 193-202.
- Moussa, H.R. ve El-Gamal, S.M., 2010. Effect of Salicylic Acid Pretreatment on Cadmium Toxicity in Wheat, Biologia Plantarum, 54, 315-320.
- Moustakas, M., Lanaras, T., Symenoidis, L. ve Karataglis, S., 1994. Growth and Some Photosynthetic Characteristics of Field Grown *Avena sativa* under Copper and Lead Stress, Photosynthetica, 30, 389-396.
- Muller, J.E. ve Whitshitt, M.S., 1996. Plant Cellular Responses to Water Deficit, Plant Growth Regulation, 20, 41-46.

- Munne-Bosch, S., Jubany-Mari', T. ve Alegre, L., 2001. Drought-Induced Senescence is Characterized by A Loss of Antioxidant Defences in chloroplasts, Plant Cell Environment, 24, 1319–1327.
- Munzuroğlu, Ö. ve Geçgil, H., 2002. Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 43, 203-213.
- Munzuroglu, O., Zengin, F.K. ve Yahyagil, Z., 2008. The abscisic acid levels of wheat (*Triticum aestivum* L. cv. cakmak 79) seeds that were germinated under heavy metal (Hg<sup>++</sup>, Cd<sup>++</sup>, Cu<sup>++</sup>) stress, Gazi University Journal of Science, 2, 1–7
- Nakano, Y. ve Asada, Y., 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-Specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts, Plant Cell Physiology, 22, 867-880.
- Nakano, Y. ve Asada, Y., 1987. Purification of Ascorbate Peroxidase from Spinach Chloroplasts: Its Inactivation in Ascorbat Depleted Medium and Reactivation by Monodehydroascorbate Radical, Plant Cell Physiology, 28, 131-135.
- Nar, H., Saglam, A., Terzi, R., Varkonyi, Z. ve Kadioglu, A., 2009. Leaf Rolling and Photosystem II Efficiency in *Ctenanthe setosa* Exposed to Drought Stress, Photosynthetica, 47, 429-436.
- Neelam, M., Rahul, M., Ajiboye, M., Kafayat, Y. ve Lateefat, Y., 2014. Salicylic Acid Alters Antioxidant and Phenolics Metabolism in *Catharanthus roseus* Grown Under Salinity Stress, African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 11(5).
- Nishiyama, Y. Ikeda, H. ve Haramaki, N., 1998. Oxidative Stress is Related to Exercise in Tolerance in Patients With Heart Failure, American Heart Journal, 135, 115.
- Noctor, G., Queval, G., Mhamdi, A., Chaouch, S. ve Foyer, C.H., 2011. Glutathione, The Arabidopsis Book, 9(1),1-32.
- Novotny, V., 1995. Diffuse Sources of Pollution by Toxic Metals and Impact on Receiving Waters, in: Heavy Metals Problems and Solutions, eds: Salomons W., Förstner V., Mader P., Springer-Verlag, Germany, Pp: 44.
- Ogawa, K., Kanematsu, S. ve Asada, K., 1997. Generation of Superoxide Anion and Localization of Cu-Zn Superoxide Dismutase in the Vascular Tissue of Spinach Hypocotyls: Their Association With Lignification, Plant Cell Physiology, 38, 1118-1126.
- O'sullivan, J.N., Asher, C.J. ve Blamey, F.P.C., 1997. Nutrient Disorders of Sweet Potato, ACIAR Monograph, Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.

- Ouzounidou, G., Ciamporova, M., Moustakas, M. ve Karataglis, S., 1995. Responses of Maize (*Zea mays* L) Plants to Copper Stress I Growth, Mineral Content and Ultra Structure of Roots, Environmental and Experimental Botany, 35, 167-176.
- Ouzounidou, G., Moustakas, M. ve Strasser, R.J., 1997. Sites Action of Copper in The Photosynthetic Apparatus of Maize Leaves: Kinetic Analysis of Chlorophyll Fluorescence, Oxygen Evolution, Absorption Changes and Thermal Dissipation as Monitored by Photoacoustic Signals, Australian Journal of Plant Physiology, 24, 81-90.
- Özfidan, C., 2010. Ekzojen ABA uygulamasının Kuraklık Stresi Altındaki Yabani ve ABA-Eksik *Arabidopsis* Mutantları Üzerindeki Biyokimyasal ve Fizyolojik etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Özfidan, C., Turkan, I., Sekmen, A.H. ve Seckin, B., 2013. Time course analysis of ABA and non-ionic osmotic stress-induced changes in water status, chlorophyll fluorescence and osmotic adjustment in *Arabidopsis thaliana* wild-type (Columbia) and ABA-deficient mutant (*aba2*), Environmental and Experimental Botany, 86, 44-51.
- Padu, E, Moldau, H. ve Kollist, H., 1999. The Effect of Ozone on Antioxidative Reactions in Apoplast and Symplast of Barley Leaves, Plant Peroxidase Newsletter., 133-138.
- Padurariu, C., Harovitz, T., Paltineau, R. ve Negomi, V., 1969. On the Relationship Between Soil Moisture and Osmotic Potential in Maize and Sugar Beet Plants, Physiologiae Plantarum, 22, 850-860.
- Palma, J.M., Gomez, M. ve Del Rio, J.L.A., 1987. Increased levels of peroxisomal active oxygen-related enzymes in copper tolerant pea plants, Plant Physiology, 85, 570-574.
- Pandey, N. ve Sharma, C.P., 2002. Effect of Heavy Metals  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  on Growth and Metabolism of Cabbage, Plant Science, 163, 753-758.
- Parida, A.K. ve Das, A.B., 2005. Salt Tolerance ve Salinity Effects on Plants: Review, Ecotoxicology and Environmental Safety, 60, 324-349.
- Pastori, G.M. ve Trippi, V.S. 1992. Oxidative Stress Induces High Rate of Glutathione Reductase Synthesis in A Drought Resistant Maize Strain, Plant and Cell Physiology, 33, 957-961.
- Pastori, G.M. ve Trippi, V.S., 1993. Antioxidative Protection in A Drought-Resistant Maize Strain during Leaf Senescence, Physiologia Plantarum, 87, 227-231.
- Pätsikkä, E., Kairavuo, M., Sersen, F., Aro, E.M. ve Tyystjarvi, E., 2002. Excess Copper Predisposes Photosystem II to Photoinhibition in vivo by Outcompeting Iron and Causing Decrease in Leaf Chlorophyll, Plant Physiology, 129, 1359-1367.

- Pätsikkä, E., Aro, E.M. ve Tyystjarvi, E., 2001. Mechanism of Copper-Enhanced Photoinhibition in Thylakoid membranes, Physiologia Plantarum, 113, 142-150.
- Patterson, W. ve Olson, J.J., 1983. Effects of Heavy Metals on Radicle Growth of Selected Woody Species Germinated on Filter Paper, Mineral and Organic Soil Substrates, Canadian Journal of Forest Research, 13, 233-238.
- Patykowski, J. ve Urbanek, H., 2003. Activity of Enzymes Related to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Generation and Metabolism in Leaf Apoplastic Fraction of Tomato Leaves Infected With *Botrytis cinerea*, Journal of Phytopathology, 151, 153-161.
- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Tomine, S., Klüsener, B., Allen, G.J., Grill, E. ve Schroeder, J.I., 2000. Calcium Channels Activated by Hydrogen Peroxide Mediate Abscisic Acid Signaling in Guard Cells, Nature, 406, 731-734.
- Pilon-Smits, E.A.H., Zhu, Y.L., Sears, T. ve Terry, N., 2000. Overexpression of Glutathione Reductase in *Brassica juncea*: Effects of Cadmium Accumulation and Tolerance, Physiologia Plantarum, 110, 455-460.
- Pitcher, L.H., Brennan, E., Hurley, A., Dunsmuir, P., Tepperman, J.M. ve Zilinskas, B.A., 1991. Overproduction of Petunia Copper/Zinc Superoxide Dismutase Does Not Confer Ozone Tolerance in Transgenic Tobacco, Plant Physiology, 97, 452-455.
- Pompella, A., 1997. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation, International Journal for Vitamin and Nutrition Research, 67, 289-297.
- Poschenrieder, C.H., Gunse, B. ve Barcelo, J., 1989. Water Relations and Cell Wall Elasticity in Cadmium Treated Bush Bean Plants, Plant Physiology, 90, 1365-1371.
- 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.
- Price, A.H., Lucas, P.W. ve Lea, P.J., 1990. Age Dependent Damage and Glutathione Metabolism in Ozone Fumigated Barley: A Leaf Section Approach, Journal of Experimental Botany, 62, 869-882.
- Queval, G., Thominet, D., Vanacker, H., Miginiac-Maslow, M., Gakière, B. ve Noctor, G., 2009. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-activated up-regulation of glutathione in Arabidopsis involves induction of genes encoding enzymes involved in cysteine synthesis in the chloroplast, Molecular Plant, 2, 344-356.
- 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 Phytologist, 159, 479-486.



- Rao, M.V., Paliyath, G., Ormrod, D.P., Murr, D.P. ve Watkins, C.B., 1997. Influence of Salicylic Acid on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production, Oxidative Stress, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Metabolizing Enzymes, Plant Physiology, 115, 137-149.
- Raskin, I., Turner, I., Melander, M. ve Wayne, R., 1989. Regulation of Heat Production in The Inflorescences of An Arum Lily by Endogenous Salicylic Acid, Proceedings of National Academy of Science, 86, 2214-2218.
- Raskin, I., 1992. Role of Salicylic Acid in Plants, Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology, 43, 439-463.
- Rejeba, K.B., Benzartia, M., Debeza, A., Bailly, C., Savouréb, A. ve Abdelly, C., 2015. NADPH oxidase-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production is required for salt-induced antioxidant defense in *Arabidopsis thaliana*, Journal of Plant Physiology, 174, 5–15.
- Robinson, S.P., Downton, W.J.S. ve Millhouse, J.A., 1983. Photosynthesis and Ion Content of Leaves and Isolated Chloroplasts of Salt-Stressed Spinach, Plant Physiology, 73, 238-242.
- Romheld, V., 1991. The Role of Phytosiderophores in Acquisition of Iron and Other Micronutrients in Graminaceous Species. An Ecological Approach, Plant and Soil, 130, 127-134.
- Ros Barcelo, A., Munoz, R. ve Sabater, F., 1987. Lupin Peroxidases: I. Isolation and Characterization of Cell Wall-Bound Isoperoxidase Activity, Physiologia Plantarum, 71, 448-454.
- Rosegrant, M.W., Paisner, M.S., Meijer S.ve Witcover, J., 2001. Global Food Projections to 2020. Emerging Trends and Alternative Futures, International Food Policy Research Institute (IFPRI) , Washington, DC .
- Rosegrant, M.W. ve Cline, S.A., 2003. Global Food Security: Challenges and Policies, Science, 302, 1917–1919.
- Sadıklar, B., Van, A. ve Karam Mehmet, S.S., 1994. Akçaabat-Yomra (Trabzon) Kıyı Yöresi Topraklarının Bazı Ağır Metal İçerikleri, Türkiye Jeoloji Bülteni, 37, 53-59.
- Saika, H., Okamoto, M., Miyoshi, K., Kushiro, T., Shinoda, S., Jikumaru, Y., Fujimoto, M., Arikawa, T., Takahashi, H., Ando, M., Arimura, S., Miyao, A., Hirochika, H., Kamiya, Y., Tsutsumi, N., Nambara, E. ve Nakazono, M., 2007. Ethylene promotes submergence-induced expression of OsABA8ox1, a gene that encodes ABA 8' -hydroxylase in rice, Plant Cell Physiology, 48, 287- 298.
- 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, Journal of Agronomy and Crop Science, 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, Biologia Plantarum, 41, 387-394.
- Sairam, R.K., Chandrasekhar, V. ve Srivastava, G.C., 2001. Comparison of Hexaploid and Tetraploid Wheat Cultivars in Their Responses to Water Stress, Biologia Plantarum, 44, 89-94
- Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, N.P.B.A., Dushenkov, V., Ensley, B.D., Chet, I. ve Raskin, I., 1995. Phytoremediation: A Novel Strategy for The Removal of Toxic Metals from The Environment Using Plants, Biotechnology, 13, 468-474.
- Sánchez-Fernández, R., Ardiles-Díaz, W., Van Montagu, M., Inzé, D. ve May, M.J., 1998. Cloning and expression analyses of AtMRP4, a novel MRP-like gene from *Arabidopsis thaliana*, Mol. Gen. Genet., 258, 655-662.
- Sawada, S.S., Sato, M., Kasai, A., Yaochi, D., Kameya, Y., Matsumoto, L. ve Kasai, M., 2003. Analysis of The Feed-Forward Effects of Sink Activity on The Photosynthetic Source-Sink Balance in Single-Rooted Sweet Potato Leaves. I. Activation of RuBPase Through The Development of Sinks, Plant and Cell Physiology, 44, 190-97.
- Schroedaer, J. ve Nambara, E., 2006. A quick release mechanism for abscisic acid, Cell, 126, 1023-1025.
- Schafer, C., Simper, H. ve Hofmann, B., 1992. Glucose feeding results in coordinated changes of chlorophyll content, ribulose-1,5-biphosphate carboxylase-oxygenase activity and photosynthetic potential in photoautrophic suspension cultured cells of *Chenopodium rubrum*, Plant Cell Environmental, 15, 343-350.
- Schnable, S.S., Ware, D., Fulton., R.S., Stein J.C. ve Wei, F., 2009. The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics, Science, 326,1112-1115.
- 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.
- Scott, I.M., Dat, J.F., Lopez-Delgado, H. ve Foyer, C.H., 1999. Salicylic Acid and Hydrogen Peroxide in Abiotic Stress Signaling in Plants, Phyton (Austria), 39, 13-17.
- Scruton, N.S., Berry, A. ve Perham, R.N., 1990. Redesign of the Coenzyme Specificity of A Dehydrogenase by Protein Engineering, Nature, 343, 38-43.
- Seman, J.R. ve Critchley, C., 1985. Effects of Salt Stres on The Growth, Ion Content, Stomatal Behaviour and Photosynthetic Capacity of Salt-Sensitive Species, *Phaseolus vulgaris* L., Planta, 164, 151-162.

- Senaratna, T., Touchell, D., Bunn, E. ve Dixon, K., 2000. Acetyl Salicylic Acid (aspirin) and Salicylic Acid Induce Multiple Stress Tolerance in Bean and Tomato Plants, Plant Growth Regulation, 30, 157-161.
- Sgherri, C.L.M., Maffei, M. ve Navari-Izzo, F., 2000. Antioxidative Enzymes in Wheat Subjected to Increasing Water Deficit and Rewatering, Journal of Plant Physiology, 157, 273-279.
- Sgherri, C.L.M., Quartacci, M.F. ve Navari-Izzo, F., 2007. Early production of activated oxygen species in root apoplast of wheat following copper excess, Journal of Plant Physiology, 164 (9), 1152-1160.
- Shainberg, O., Rubin, B., Rabinowitch, H.D. ve Tel-Or, E., 2001. Loading Beans with Sublethal Levels of Copper Enhances Conditioning to Oxidative Stress, Journal of Plant Physiology, 158, 1415-1421.
- Shen, H.J., Xie, Y. ve Li, R., 1994. Effects of Acid Stress on Polyamine Levels, Ions Efflux, Protective Enzymes and Macromolecular Synthesis in Cereal Leaves, Plant Growth Regulation, 14, 1-5.
- Shakirova, F.M., Sakhabutdinovam, A.R., Bezrukova, M.V., Fatkhutdinova, R.A. ve Fatkhutdinova, D.R., 2003. Changes in Hormonal Status of Wheat Seedlings Induced by Salicylic Acid and Salinity, Plant Science, 164, 317-322.
- Sharma, P. ve Dubey, R.S., 2005. Drought Induced Oxidative Stress and Enhances The Activities of Antioxidant Enzymes in Growing Rice Seedlings, Plant Growth Regulation, 46, 209-221.
- Siborova, M., 1988. Cd<sup>2+</sup> ions affect the quaternary structure of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from barley leaves, Biochemie und Physiologie der Pflanzen, 183, 371-378.
- Simova-Stoilova, L., Demirevska-Kepova, K., Stoyanova, Z. ve Smilova, E., 2002. Effect of Cu and Mn toxicity on leaf protein pattern and rubisco quantity of young barley plants, Compt Rend Acad Bulg Sci., 55, 79-84.
- Singla-Pareek, S.L., Yadav, S.K., Pareek, A., Reddy, M.K. ve Sopory, S.K., 2006. Transgenic Tobacco Overexpressing Glyoxalase Pathway Enzymes Grow and Set Viable Seeds in Zinc-Spiked Soils, Plant Physiology, 140, 613-623.
- Sivaramkrishnan, S., Patell, V.Z., Flower, D.J. ve Peacock, J.M., 1988. Proline Accumulation and Nitrate Reductase Activity in Contrasting Sorghum Lines during Mid-Season Drought Stress, Physiologia Plantarum, 74, 418-426.

- Slesak, 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 Biochimica Polonica, 54, 39-50.
- Smirnoff, N., 1993. The Role of Active Oxygen in the Response of Plants to Water Deficit and Desiccation, New Phytologist, 125, 27-58.
- Smith, I.K., Kendall, A.C., Keys, A.J., Turner, J.C. ve Lea, P.J., 1984. Increased levels of glutathione in a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Science Letters, 37, 29-33.
- Son, J.A., Narayanankutty, D.P. ve Roh, K.S., 2014. Influence of Exogenous Application of Glutathione on Rubisco and Rubisco Activase in Heavy Metal-Stressed Tobacco Plant Grown in Vitro, Saudi Journal of Biological Sciences, 21, 89-97.
- Soto, A., Ruiz, K.B., Ravaglia, D., Costa, G. ve Torrigiani, P., 2013. ABA may promote or delay peach fruit ripening through modulation of ripening- and hormone-related gene expression depending on the developmental stage, Plant Physiology and Biochemistry, 64, 11-24.
- Stahl, W. ve Sies, H., 2002. Introduction: Reactive Oxygen Species, Research Monographs, 1-2.
- Stephan, U.W. ve Scholz, G., 1993. Nicotianamine: Mediator of Transport of Iron and Heavy Metals in The Phloem, Physiologia Plantarum, 88, 522-529.
- 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, Physiologia Plantarum, 88, 590-598.
- Street, H.E. ve Öpik, H., 1984. *The Physiology of Flowering Plants: Their Growth and Development*, Third Edition, Baltimore.
- Sudo, E., Itouga, M., Yoshida-Hatanaka, K., Ono, Y. ve Sakakibara, H., 2008. Gene expression and sensitivity in response to copper stress in rice leaves, Journal of Experimental Botany, 59(12), 3465-3474.
- Sun, X.H., Yu, G., Li, J.T., Jia, P., Zhang, J.C., Jia, C.G., Zhang, Y.H. ve Pan, H.Y., 2014. A heavy metal-associated protein (AChMA1) from the Halophyte, *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. confers tolerance to iron and other abiotic Stresses when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, International Journal of Molecular Sciences, 15, 14891-14906.

- Sung, D.Y., Kim, T.H., Komives, E.A., Mendoza-Cózatl, D.G., ve Schroeder, J.I., 2009. ARS5 is a component of the 26S proteasome complex, and negatively regulates thiol biosynthesis and arsenic tolerance in Arabidopsis, The Plant Journal, 59, 802-812.
- Swanson, S. ve Gilroy, S., 2010. ROS in plant development, Physiologia Plantarum, 138, 384–392.
- Szabados, L. ve Savoure, A., 2010. Proline: A Multifunctional Amino Acid, Trends in Plant Science, 15, 89-97.
- Szafranska, K., Cvikrova M., Kowalska U., Gorecka K., Gorecki, R., Martincova O. ve Janas K.M., 2011. Influence of Copper Ions on Growth, Lipid Peroxidation, and Proline and Polyamines Content in Carrot Rosettes Obtained from Anther Culture, Acta Physiologiae Plantarum, 33, 851-859.
- Szekely, G., Abraham, E. ve Cseplo, A. 2008. Duplicated P5CS Genes of Arabidopsis Play Distinct Roles in Stress Regulation and Developmental Control of Proline Biosynthesis, The Plant Journal, 53, 11-28.
- Taiz, L. ve Zeiger, E., 2008. Bitki Fizyolojisi, Palme Yayıncılık, Ankara.
- 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*), Physiologia Plantarum, 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.
- Taşgın E., Tasgın, E., Atıcı, Ö., Nalbantoğlu, B., Popova, L.P., 2006. Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves, Phytochemistry, 67, 710–715.
- Tavladoraki, P., Cona, A., Federico, R., Tempera, G., Viceconte, N., Saccoccio, S., Battaglia, V., Toninello, A. ve Agostinelli, E. 2012. Polyamine Catabolism: Target Forantiproliferative Therapies in Animals and Stress Tolerance Strategies in Plants, Amino Acids, 42, 411-426.
- Taylor, G.J. ve Foy, C.D., 1985. Differential Uptake and Toxicity of Ionic and Chelated Copper in *Triticum aestivum*, Canadian Journal of Botany, 63, 1271-1275.
- Thompson, J.E., Ledge, R.L. ve Barber, R.F., 1987. The Role of Free Radicals in Senescence and Wounding, New Phytologist, 105, 317-344.

- Thounaojam, T.C., Panda, P., Mazumdar, P., Kumar, D., Sharma, G.D., Sahoo, L. ve Panda, S.K., 2012. Excess Copper Induced Oxidative and Response of Antioxidants in Rice, Plant Physiology and Biochemistry, 53, 33-39.
- Thurman, D.A., 1981. Mechanism of Metal Tolerance in Higher Plants, in: Effect of Heavy Metal Pollution on Plants, ed: Lepp N.V., Applied Science Publishers, London, England, Pp: 239-249.
- Tie, S.G., Tang, Z.J., Zhao, Y.M. ve Li, W., 2012. Oxidative damage and antioxidant response caused by excess copper in leaves of maize, African Journal of Biotechnology, 11, 4378-4384.
- Türkan, I. ve Demiral, T., 2009. Recent Developments in Understanding Salinity Tolerance, Environmental and Experimental Botany, 67, 2–9.
- Türkan, I., Demiral, T. ve Sekmen, A.H., 2013. The Regulation of Antioksidant Enzymes in Two Plantago Species Differing in Salinity Tolerance Under Combination of Waterlogging and Salinity, Functional Plant Biology, 40, 484-493.
- Umezawa, T., Hirayama, T., Kuromori, T. ve Shinozaki, T., 2011. Advances in Botanical Research, The Regulatory Networks of Plant Responses to Abscisic Acid, Editor İsmail Türkan, 57, First Edition, 202-233, Elsevier, Japan.
- Ungar, I.A., 1996. Effect of Salinity on Seed Germination, Growth, and Ion Accumulation of *Atriplex Patula* (Chenopodiaceae), American Journal of Botany, 83, 604-607.
- URL-1, <http://www.inchem.org>. 10 Şubat 2011.
- URL-2, [http://biyoloji.ataturkfenlisesi.com/ders\\_notlari/bitkilerde-stres.html](http://biyoloji.ataturkfenlisesi.com/ders_notlari/bitkilerde-stres.html). 10 Nisan 2011.
- URL-3, <http://en.wikipedia.org/wiki/Maize#Production>. 18 Şubat 2015.
- URL-4, [http://rapory.tuik.gov.tr/18-02-2015-13:12:17\\_11274771349080627781583773547.html?](http://rapory.tuik.gov.tr/18-02-2015-13:12:17_11274771349080627781583773547.html?). 18 Şubat 2015.
- Urbanek, H., Kuzniak-Gebarowska, E. ve Herka, K., 1991. Elicitation of Defense Responses in Bean Leave By *Botrytis cinerea* Polygalacturanase, Acta Physiologiae Plantarum, 13, 43-50.
- Van Kooten, O. ve Snel, J.F.H., 1990. The Use of Chlorophyll Fluorescence Nomenclature in Plant Stress Physiology, Photosynthesis Research, 25, 147–150.
- Vasilev, A., Lidan, F., Ramalho, J.C., Do Ceu Matos, M. ve Da Graco, M., 2003. Effect of Excess Cu on Growth and Photosynthesis of Barley. Implication With a Screening Test For Cu Tolerance, Journal of Central European Agriculture, 4, 225-236.

- Velikova, V., Yordanov, I. ve Edreva, A., 2000. Oxidative Stress and Some Antioxidant Systems in Acid Rain-Treated Bean Plants, Protective Role of Exogenous Polyamines, Plant Science, 151, 59-66.
- Viehweger, K., 2014. How Plants Cope with Heavy Metals, Viehweger Botanical studies, 55, 1-13.
- Vionella, A. ve Macri, F., 1991. Generation of Superoxide Anion and Hydrogen Peroxide at Surface of Plant, Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 23, 409-423.
- Wang, C. ve Oliver, D.J., 1996. Cloning of The cDNA and Genomic Clones for Glutathione Synthetase from *Arabidopsis thaliana* and Complementation of A *gsh2* Mutant in Fission Yeast, Plant Molecular Biology, 31, 1093-1104.
- Wang, G.F., Li, W.Q., Wu, G.L., Zhou, C.Y. ve Chen, K.M., 2013. Characterization of Rice NADPH Oxidase Genes and Their Expression under Various Environmental Conditions, International Journal of Molecular Sciences, 14, 9440-9458.
- Weser, U., Schubotz, L.M. ve Younes, M., 1979. Copper in The Environment, Kısım II: Health Effects, ed: Nriagu J.O., John Wiley ve Sons, Toronto, 197-240.
- Whitacre, D.M., 2011. Reviews of environmental contamination and toxicology Volume 213. Springer, USA, 180.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D. ve Van Camp, W., 1997. Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defense in C3 plants, The EMBO Journal, 16, 4806–4816.
- Xiang, C. ve Oliver, D.J., 1998. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*, Plant Cell, 10, 1539–1550.
- Xiong, L., Gong, Z., Rock, C.D., Subramanian, S., Guo, Y., Xu, W., Galbraith, D. ve Zhu, J.K., 2001. Modulation of Abscisic Acid Signal Transduction and Biosynthesis by An Sm-like Protein in *Arabidopsis*, Developmental Cell, 1, 771-81.
- Xiong, Z.T., Liu, C. ve Geng, B., 2006. Phytotoxic effects of copper on nitrogen metabolism and plant growth in *Brassica pekinensis* Rupr., Ecotoxicology and Environmental Safety, 64, 273-280.
- Xu, F.J., Jin, C.W., Liu, W.J., Zhang, Y.S. ve Lin, X.Y., 2011. Pretreatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Alleviates Aluminum-Induced Oxidative Stress in Wheat Seedlings, Journal of Integrative Plant Biology, 53, 44-53.
- Yang, H.Y., Shi, G.X., Qiao, X.Q. ve Tian, X.L., 2011. Exogenous Spermidine and Spermine Enhance Cadmium Tolerance of *Potamogeton malaiianus*, Russian Journal of Plant Physiology, 58, 622-628.

- Yau, P.Y., Loh, C.F. ve Azmil, I.A.R., 1991. Copper Toxicity of Clove [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. and Perry] Seedlings, MARDI Research Journal, 19, 49-53.
- Yaylalı-Abanuz, G. ve Tüysüz, N., 2012. Çayeli Bakır Yatağı Çevresindeki Toprak ve Bitkilerde Mevsimsel Değişimlerin İstatistiksel olarak Belirlenmesi, Jeoloji Mühendisliği Dergisi, 36, 99-113.
- Yazıcı, I., Türkan, İ., Sekmen, A.H. ve Demiral, T., 2007. Salinity tolerance of purslane (*Portulaca oleracea* L.) is achieved by enhanced antioxidative system, lower level of lipid peroxidation and proline accumulation, Environmental and Experimental Botany, 61, 49-57.
- Yordanov, I., Velikova, V. ve Tsonev, T., 2000. Plant Responses to Drought, Acclimation, and Stress Tolerance, Photosynthetica, 38, 171-186.
- Yruela, I., 2005. Copper in Plants, Brazilian Journal of Plant Physiology, 17, 145-156.
- Yu, C.W., Murphy, T., Sung, W.W. ve Lin, C.H., 2002. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Treatment Induces Glutathione Accumulation and Chilling Tolerance in Mung Bean, Functional Plant Biology, 29, 1081-1087.
- Yu, C.W., Murphy, T. ve Lin, C.H., 2003. Hydrogen Peroxide-Induced Chilling Tolerance in Mung Bean Mediated through ABA-Independent Glutathione Accumulation, Functional Plant Biology, 30, 955-963.
- Zanella, F., Watanabe, T.M., da Silva Lima, A.L. ve Schiavinato, M.A., 2004. Photosynthetic Performance in Jack Bean (*Canavalia ensiformis* (L.) D.C.) Under Drought and After Rehydration, Brazilian Journal Plant Physiology, 16, 181-184.
- Zeng, F., Qiu, B., Wu, X., Niu, S., Wu, F. ve Zhang G., 2012. Glutathione-Mediated Alleviation of Chromium Toxicity in Rice Plants, Biological Trace Element Research, 148, 255-263.
- Zengin, F.K. ve Kırbağ, S., 2007. Effects of copper on chlorophyll, proline, protein and abscisic acid level of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings, Journal of Environmental Biology, 28, 561-566.
- Zhang, J., Cui, S., Li, J. ve Kirkham, M.B., 1995. Protoplasmic Factors, Antioxidant Responses, and Chilling Resistance in Maize, Plant Physiology and Biochemistry, 33, 567-575.
- Zhang, X., Zhang, L., Dong, F., Gao, J., Galbraith, D.W. ve Song, C.P., 2001. Hydrogen Peroxide is Involved in Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure in *Vicia faba*, Plant Physiology, 126, 1438-1448.



- Zhang, L., Chia, J.M., Kumari, S., Stein, J.C., Liu Z., Narechania, A., Maher, C.A., Guill, K, McMullen, M.D ve Ware, D., 2009. A genome-wide characterization of microRNA genes in maize. PLoS Genetics, 5,11, 1-16.
- Zhao, H. ve Yang, H., 2008. Exogenous Polyamines Alleviate The Lipid Peroxidation Induced by Cadmium Chloride Stress in *Malus hupehensis* Rehd., Scientia Horticulturae, 116, 442–447.
- Zhao, S., Liu, Q., Qi, Y. ve Duo, L., 2010. Responses of root growth and protective enzymes to copper stress in Turfgrass. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 52, 7-11.
- Zheng, Y., Huang, Y., Xian, W., Wang, J. ve Liao, H., 2012. Identification and expression analysis of the Glycine max CYP707A gene family in response to drought and salt stresses, Annals of Botany, 110, 743-756.
- Zhou, B., Guo, Z. ve Lin, L., 2006. Effects of abscisic acid application on photosynthesis and photochemistry of *Stylosanthes guianensis* under chilling stress, Plant Growth Regulation, 48, 195–199.
- Zhu, B. ve Alva, A.K., 1993. Effect of pH on Growth and Uptake of Copper by Swingle Citrumelo Seedlings, Journal of Plant Nutrition, 16, 1837-1845.

## ÖZGEÇMİŞ

02.09.1977 yılında Diyarbakır'ın Silvan ilçesinde doğdu. İlköğrenimini Silvan Kazım Karabekir İlkokulu'nda, ortaokulu Diyarbakır Ş. P. Mehmet Erçin ortaokulunda ve lise öğretimini Yunus Emre Lisesi'nde tamamladı. 2000 yılında Dicle Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde başladığı lisans öğreniminden 2004 yılında bölüm birincisi olarak mezun oldu. 2009 yılında Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine, 2011 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda Doktora eğitimine başladı. 2010 yılında Muş Alparslan Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'ne Araştırma Görevlisi olarak atandı. Evli ve bir çocuk babasıdır.