

**ASPIR BİTKİSİNİN YEREL (*Carthamus tinctorius* L.) VE
ATASAL (*Carthamus oxyacantha* M. Bieb) GENOTİPLERİNİN
NİKEL TOLERANSLARININ BELİRLENMESİ VE
FİTOREMEDİASYONUNDA KULLANILMA POTANSİYELLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**DETERMINATION OF NICKEL TOLERANCES OF DOMESTIC
(*Carthamus tinctorius* L.) AND WILD (*Carthamus oxyacantha*
M.Bieb.) GENOTYPES OF SAFFLOWER AND EVALUATION OF
THEIR USAGE POTENTIAL IN PHYTOREMEDIATION**

UĞURCAN BARAN

PROF. DR. YASEMİN EKMEKÇİ

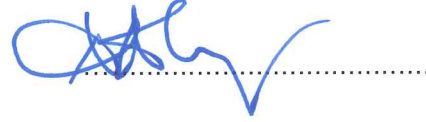
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır

2018

Uğurcan BARAN'ın hazırladığı “Aspir Bitkisinin Yerel (*Carthamus tinctorius* L.) ve Atasal (*Carthamus oxyacantha* M.Bieb) Genotiplerinin Nikel Toleranslarının Belirlenmesi ve Fitoremediasyonunda Kullanılma Potansiyellerinin Değerlendirilmesi” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

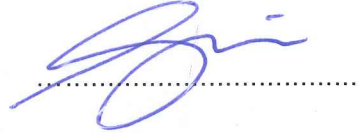
Prof. Dr. Ahmet AKSOY
Başkan



Prof. Dr. Yasemin EKMEKÇİ
Danışman



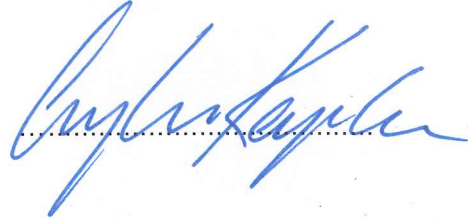
Prof. Dr. Füsün EYİDOĞAN
Üye



Doç. Dr. Nuran ÇİÇEK
Üye



Dr. Öğretim Üyesi Ceyhan KAYIHAN
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisans üstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- ☐ Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- ☐ Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren Ay ertelenmiştir.
- ☐ Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

21 / 12 / 18

Uğurcan BARAN

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi
- Kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.



Uğurcan BARAN

ÖZET

ASPIR BİTKİSİNİN YEREL (*Carthamus tinctorius* L.) VE ATASAL (*Carthamus oxyacantha* M. Bieb.) GENOTİPLERİNİN NİKEL TOLERANSLARININ BELİRLENMESİ VE FİTOREMEDİASYONUNDA KULLANILMA POTANSİYELLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Uğurcan BARAN

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Yasemin EKMEKÇİ

Aralık 2018, 101 sayfa

Nikel (Ni^{+2}) bitki büyüme ve gelişmesi için gerekli bir mikrobesein maddesi olup, yüksek konsantrasyonları oldukça toksik etkilere sahiptir. Bu çalışmada, nikelin yerel (*Carthamus tinctorius* L., Olas) ve atasal (*Carthamus oxyacantha* M. Bieb.) aspir genotiplerinin büyüme ve fotokimyasal aktiviteleri üzerindeki etkileri ve genotiplerin nikel toleransı ile biriktirme potansiyellerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Kontrollü koşullara sahip iklim kabininde (16/8 saat fotoperiyot, 180-200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 23-25 $\pm$ 1°C gece/gündüz sıcaklık, %50 $\pm$ 5 nem) su kültüründe 14 gün yetiştirilen bitkiler, 7 gün süre ile farklı nikel konsantrasyonlarına [kontrol, 0.5 mM, 0.75 mM ve 1.0 mM ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)] maruz bırakılmıştır.

Hem yerel hem de atasal genotiplerde nikel birikimine bağlı olarak, kök ve sürgün biyokütlesi azalmış ve bu azalışın, köklerde daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, her iki genotip de kökleri ile aldıkları nikelin yaklaşık %8-18'ini yapraklara

transloke etmiştir. Yapraklara az miktarda nikel taşınmasına rağmen, fotosentetik aparatlar olumsuz yönde etkilenmiştir. Toksik nikel düzeyleri, tilakoid membranlardaki spesifik (ABS/RC, TR_O/RC, ET_O/RC, RE_O/RC ve DI_O/RC) ve fenomenolojik (ABS/CS, TR_O/CS_O, ET_O/CS_O ve DI_O/CS_O) enerji akışlarında, kuantum verimlerinde (ϕ_{Po} ve ϕ_{DIo}), PSII'nin donör (V_K/V_J) ve PSI'in akseptör (ΔV_{IP}) kısımlarının etkinliğinde değişimlere yol açmıştır. Bu değişimler, genotiplerin fotosentetik performanslarında (PI_{ABS} ve PI_{TOP}) önemli düzeyde azalmaya neden olmuştur, ancak nikelin bu olumsuz etkileri membran bütünlüğü ile anten ve aktif reaksiyon merkezlerindeki pigment miktarlarını etkilese de, bu etki fotosistemlerin işlevselliklerini durduracak düzeyde olmamıştır.

Genotiplerin köklerinde süperoksit dismutaz (SOD) ve guaiakol peroksidaz (POD) enzimlerinin yüksek aktiviteleri ile toksik nikel düzeylerinin oluşturduğu oksidatif hasar ürünleri olan süperoksit (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) detoksifiye edilirken; yapraklarda bu enzimlere ilaveten askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon redüktaz (GR) aktiviteleri ile aksesuar pigmentlerden antosiyanin ve flavonoidlerin miktarlarındaki artışın da savunmada etkili olduğu saptanmıştır.

Yerel ve atasal genotipler, nikel toksisitesine karşı benzer tolerans sergilemişlerdir. Aspir bitkisinin, nikeli büyük oranda köklerinde biriktirmesinden dolayı nikelle kirlenmiş toprakların remediasyonunda (fitostabilizasyon) kullanılma potansiyelleri mümkün olabilir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidant enzimler, Aspir, *Carthamus tinctorius*, *Carthamus oxyacantha*, Fotokimyasal aktivite, Nikel, Tolerans

ABSTRACT

DETERMINATION OF NICKEL TOLERANCES OF DOMESTIC (*Carthamus tinctorius* L.) AND WILD (*Carthamus oxyacantha* M. Bieb.) GENOTYPES OF SAFFLOWER AND EVALUATION OF THEIR USAGE POTENTIAL IN PHYTOREMEDIATION

Uğurcan BARAN

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Yasemin EKMEKÇİ

December 2018, 101 pages

Nickel (Ni^{+2}) is a micronutrient that is essential for plant growth and development, and its high concentrations have highly toxic effects. In this study, the effects of nickel on the growth and photochemical activities of domestic (*Carthamus tinctorius* L., Olas) and wild (*Carthamus oxyacantha* M. Bieb) safflower genotypes and the potential of accumulation with the nickel tolerance of the genotypes were aimed. 14 day-old seedlings grown in climate cabinet with controlled conditions (16/8 hour photoperiod, $180\text{-}200 \mu\text{mol. m}^{-2}\text{s}^{-1}$ light intensity, $23\text{-}25 \pm 1$ °C day/night temperature, $50 \pm 5\%$ humidity) were exposed to different nickel concentrations [control, 0.5mM, 0.75mM and 1.0mM ($\text{NiCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$)] for 7 days.

In both domestic and wild genotypes, the biomass of root and shoot decreased depending on nickel accumulation, and this decrease was found to be higher in the

roots. Furthermore, both genotypes translocated the nickel which uptaken by their roots to the leaves by approx. 8-18%. Although a small amount of nickel was transferred to the leaves, photosynthetic apparatus were adversely affected. Toxic nickel levels caused the changes in the specific (ABS/RC , TR_O/RC , ET_O/RC , RE_O/RC and DI_O/RC) and phenomenological energy fluxes (ABS/CS , TR_O/CS_O , ET_O/CS_O and DI_O/CS_O), quantum yields (ϕ_{P_0} and ϕ_{DI_0}), the efficiencies of PSII's donor (V_K/V_J) and PSI's acceptor (ΔV_{IP}) sides in the thylakoid membranes. These changes led to a significant decrease in the photosynthetic performance (PI_{ABS} ve PI_{TOP}) of the genotypes. However these negative effects of nickel were not at a level to destroy the functionality of the photosystems, even though it affected membrane integrity and the amount of pigments in the antenna and active reaction centers.

While superoxide (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2) which are oxidative damage products caused by toxic nickel levels were detoxified by high activity of superoxide dismutase (SOD) and guaiacol peroxidase (POD) enzymes in the roots of genotypes. In addition to these enzymes, ascorbate peroxidase (APX) and glutathion reductase (GR) activities and the increase in the amount of anthocyanins and flavonoids being accessory pigments were determined to have impact on the defence system in the leaves.

Wild and domestic genotypes showed similar tolerance behavior against to nickel toxicity. It may be possible to take advantage of the potential usage of the safflower plants for remediation (phytostabilization) in soils contaminated with nickel due to accumulation in large amount of nickel in the roots of genotypes.

Key Words: Antioxidant enzymes, *Carthamus tinctorius*, *Carthamus oxycantha*, Nickel, Photochemical activity, Safflower, Tolerance

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde kendisinden her gün yeni bilgiler öğrendiğim, daima ilgisini ve desteğini gördüğüm, derin bilgi birikimi, tecrübeleri ve olanaklarını benimle paylaşan, sadece akademik olarak değil insani yönüyle de örnek aldığım ve öğrencisi olarak ekolünde yetişmekten gurur duyduğum tez danışmanım, Değerli Hocam Sayın Prof.Dr. Yasemin EKMEKÇİ'ye,

Tez çalışmam sürecinde bana eşsiz bilgisi ve deneyimleriyle yol gösteren, içten kişiliği ve pozitif enerjisi ile motive eden çok kıymetli Hocam Sayın Doç.Dr. Nuran ÇİÇEK'e,

Çalışmamın özellikle deneysel aşamasında laboratuvar tecrübelerini paylaşan ve her türlü sorumu sabırla cevaplayıp tezimin son aşamasına kadar yardımlarını gördüğüm Arş.Gör.Dr. Şeküre ÇULHA ERDAL ve Arş.Gör.Dr. Suna BALKAN NALÇAYI'ye

Atomik absorpsiyon spektrometresi ile metal analizlerinde yardımcı olan Sayın Öğr.Gör. Dr. Yasemin ÖZTÜRK'e ve örneklerinin yaş yakılmasında kül fırınına kullanmama olanak sağlayan Sayın Doç.Dr. Aysun KILIÇ SÜLOĞLU'na

Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde Araştırma görevlisi olarak göreve başladıktan sonra tezimin kalan kısmını tamamlamam için her türlü desteğini gördüğüm A.Ü. Fen Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Ahmet AKSOY'a,

Tezimin deneysel çalışmalar kısmında yardımlarını gördüğüm arkadaşlarımdan Sevgili Fatih KISAK, İrem GENÇAY, Kübra ULUTAŞ ve diğer arkadaşlarım ile emeği geçen tüm özel çalışma öğrencilerine,

Her zaman yanımda olan ve maddi manevi desteğini esirgemeyen biricik anne ve babama, sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER.....	ix
ŞEKİLLER.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Aspir (<i>Carthamus tinctorius</i> L.) Bitkisi	6
2.2. Ağır Metal Stresi	8
2.3. Ağır Metal Olarak Nikel	8
2.4. Nikelin Bitki Bünyesine Alımı	10
2.5. Artan Nikel Düzeylerinin Bitkilerdeki Etkileri	12
2.5.1. Morfolojik Değişimler	12
2.5.2. Metabolik Değişimler	13
2.5.3. Oksidatif Değişimler	17
2.6. Bitkilerin Nikel Zararlarına Karşı Oluşturduğu Yanıtlar	19
2.6.1. Sakınma (Kaçınma)	19
2.6.2. Tolerans (Dayanım)	20
2.6.2.1. Ligandlara Bağlanma.....	20
2.6.2.1.2. Metalotiyoninler	21
2.6.2.1.3. Bazı Organik Asitler (Tiyol Olmayan Metal Şelatörler).....	21
2.6.2.2. Antioksidan Savunma Sistemi	22
2.7. Metal Kirliliğinin Giderilme Yolları: Fitoremediasyon	25
2.7.1. Fitoekstraksiyon	26
2.7.2. Rizofiltrasyon.....	26
2.7.3. Fitovolatilizasyon	27
2.7.4. Fitodegradasyon	28
2.7.5. Fitostabilizasyon.....	28
2.8. Ağır Metal Biriktirebilen Bitkiler	28

2.8.1. Metallofitler	28
2.8.2. Hiperakümülatörler	29
2.9. Fitoremediasyon Yönteminin Avantaj ve Dezavantajları	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM	32
3.1. Bitki Materyali	32
3.1.1. Bitki Yetiştirme Yöntemi	32
3.2. Ölçüm ve Analizler	33
3.2.1. Morfolojik Ölçümler	33
3.2.1.1. Kök ve Sürgün Uzunlukları ile Yaprak Sayısı Ölçümleri	34
3.2.1.2. Kök ve Sürgünlerin Yaş ile Kuru Ağırlık Ölçümü	34
3.2.2. Fizyolojik ve Biyokimyasal Analizler	35
3.2.2.1. Nikel Birikiminin Belirlenmesi	35
3.2.2.2. Polifazik Klorofil <i>a</i> Floresans Kinetikleri Ölçümü	35
3.2.2.3. Fotosentetik Pigment Miktarının Belirlenmesi	38
3.2.2.4. Oransal Su İçeriğinin Belirlenmesi	38
3.2.2.5. İyon Sızıntısı Oranının Belirlenmesi	39
3.2.2.6. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) Miktarının Belirlenmesi	39
3.2.2.7. Antosiyanin ve Flavonoid Miktarının Belirlenmesi	39
3.2.2.8. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	40
3.2.2.8.1. Protein Miktarının Belirlenmesi	40
3.2.2.8.2. Toplam Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Belirlenmesi	40
3.2.2.8.3. Toplam Peroksidaz (POD) Aktivitesinin Belirlenmesi	41
3.2.2.8.4. Toplam Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesinin Belirlenmesi ..	41
3.2.2.8.4. Toplam Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesinin Belirlenmesi.	
3.2.3. İstatistiksel Analizler	42
4. BULGULAR	43
4.1. Aspir Genotiplerde Artan Nikel Düzeylerinin Morfolojik Değişimler Üzerine Etkileri	43
4.1.1. Kök ve Sürgün Uzamasındaki Değişimler	43
4.1.2. Kök ve Sürgün Yaş Ağırlıklarındaki Değişimler	43
4.1.3. Kök ve Sürgün Kuru Ağırlıklarındaki Değişimler	46
4.1.4. Nikelin Yaprak Sayısı Üzerine Etkisi	48

4.2. Aspir Genotiplerde Artan Nikel Düzeylerinin Fizyolojik ve Biyokimyasal Değişimler Üzerine Etkileri.....	49
4.2.1. Aspir Genotiplerin Farklı Dokularındaki Nikel Akümülayonu	49
4.2.2. Fotokimyasal Aktivitedeki Değişimler	52
4.2.3. Fotosentetik Pigment İçeriğindeki Değişimler	57
4.2.3.1.Klorofil a (kl a) miktarı	57
4.2.3.2. Klorofil b (kl b) miktarı	58
4.2.3.3. Toplam klorofil (kl a+b) miktarı	58
4.2.3.4. Toplam karotenoid (x+c) miktarı	58
4.2.4. Oransal Su İçeriğindeki Değişimler	59
4.2.5. İyon Sızıntısı Miktarındaki Değişimler	61
4.2.6. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) Miktarındaki Değişimler	61
4.3. Aspir Genotiplerinde Artan Nikel Düzeylerinin Savunma Sistemleri Üzerine Etkisi	62
4.3.1. Antosiyanin ve Flavonoid Pigment İçeriklerindeki Değişimler	62
4.3.2. Enzimatik Antioksidan Enzim Aktivitelerindeki Değişimler	63
4.3.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi	63
4.3.2.2. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi	64
4.3.2.3. Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesi	65
4.3.2.4. Peroksidaz (POD) Aktivitesi	67
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	69
KAYNAKLAR.....	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Nikelin bitki bünyesindeki translokasyon indeksi.....	50
Çizelge 4.2. Artan nikel düzeylerine maruz kalan aspir genotiplerinin yaprak dokularındaki fotosentetik pigment içerikleri.....	60



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. FAOSTAT'ın 2016 verilerine göre dünyada aspir üreten ülkelerin üretim yüzdeleri.	6
Şekil 2.2. Aspir bitkisi (<i>Carthamus tinctorius</i> L.).	7
Şekil 2.3. Bitkilerde nikelin alınımı, taşınımı ve dağılımı.	11
Şekil 2.4. Bitkilerde nikelin çimlenme, solunum, fotosentez, transpirasyon ve besin alımına etkisi [(-) azalma/inhibisyon; (+) artma/aktivasyon].....	13
Şekil 2.5. Fotosentezin ışık reaksiyonları üzerine ağır metallerin etkisi	15
Şekil 2.6. Bitki hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin oluşum reaksiyonları	18
Şekil 2.7. Bitkilerde metal zararına karşı oluşturulan başlıca yanıtlar ve aralarındaki ilişkiler. (A) Hücre çeperine ve kök sızıntılarına metal iyonu bağlanması; (B) Plazma membranından metal girişinin azaltılması; (C) Membrandan apoplasta pompalanan akış (ATP-bağlı ABC kaset ve P1B-ATPaz Taşıyıcıları); (D) Fitoşelatinler (PC), Metalotiyoninler (MT), Organik asitler (OA) ve aminoasitler gibi ligantlar ile ağır metal (HM)'lerin sitozolde şelatlanması; (E) ROT savunma mekanizması [Antioksidant enzimler (SOD, APX, GR, POD, GPX ve CAT) ve enzim olmayanlar (GSH ve GSSG)]; (F) Hormon sinyal yolağı; (G) Taşıma ve vakuolde kompartmanlaşma [(ATP-bağlı ABC kaset ve P1B-ATPaz Taşıyıcıları; NRAMP (doğal dirençlilik ile ilişkili makrofaj protein), CAX (katyon/proton değiştirici)]. Metal iyonları siyah daireler şeklinde gösterilmektedir.	23
Şekil 2.8. Reaktif oksijen türevlerinin (ROT) oluşumu ve antioksidan enzimler tarafından bertaraf edilme yolları	24
Şekil 2.9. Bitkilerde fitoremediasyon, hiperakümüülasyon ve nikel toleransında yer alan çeşitli mekanizmalar.	27
Şekil 3.1. Bitkilerin yetiştirildiği su kültürü sistemi ve iklim kabininden görüntüler .	32
Şekil 3.2. Deneme planı	33
Şekil 3.3. Aspir genotiplerine ait morfolojik ölçümleri yapılan örneklerden görüntüler	34
Şekil 3.4. a) HandyPEA cihazının genel görünümü, b) Biolyzer HP3 programı ile analiz görüntüsü ve c) Bitkiler tarafından sergilenen tipik polifazik klorofil a floresansı	36

Şekil 4.1. Aspir genotiplerinde nikel konsantrasyonlarının kök (A) ve sürgün (B) uzaması üzerine etkisi	44
Şekil 4.2. Nikel konsantrasyonlarının aspir genotiplerinin kök (A) ve sürgün (B) yaş ağırlığı üzerindeki etkisi.	45
Şekil 4.3. Nikel konsantrasyonlarının aspir genotiplerinin kök (A) ve sürgün (B) yaş ağırlık tolerans indeksi (YATI) üzerindeki etkisi.....	46
Şekil 4.4. Nikel konsantrasyonlarının aspir genotiplerinde kök (A) ve sürgün (B) kuru ağırlığı üzerindeki etkisi.	47
Şekil 4.5. Nikel konsantrasyonlarının aspir genotiplerinde kök (A) ve sürgün (B) kuru ağırlık tolerans indeksi (KATI) üzerine etkisi	48
Şekil 4.6. Nikel düzeylerinin aspir genotiplerinin yaprak sayısı üzerine etkisi	49
Şekil 4.7. Aspir genotiplerinde kök (A) ve gövde (B) ve yaprak (C) dokularındaki nikel akümüasyonu.	51
Şekil 4.8. Artan nikel düzeylerinin yerel (A) ve atasal (B) aspir genotiplerinin yapraklarındaki karakteristik polifazik O-J-I-P eğrisi üzerine etki.	52
Şekil 4.9. Artan nikel düzeylerinin aspir genotiplerinin spesifik enerji akışlarına ve diğer bazı JIP parametrelerine etkisi	55
Şekil 4.10. Nikel uygulamalarının yerel (A) ve atasal (B) genotiplerin fenomenolojik enerji akışları üzerine etkisi	56
Şekil 4.11. Farklı nikel düzeylerinde aspir genotiplerinin fotosentetik performansları	57
Şekil 4.12. Nikel konsantrasyonlarının aspir genotiplerinin yaprak su içeriği üzerine etkisi	59
Şekil 4.13. Nikel uygulamalarının aspir genotiplerinin yapraklarındaki iyon sızması üzerine etkisi.....	61
Şekil 4.14. Nikel konsantrasyonlarının aspir genotiplerinde H ₂ O ₂ miktarı üzerine etkisi.	62
Şekil 4.15. Nikel konsantrasyonlarının aspir genotiplerinde antosiyanin (A) ve flavonoid (B) içeriği üzerine etkisi.	63
Şekil 4.16. Nikel konsantrasyonlarının aspir genotiplerinde kök (A) ve yaprak (B) dokularındaki toplam süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi üzerine etkisi.	65

Şekil 4.17. Nikel konsantrasyonlarının aspir genotiplerinde kök (A) ve yaprak (B) dokularındaki toplam askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi üzerine etkisi	66
Şekil 4.18. Nikel konsantrasyonlarının aspir genotiplerinde kök (A) ve yaprak (B) dokusundaki toplam glutatyon redüktaz (GR) aktivite üzerine etkisi.	67
Şekil 4.19. Nikel konsantrasyonlarının aspir genotiplerinde kök (A) ve yaprak (B) dokusundaki toplam peroksidaz (POD) aktivitesi üzerine etkisi.	68



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	Santigrat derece
%	Yüzde
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
m	Metre
m ²	Metrekare
mA	Miliamper
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
L	Litre
ppm	Milyonda bir birim
rpm	Dakikadaki devir sayısı
s	Saniye
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µmol	Mikromol

Kısaltmalar

ABS/RC	Aktif reaksiyon merkezinin verimli anten büyüklüğü
ANOVA	Varyans analizi (Analyses of variance)
AÖF	Anlamlı önemli fark
APX	Askorbat peroksidaz
AsA	Askorbik asit
ATP	Adenozin trifosfat
BBTI	Bitki boyu tolerans indeksi

BSA	Sığır serum albümini (Bovine serum albumin)
CAT	Katalaz
Cd	Kadmiyum
Cr	Krom
<i>C ox.</i>	<i>Carthamus oxyacantha</i>
Cu	Bakır
DHAR	Dehidroaskorbat redüktaz
DI ₀ /RC	Bir aktif reaksiyon merkezinin enerji dağılımı
DTT	Dikloro difenil trikloroethan
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ET ₀ /ABS(ϕE_0)	Elektron transportunun maksimum verimi (PHI(E ₀))
ET ₀ /RC	Reaksiyon merkezi başına elektron transportu
ET ₀ /TR ₀ (ψ_0)	Q _A -'dan elektron transport zincirine bir elektronu hareket ettirme etkinliğini
FAOSTAT	Food and Agriculture Organization of the United Nations
F_0	Karanlığa adapte olmuş yapraklardaki minimum fluoresans
F_M	Karanlığa adapte olmuş yapraklardaki maksimum fluoresans
F_V	Karanlığa adapte olmuş yapraklardaki değişken fluoresans
$F_V/F_M(\phi_{P_0})$	PSII'nin potansiyel fotokimyasal etkinliği (TR ₀ /ABS)
F_V/F_0	PSII'de O ₂ oluşturan kompleksin etkinliği
F_V'/F_M'	PSII'nin eksitasyon enerjisini yakalama etkinliği
F_0'	Işık ile doygun durumdaki minimum fluoresans
F_M'	Işık ile doygun durumdaki maksimum fluoresans
F_s	Işık ile adapte edilmiş yapraklardaki dinamik denge durumundaki fluoresans
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	İndirgenmiş glutasyon
GST	Glutasyon s-transferaz
GSSG	Yükseltgenmiş glutasyon
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HA	Turgor durumundaki ağırlık (Hidrate ağırlık)
HCl	Hidroklorik asit
Hg	Cıva
KA	Kuru ağırlık

KATI	Kuru ağırlık tolerans indeksi
KSI	Klorofil stabilite indeksi
KH_2PO_4	Potasyum di hidrojen fosfat
MDA	Malondialdehit
MDHAR	Monodehidroaskorbat redüktaz
Mg	Magnezyum
MgCl_2	Magnezyum klorür
MT	Metallotiyonein
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid
Na_2EDTA	Di sodyum etilendiamin tetraasetik asit
NBT	Nitrobluetetrazolyum
Ni	Nikel
OSİ	Oransal su içeriği
OEC	Oksijen Çıkaran Kompleks
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Süperoksit radikali
$\text{OH}^{\cdot}$	Hidroksil radikali
PC	Fitoşelatin
PCS	Fitoşelatin sentaz
$\text{PI-PI}_{\text{abs}}$	Performans indeksi
PI_{top}	Toplam performans indeksi
POD	Peroksidaz
PSI	Fotosistem I
PSII	Fotosistem II
PVP	Polivinilpirolidon
PQ	Plastokinon
$\text{RE}_0/\text{ABS} (\varphi R_0)$	Q_A 'dan ferrodoksine elektron transportunun kuantum verimi
$\text{RE}_0/\text{ET}_0 (\delta R_0)$	İndirgenmiş sistemler arası elektron alıcılarının bir elektronu, PSI son elektron alıcılarına hareket ettirme etkinliği
ROT	Reaktif Oksijen Türevleri
SOD	Süperoksit dismutaz
SPSS	Sosyal bilimler için istatistik paket programı (Statistical Package for the Social Sciences)
TBA	Tiyobarbütirik asit
TCA	Trikloroasetik asit

UV	Ultraviyole
YA	Yaş ağırlık
YATI	Yaş ağırlık tolerans indeksi
Zn	Çinko



1.GİRİŞ

Son zamanlarda, artan endüstriyel faaliyetler, fosil yakıtların üretimi, pestisit ve gübrelerin tarımda istikrarlı kullanımı ve buna bağlı olarak oluşan sera gazı emisyonları ile birlikte ağır metal kirliliği önemli bir çevresel tehdit olarak ortaya çıkmaktadır (Rubio ve ark., 1994; Duman ve Öztürk, 2010; He ve ark., 2012; Roccotiello ve ark., 2016). Ağır bir metal olan nikel (Ni), yeryüzünde genellikle sülfatlar ve oksitler halinde mevcut olup, çoğunlukla diğer bazı metaller gibi serpantin topraklarda yoğun bir şekilde bulunmaktadır. Bazı bitki besinlerince (N, P ve K gibi) noksan içeriğe sahip olan bu serpantin topraklar dünyada ve ülkemizde geniş yayılım alanları göstermektedir (Chen, Huang ve Liu, 2009; Yaman ve ark., 2014). Toprakta bulunan diğer ağır metaller gibi nikel de gerek doğal süreçler (serpantin kayaçların yıkanması, orman yangınları, volkanik patlamalar gibi) ile gerekse antropojenik etkiler (endüstriyel faaliyetler; madencilik, tekstil ve çelik sanayi, atık materyal) ile yer altı sularının ve verimli tarım alanlarının ağır metallerle kirlenmesine yol açmaktadır (Amari ve ark., 2016).

Bitkiler için esansiyel bir element olan nikel (Ni^{+2}), çok düşük konsantrasyonlarda bitki büyüme ve gelişmesi için gereklidir (Ghasemi ve ark., 2014; Anjum ve ark., 2015a; Roccotiello ve ark., 2016). Ancak bitkilerin topraktan nikeli çok düşük veya yüksek konsantrasyonlarda alımı, noksanlık veya toksisite semptomlarının oluşmasına neden olabilir (Cempel ve Nickel, 2006). Topraktan çoğunlukla iyon formunda bulunan nikelin (Ni^{+2}) kökler tarafından alımı pasif difüzyon veya aktif taşıma ile gerçekleşmektedir. Ayrıca bazı araştırmacılara göre nikelin bitki metabolizmasına aktiveleştirilmiş kalsiyum kanalları vasıtasıyla da alındığı bildirilmiştir (Seregin ve Kozhevnikova, 2006). Topraktaki veya besin çözeltisindeki nikelin formu, konsantrasyonu ve nikelin alımında aktif/pasif taşınım arasındaki oran bitki çeşidine, gelişim evresine ve konsantrasyona bağlı olarak değişim gösterir (Chen, Huang ve Liu, 2009). Bununla birlikte nikel, iyon formunda bitki bünyesine yarışmalı olarak diğer metal taşıyıcılarından (ZIP, NRAMP vb.) ve kanallardan girebilmekte olup, girişinin diğer metallerden (Fe, Cu, Mg vb.) daha kolay olduğu bildirilmiştir (Rubio ve ark., 1994; Guerinot, 2000). Bitkiler tarafından metal alınımını etkileyen başlıca çevresel faktörler ise; toprak asiditesi, katyon değişim kapasitesi,

organik madde ve kireç içeriği, nem potansiyeli, granülometrik kompozisyon ile makro ve mikro besin konsantrasyonudur (Seregin ve Kozhevnikova, 2006). Bunun yanı sıra nikel köklerden sürgünlere ve yapraklara, ksilem aracılığıyla iyon formunda transpirasyon akımı ile; floem aracılığıyla ise ligandlarla uzak mesafelere taşınabilmektedir (Chen, Huang ve Liu, 2009). Nikelin kritik konsantrasyon düzeyi duyarlı bitkilerde, yaklaşık 10 µg.g kuru ağırlık⁻¹ (Kozlow, 2005), orta düzeyde toleranslı bitkilerde >50 µg.g kuru ağırlık⁻¹ ve nikel biriktiren türlerde (*Alyssum* L. ve *Thlaspi* L. gibi) ise yaklaşık >1000 µg.g kuru ağırlık⁻¹ olduğu bildirilmiştir (Yusuf ve ark., 2011).

Nikel toksisitesinin bitki büyüme ve gelişmesi ile fotosentetik aktiviteyi olumsuz yönde etkilediğini bildiren pek çok çalışma bulunmaktadır (Chen, Huang ve Liu, 2009; Yusuf ve ark., 2011; Rubio ve ark., 1994; Sreekanth ve ark., 2013). Bu etki öncelikle kloroplast (grana ve tilakoidlerinin sayısının azalması ve yapılarının bozulması) ve elektron taşıma sisteminde yer alan komplekslerin [fotosistem I (PSI), fotosistem II (PSII), plastokinon (PQ), sitokrom b6f, plastosiyanin (PC), ışık toplayıcı kompleks (LHC) ve oksijen oluşturan kompleks (OEC)] yapılarını bozarak ve klorofil biyosentezini inhibe ederek ortaya çıkmaktadır. Buna bağlı olarak, Calvin döngüsü enzimlerinin (rubisko, 3-fosfoglisarat kinaz, fruktoz 1-6 bisfosfataz, aldolaz gibi) aktivitesinde ve CO₂ alımında da azalmalar olduğu bildirilmiştir (Sreekanth ve ark., 2013). Özellikle PSII'nin zarar görmesi ve CO₂ alımındaki sınırlamalar neticesinde fotosentez aktivitesindeki azalmanın, bitki büyümesinin sınırlanması ve dolayısıyla bitki biyokütlesinin belirgin şekilde azaldığını gösteren pek çok çalışma mevcuttur. Ayrıca aşırı nikel birikiminin, bitkide morfolojik olarak klorozis ve nekrozise de neden olduğu bildirilmiştir (Nagajyoti, Lee ve Sreekanth., 2010; Ahmad ve Ashraf, 2011; Sreekanth ve ark., 2013). Nikel toksisitesinin fotosentetik aktiviteyi olumsuz etkilemesinin diğer bir sebebi de oksidatif stresi tetiklenmesidir. Stres koşullarına bağlı olarak PSII'nin aşırı uyarılması fotosentetik fonksiyonların bozulmasına ve reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşmasına neden olur (Sperdouli ve Moustakas, 2012). Moleküler O₂'nin H₂O oluşturmak için enerji veya elektron transferinin gerçekleştirdiği indirgenme reaksiyonlarının ara ürünleri olan ve stres koşullarında sentezlenme miktarı artan ROT'lar [singlet oksijen (¹O₂), süperoksit molekülü (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikali (OH⁻)]; yapraklarda membran hasarına

yol açarak lipid peroksidasyona neden olmaktadır (Breusegem ve ark., 2001; Cobbet ve Goldsbrough, 2002; Apel ve Hirt, 2004; Mishra ve Dubey, 2006; Jajic, Sarna ve Strzalka, 2015; Yadav ve Sharma, 2016). Bu yolla nikelin bitki bünyesinde protein, lipid ve nükleik asit gibi bazı yapısal bileşenlerin oksitlenmesine neden olduğu, hücre ve organel membranlarında kantitatif ve kalitatif değişiklikler meydana getirdiği ve çeşitli metabolik (karbon, azot metabolizması gibi) süreçleri olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir (Nagajyoti, Lee ve Sreekanth., 2010; Ahmad ve Ashraf, 2011). Bitkiler ROT'ları ortamdaki uzaklaştırmak için süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR), katalaz (CAT), peroksidaz (POD) gibi enzimatik ve askorbik asit (AsA), glutatyon (GSH), antosiyanin ve karotenoid gibi düşük moleküler ağırlıklı enzimatik olmayan antioksidanlardan oluşan savunma sistemleri geliştirerek; hücrelerini oksidatif hasara karşı koruyabilmektedirler. Çeşitli bitkilerde, nikel toksisitesine karşı tolerans kazanılmasında artan antioksidan savunma sistemlerinin önemli role sahip olduğu birçok çalışma ile ortaya konulmuştur (Duman ve Öztürk, 2010; Israra ve ark., 2011; He ve ark., 2012). Bununla birlikte bitkilerin nikelin oluşturduğu toksik etkilere karşı koyabilmek için daha farklı mekanizmalara da sahip olduğu bilinmektedir. Bunlar metal alımından sakınma (Ayhan, Ekmekçi ve Tanyolaç, 2006), ısı şoku proteinleri ile proteinleri koruma ve vakuolde alıkonmadır (Hall, 2002; Anjum ve ark., 2015a). Nikelin vakuole taşınımı, burada detoksifikasyonu ve floem aracılığıyla uzak mesafelere transferinde rol alan sisteince zengin tiyol grupları içeren en iyi tanımlanmış ağır metal bağlayıcı ligandlar; fitoşelatin (PC) ve metallotiyoneinlerdir (MT). PC, fitoşelatin sentaz (PCS) enzimi ile sentezlenir. Hücrede PCS her zaman belirli bir konsantrasyonda inaktif halde bulunur, ağır metal sinyali ile aktif hale geçer ve glutatyondan (GSH) PC'yi sentezler. PC'lerden farklı olarak; MT'ler sistein başına metal taşıma kapasitesi daha düşük olup, gen kodlu olarak sentezlenirler ve metalleri sitozolde bağlayabilir, vakuole hapsedebilir ya da hücre dışına atabilirler ve böylece metal detoksifikasyonunda görev alırlar (Cobbet ve Goldsbrough, 2002; Yadav ve Sharma, 2016; Anjum ve ark., 2015b; Jajic, Sarna ve Strzalka, 2015).

Nikel veya diğer ağır metallerle kirlenmiş alanların iyileştirilmesinde, çevreyle uyumlu ve etkin metotların geliştirilmesi, yeraltı suyu ve tarımsal ürünlerin kalitesinin korunmasında oldukça önemlidir. Nikel ile kontamine olmuş doğal alanların arındırılması ve temizlenmesi çeşitli yöntemlerle (kimyasal, fiziksel ve biyolojik)

mümkündür. Metallerle kirlenmiş alanların temizlenmesinde bitkilerin kullanıldığı fitoremediasyon, geleneksel mühendislik yöntemlerine göre düşük maliyetli olması, herhangi bir yan ürün oluşturmaması ve ortamdan uzaklaştırılan metallerin tekrar elde edilebilmesi (fitomining) bakımından remediasyon yöntemleri arasında öne çıkmaktadır (Peuke ve Rennenberg, 2005; He ve ark., 2012). Özellikle serpantin tipi topraklarda ağır metal biriktirebilen ve hayat döngüsünü etkilenmeden sürdürebilen Brassicaceae ve Asteraceae gibi familyalara ait 570 bitki türü saptanmıştır ve bunların yaklaşık 450 tanesi nikel hiperakümülatörüdür (Çelik, J., Aksoy, A. ve Leblebici, Z, 2018). Bunun yanı sıra, bazı yağlı tohumlu bitkilerin biyoyakıt üretme potansiyellerine ek olarak ağır metal biriktirme özelliklerinin de olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Bauddha ve ark., 2015; Tripathi Edrisi ve Abhilashn, 2016). Avrupa Enerji politikası, fosil yakıtların yenilenebilir kaynaklar ile kademeli olarak yer değiştirilmesini teşvik etmektedir. Enerji ihtiyacının karşılanması için alternatif kaynakların kullanımı, artan petrol maliyetleri ile sera gazlarının emisyonunun azaltılmasına katkıda bulunacaktır. Bu bağlamda ağır metal ile kirlenmiş alanlarda yetişen yüksek biyokütleli bitkilerin alan iyileştirilmesi ve biyoenerji üretimi açısından bazı avantajlara sahip olduğu bildirilmiştir (Llugany ve ark., 2012). Ülkemizde de yetiştirilen yüksek biyokütle oranına sahip biyoenerji üretiminde kullanılan aspir bitkisinin, nikel kirliliğinin remediasyonunda kullanılma potansiyelinin değerlendirmesi oldukça önemlidir (Chami ve ark., 2015).

Asteraceae familyasından aspir (*Carthamus tinctorius* L.), yüksek omega-9 (%16-20 oleik asit) ve omega-6 (%71-75 linoleik asit) içeriği ile dünyanın en eski yağlı tohumlu bitkilerinden biridir. Bunun yanı sıra, aspir bitkisinden elde edilen biyoyakıtın ticari ölçekte dizel yakıtlara fiziksel ve kimyasal özelliklerin benzemesi ile dizel motorlar için alternatif yakıt potansiyeli olabileceği ileri sürülmektedir (Dorado ve ark., 2004). Shi ve arkadaşları (2010), *C. tinctorius*'un kadmiyum metale karşı toleranslı olduğunu ve fitoremediasyonda başarılı bir şekilde kullanılabileceğini bildirmiştir. Ancak, aspir bitkisinin nikel ile kirlenmiş alanların fitoremediasyonunda değerlendirilmesi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Shi ve ark., 2010; Chami ve ark., 2015).

Bu tez kapsamında, yağ ve biyoenerji üretiminde kullanılan yağlı tohumlu aspir bitkisinin yerel (*Carthamus tinctorius*) ve ıslah programlarında kullanılan ve gen

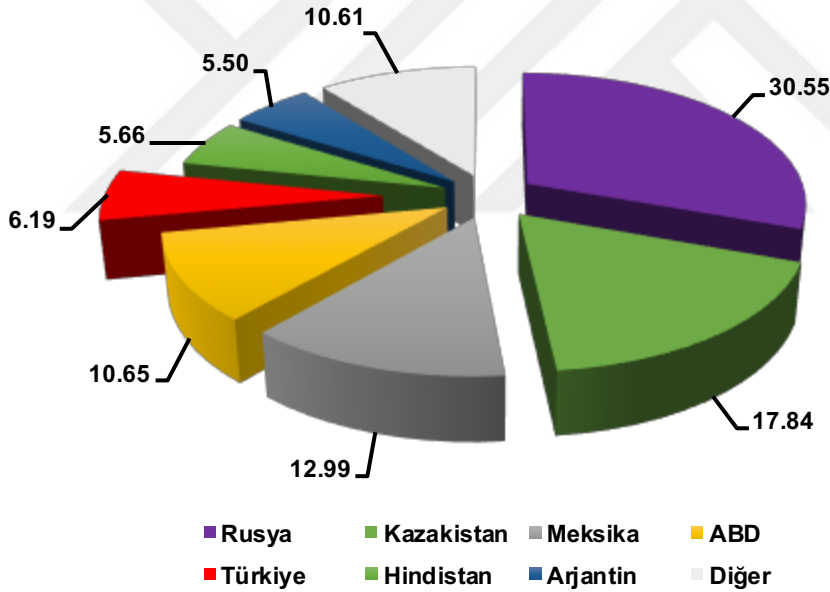
kaynağı olan atasal (*Carthamus oxyacantha*) genotiplerinin nikel toksisitesine karşı oluşturduğu cevaplar karşılaştırılmalı olarak morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal parametreler ile incelenmiş ve nikel fitoremediasyonunda kullanılma potansiyelleri değerlendirilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) Bitkisi

Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) Asteraceae familyasından yağlı tohumlu bir bitkidir (Koti ve ark., 2014; Pearl ve ark., 2014). Dünyada 25 taksonu bulunan *Carthamus* cinsinin Türkiye'de bulunan atasal türü *C. oxyacantha* (2n=24) olup, yerel olarak ekimi de yapılan türü ise *C. tinctorius* (2n=24)'dur (Meshram ve ark., 2011; Çulha-Erdal, 2017). Güney Asya kökenli olan aspir bitkisinin dünyada Rusya, Kazakistan, Hindistan Meksika, Arjantin, ABD ve Türkiye'de üretimi yaygın olarak yapılmaktadır. FAOSTAT'ın 2016 verileri; Türkiye'de 39.352 ha alanda aspir ekimi yapıldığını ve 58.000 ton üretim ile dünyada 6. sırada yer aldığını göstermektedir (Şekil 2.1; Anonim, 2018).



Şekil 2.1. FAOSTAT'ın 2016 verilerine göre dünyada aspir üreten ülkelerin üretim yüzdeleri.

Aspir bitkisi oldukça iyi dallanmış, yoğun toprak üstü aksamına sahip vejetasyon süresi yaklaşık 120-140 gün olan tek yıllık, bir uzun gün bitkisidir (Babaoğlu, 2007; Hamamci ve ark., 2011; Pace ve ark., 2015). Farklı renkte kapitulum çiçek durumuna sahip olan aspir bitkisinin meyve tipi akendir (Şekil 2.2). Olgun akenlerin

yaklaşık olarak %30 ile 60'ı perikarp (Dajue ve Mündel, 1996) kalan diğer kısmını ise yağ (%30- 45, Smith ve Jimmerson, 2005), ham lif (%30-40), protein (%15 ile 20, Çamaş, Çırak ve Esendal, 2012) ve su (%5- 8, Gecgel ve ark., 2007) içeren tohum oluşturmaktadır.

Dünyanın en eski yağlı tohumlularından olan ve yağ üretimi için yetiştirilen aspir, yüksek omega-9 (%16-20 oleik asit) ve omega-6 (%70-75 linoleik asit) içeriğine sahiptir. Özellikle linoleik asit içeriği diğer yağlı bitkilerine (mısır, fındık, zeytin, ayçiçeği, kolza gibi) oranla daha yüksektir (Oelke ve ark., 1992; Cosge ve ark., 2007). Yağ içeriği genotipe, çevresel koşullara ve tarımsal uygulamalara göre değişebilen aspir tohumları (Koutroubas ve ark., 2009), aynı zamanda iyi bir E vitamini kaynağıdır (Matthaus ve ark., 2015). Bununla birlikte, tohumlarında yağda çözünebilen ve antioksidan aktiviteye sahip tokoferoller de içermektedir (Velasco, Perez-Vich ve Fernandez-Martinez, 2005).



Şekil 2.2. Aspir bitkisi (*Carthamus tinctorius* L.) (Anonim web görüntü).

Bir yağ bitkisi olan aspir bitkisi aynı zamanda biyodizel üretiminde de değerlendirilmektedir. Shi ve arkadaşları (2010) ağır metal biriktirme potansiyeline sahip Brassicaceae familyasına ait türlerin yanı sıra, bazı yağlı tohumlu ve biyoyakıt bitkilerin kullanımının hem alan iyileştirilmesi hem de biyoenerji üretimi bakımından avantajlara sahip olduğu bildirilmektedir (Clemens, Palmgren ve Kramer, 2002; Bauddha ve ark., 2015; Chami ve ark., 2015; Tripathi et al., 2016). *C. tinctorius*'un kadmiyum metale karşı toleranslı olduğunu ve fitoremediasyonda başarılı bir şekilde kullanılabileceğini bildirmiştir (Chami ve ark., 2015). Bununla birlikte aspir

bitkisinin nikel toleransı ve nikel birikimini değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır.

2.2. Ağır Metal Stresi

Biyolojik olarak stres kavramını ilk kez Levitt 1980 yılında “canlı organizmalar için uygun olmayan çevre koşulları” olarak tanımlamıştır (Gaspar ve ark., 2002). Canlılar doğaları gereği dış çevre ile sürekli ilişki halindedir. Çevre şartlarının bir bitkinin normal büyüme ve gelişmesini olumsuz yönde etkileyecek kadar değişmesi halinde bitkide meydana gelen duruma stres denir. Bitkiler yaşamları sürecinde abiyotik (ağır metal, kuraklık, tuzluluk, yüksek/düşük sıcaklık, kimyasal vb.) ve biyotik (patojen, virüsler, parazitler gibi) stres faktörleri ile karşı karşıya kalmaktadırlar. Abiyotik stresler, dünya çapında bitkisel verim kaybının birincil nedeni olup, tarımsal bitkilerindeki ortalama ürün verimini %50'den fazla azaltmaktadır (Wang ve ark., 2004).

Bitkinin normal büyüme ve gelişim sürecinde metabolik faaliyetlerini verimli şekilde yürütmek amacıyla gereksinim duyduğu mikro besin elementlerinden olan, bazı ağır metaller [bakır (Cu), nikel (Ni) ve çinko (Zn)] mutlaka ama az miktarda gerekli olmasına rağmen; analiz sonuçları bu metallerin yüksek konsantrasyonlarda bitkiler için önemli derecede zararlı olduğunu ortaya koymaktadır. Bunlara ek olarak; kadmiyum, kurşun ve civa gibi diğer esansiyel olmayan ağır metal iyonları ise yüksek oranda reaktiftir ve canlı hücreler için oldukça toksik olabilmektedir. Diğer yandan bitkiler, tüm canlı organizmalar gibi hem esansiyel hem de esansiyel olmayan ağır metallerin alımını ve birikimini kontrol eden ve buna cevap veren mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalar temelde, özel ligandlar tarafından ağır metallerin şelasyonu ve alıkonulmasını içermektedir. Bitki hücrelerindeki en iyi iki karakterize ağır metal bağlayıcı ligandlar, fitoşelatinler (PC) ve metallotiyoninlerdir (MT) (Cobbett ve Goldsbrough, 2002).

2.3. Ağır Metal Olarak Nikel

Atom numarası 28 olan nikel, sulu ortamda Ni^{+2} iyonu halinde bulunmaktadır. Nikel ve oluşturduğu bileşikler, karakteristik koku ya da tada sahip değildir. Farklı çalışma alanları farklı tanımlamalar yapmalarına rağmen biyologlar, jeologlar ve kimyacılar

için yaygın olarak kabul edilen tanımda; 1 cm³'ünün ağırlığı 5 gramdan fazla olan metallere ağır metal denilmektedir. Bitki büyüme ve gelişmesi için esansiyel (mutlak gerekli) ve düşük konsantrasyonlarda bulunması gereken bakır (Cu; 8,9g/cm³), çinko (Zn-7.1g/cm³) gibi mikroelementler de ağır metaller olup, nikel de cm³'ünün 8,7 gram ağırlığı ile bu sınıfa girmektedir. Bunun yanı sıra bitkilerde herhangi bir metabolik işlevi olmayan ve bitki bünyesinde alındığında toksik olan ağır metaller [civa (Hg;13.5g/cm³), krom (Cr;7.2g/cm³), kurşun (Pb;11.4g/cm³), kadmiyum (Cd; 8,6g/cm³) vb.] de bulunmaktadır (Petrucchi ve Harwood, 1993; Ayhan, 2006).

Toprakta bulunan diğer ağır metaller gibi nikelde gerek doğal süreçler (serpantin kayaçların yıkanması, orman yangınları, volkanik patlamalar gibi) gerekse antropojenik etkiler [endüstriyel faaliyetler (madencilik, tekstil ve çelik sanayi, atık materyal)] ile ağır metal kirlenmesine yol açmaktadır (Amari ve ark., 2016). Nikel yeryüzünde genellikle sülfatlar ve oksitler halinde mevcut olup, özellikle dünyada geniş yayılım alanlarına sahip olan serpantin topraklarda yoğun şekilde bulunmaktadır (Chen, Huang ve Liu., 2009). Son yıllarda artan endüstriyel faaliyetler, fosil yakıtların yakılması ile pestisit ve gübrelerin tarımda istikrarlı kullanımı dünya genelinde olduğu kadar Türkiye toprakları için de sorun haline gelmektedir (Rubio ve ark., 1994; Duman ve Öztürk, 2010; He ve ark., 2012; Roccotiello ve ark., 2016).

Nikel, bitki büyüme ve gelişmesi için gerekli olan bir mikroelementtir (Ghasemi ve ark., 2014; Anjum ve ark., 2015a; Roccotiello ve ark., 2016). Ancak bitkilerin topraktan nikeli çok düşük veya yüksek konsantrasyonlarda alımı, sırası ile noksanlık veya toksisite semptomlarının oluşmasına neden olabilir (Cempel ve Nikel, 2006). Tarımsal topraklarda nikel konsantrasyonu 3-1000 mg.kg⁻¹ aralığında olup, son yıllarda kirlenmiş topraklardaki konsantrasyonu 200-26.000 mg.kg⁻¹ kadar ulaşması nedeni ile nikel ağır metaller arasında önemli çevresel kirleticiler kategorisinde değerlendirilmektedir (Amari ve ark., 2016; Syam ve ark., 2016; Sachan ve Lal., 2019).

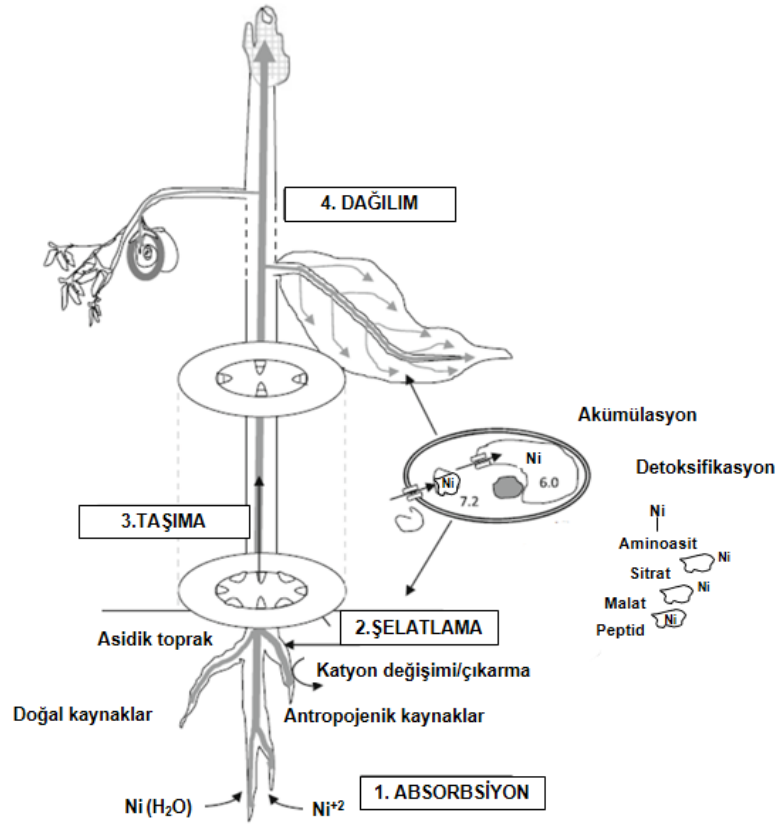
2.4. Nikelin Bitki Bünyesine Alımı

Bitkilerde metal alımı, taşınımı, alıkonulması ve homestasisinin fizyolojik mekanizmaları ve genetik temeli çok fazla çalışılmış ancak hala aydınlatılamamış pek çok nokta bulunmaktadır (Singh ve ark., 2011; Wojcik ve ark., 2017).

Bitkiler için nikelin temel alım yolu kökler tarafından pasif difüzyon ve aktif taşınım ile gerçekleşmektedir. Bu aktif veya pasif taşınım arasındaki oran bitki türüne, nikelin formuna, topraktaki ya da besin çözeltisindeki konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir (şekil 2.3), (Seregin ve Kozhevnikova, 2006). Ayrıca nikelin bitki bünyesine girişte benzer y k/boyut oranına sahip ve yarış halinde olduğu iyonlar ( rneğin Cu^{+2} ve Zn^{+2}) nikel alımını inhibe etmişlerdir. Bu durum bu üç çözünmüş metal iyonlarının aynı katyon taşıma sistemi ile taşındığını göstermektedir (Cataldo, Garland ve Wildung, 1978; Chen, Huang, Liu, 2009). Ancak nikel ve magnezyum (Mg) iyonlarının benzer y k/boyut oranına sahip olmasına rağmen, aynı iyon taşıyıcı sistemi ile taşındığı ve magnezyumun nikel taşınımını inhibe etmediği bildirilmiştir (Oller, Costa ve Oberdörster, 1997; Chen, Huang, Liu, 2009). Bu alımlara ek olarak, şelatlanmış nikelin sekonder aktif taşınımı da mümkündür ve HoxN (yüksek afiniteli nikel transport protein, a permeaz), metallothionein (MT) ve metalloşaperonlar gibi nikel'e spesifik bağ yapabilen proteinler olduğu bildirilmiştir (Wolfram, Friedrich ve Eitinger, Hausinger, 1997; 1995; Watt ve Ludden, 1998; Eitinger ve Mandrand-Berthelot, 2000; Schor-Fumbarov ve ark., 2005). Nikel, iyon formunda bitki bünyesine yarışmalı olarak diğer metal taşıyıcılarından (ZIP, NRAMP vb.) ve kanallardan girebildiği ve bu girişin diğer metallerden daha kolay olduğu belirtilmektedir (Guerinot, 2000).

Bunlara ek olarak, bitkiler tarafından metal alınımını etkileyen diğer faktörler ise; toprağın asiditesi (pH'sı), katyon değişim kapasitesi, organik madde ve kireç içeriği, nem potansiyeli, granülometrik kompozisyon ile makro ve mikrobeyin konsantrasyonu; sıcaklık, kök yüzey alanı ve mikroorganizmalardır (Seregin ve Kozhevnikova, 2006; Chen, Huang ve Lui, 2009). Bu faktörlerden sıcaklık 23-30 C'de iken maksimum nikel absorpsiyonu gözlemlenirken; 2 C gibi düşük sıcaklıklarda oldukça düşük miktarda nikel alımı olmaktadır. Nikel absorpsiyonu ve optimal sıcaklık (23-30 C) arasındaki ilişki sigmoid-benzeri eğri olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca nikel de dahil olmak üzere metaller pH 5.5-6.0 arasında

iken yüksek mobiliteye sahip olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla toprak pH'sı 5.5-6.0 aralığından uzaklaştığında metal alımı da güçleşmektedir (Chen, Huang ve Lui, 2009). Metal alınımını etkileyen faktörlerden, katyon değişim kapasitesi ile kök yüzey alanının fazla olması da metal alınımını artırır (Şekil 2.3) (He ve ark., 2012).



Şekil 2.3. Bitkilerde nikelin alınımı, taşınımı ve dağılımı (Yusuf ve ark., 2011).

Bunlara ek olarak, toprağın doğası gereği bitkilerle birlikte yaşamayan bazı mikroorganizmalar (Bitki büyümesini teşvik edici bakteriler) bitkilerin besin alımlarını etkileyebilmektedirler. Örneğin bazı mikroorganizmalar, indol asetik asit (IAA) sentezleyerek kök morfolojisi ve taşıyıcıların aktivasyonunda değişime sebep olabilir, siderofor adı verilen bileşikler sentezleyebilir ya da salgıladığı organik asitlerle çözünmemiş haldeki fosfatı çözünebilir hale getirerek nikelin bitki bünyesine girişini kolaylaştırabilir (He ve ark., 2012).

Bunların yanı sıra nikel köklerden sürgünlere ve yapraklara, ksilem aracılığıyla transpirasyon akımı ile iyon formunda, floemde ise ligandlarla uzak mesafelere

taşınabilmektedir (Chen, Huang ve Lui, 2009; Yusuf et al., 2011; Sachan ve Lal, 2019). Vasküler dokulara (ksilem/floem) nikelin girebilmesi için hücre zarını H^+ ATPaz pompası/kanalı vasıtasıyla simplastik geçmelidir. Nikotinamin (NA), histidin (HİS) ve organik asitler (sitrik asit ve malat iyonları) gibi ligandlar nikel ile bağ yaparak nikelin transportu, translokasyonu ve akümülyasyonunda intraselüler şelatör olarak görev yaparlar (Şekil 2.3), (Krämer ve ark., 1996; Douchkov ve ark., 2005; Sachan ve Lal, 2019). Ayrıca son yıllarda nikel-nikotinamin kompleksinin vasküler yükleme ve taşımada yellow stripe-like proteinler (YSLs) ile taşındığı bildirilmiştir (Halimaa ve ark., 2014; Wojcik ve ark., 2017).

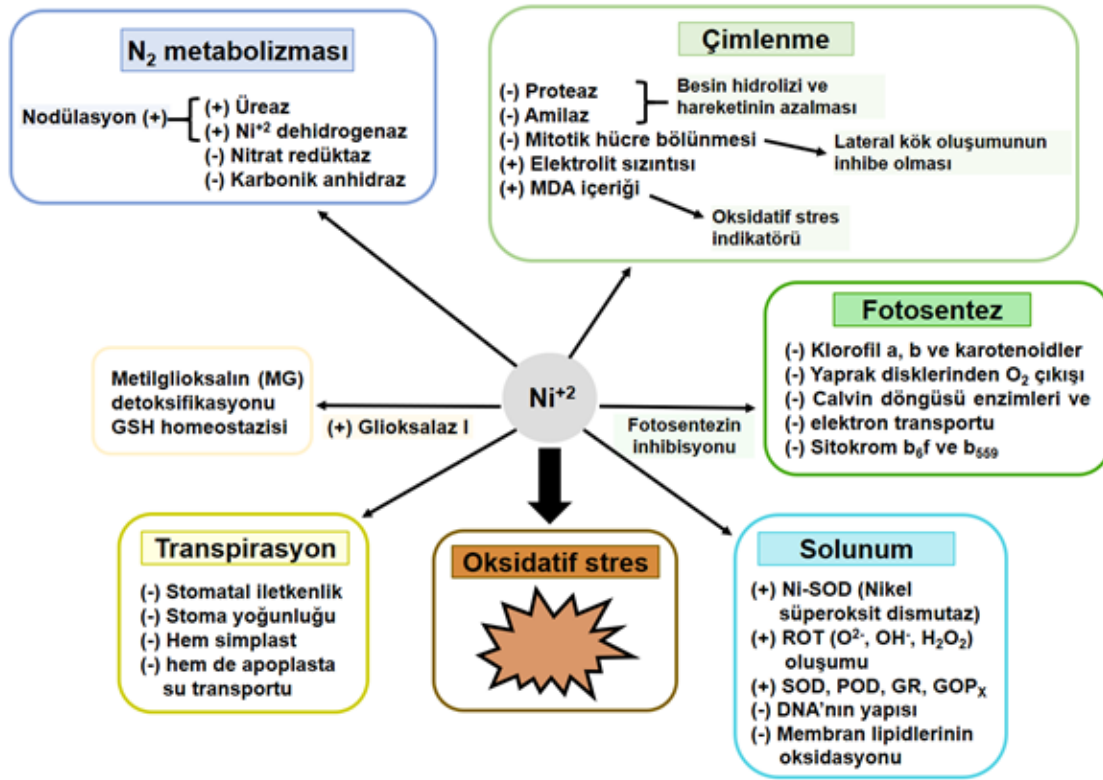
2.5. Artan Nikel Düzeylerinin Bitkilerdeki Etkileri

2.5.1. Morfolojik Değişimler

Bitkide nikel toksisitesi ile çimlenmenin inhibisyonu, gövde ve kök büyümesinde azalma, zayıf dallanma, çiçek şekillerinde anomaliler, biyokütle üretiminde azalma, yaprakta nekrozlar, yaprak ayasında küçülme ile yaprak, çiçek, meyve sayısında azalma gibi bazı morfolojik değişiklikler gözlenmektedir (Gajewska ve ark., 2006; Sachan ve Lal, 2017; Sachan ve Lal, 2019). Aşırı nikel köklerden besin alımını, fotosentez ve transpirasyonu inhibe etmektedir. Bütün bu işlevler bitki büyüme ve veriminde azalmaya neden olmaktadır (Şekil 2.4).

Ağır metal ve diğer çevresel faktörlere karşı bitki gelişiminin her evresi duyarlıdır. Artan nikel konsantrasyonu tohum çimlenmesi ve büyümesini çoğu bitkide engellemektedir. Nikelin neden olduğu büyüme inhibisyonu, protein sentezinden ve besin mobilizasyonundan sorumlu bazı anahtar enzimlerin aktivitesindeki azalmalar ile ilgilidir (Chen, Huang ve Liu, 2009; Ahmad ve Ashraf, 2011). Nikel genellikle köklerde gövdeden daha çok biriktirildiği için kök büyümesini daha çok inhibe etmektedir (Pandey ve Sharma 2002; Seregin ve ark., 2003). Kök büyümesine karşın, yan kök oluşumu ağır metal toksisitesine karşı endoderma bariyeri ve merkezi silindirin karakteristik yapısından dolayı daha dirençlidir (Seregin ve Ivanov 2001). Ancak yan köklerde nikelin endodermayı geçip perisikl hücrelerinde birikmesi ile yan kök sayısı nikel alımı ile azalmaktadır (Seregin ve ark., 2003; Yusuf ve ark., 2011). Nikel bitkilerde gövde büyümesini, hücre bölünmesini inhibe ederek gerçekleştirmektedir (Yusuf ve ark., 2011). Yaprak büyümesi, alanı ve sayısı nikel toksisitesinden olumsuz yönde etkilenmektedir. Artan nikel düzeylerinde yapraklarda koyu kahverengi nekrozlar, su potansiyeli, transpirasyon hızında

azalma ve yaprak kenarlarında kurumalar gözlemlenmiştir (Pandey ve Sharma 2002; Yusuf ve ark., 2011). Bunun yanı sıra yaprak deformasyonları düzensiz hücre uzamalarının ifadelerini arttırarak, yaprak büyümesine yol açmaktadır. Bu yanıtın, dayanıklı bitki seçiminde ve metal kirliliğinde uygun biyoindikatörler olarak kullanılabileceği bildirilmektedir (Yusuf ve ark., 2011).



Şekil 2.4. Bitkilerde nikelin çimlenme, solunun, fotosentez, transpirasyon ve besin alımına etkisi [(-) azalma/inhibisyon; (+) artma/aktivasyon] (Sachan ve Lal, 2019).

2.5.2. Metabolik Değişimler

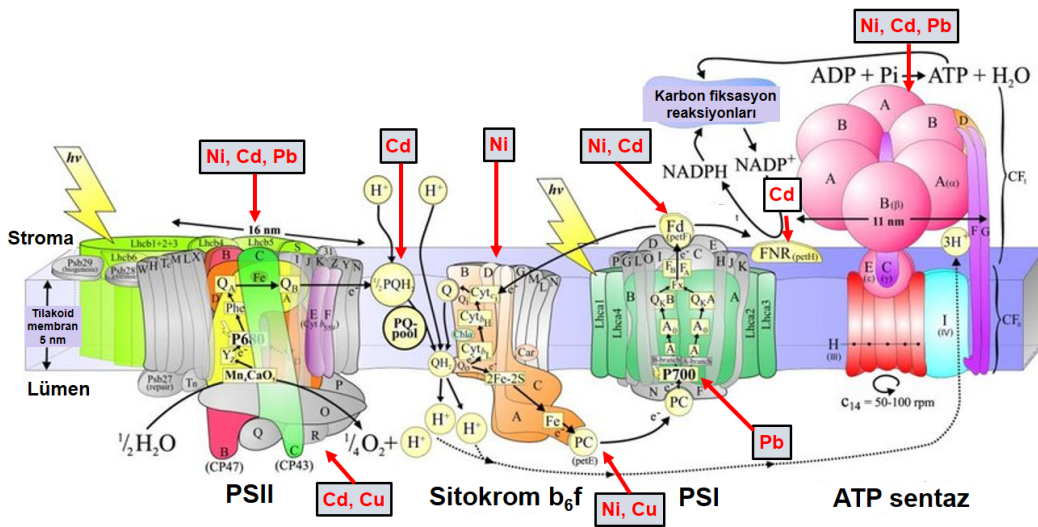
Bitki bünyesine giren diğer ağır metaller gibi nikel de bazı metabolik yolların sekteye uğramasına ya da yapısal bileşenlerin hasar görmesine sebep olmaktadır. Aşırı nikel düzeyleri aynı zamanda kök yoluyla besin alımını etkilemekte, bitki metabolizmasını bozmakta, fotosentez ve transpirasyonu engellemektedir (Şekil 2.4). Bitki bünyesindeki nikel miktarındaki artış, fotosentez gibi temel metabolik işlemleri doğrudan ya da dolaylı yoldan etkileyerek inhibe edebilir (Seregin ve

Kozhevnikowa, 2006; He et al., 2012). Toksik nikel düzeylerinin karbon metabolizması üzerine etkisi üç şekilde ortaya çıkabilir;

- Nikel toksitesi ile kloroplast büyüklüğünde ve sayısında azalma, grana ve tilakoid sayısında azalma, grana ve tilakoid deformasyonu, plastoglobuli oluşumunu da içeren kloroplast yapısındaki ve membran lipid bileşimindeki değişiklikler bildirilmiştir (Persans, Nieman ve Salt, 2006; Chen, Huang ve Liu, 2009). Nikel toksitesi ile pigmentlerinin miktarındaki azalma, anten kompleksini oluşturan karotenoid ve klorofil pigmentlerinin parçalanması veya sentezinin azalmasının sonucudur. Işık enerjisini reaksiyon merkezine iletmek ve ışığın zararlı etkisinden reaksiyon merkezini korumak olmak üzere anten kompleksin iki temel görevi vardır. Bu kompleksteki zayıflama fotosentezin gerçekleştiği reaksiyon merkezine daha az enerjinin aktarılmasına ve ışığın zararlı etkisi ile reaksiyon merkezinin hasar görmesine sebep olmakta ve dolayısıyla fotosentez veriminde azalmalar gözlenmektedir. Bazı araştırmacılar nikel uygulanmış bitkilerin yapraklarında görülen klorozisin; klorofil sentezinin inhibisyonu sonucunda klorofil içeriğinin azalmasına ile Fe ve Mg eksikliğine bağlı gerçekleştiğini bildirmektedir (Brooks, Shaw ve Marfil, 1981; Luo ve Rimmer, 1995; Fu, Olsen ve Maier, 1995; Sagner ve ark., 1998; Persans, Nieman ve Salt, 2006; Chen, Huang ve Liu, 2009).
- Diğer ağır metaller gibi toksik nikel düzeyleri genellikle fotosistem II (PSII) üzerine olumsuz etki etmektedir. PSII'nin yanı sıra nikel elektron taşıma sisteminde yer alan feofitinden Q_A ve Q_B 'ye elektron taşınımını, plastokinon Q_B ya da reaksiyon merkezi proteinleri gibi taşıyıcıların yapısını değişmesine, sitokrom *b6f* ve *b559*, ferrodoksin ve plastosiyanin bileşenlerinin azalmasına, ışık hasat edici kompleks II (LHCII) ve oksijen çıkaran kompleks (OEC- 16 ve 24 kDa polipeptidler) üzerine de olumsuz etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Veeranjaneyulu ve Das, 1982; Mohanty, Vaas ve Demeter, 1989; Sheoran, Singal ve Singh, 1990; Krüpa ve ark, 1993; Krupa ve Baszynski, 1995; Wisniewski ve Dickinson, 2003; Seregin ve Kozhevnikowa, 2006; Aravind ve Prasad, 2004; Boisvertetal, 2007). Ayrıca kloroplast membranlarında oksidatif strese sebep olup membran bütünlüğünü ve membran üzerindeki fotosentetik aygıtların işlevini ve dolayısıyla elektron taşınımı olumsuz yönde etkileyerek fotosentez aktivitesinin inhibisyonuna neden olmaktadır. Bu inhibisyon özellikle PSII donör bölgesi (Singh, Khare ve Singh, 1989; Krupa ve Baszynski, 1995; Chen, Huang ve Liu, 2009), Q_B 'nin bağlanma

bölgesi ve PSI'in sekonder kinon alıcısı (Mohanty, Vaas ve Demeter, 1989; El-Sheekh, 1993) bölgelerinde gerçekleşmektedir (Şekil 2.5).

- Nikel stresine maruz kalmış bitkilerde fotosentetik verimliliği engelleyen bir başka mekanizma da stomaların kapanmasından kaynaklanan CO₂ alımının sınırlandırılmasıdır. (Sheoran, Singal ve Singh, 1990, Bishnoi, Sheoran ve Singh, 1993; Seregin ve Kozhevnikowa, 2006). Nikelin karbon reaksiyonları üzerine etkisi, karbondioksitin özümленerek glikozun oluşturulduğu Calvin döngüsünün bazı anahtar enzimleri (Rubisko, fosfoglisarat kinaz, gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz, Fruktöz 1,6-bisfosfataz) üzerine inhibe edici etkiye sahiptir. Ayrıca Calvin döngüsü reaksiyonlarında meydana gelen bu blokaj, ışık reaksiyonlarında üretilen ATP ve NADPH'nin birikmesine ve sonrasında tilakoid membran boyunca yüksek bir pH gradyenti oluşmasına ve PS II aktivitesinin azalmasına neden olduğu bildirilmiştir (Krupa ve Baszynksi, 1995; Seregin ve Kozhevnikowa, 2006).



Şekil 2.5. Fotosentezin ışık reaksiyonları üzerine ağır metallerin etkisi (Seregin ve Kozhevnikowa, 2006'dan modifiye edilmiştir)

Nikelin azot metabolizması üzerine inhibe edici etki göstererek amino asit ve protein sentezini etkilemektedir. Bitkiler havadaki gaz formundaki azotu kullanamamaktadır. Toprakta nitrat formunda alınan azotun çeşitli enzimler aracılığıyla azot asimilasyonu gerçekleşmekte ve bunun sonucunda amino asit ve protein sentezi sağlanmaktadır. Nikel azot asimilasyonun gerçekleşmesi için gerekli

olan enzimlerin (Nitrata redüktaz, nitrit redüktaz, glutamin sentetaz, glutatyon redüktaz, aspartat transaminaz) aktivasyonunu düşürebilmekte hatta engelleyebilmektedir (Şekil 2.4), (Yusuf ve ark., 2011; Sachan ve Lal, 2019). Nikelin fazlalığı kadar eksikliği de önem arz etmektedir. Çeşitli proteinlerin katabolizması sonucu üre oluşmaktadır ve üre biriktiği zaman yapraklarda üre yanıkları adı verilen nekrozlara sebep olmaktadır. Ürenin amonyak ve karbondioksit parçalanması için üreaz enzimi gerekmektedir. Nikel eksikliğinde üreaz aktivitesinde azalma görülmektedir. Çünkü nikel, üreazın kofaktörüdür ve üreazın holoenzim hale gelmesi ve aktivite gösterebilmesi için ortamda nikelin bulunması gerekmektedir (Gheibi ve ark., 2009). Yüksek nikel düzeyinin etkisi, karbon ve azot metabolizması üzerine olan olumsuz etkisinin aksine, teşvik edici olmaktadır. Çünkü bitkinin ağır metallerle mücadelesinde gerekli olan savunma bileşiklerinin (fitoşelatin, metallothionein, glutatyon gibi) sentezi için kükürt içeren sistein amino asitlerine ihtiyaç vardır. Dolayısıyla sistein sentezi için de sülfat asimilasyonunun artması gerekmektedir.

Nikelin bitkilerde mineral madde metabolizması üzerine etkisi doğrudan olduğu gibi dolaylı yollardan da gerçekleşmektedir. Nikelin dolaylı yollardan zararlı etkisi ikiye ayrılmaktadır. Birincisi diğer metal iyonlarıyla olan etkileşiminden kaynaklanırken; ikincisi oksidatif strese sebep olmasından ileri gelmektedir. Nikel, bitkiler için mikrobisin olan diğer metal iyonlarıyla (Cu, K, Ca, Zn, Mn, Fe vb.) yarış halindedir. Bu yarışta eğer nikel üstün geliyor ise, bitki bünyesinde yarıştığı metal açısından eksikliğe ve bu metalin eksikliğinin semptomlarına sebep olmaktadır. Örneğin; Cu ve Zn ile yarışı kazanan nikel olursa bitkide antioksidan savunmasında rol oynayan ve önemli bir enzim olan SOD (süperoksit dismutaz) açısından eksikliğe sebep olarak reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinde aksamalara yol açmaktadır. Çünkü Cu ve Zn, SOD da dahil bazı metalloenzimlerin kofaktörüdür. Ayrıca, nikel ile demir hem nikotinamid ve sitrat hem tarafından etkin bir şekilde şelatlanabilmekte hem de aynı taşıyıcılardan alınmaktadır. Dolayısıyla ortamda nikel konsantrasyonu yüksekse demir yerine nikel bitki bünyesine girmekte ve bitkide demir eksikliği semptomları görülebilmektedir. Bunun yanı sıra nikel, demirin ligand yapısını bozduğu için köklerden sürgünlere doğru olan translokasyonunu engelleyebilmekte ve köklerde aşırı demir birikimine bağlı olarak demir toksisitesi gözlenmektedir (Nishida, Aisu ve Mizuno, 2012). Bir diğer metal iyonu olan kalsiyum (Ca) ise

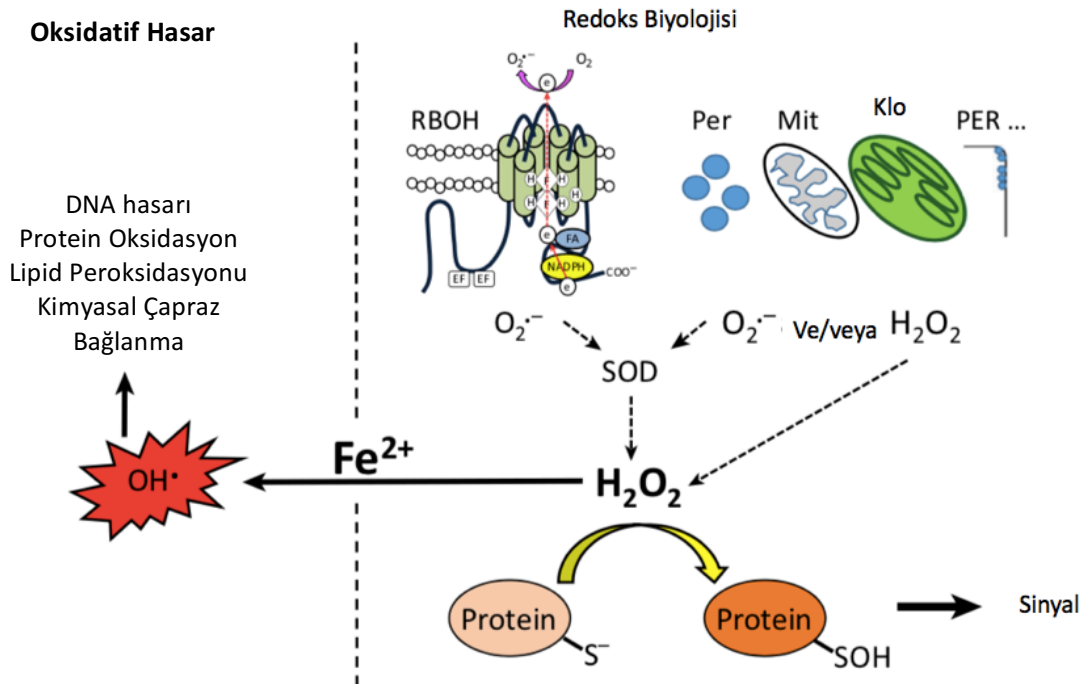
PSII'deki oksijen çıkaran kompleksi (OEC)'nde görev alır. Nikel yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu zaman bu kompleksteki Ca iyonunun yerine Mg iyonunun geçmesine sebep olarak kompleksin işlevini yitirmesine yol açmaktadır. Bu kompleks fonksiyonunu yerine getiremediği durumlarda su parçalanamaz, proton gradienti oluşamaz ve buna bağlı olarak da ATP sentezlenemez (Chen, Huang ve Lui, 2009). Nikel Mg ile de yarışmaktadır. Mg, klorofil için önemli bir elementtir ve eksikliği klorofil miktarında azalmaya bağlı olarak fotosentez aktivitesinde azalmaya neden olmaktadır (Chen, Huang ve Lui, 2009).

2.5.3. Oksidatif Değişimler

Bitki hücrelerinin ve organellerinin membranları üzerine yüksek nikel düzeylerinin etkisi olumsuzdur. Membran lipidlerinde kalitatif ve kantitatif değişiklikler yaparak membranın yapısal ve fonksiyonel durumunda, membran akıcılığında, transportunda bozulmalara; serbest radikallerin seviyesinde artış yaratarak da membran lipid peroksidasyonuna ve dolayısıyla membrana bağlı taşıyıcıların (örneğin ATPaz) fonksiyonlarında değişikliklere yol açmaktadır (Nagajyoti, Lee ve Sreekanth, 2010; Sachan ve Lal., 2019). Nikelin ATPaz aktivitesini azaltarak membrandan çözünmüş madde geçişini etkilediği ve buna bağlı olarak membranla ilişkili lipid kompozisyonunda değişikliğe neden olduğu bildirilmiştir (Cakmak ve Horst, 1991; Strass ve Horst, 1995; Sachan ve Lal., 2019).

Nikelin dolaylı yollardan ortaya çıkan bir diğer etkisi ise hücrelerde reaktif oksijen türlerinin (ROT) sentezini tetikler ve oksidatif stres oluşumuna neden olur (Chen, Huang ve Liu, 2009). Hücrelerde bilinen başlıca ROT'lar singlet oksijen ($^1O_2$), süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^\cdot$) olup, normal şartlarda hücredeki seviyeleri denge halindedir (Şekil 2.6) (Levitt, 1972; Halliwell ve Gutteridge, 1998). Sentezlenen bu ROT'lardan singlet oksijen ($^1O_2$), elektron transport sisteminde görevli olan moleküler oksijenin (O_2) fazla enerji alması sonucu kendi dönüş ekseninin tersi yönde farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi sonucu oluşabileceği gibi; bu radikal ile nitrik oksit (NO)'in ve H_2O_2 ile hipoklorit (ClO^-)'in tepkimesi sonucunda da sentezlenebilir. (Stadtman ve Barlett, 1997; Halliwell ve Gutteridge, 1998). Süperoksit anyonu (O_2^-), kloroplastta, fotosistemler arası elektron transportunda görev alan moleküler oksijenin (O_2) bir elektron transferi sonucu indirgenmesi ile oluşur. O_2 'den daha oksitleyici olan

süperoksit $O_2^{\cdot -}$ bir elektron daha alır ve peroksit anyonuna indirgenir. H_2O_2 , aerobik canlılarda $O_2^{\cdot -}$ 'lerden süperoksitdismutaz (SOD) enzimi aracılığıyla sentezlenir. H_2O_2 , özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan Fe ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif Fe formlarını oluşturur (Şekil 2.6). Bu formdaki Fe, çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir (Asada ve Yoshikawa, 1974). Hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) ise hücrelerde en reaktif oksidantlardan olan $OH^{\cdot}$ 'in eliminasyonunda kullanılabilecekleri bir enzim sistemi mevcut bulunmadığından kolayca bütün biyo-moleküller ile tepkimeye girebilir ve aşırı miktarda üretildiğinde ise hücrelerin ölümüne sebep olur. $OH^{\cdot}$; daha az toksik olan H_2O_2 ve $O_2^{\cdot -}$ anyonun metal iyonları varlığında Haber – Weiss (Cu^+ , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+}) veya fenton (Fe^{2+} ve diğer geçiş metalleri; Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) reaksiyonu ile sentezlenir (Haber ve Weiss, 1934; Smirnov, 1993).



Şekil 2.6. Bitki hücrelerinde reaktif oksijen türleri (ROT)'nin oluşum reaksiyonları (Mittler, 2017'den modifiye edilmiştir).

Stres koşullarına tolerans da dahil olmak üzere çoğu hücresel süreçte ROT'lar sekonder haberciler olarak da rol üstlenmektedirler. Bitkiler özellikle tuzluluk, kuraklık, metal toksisitesi ve UV radyasyonu gibi abiyotik stres durumlarına maruz

kaldıklarında ROT'ların üretimi artmaktadır. Hücrelerdeki ROT konsantrasyonunun artması, antioksidan savunma bileşenleri ve ROT üretimi arasındaki dengeyi bozmakta ve birbirini takip eden reaksiyonlar biçiminde organizmada ROT artışı sonucu bitkiler oksidatif strese girmektedir. Stres koşullarında ROT üretiminin aşırı miktara ulaşması; lipidlerin peroksidasyonuna, proteinlerin oksidasyonuna, nükleik asit hasarına, enzimlerin inhibisyonuna ve programlı hücre ölümüne (apoptozis) kadar birçok soruna sebep olabilir (Smirnoff, 1993; Sgherry, Pinzino ve Navari-Izzo, 1996; Büyük, Soydam-Aydın ve Aras, 2012).

2.6. Bitkilerin Nikel Zararlarına Karşı Oluşturduğu Yanıtlar

Nikel elementinin yarattığı toksik etkilere karşı bitkilerin yanıtı, sakınma (kaçınma) ve tolerans (dayanım) olmak üzere iki şekilde olur (Bray, Bailey-Serres ve Weretilnyk, 2000; Ayhan, 2006).

2.6.1. Sakınma (Kaçınma)

Bitkilerin metalleri topraktan bünyelerine almalarını engellemesidir. Bunun için bitkiler tarafından rizosfere karbondioksit veya bazı organik asitler ile şelatlar, musilaj ya da kalloz gibi karbonhidratlar salınabilmektedir. Salınan bu bileşiklerden organik asitler ve karbondioksit, toprak pH'sını metallerin en mobil olduğu 5.5-6.0 pH aralığından daha düşük değerlere inmesine yol açarak metallerin alımını azaltmaktadır. Ayrıca kalloz ve müsilaj gibi hücre dışı karbohidratlar ile metaller ile bağ yaparak onların rizosferde immobil hale geçmesini sağlamak ve taşıyıcılar vasıtasıyla hücre içine girmesine engel olmaktadır (Siedlecka ve ark., 2001; Wojcik, 2017). Buna ilaveten, bitki köklerinden dışarı salınan organik asitler, metal iyonları ile stabil metal-ligand kompleksleri oluşturur ve metallerin hareketliliklerini ve biyo-elverişliliğini değiştirebilirler. Böylece metal iyonlarının köklere alınmasını ve birikmesini önleyerek hücre dışı detoksifikasyon işlevini gerçekleştirirler (Clemens, 2001; Hall, 2002).

Kök hücre çeperleri, toksik metallerin sitozole girmesini lignopolisakkarit (selüloz, hemiselüloz ve pektinler) matriksinde metalleri immobil hale getirerek önlemede rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra hücre membranları da hücre içine metal alımını düzenlenmesinde (engelleme/azaltma) önemli rollere sahiptir. Metal biriktiren ve sakınan bitkilerde metal alım ve birikim hızındaki farklılık, aynı membran

taşıyıcılarının ifade düzeyindeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Bitkiler membranlarında çok çeşitli taşıyıcılara sahiptir [ZIP (Çinko-düzenleyici taşıyıcı-demir düzenleyici taşıyıcı; protein), CDF (Katyon difüzyon kolaylaştırıcı, Metal tolerans proteini (MTP) olarak da bilinir), NRAMP (Doğal dirençlilikle ilişkili makrofaj protein, P tipi ATPaz protein aileleri, ATP bağlayan ABC kaset taşıyıcıları gibi (Şekil 2.7)] (Anjum ve ark, 2015b).

2.6.2. Tolerans (Dayanım)

Tolerans, metallerin toksik etkilerinin giderilmesi, azaltılması ve ortadan kaldırılması gibi etkin mekanizmaları kapsamaktadır.

2.6.2.1. Ligandlara Bağlanma

Bitki hücrelerinde metallerin etkisiz hale getirilerek depo edildiği ana bölge olan vakuollere, metallerin taşınmasında ve detoksifikasyonunda rol oynayan bazı ligandlar vardır. Bunlar fitoşelatinler (PC), metallothioneinler (MT) ve bazı organik asitlerdir.

2.6.2.1.1. Fitoşelatinler

Fitoşelatinler [PCs; γ -glutamil (Glu)-sistein (Cys)] $_n$ -X, $n = 2-11$ ve X ise glisin (Gly), serin, β -alanin, glutamat veya glutamindir], düşük moleküler ağırlıklı sisteince zengin tiyol grupları içeren ve enzimatik olarak sentezlenen metallerin vakuole taşınmasında, detoksifikasyonunda ve floem aracılığıyla uzak mesafelere aktarılmasında rol oynamaktadırlar (Cobbett ve Goldsbrough, 2002; Anjum ve ark., 2015b). PC sentezi, PC sentaz (PCS) enzimi ile gerçekleşir. PCS hücrede her daim belirli bir konsantrasyonda inaktif halde bulunurken, bir ağır metal uyarısı geldiği zaman sentezlenerek aktif hale geçer ve glutatyon (GSH)'dan PC sentezini katalizler. GSH, PC'nin sentezi için öncül molekül olmasının yanı sıra sülfürün başlıca taşınım ve depo formu olup ROT'lara karşı da antioksidan savunmada yer almaktadır. Eğer ortamda GSH yoksa ROT'lar yapısal bileşenleri (lipid, protein, nükleik asit gibi) oksitleyebilmektedir. Ortamda GSH olduğunda ise affinite farkından dolayı ROT'lar, GSH'ı oksitlemektedir ve GSH okside formu olan okside glutatyon (GSSG)'ye dönüşmektedir. Glutatyon redüktaz (GR) enzimi ile GSSG, redükte formu olan GSH'a dönüşmekte ve bu olay bir döngü halinde ROT'lara karşı

savunmada önem arz etmektedir. GSH eksikliğinde ağır metal stresine karşı aşırı hassas bireyler oluşurken, GSH'ın aşırı ifadesi toleranslı bireyler oluşması için yeterli değildir (Şekil 2.7).

2.6.2.1.2. Metallotiyoninler

Bir diğer metal şelatörü olan MT'ler de PC'lere benzer şekilde düşük moleküler ağırlıklı (4-14kDa) tiyol grupları içeren sisteince zengin olup, yaygın olarak prokaryot ve ökaryotik organizmalarda bulunan polipeptitlerdir (Anjum ve ark., 2015b). Fakat PC'lerden farklı olarak sistein başına metal taşıma kapasitesi daha düşük olup, gen kodlu olarak sentezlenirler. İki alt birim içeren MT'lerin (stabil alfa domain, 4 divalent metal iyonu içerir; reaktif beta domain, 3 iyon içerir) bitki kısımlarında bulunma yerlerine göre 4 tipi vardır (Tip 1, köklerde; Tip 2, yapraklarda; Tip 3, olgunlaşmış meyvelerde ve Tip 4, gelişen tohumlara yer alır). MT'ler, metalleri sitozolde bağlayabilir, vakuole alıkonulabilir ya da hücre dışına atabilirler (Şekil 2.7). Abiyotik ya da biyotik stresler sonucu bitki bünyesinde MT sentezi artmaktadır ve bu artış ekotoksikolojik çalışmalarda biyomarker olarak kullanılabilir (Joshi, Pareek ve Singla-Pareek, 2015).

2.6.2.1.3. Bazı Organik Asitler (Tiyol Olmayan Metal Şelatörler)

Bitkilerde tiyol bileşikleri olmayan bazı organik asit (sitrat, malat, okzalit, malonat, akonitat ve tartarat) ve aminoasitler ve türevleri (glisin-betain, prolin, histidin, sistein, arginine, glutamat, nikotinamin) de metal şelatları oluşturabilirler (Hall, 2002; Sharma ve Dietz, 2006; Jakkeral ve Kajjdoni, 2011) (Şekil 2.7). Organik asitler düşük moleküler ağırlıkta ve en az bir karboksil grubu içeren oksijen verici ligandlar olarak tanımlanır. Bu bileşiklerin bazıları, piruvatın oksidasyonunun gerçekleştiği solunum metabolizma yolağındaki trikarboksilik asit döngüsünün bir ara ürünü olarak tüm bitki hücrelerinde oluşmaktadır (Trejo-Tellez, Gomez-Merino ve Schmitt, 2012).

Organik asitler (OA), rizosferde çoklu fonksiyonları yerine getirme potansiyeline sahiptir. Karboksilik grupların sayısına ve ayrışma özelliklerine bağlı olarak, değişen negatif yük taşıyabilen OA'ler metal katyonu ile çözelti içinde kompleks oluşturmaya ve anyonların toprak-matriksinden yer değiştirmesine izin verirler

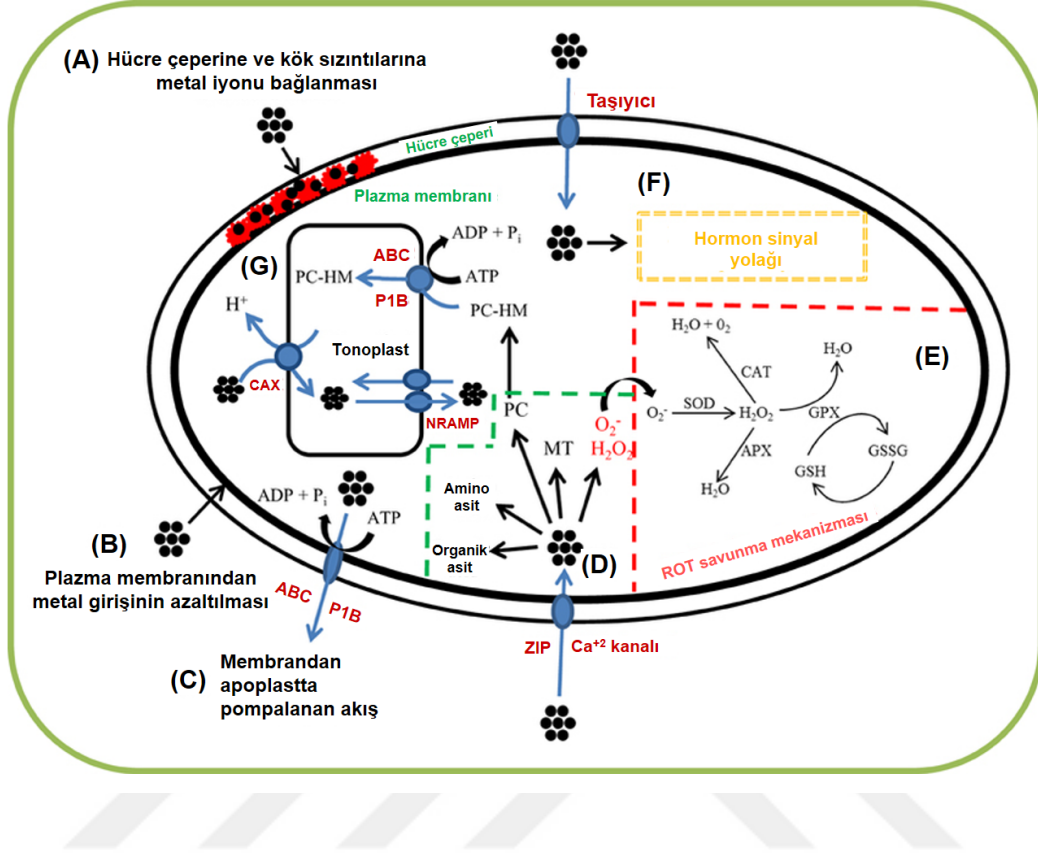
(Jakkeral ve Kajjidoni, 2011). Bitki hücrelerinde anahtar bir metabolit olan sitrat, karbon metabolizmasında (bir ara madde olarak), abiyotik (metaller, besin noksanlıkları) ve biyotik (rizosferdeki bitki-mikroorganizma etkileşimleri) streslere karşı bitki toleransında yer aldıkları bildirilmiştir (Trejo-Tellez, Gomez-Merino ve Schmitt, 2012). Bitkilerde çok az bulunan oksalat ise dikarboksilik asit anyonu olup, oldukça kuvvetli bir organik asittir. Bazı bitki türlerinde yüksek düzeyde birikebilir (okzalit akümülatörleri; Caryophyllaceae, Chenopodiaceae ve Polygonaceae) (Massey, 2003). Malat ise fotosentez (C3, C4 ve CAM bitkileri), solunum, yağ asidi oksidasyonu, azot fiksasyonu, lignin biyosentezi, stoma hareketleri ve enerji metabolizmasında rol oynamaktadır (Finkemeier ve Sweetlove, 2009). Bitkilerde çeşitli süreçlerde oluşan bu organik asitler metaller ile şelatlar oluşturarak, uzun mesafelere ksilem ile taşınır (Rascio ve Navari-Izzo, 2011). Sitrat, özellikle Fe ve Al olmak üzere Zn, Co, Ni, ve Cd metal iyonları ile kuvvetli şelat yapma kapasitesine sahiptir (Boominathan ve Doran, 2002; Clemens, 2001; Singh ve Chauhan, 2011). Nikel biriktiren bitkiler üzerinde yapılan çalışmalar, nikelin sitrata bağlandığını ve üretilen sitrat miktarının da nikel birikimi ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (Brooks, 1998 Ayhan, 2006). Hücre içi metal detoksifikasyonunda, organik asitler sitozolde şelat oluşturarak metalleri, toksik olmayan veya daha az toksik bir forma dönüştürülebilirler (Clemens, 2001; Hall, 2002). Organik asitler, amino asitler ve tiyoller gibi ligandlar ile metilasyonların şelasyonu, ağır metallerin köklerden sürgünlere geçişini kolaylaştırır (Zacchini ve ark., 2009).

Bitkilerde pek çok metabolit yolda rol alan bazı aminoasitler ve türevleri (glisin betain, nikotinamin, prolin, sistein, histidine, arjinin, glutamat, poliaminler gibi) metaller ile şelatlar oluşturabilir ancak mekanizma henüz tam açıklanamamıştır (Anjum ve ark., 2015b).

2.6.2.2. Antioksidan Savunma Sistemi

Fotosentez veya solunum gibi metabolik süreçlerin doğal sonucu olarak ROT sentezlenir. Optimum koşullarda, bitki bünyesinde ortaya çıkan ve eşleşmemiş elektrona sahip reaktif iyonlar ile kolaylıkla yapısal bileşenleri oksitleyebilen ve hasarlara yol açabilen ROT'lar (süperoksit ve hidroksil radikali, singlet oksijen, H₂O₂, gibi) bitkilerin antioksidan savunma sistemleri ile bertaraf edilir (Şekil 2.8). Redoks-aktif bir metal olarak nikel, aşırı serbest radikal oluşumunu teşvik ederek oksidatif

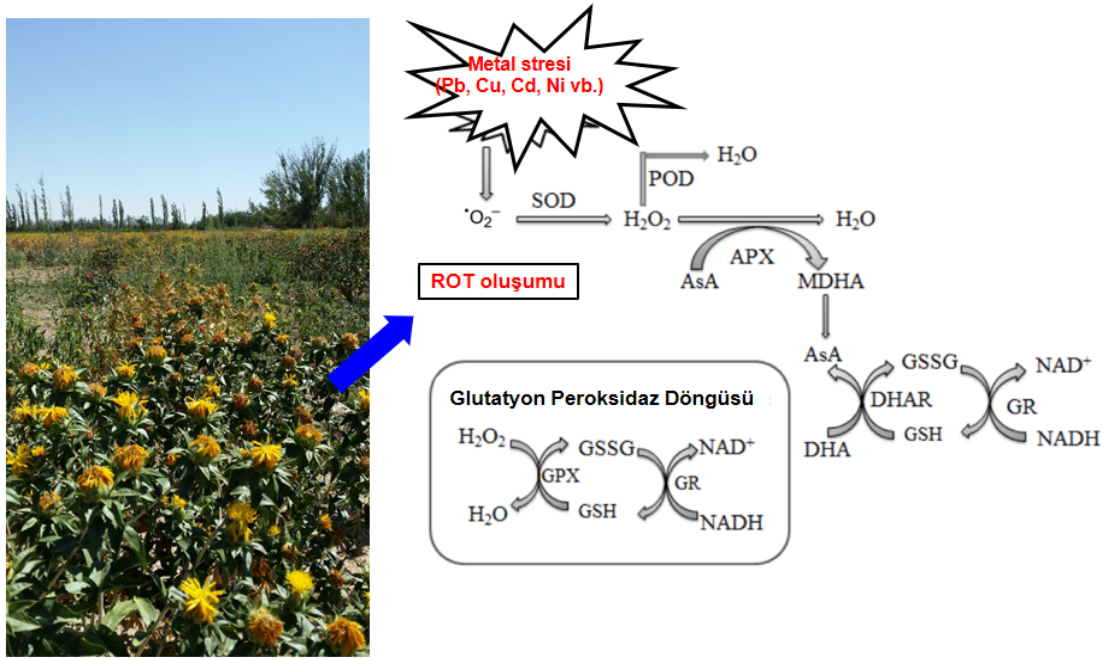
zararlara neden olur. Bitkiler serbest radikallerin zararlarından korunmak için enzimatik ve enzimatik olmayan bir antioksidan savunma sistemine sahiptir.



Şekil 2.7. Bitkilerde metal zararına karşı oluşturulan başlıca yanıtlar ve aralarındaki ilişkiler. (A) Hücre çeperine ve kök sızıntılarına metal iyonu bağlanması; (B) Plazma membranından metal girişinin azaltılması; (C) Membrandan apoplastta pompalanan akış (ATP-bağlı ABC kaset ve P1B-ATPaz Taşıyıcıları); (D) Fitoşelatınlar (PC), Metalloitiyoninler (MT), Organik asitler (OA) ve aminoasitler gibi ligantlar ile ağır metal (HM)'lerin sitozolde şelatlanması; (E) ROT savunma mekanizması [Antioksidant enzimler (SOD, APX, GR, POD, GPX ve CAT) ve enzim olmayanlar (GSH ve GSSG)]; (F) Hormon sinyal yolağı; (G) Taşıma ve vakuolde kompartmanlaşma [(ATP-bağlı ABC kaset ve P1B-ATPaz Taşıyıcıları; NRAMP (doğal dirençlilik ile ilişkili makrofaj protein), CAX (katyon/proton değiştirici)]. Metal iyonları siyah daireler şeklinde gösterilmektedir (Anjum ve ark., 2015b'den modifiye edilmiştir).

Antioksidatif enzimler; [süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR) ve diğer askorbat-

glutasyon çevrimi enzimleri (monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) ve dehidroaskorbat redüktaz (DHAR)) metallerin detoksifikasyonunda etkilidir (Alsher, Donahue ve Cramer, 1997).



Şekil 2.8. Reaktif oksijen türevlerinin (ROT) oluşumu ve antioksidan enzimler tarafından bertaraf edilme yolları (Cai ve ark., 2017).

Bitkilerde $O_2^{\cdot-}$ lerin H_2O_2 'e dismutasyonunda SOD enzimi tarafından gerçekleştirilir. Oluşan H_2O_2 apoplastta APX veya GPX enzimleri ile, peroksisomlarda ise CAT enzimi tarafından suya detoksifiye edilir (Zoller ve ark., 2003; Gratao ve ark. 2005). SOD'un ve APX'in farklı izoformları kloroplast, mitokondri, peroksisom, sitozol ve apoplastta yer almaktadır. GPX sitozolde, CAT ise peroksisomda yerleşmiştir. APX tarafından H_2O_2 'in detoksifikasyonu, askorbatın monodehidroaskorbat (MDHA)'ya oksidasyonu ile gerçekleşir. Askorbat da NADPH'ı elektron donörü olarak kullanarak hücredeki havuzunu yeniler. MDHA da kendiliğinden dehidroaskorbat (DHA)'a dönüşebilir. Askorbatın yenilenmesi Askorbat-Glutasyon döngüsü ile başlar. Bu döngüde, glutasyon (GSH) okside glutasyon (GSSG)'a ve DHA'nın askorbata rejenerasyonu DHAR enzimi aracılığıyla gerçekleşir. Glutasyon redüktaz (GR), indirgeyici ajan olarak NAD(P)H'ı kullanarak GSSH'dan GSH'ı rejenere eder. Bu yolak, GPX döngüsü olarak bilinir (Yusuf ve ark., 2011).

Bitkiler toksik metal düzeylerine maruz kaldığında antioksidant enzim kapasitesi, metal zararının üstesinden gelmesi için yeterli olmayabilir. Metaller hem gen düzeyinde hem de yapısal ve işlevsel düzeyde zarar verip antioksidant enzimlerin de aktivitelerini azaltabilirler. Artan nikel düzeylerinde çeşitli bitkilerde antioksidan savunma sisteminin aktive/inhibe edildiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Ali ve ark., 2003; Gajewska ve Skłodowska, 2007; Siddiqu, Al-Whaibi ve Basalah, 2011; Theriault, Michael ve Nkongolo, 2016).

Glutatyon, askorbat, vitamin E, fenolik bileşikler, flavonoidler, ligninler, taninler vb. enzimatik olmayan antioksidan moleküller hem ROT'ları etkisiz hale getirirler hem de metallere bağlanıp metal zararına karşı hücrel savunmada rol oynarlar (Asada, 1999; Sakihama ve ark., 2002).

Tüm bu savunma mekanizmalarının aktifleştirilip metal stresiyle mücadele edebilmesi için bitkilerin öncelikle metal stresi altında olduklarını algılamaları gerekmektedir. Bunun için bazı sinyal molekülleri ve sekonder mesajcılar bulunmaktadır. Özellikle H_2O_2 bu anlamda önemli bir moleküldür. Ağır metallerin miktarındaki artış; etilen, salisilik asit veya jasmonik asit gibi hormonların ya da kalsiyum-kalmodulin veya MAPK gibi sekonder mesajcılarının sentezinin uyarılmasına sebep olur. Tüm bu sinyal molekülleri bitkilerin ağır metal stresi altındayken görev alan savunma bileşiklerinin (PC, MT, GSH, HSP vb) sentezlenmesi ve mevcut sentezinin artması ile gerekli olan gen ifadesinin artışı veya transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu sağlamaktadır (Manara, 2012).

2.7. Metal Kirliliğinin Giderilme Yolları: Fitoremediasyon

Nikel ile kontamine olmuş doğal alanların arındırılması ve temizlenmesi çeşitli kimyasal, fiziksel ve biyolojik yöntemlerle mümkündür. Biyolojik yöntemlerden biri olan fitoremediasyon, yeşil bitkilerle metaller, organik bileşikler veya radyoaktif bileşenler gibi çevrede bulunan zararlı yapıların kontrol altına alınması, zararsız hale getirilmesi veya uzaklaştırılması olarak tanımlanır (Zouboulis ve Katsoyiannis, 2005). Bu tanımlama çevredeki kirleticilerin bitki-etkili yöntemleri ile kontaminant alınımı, hapsedilmesi, bozunması ve biyo-transformasyonunu kapsar. Fitoremediasyon güneş enerjisini kullanan yeşil teknolojidir ve bu sıklıkla geleneksel remediasyon metotlarından daha fazla tercih edilir. Ayrıca fitoremediasyon;

geleneksel mühendislik yöntemlerine göre düşük maliyetli olması, herhangi bir yan ürün oluşturmaması ve ortamdan uzaklaştırılan metallerin tekrar elde edilebilmesi (fitomining) bakımından remediasyon (temizleme /arındırma/ iyileştirme) yöntemleri arasında öne çıkmaktadır (Peuke ve Rennenberg, 2005; He ve ark., 2012). Metal ile kontamine olmuş topraklarda ağır metal biriktirebilen ve hayat döngüsünü etkilenmeden sürdürebilen Brassicaceae ve Asteraceae gibi familyalara ait bitki türleri saptanmıştır (Küpper ve ark., 2004; Adıgüzel ve Revees, 2012). Bunun yanı sıra, bazı yağlı tohumlu bitkilerin biyoyakıt üretme potansiyellerine ek olarak ağır metal biriktirme özelliklerinin de olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Bauddha ve ark., 2015; Tripathi, Edrisi ve Abhilashn, 2016).

Fitovolatilizasyon, fitodegradasyon, fitostabilizasyon gibi çeşitli fitoremediasyon metotları bulunmaktadır (Şekil 2.9) ve bunlar arasından metal kirliliği ile mücadelede en etkili metot fitoekstraksiyondur (Robinson ve ark., 1999; Nedelkoska ve Doran, 2000; Chaney ve ark., 2007).

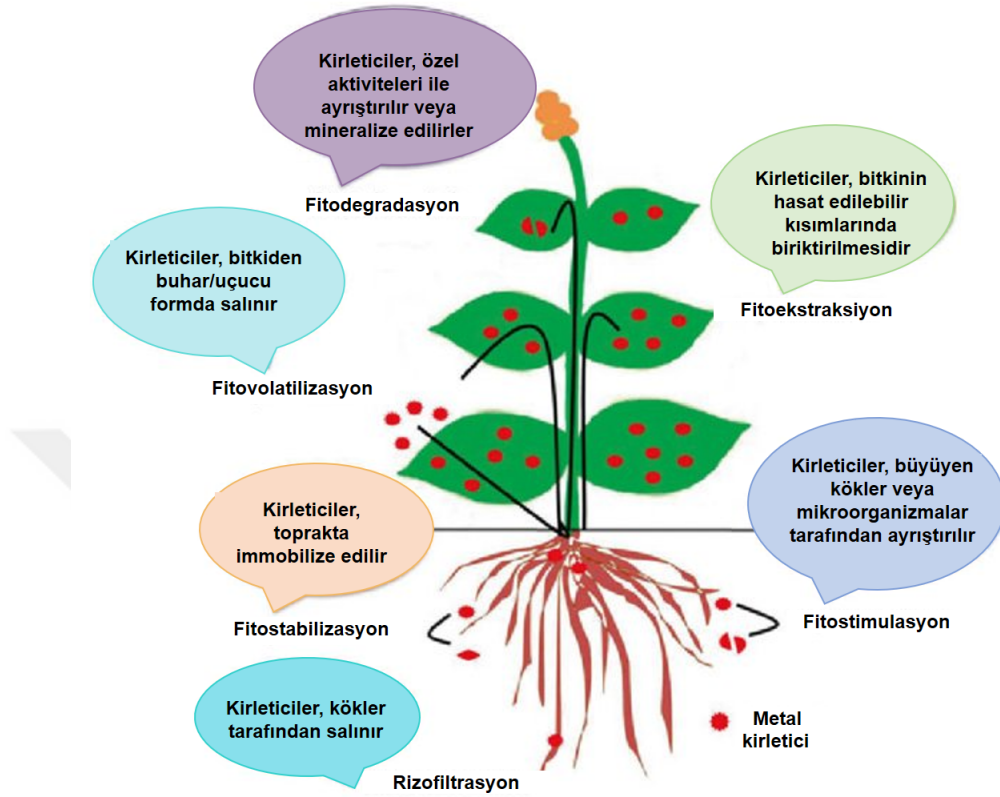
2.7.1. Fitoekstraksiyon

Bitkilerin kökleri aracılığıyla kirleticilerin bünyeye alımı, toprak üstü organlarda biriktirilmesi ile bitkilerin hasat edilmesini kapsayan bir işlemdir. Bu işlem Cu, Zn ve Ni gibi aktif olarak alınan mikrobese elementleri ve Cd, ve Pb gibi besin elementi olmayan ağır metallerin uzaklaştırılmasında kullanılabilmektedir. Fitoekstraksiyon sadece metal kirliliğinin nispeten düşük veya orta seviyede olduğu alanlar için uygulanabilmektedir. Çünkü metal konsantrasyonunun yüksek düzeylerde olduğu alanlarda bitkilerin yetiştirilebilmesi mümkün olmamaktadır (Padmavathiamma ve Loretta, 2007).

2.7.2. Rizofiltrasyon

Bitki kökleri tarafından metal kirleticilerin alınımı ve alıkonmasını kapsamaktadır (Şekil 2.9). *Brassica juncea*, *Phaseolus vulgaris* ve *Helianthus annuus* gibi hidroponik ortamlarda büyütülen birçok bitki türünün kökleri nikelin yanı sıra Cu, Cd, Cr, Pb, Zn gibi toksik metallerin sıvı çözeltilerinden uzaklaştırılmasında kullanılabilmektedir. Rizofiltrasyon için ideal bitki; önemli düzeyde kök biyokütlesi veya yüzey alanı üretmeli, yüksek miktarda hedef metali biriktirebilmeli ve tolere

edebilmeli, düşük maliyetli olmalı ve minimum düzeyde sekonder atık üretmelidir (Dushenkov ve Kapulnik, 2000; Aybar, Bilgin ve Sağlam, 2015).



Şekil 2.9. Bitkilerde fitoremediasyon, hiperakümülayon ve nikel toleransında yer alan çeşitli mekanizmalar (Yadav ve ark., 2016).

2.7.3. Fitovolatilizasyon

Bitkisel buharlaştırma olarak da adlandırılan bu işlem, organik kirlenitilerin ve ağır metal içeren suların büyük bir miktarının kökler aracılığı ile bünyelerine alan ağaç formu bitkilerde gözlenir (Şekil 2.9). Fitovolatilizasyon ile bitkiler tarafından tutulan kirlenitiler, daha az toksik olan buhar formlarına çevrilerek transpirasyon ile doğaya salınmaktadır. Bilindiği gibi su, köklerden alınarak gövde ve yapraklara iletilir. Böylece kirlenitiler, bitkiyi çevreleyen havaya terleme ve gaz formuna dönüşerek karışır. Kavak ağaçları ile yapılan çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu metotta kökün ilerleyebildiği derinlik oldukça önemlidir. Yeraltı sularının remediasyonunda kazık kök sistemi bulunduran bitki türleri seçilmelidir. Bu yöntemin etkili şekilde uygulanabildiği bölgeler yeraltı suları, toprak, çamur ve sedimentlerdir (Ghosh ve Singh, 2004; Aybar, Bilgin ve Sağlam, 2015).

2.7.4. Fitodegradasyon

Bu metot, hiperakümülatör bitkilerin kullanılması ile ortamda bulunan organik kirleticilerin yapısının bozunması esasına dayanmaktadır (Şekil 2.9). Bu işlemin gerçekleşmesi için enzimatik reaksiyonlara ihtiyaç vardır. Kontaminantlar öncelikle bitkiler aracılığı ile absorbe edilir, ardından enzimler sayesinde bozunuma uğratılırlar. Bitkilerin bünyelerinde barındırdıkları organik maddeler, metabolik yollar aracılığı ile daha küçük boyutlu parçalara ayrılırlar. Ardından parçalara ayrılan bu moleküller, metabolik olarak kullanılabilir duruma gelip bitki dokuları ile bütünleşik bir hal alırlar. Fitodegradasyondan faydalanılarak yeraltı sularındaki çözücüler, topraktaki petrol ve aromatik bileşikler ile havadaki uçucu bileşikler gibi birçok farklı kirleticinin yarattığı kirlilik iyileştirilebilir (Newman ve Reynolds, 2004).

2.7.5. Fitostabilizasyon

Bu teknikte, erozyon oluşumunun önüne geçilmesi, yer altı sularının kirletici maddelerce kontamine olmasının azaltılması ve toprakla doğrudan temasın engellenmesi için toprak yüzeyi bitkiler ile kaplanmaktadır (Şekil 2.9). Fitostabilizasyon ile bitki kökleri fiziksel ve kimyasal olarak kirleticileri immobilize etmektedir (Berti ve Cunningham, 2000). Kirlenmiş topraklarda yetişebilen ve ağır metalleri toksik olmayan veya daha düşük toksisiteye sahip formlara dönüştürmek için toprağın fizyolojik, kimyasal ve biyolojik karakterini değiştirebilen bitkiler bu yöntem için tercih sebebidir. Geniş kök sistemi, yüksek biyokütle üretimi (toksik düzeyde ağır metallerin varlığında) ve metalleri gövdeye en az seviyede taşıma kapasitesi olan bitkiler fitostabilizasyonda kullanıma oldukça elverişlidir (Rizzi ve ark., 2004; Aybar, Bilgin ve Sağlam, 2015).

2.8. Ağır Metal Biriktirebilen Bitkiler

2.8.1. Metallofitler

Fitoremediasyon yönteminde kullanılabilen bazı genetik olarak donanımlı metal biriktirme kapasitesi yüksek bitkiler vardır. Metallofitler olarak adlandırılan bu bitki türleri; fitotoksik ağır metal (As, Cd, Cu, Pb, Ni vb.) kirliliği seviyelerine sahip topraklara dayanıklı olup bu metal seviyelerinde hayatta kalarak, üreyip çoğalabilirler. Metallofitler, tolerans elde etmek için iki özel strateji geliştirmişlerdir,

bunlardan ilk olarak metal iyonlarının girişini ve/veya kökten sürgüne translokasyonunu sınırlamak; ikinci olarak da bitki gövdesinde ağır metal iyonlarının varlığını tolere etmektir (Wojcik ve ark., 2017).

2.8.2. Hiperakümülatörler

Hiperakümülatörler, bünyelerinde fiziksel hiçbir hasar meydana gelmeksizin diğer bitkiler için kritik seviyenin üzerinde ağır metal biriktirebilirler. Kuru yaprak kütlesinde nikel hiperakümülatörlerinin 450 taksonu $1000-38000 \text{ mg Ni kg}^{-1}$ arasında akümüle ederken; aynı habitatta bulunan akümülatör olmayan taksonların çoğunluğu $200 \text{ mg Ni kg}^{-1}$ konsantrasyonunun altında biriktirirler (Wycisk ve ark., 2004). Bir metal hiperakümülatörünü tanımlamak için değerlendirilen ana özellik, tolere edilebilen toksik metal iyonunun eşik konsantrasyonudur. Tipik olarak, sürgün kuru ağırlığının Zn ve Mn için %1'i; As, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb, Se ve Tl için %0.1'i ve Cd için %0.01'i eşik değer olarak kabul edilir. Dünyada tanımlanmış olanların yanı sıra halen tanımlanmamış potansiyel nikel hiperakümülatör bitkilerin de var olabileceği yönündeki raporlar gün geçtikçe literatüre eklenmektedir. Nikelin, bitkilerde en yüksek akümülyasyon seviyesine ulaşabilen ağır metal olduğu gösterilmiştir. New Caledonia'nın serpentin topraklarına endemik olan *Sebertia acumunata*'da lateksinde %26'ya kadar nikel akümüle edebilmektedir. Türünün tek bir ağacı tek başına 37 kg metal biriktirebilmektedir. Keşfedilmiş nikel hiperakümülatörlerinin yaklaşık %25'i Brassicaceae ailesine ve özellikle de *Alyssum* ve *Thlaspi* cinsine aittir (Rascio ve Navari-Izzo, 2011; Van der Ent ve ark, 2013).

2.9. Fitoremediasyon Yönteminin Avantaj ve Dezavantajları

Çevresel ıslah adı altında diğer ıslah yöntemleriyle kıyaslandığında fitoremediasyon yönteminin öne çıktığı avantajlar ve uygulanmasında ya da sonuç alınmasında bazı zorluklar bulunmaktadır.

Fitoremediasyonun Avantajları;

- Diğer remediasyon yöntemlerine göre oldukça ekonomiktir,
- Atık dökümü için ekstra bir alana gerek duyulmaz,
- Kamuoyu tarafından da kabul gören estetik bir görünüm ortaya çıkar,

- Kirlenmiş alanın farklı bir yere transfer edilmesine ihtiyaç olmadığı için kontaminantların çevreye yayılması engellenmiş olur,
- Yalnızca tek bir kirleticie yönelik değil birden fazla kirleticie ile mücadele edilebilir ve alanda çok yönlü bir iyileştirme sağlanabilir.
- Ortamdan uzaklaştırılan değerli metallerin tekrar elde edilebilmesi sağlanır

Fitoremediasyonun Dezavantajları;

- Kullanılacak bitkilerin, kirlenmiş alanın biyotik faktörlerine uyumu ve bitkinin kirleticie olan toleransı, yöntemin başarıya ulaşma hızını etkiler,
- Yapraklarda akümüle edilen kirleticiler yaprakların dökülmesi ile beraber yeniden toprağa karışabilir,
- Diğer ıslah metotlarıyla kıyaslandığında ıslah zamanı daha uzun sürebilir (EPA, 1995)

Hiperakümülatörler, kirlenmiş alanların detoksifikasiye edilmesinde ve değerli metallerin fitomadenciliğinde oldukça yararlı ve ilgi çekicidir (Visioli ve Marmioli, 2013).

Genellikle serpantin topraklara endemik olan bu bitkiler küçük boyutlu, düşük büyüme oranına sahip ve mekanik olarak hasatı zor olan bitkilerdir. Günümüzde genetik stratejiler ile bu hiperakümülatör bitkilerden tolerans genlerinin tespit edilip klonlanarak ilgili genin hedef bitkiye aktarılması sonucu; büyüme oranı yüksek, kısa zamanda önemli düzeyde biyokütle üreten ve mekanik olarak hasatı kolay olan üstün fitoremediasyon yeteneğine sahip transgenik bitkiler elde edilerek fitoremediasyon yönteminde kullanılmaktadır. Genetik stratejilerin yanı sıra klasik ıslah yöntemleri ile de yapılan çalışmalar da mevcuttur.

Bu çalışmalar hiperakümülatör bitkilerin metal biriktirmelerinin kendilerine bazı avantajlar kazandırdığını ortaya koymuştur. Bu avantajlar iki grupta incelenebilir: Birincisi, diğer bitkiler ile olan rekabet avantajıdır. Diğer bitkilerin yaşayamayacağı kadar yüksek konsantrasyonda metal içeren bu topraklarda yaşayan bitkiler, daha fazla ışığa, suya ve bazı besinlere daha çok ve kolay ulaşabilme imkanına sahiptirler. İkincisi, herbivor ve patojen saldırılarından korunmalarıdır. Ağır metaller

sadece bitkiler için değil diğer canlılar için de toksik etki göstermesi nedeniyle floem özsuyunda ve diğer organlarda metal biriktiren bitkilerin daha az saldırıya uğradığı; üzerine bırakılan larvaların metal içermeyen bitkilere göre larval biyokütlelerini artmadığı ve larvaların kısa bir süre içinde öldüğü gösterilmiştir (Martens ve Boyd, 2002).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali

Bu araştırmada kullanılan aspir bitkisinin yerel (*Carthamus tinctorius* L., Olas) ve atasal (*Carthamus oxyacantha* M. Bieb.) genotiplerine ait tohumlar, Trakya Tarımsal Araştırmalar Enstitüsünden temin edilmiştir.

3.1.1. Bitki Yetiştirme Yöntemi

Aspir genotiplerine ait tohumlar %5'lik sodyum hipoklorit çözeltisi ile 5 dakika kabuk sterilizasyonu yapılmış ardından yaklaşık 10 defa distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra 3 saat boyunca distile su içerisinde şişmeye bırakılan tohumlar, çimlendirme kaplarında karanlıkta çimlendirildikten sonra, fideler su kültürü ortamında yetiştirilmek üzere tek bitki içeren ve saksılara sabitlenen 3 falkon tüplerinden (50ml) oluşan sisteme transfer edilmiştir (Şekil 3.1). Denemeler, 4 uygulama ve 3 tekrarlı ve her bir tekrarda bağımsız 3 bitki olacak şekilde tasarlanmıştır. Herhangi bir kontaminasyona karşı (örneğin ışıktaki alg üremesi gibi) tüpler alüminyum folyo ile sarılarak kökler ışıktan korunmuştur. Denemeler, 25°C sıcaklıkta, 16 saat ışık/ 8 saat karanlık fotoperiyotta ve 180-200 $\mu\text{mol.m}^{-1}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde, %40-50 nemde, kontrollü iklim kabinlerinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1).

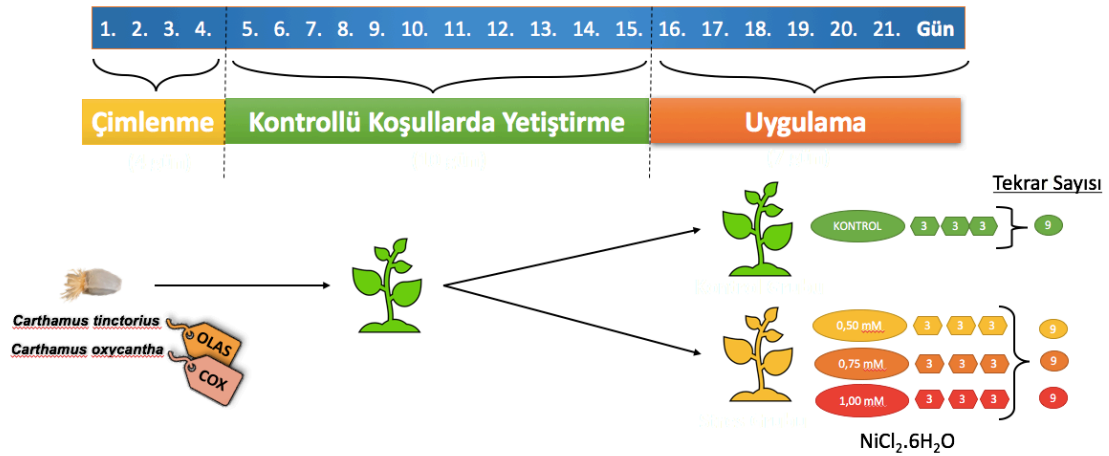


Şekil 3.1. Bitkilerin yetiştirildiği su kültürü sistemi ve iklim kabininden görüntüler

Genotiplere ait bitkiler 4 günlük çimlenme periyodunun ardından 10 gün boyunca su kültüründe Hoagland (1952) besin çözeltisinde yetiştirilmiş, ardından 7 gün süre ile uygulama gruplarına nikel ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) uygulanmıştır. Kontrol uygulamaları için

yalnızca Hoagland besin çözeltisi kullanılmıştır. Besin çözeltileri ilk 10 gün boyunca günde bir, uygulama süresince ise her gün değiştirilmiştir.

Nikel konsantrasyonları ve süresi, fotosentetik sistemlerin enerjetik davranışlarında meydana gelen değişimlerin anlaşılmasını sağlayan klorofil a floresans ölçümleri ile belirlenmiştir. Bu bağlamda nikel stresinin başlangıcından itibaren sırasıyla 1., 3., 5., 7., 9. günlerde polizafik klorofil a floresansı ölçümleri yapılarak stres uygulamalarının konsantrasyonu ve süresi ön denemeler ile belirlenmiştir. Nikel uygulamaları 7 gün süre ile 0 (kontrol), 0.5, 0.75 ve 1.0 mM nikel ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) konsantrasyonları olacak şekilde yapılmıştır. Toplam 21 gün süren denemeler her bir uygulama ve kontrol için 9 tekrarlı olup rastgele deneme deseninde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.2. Deneme planı

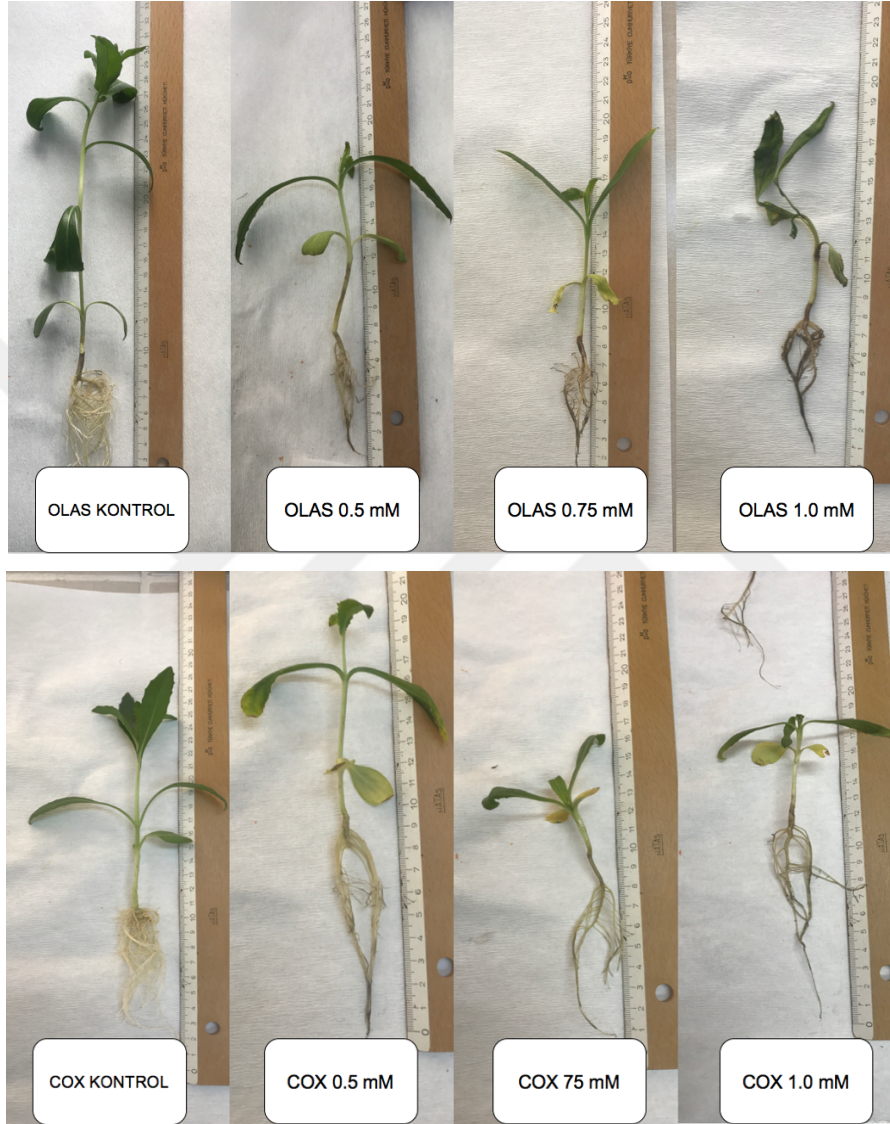
3.2. Ölçüm ve Analizler

3.2.1. Morfolojik Ölçümler

Morfolojik ölçümler her uygulama için 9 teknik (3 saksı x her bir saksıda 3 bitki) ve 2 deneysel tekrar olacak şekilde toplam 18 ($n=18$) tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.1. Kök ve Sürgün Uzunlukları ile Yaprak Sayısı Ölçümleri

Kontrol ve uygulama grubuna ait aspir bitkilerinin kök ve sürgün boyları (cm. bitki⁻¹) ölçülüp yaprak sayıları (adet. bitki⁻¹) belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen bu verilere göre bitki boyu tolerans indeksi (%BBTI) hesaplanmıştır (Blumenthal ve ark., 1990; Ahmad ve ark., 2009).



Şekil 3.3. Aspir genotiplerine ait morfolojik ölçümleri yapılan örneklerden görüntüler

3.2.1.2. Kök ve Sürgünlerin Yaş ile Kuru Ağırlık Ölçümü

Kontrol ve nikel uygulama gruplarına ait bitkilerin kök ve sürgün organları ayrılıp yaş ağırlıkları (g. bitki⁻¹) ölçülmüştür. Ardından yaş ağırlıkları belirlenen bitki materyalleri 80°C'deki etüvde 48 saat kurutulup yeniden tartımı yapılarak kuru ağırlıkları (g. bitki⁻¹) belirlenmiştir. Elde edilen bu verilere göre, yaş ağırlık tolerans indeksi (%YATI) ve

kuru ağırlık tolerans indeksi (%KATI) hesaplanmıştır (Blumenthal ve ark., 1990; Ahmad ve ark., 2009).

YATI (%) = (Strese maruz kalan bitkilerin yaş ağırlığı/Kontrol bitkilerinin yaş ağırlığı) × 100

KATI (%) = (Strese maruz kalan bitkilerin kuru ağırlığı/Kontrol bitkilerinin kuru ağırlığı) × 100

3.2.2. Fizyolojik ve Biyokimyasal Analizler

3.2.2.1. Nikel Birikiminin Belirlenmesi

Genotiplerin kök, gövde ve yaprak dokularındaki nikel birikimini belirlemek için dokular 80°C'lik etüvde 48 saat süreyle kurutulmuştur. Dokulara ait 0.2 g kurutulmuş bitki materyali havanda ince bir şekilde öğütülmüştür. Öğütülen doku örnekleri porselen krezelerde 550°C'lik kül fırınında 5 saat yakılmıştır. Yaş yakma işleminden sonra, fırından alınan numunelere, soğutulduktan sonra 1 ml derişik HNO₃ ilave edilerek 15 dakika inkübe edilir. Daha sonra çözeltiler balon jojelere alınmış ve üzerlerine 25 ml'ye tamamlayacak şekilde deiyonize su eklenerek 30 dakika bekletilmiştir. Bekleme işlemi sonunda çözeltiler Whatman kağıdından süzölmüştür. Uygulamalara ait süzülen çözeltilerdeki nikel miktarı, atomik absorbsiyon spektrometresinde (Varian AA2420FS) belirli standart nikel çözeltileri ile kalibre edildikten sonra her bir uygulama için 3 tekrarlı olacak şekilde belirlenmiştir. Okunan absorbans değerlerinden nikel miktarı, kuru ağırlık (KA) temelinde ppm. g KA⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu verilerden, translokasyon indeksleri Chami ve ark. (2015)'larına göre hesaplanmıştır.

3.2.2.2. Polifazik Klorofil a Fluoresans Kinetikleri Ölçümü

Klorofil a floresans ölçümleri (OJIP geçişleri) Fluorometre (HandyPEA, Hansatech Ltd.) ile yapılmıştır (Şekil 3.4a). Uygulama gruplarına ait fidelerden seçilen bitkilerin özel yaprak klipsleri ile üstten tutturulmasıyla 30 dakika karanlığa adapte edilen yapraklarında ölçüm yapılmıştır.

Fluorometre, floresansı kırmızı ışıkla (maximum 650 nm'de emisyon) uyarır ve 700 nm üzerindeki floresansı algılar. Ölçümler 3 adet düzenli ışık yayan diodun ürettiği bir saniyelik tek güçlü ışık pulsu (3000 µmol m⁻²s⁻¹, tüm PSII reaksiyon merkezlerinin kapanması için yeterli olan eksitasyon şiddeti) ile ve 4 mm'lik yaprak alanında gerçekleştirilmiştir (Strasser ve Strasser, 1995). Hızlı floresans kinetikleri (minimum floresans, F_O-maksimum floresans, F_M) 10 µs'den 1 s'ye ve 20 µs "O",

b)

a)

c)

Klorofil a floresansı (a.u.)

Zaman (s)

OJIP

Elektronlar STROMA

Protonlar

LÜMEN

Sinilayıcı basamaklar:

- J** = Okside PQ molekülünün reduklenmesi
- I** = PQH₂'nin cı b6/f tarafından tekrar oksidasyonu
- P** = inaktif ferredokin-NADP⁺-redüktaz (FNR)

OJ = PSII'nin akseptör kısmının reduksiyonu

JI = PQ havuzunun reduksiyonu

IP = PSI'nin akseptör kısmındaki ferredoksinin reduksiyonu

36

Çizelge 3.1. JIP-testte kullanılan bazı terimlerin, tanımlamaların ve formüllerin özeti
(Strasser ve ark., 2000; 2004; Tsimilli-Michael ve Strasser 2008; Han ve ark., 2009; Stirbet ve ark., 2018).

Teknik ve hesaplanan fluoresans parametreleri	Tanımı
F_o	Minimum fluoresans intensitesi (O basamağı)
F_J	2 ms'deki fluoresans intensitesi (J basamağı)
F_I	30 ms'deki fluoresans intensitesi (I basamağı)
F_M	Maksimum fluoresans intensitesi (P basamağı)
V_J	$(F_{2ms} - F_o)/(F_M - F_o)$, J basamağındaki değişken fluoresans
Mo veya $(dV/dt)_o$	$4(F_{300\mu s} - F_o)/(F_M - F_o)$, Fluoresansın tahmini başlangıç eğimi (ms^{-1} 'deki) veya fotokimyanın başlangıç hızı
Kuantum etkinliği veya akış oranları	
ϕ_{Po} veya TRo/ABS	$(1 - F_o)/F_M$ veya F_v/F_M , Primer fotokimyanın maksimum quantum verimi
ϕ_{Eo} veya ETo/ABS	$1 - F_o/F_M$. Ψ_o , Elektron transportunun maksimum verimi
Ψ_o veya ETo/TRo	$1 - V_J$, Tutulan eksitonun Q_A^- 'dan elektron transport zincirine bir elektronu hareket ettirme etkinliği
δRo veya RE/ETo	$(1 - V_J)/(1 - V_I)$, İndirgenmiş sistemlerarası elektron alıcılarının bir elektronu, PSI son elektron alıcılarına hareket ettirme etkinliği
ϕ_{Ro} veya REo/ABS	$\phi_{Po} \cdot \Psi_o \cdot \delta Ro$, Q_A^- 'dan PSI son elektron alıcılarına elektron transportun kuantum verimi
Spesifik akışlar	Her bir reaksiyon merkezi başına enerji akışları
ABS/RC	$Mo \cdot (1/V_J) \cdot (1/\phi_{Po})$, $t = 0$ 'da absorplanan enerji akışı veya ortalama anten büyüklüğü
TRo/RC	$Mo \cdot (1/V_J)$, $t = 0$ 'da yakalanan enerji akışı
ETo/RC	$Mo \cdot (1/V_J) \cdot \Psi_o$, $t = 0$ 'da elektron transportu
Dlo/RC	$(ABS/RC) - (TRo/RC)$, Fotokimya dışında kaybedilen enerji
Fenomenolojik akışlar	Ölçüm yapılan yaprak alanı bazında enerji akışları
ABS/CSO $\approx F_o$	$t = 0$ 'da absorplanan enerji akışı
TRo/CSO	$\phi_{Po} \cdot (ABS/CSO)$, $t = 0$ 'da yakalanan enerji akışı
ETo/CSO	$\phi_{Po} \cdot \Psi_o \cdot (ABS/CSO)$, $t = 0$ 'da elektron transportu
Dlo/CSO	$(ABS/CSO) - (TRo/CSO)$, Bir PSII'de fotokimya dışında kaybedilen enerji
RC/CSO	$\phi_{Po} \cdot (V_J/Mo) \cdot F_o$, $t = t_{F_M'}$ 'da aktif PSII reaksiyon merkezleri miktarı
PI_{abs}	$(RC/ABS) \cdot (\phi_{Po} / (1 - \phi_{Po})) \cdot (\Psi_o / (1 - \Psi_o))$, Performans indeksi
PI_{Top}	$(RC/ABS) \cdot (\phi_{Po} / (1 - \phi_{Po})) \cdot (\Psi_o / (1 - \Psi_o)) \cdot (\delta Ro / (1 - \delta Ro))$, Toplam performans indeksi

3.2.2.3. Fotosentetik Pigment Miktarının Belirlenmesi

Kontrol ve nikel uygulama gruplarına ait yerel ve atasal aspir genotiplerinin yaprak dokularındaki klorofil (a+b) ve karotenoid (ksantofil+β-karoten) miktarları (mg. ml⁻¹ cm⁻²) Lichtenthaler (1987)'a göre belirlenmiştir. Bu yöntemde kontrol ve uygulama gruplarına ait bitkilerin yaprak dokusundan her bir uygulama için 9 tekrarlı olacak şekilde diskler çıkartılarak (R=0.6 cm) ependorf tüplere aktarılmış ve üzerlerine 1 ml %100'lük aseton eklenmiştir. Örnekler bir hafta +4 C'de karanlıkta bekletilerek pigment içeriğinin asetona geçmesi sağlanmıştır. Ardından spektrofotometre (Shimadzu UV-Vis Double Beam) ile 470, 644.8 ve 661.6 nm dalga boylarında absorbanslar okunmuştur. Elde edilen bu verilere göre, pigment miktarları ve klorofil a/b oranı hesaplanırken, klorofil stabilite indeksi (KSI) Sairam ve ark. (1997) göre belirlenmiştir. Pigment miktarları aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır;

$$\text{Klorofil a (kl.a)} = (11.24 \times A_{661.6}) - (2.04 \times A_{644.8})$$

$$\text{Klorofil b (kl.b)} = (20.13 \times A_{644.8}) - (4.19 \times A_{661.6})$$

$$\text{Toplam klorofil (kl a+b)} = (7.05 \times A_{661.6}) - (18.09 \times A_{644.8})$$

$$\text{Karotenoid (x+c)} = [(1000 \times A_{470}) - (1.9 \times \text{kl.a}) - (63.14 \times \text{kl.b})] / 214$$

$$\text{KSI (\%)} = (\text{Strese maruz kalan bitkilerin toplam klorofil içeriği} / \text{Kontrol bitkilerinin toplam klorofil içeriği}) \times 100$$

3.2.2.4. Oransal Su İçeriğinin Belirlenmesi

Aspir genotiplerinde yaprak oransal su içeriğini belirlenmesi Farrant (2000)'a göre yapılmıştır. Bu metotta her bir uygulama için 6 tekrarlı olacak şekilde stres ve kontrol gruplarına ait bitkilerin yapraklarından 0.5 cm çapında diskler çıkarılmıştır. Yaş ağırlıkları alınan bu diskler 5 ml su içeren falkon tüplerde 24 saat boyunca 100 rpm'de çalkalanmıştır. Hidrate olan yaprak diskleri tekrar tartılarak turgor durumundaki ağırlıkları hesaplanmıştır. Ardından 48 saat boyunca 80 °C'deki etüvde suyunu kaybetmesi sağlanarak kuru ağırlığı ölçülmüştür. Elde edilen verilerden %OSİ formülü ile oransal su içeriği hesaplanmıştır.

$$\text{OSİ (\%)} = (\text{YA-KA}) / (\text{HA-KA}) \times 100$$

Formülde YA, yaş ağırlığı; HA, hidrate ağırlığı ve KA, kuru ağırlığı ifade etmektedir.

3.2.2.5. İyon Sızıntısı Oranının Belirlenmesi

İyon sızıntısı Redmann, Haraldson ve Gusta (1986)'nın modifiye edilmiş metoduna göre analiz edilmiştir. Uygulama ve kontrol gruplarının yaprak dokularından 6 tekrarlı olacak şekilde 2 adet alınan kesitler (1 cm²) 10 ml distile su bulunan falkon tüplere aktarılmıştır. 24 saat 100 rpm'de çalkalanan örnekler alüminyum folyolara sarılarak 30 dakika boyunca sıvı azot içerisinde bekletilmiştir. Bu süreçte falkon tüplerdeki sıvı örnekleri ise 280 nm dalga boyunda absorbens değerleri okunmuştur (A₂₈₀). Okumadan sonra yaprak diskleri tekrar ilgili tüplere konularak 24 saat aynı rpm'de çalkalanmıştır ve 24 saat sonunda diskler tekrar tüplerden çıkartılıp tüpte kalan sıvı örneklerin absorbens değerleri spektrofotometrede 280 nm dalga boyunda okunmuştur (A'₂₈₀). Elde edilen verilerden iyon sızıntısı oranı aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{İyon Sızıntısı Oranı} = A_{280}/A'_{280}$$

3.2.2.6. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Miktarının Belirlenmesi

Bir reaktif oksijen türü (ROT) olan H₂O₂ miktarı Esterbauer ve Cheeseman (1990)'a göre belirlenmiştir. Kontrol ve uygulama gruplarındaki bitkilerden alınan 0.1 g yaprak örneği, 4 ml %0.1 trikloroasetik asit (TCA) ile 4°C'de homojenize edilmiştir. Homojenat 10000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatandan H₂O₂ miktarı aşağıda verilen yöntem ile belirlenmiştir. Her bir uygulama için 3 teknik 2 deneysel tekrar olmak üzere toplam 6 tekrarlı (n=6) olacak şekilde ölçüm yapılmıştır.

H₂O₂ miktarını belirlemek için cam tüpe alınan 0.5 ml süpernatanın üzerine 0.5 ml pH'sı 7.6 olan 0.1 M tris/HCl tamponu ve 1 ml 1 M KI eklenmiştir. Reaksiyon karışımı 90 dk karanlıkta bekletilmiş ve spektrofotometrede (Shimadzu UV-Vis Double Beam) 390 nm dalga boyunda absorbens değerleri okunmuştur. Yaprak dokularındaki H₂O₂ miktarı µmol g T.A.⁻¹ olarak belirlenmiştir.

3.2.2.7. Antosiyanin ve Flavonoid Miktarının Belirlenmesi

Kontrol ve nikel uygulama gruplarına ait bitkilerin yaprak dokularındaki antosiyanin içeriği Mancinelli (1975)'ye göre, flavonoid içeriği ise Mirecki ve Teramura (1984)'ya göre ölçülmüştür. Her bir uygulama için 3 teknik 2 deneysel tekrar olmak üzere toplam 6 tekrarlı (n=6) olacak şekilde 0.1 g taze yaprak örneği 6 ml %79 metanol,

%20 distile su ve %1 HCl'den oluşan karışım eklenerek homojenize edilmiştir. Homojenat +4°C'de 10000 rpm'de 20 dk boyunca santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatandan aşağıda belirtilen metotlar takip edilerek antosiyanin ve flavonoid içeriği saptanmıştır:

Antosiyanin içeriğini belirleyebilmek için, elde edilen süpernatanın spektrofotometrede (Shimadzu UV-Vis Double Beam) 530 ve 657 nm dalga boylarında absorbans değerleri kaydedilmiştir. Yaprak dokularındaki antosiyanin miktarları (mg ml^{-1} g YA⁻¹) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Antosiyanin} = A_{530} - (A_{657}/3)$$

Flavonoid içeriğini belirleyebilmek için, elde edilen süpernatanın spektrofotometrede (Shimadzu UV-Vis Double Beam) 300 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur. Yaprak dokularındaki flavonoid miktarı kontrole göre yüzde olarak hesaplanmıştır.

3.2.2.8. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.2.2.8.1. Protein Miktarının Belirlenmesi

Aspir genotiplerinin kontrol ve uygulama gruplarına ait yaprak örneklerinin protein konsantrasyonları, Bradford (1976) yöntemine göre sığır serum albümini (BSA) standardı kullanılarak saptanmıştır. 20 µl örnek çözelti ile 480 µl distile su karıştırıldıktan sonra, karışıma 5 ml Bradford çözeltisi eklenmiştir. Vorteks ile yaklaşık 30 saniye homojen hale getirilen karışım oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir. Çözeltinin absorbans değerleri spektrofotometrede (Shimadzu UV-Vis Double Beam) 595 nm dalga boyunda üç tekrarlı olacak şekilde okunmuştur.

3.2.2.8.2. Toplam Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Belirlenmesi

Toplam süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) enzim aktivitesi, nitrobluetetrazolyumun (NBT) fotokimyasal indirgenmesini esas alan metoda uygun şekilde spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Beyer ve Fridovich, 1987). Kontrol ve stres grubuna ait bitkilerin yaprak ve kök dokusundan 0.5 g alınıp sıvı azot yardımı ile öğütüldükten sonra 100 mM potasyum fosfat (pH 7.0) ve 1 mM Na₂EDTA içeren 1.5 ml'lik çözelti eklenmiştir. Karışım 14000 rpm'de 20 dakika +4 °C'de santrifüj

edildikten sonra enzimin bulunduğu süpernatant kısmı ayrılmıştır. Konsantrasyonu 50 mM olan fosfat tamponu (pH 7.8), 9.9 mM L-metiyonin, 57 µM NBT ve %1 triton X-100 ile karıştırılmıştır ve bu karışımdan alınan 1 ml çözeltiye 20 µl süpernatant eklenmiştir. Örneğin konulmasının ardından reaksiyonu başlatmak için karışıma 10 µl riboflavin ilave edilmiştir. Ardından tüpler $375 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda floresan ışığına maruz bırakılmıştır ve absorbans değerleri spektrofotometrede (Shimadzu UV-Vis Double Beam PC) 560 nm dalga boyunda okunmuştur. Toplam SOD aktivitesi ünite mg protein⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Bir enzim ünitesinin aktivitesi, NBT indirgenmesinde %50'lik bir inhibisyon yaratmak için gereken SOD miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.2.2.8.3. Toplam Peroksidaz (POD) Aktivitesinin Belirlenmesi

Toplam guaiakol peroksidaz (POD; EC 1.11.1.7) enzim aktivitesi Bergmeyer (1974)'e göre belirlenmiştir. Yaprak ve kök dokularından örneklerle ölçülen bu metotta reaksiyon karışımı 3 ml olup 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0), 20.1 mM guaiakol, 12.3 mM H₂O₂ ve enzim özütü içermektedir. Reaksiyon, enzim özütünün ilavesiyle başlatılmıştır ve 10 dk'lık süre içerisinde izlenmiştir. Toplam POD enzim aktivitesi, guaiakol'ün ekstinksiyon katsayısı (6.39 mM.cm⁻¹, 436 nm) kullanılarak reaksiyon başlangıç hızından (nmol H₂O₂ dak⁻¹ mg protein⁻¹) hesaplanmıştır.

3.2.2.8.4. Toplam Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesinin Belirlenmesi

Rao, Hale ve Ormrod (1995)'un metodu ile belirlenen toplam glutasyon redüktaz (GR: EC 1.6.4.2) aktivitesi için uygulama ve kontrol gruplarına ait bitkilerin yaprak ve kök dokularından 0.5 g taze yaprak örneği sıvı azot ile ezildikten sonra üzerine 100 mM potasyum fosfat (pH 7.0) ve 1 mM Na₂EDTA içeren 1.5 ml'lik çözelti eklenmiştir. Bu karışım 14000 g +4°C'de 20 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant enzim ölçümü için ayrılmıştır. Konsantrasyonu 100 mM olan potasyum fosfat tamponu (pH 7.8), 2 mM Na₂EDTA, 0.5 mM GSSG, 0.2 mM NADPH ve 100 µg protein içeren enzim ekstraktı son hacim 1 ml olacak şekilde hazırlanmıştır. NADPH'nin ortama eklenmesi ile reaksiyon başlamış örnekler 340 nm'de spektrofotometre'de (Shimadzu UV-Vis Double Beam PC) okunmuştur. NADPH'in enzimatik olmayan oksidasyonu için 340 nm dalga boyunda GSSG eklenmeyerek kaydedilen azalışla

düzeltilme yapılmıştır. Toplam GR aktivitesi NADPH'nin ekstinksiyon katsayısı (6.2 mM.cm^{-1}) kullanılarak enzimatik olmayan oksidasyon çıkarıldıktan sonra reaksiyon başlangıç hızından ($\text{nmol NADPH dak}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) hesaplanmıştır.

3.2.2.8.5. Toplam Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesinin Belirlenmesi

Askorbat peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11) enzim aktivitesi Wang ve ark. (1991)'nin metoduna göre belirlenmiştir. Kontrol ve uygulama gruplarına ait bitkilerden alınan taze yapraklar (0.5 g) sıvı azot ile ezildikten sonra üzerine 50 mM Tris-HCl (pH 7.2), 1 mM Na_2EDTA ve 2 mM askorbat içeren 1.5 ml'lik çözelti eklenmiştir. Bu karışım $+4^\circ\text{C}$ 'de 12000 rpm'de 20 dakika santrifüjlendikten sonra 75 μg protein içeren enzime 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 6.6), 2.5 mM askorbat ve 10 mM H_2O_2 ile son hacim 1 ml olacak şekilde ilave edilmiştir. H_2O_2 'nin eklenmesi ile reaksiyon başlatılmıştır. Askorbatın okside olması nedeniyle askorbat konsantrasyonunda azalma görülmektedir. Bu azalma spektrofotometrik olarak 290 nm dalga boyundaki absorbans değerlerinin enzim içermeyen reaksiyon çözeltisine karşılık kaydedilmesiyle değerlendirilmiştir. Toplam APX enzim aktivitesi, askorbatın ekstinksiyon katsayısı (2.8 mM.cm^{-1}) kullanılarak başlangıç hızından ($\text{nmol askorbat dak}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) hesaplanmıştır.

3.2.3. İstatistiksel Analizler

Denemeler rastgele deneme desenine göre 3 tekrarlı ve her bir tekrarda 3 bitki olacak şekilde düzenlenmiştir. Denemelerde her bir değişken için kullanılan örneklem sayısı ($n=$) ilgili ölçüm açıklamasında verilmiştir. Denemelerden elde edilen verilere, istatistik paket programı (SPSS, versiyon 20) kullanılarak istatistikî varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Her bir değişken için uygulama ile genotipler arasındaki farkın önem kontrolü, anlamlı önemli fark (AÖF) %5 düzeyinde hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Aspir Genotiplerde Artan Nikel Düzeylerinin Morfolojik Değişimler Üzerine Etkileri

4.1.1. Kök ve Sürgün Uzamasındaki Değişimler

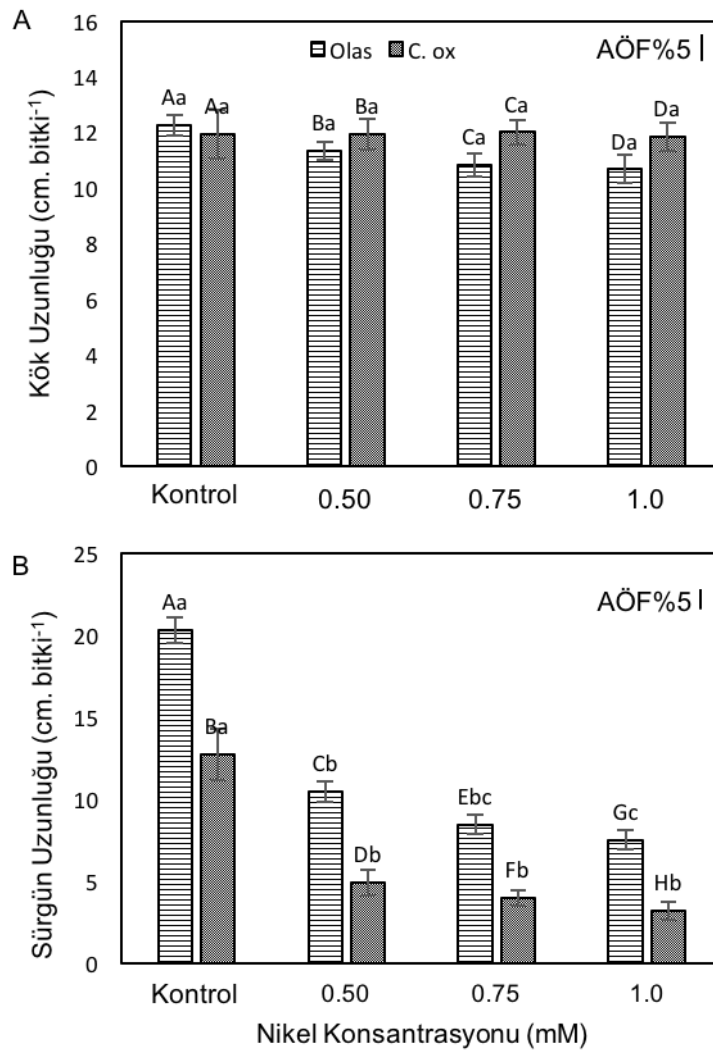
Yerel (Olas) ve atasal (*C. oxyacantha*) aspir genotiplerinin kök uzunlukları incelendiğinde; hem Olas hem de *C. oxyacantha*'nın kontrol grupları ve artan nikel düzeylerinde kök uzunluğunda meydana gelen değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Benzer şekilde genotipler birbirleri ile karşılaştırıldığında da kontrol ve nikel uygulamalarında genotipler arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.1A). Bunun yanı sıra her iki genotipte de nikel konsantrasyonunun artışına bağlı olarak (0.50, 0.75 ve 1.0 mM Ni) sürgün uzamasında anlamlı bir azalma belirlenmiştir. Genotipler arasındaki sürgün boyu farkı kontrol grubu da dahil olmak üzere tüm konsantrasyonlarda anlamlı olup, atasal genotipin yerel çeşide göre daha kısa sürgün boyuna sahip olduğu olduğu saptanmıştır. Uygulama gruplarında ise Olas çeşidinde sadece 0.50 ve 1.0 mM nikel uygulamaları arasındaki fark önemli iken, *C. oxyacantha* genotipinde uygulamalar arası fark önemli bulunmamıştır (Şekil 4.1B).

4.1.2. Kök ve Sürgün Yaş Ağırlıklarındaki Değişimler

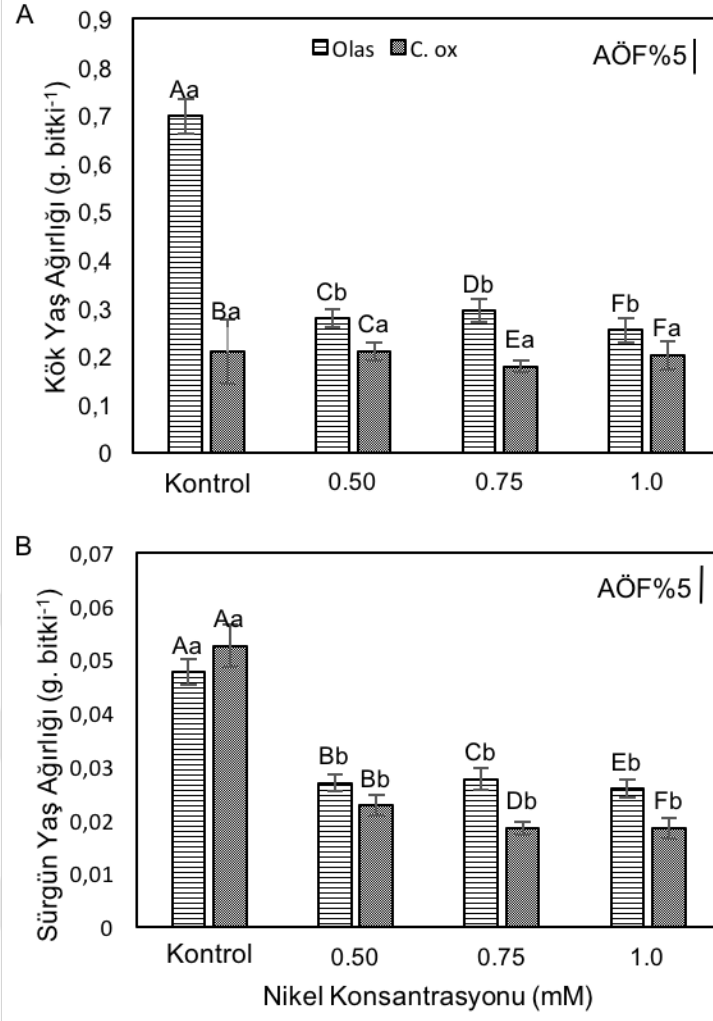
Aspir bitkisinin yerel ve atasal genotiplerinin köklerdeki yaş ağırlık ölçümleri sonucunda, Olas çeşidinin kontrol gruplarının kök yaş ağırlıklılarının uygulama gruplarına göre önemli düzeyde fazla olduğu, ancak nikel uygulama grupları arasında önemli bir fark olmadığı belirlenmiştir. *C. oxyacantha*'da ise tüm uygulamalar arasındaki yaş ağırlık değişimlerinin istatistiki açıdan önemsiz olduğu saptanmıştır. Genotipler arası yaş ağırlık farkının anlamlı olduğu konsantrasyon ise, sadece 0.75 mM nikel uygulama ve kontrol grubu olarak saptanmıştır (Şekil 4.2A). Buna karşın, *C. oxyacantha*'nın kök yaş ağırlık tolerans indeksi (%YATI)'nin yerel genotipe göre daha yüksek değere sahip olduğu bulunmuştur (Şekil 4.2A).

Her iki genotipte de kontrol ile uygulama gruplarında belirlenen sürgün (gövde+yaprak) yaş ağırlıklıkları arasındaki farkın anlamlı olduğu saptanmıştır. Genotipler arasındaki farklar ise 0.50 ve 0.75 mM nikel uygulamalarında anlamlı

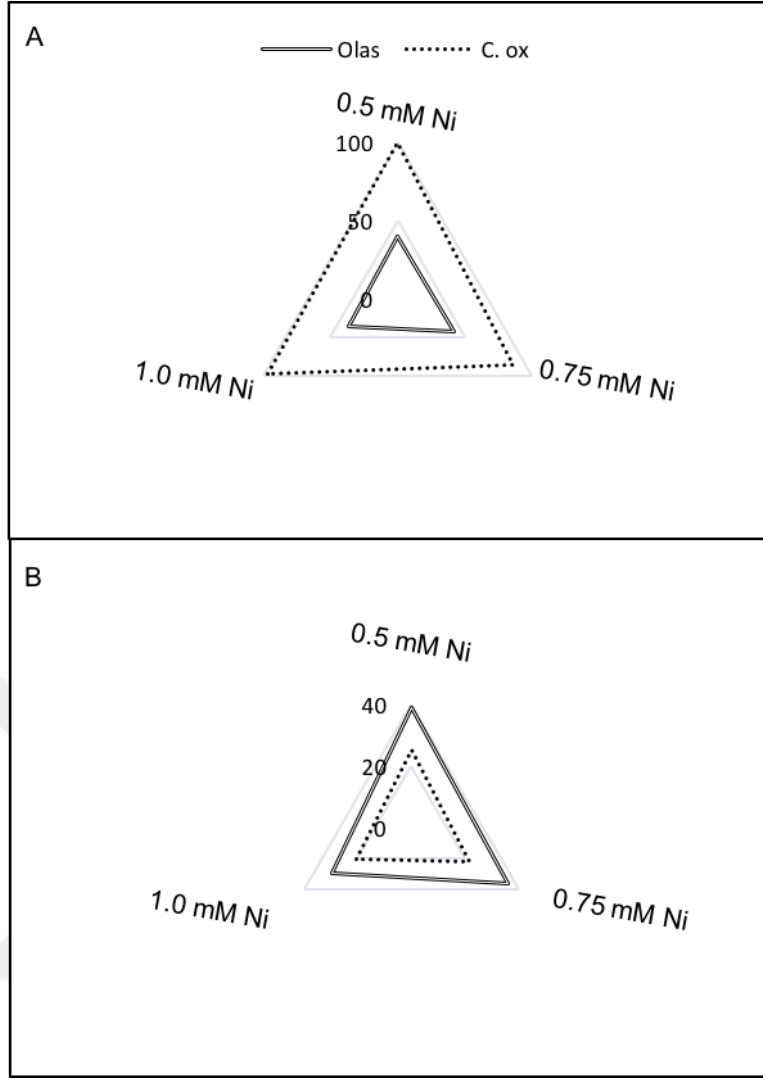
iken, kontrol ve 1 mM nikel uygulamasında önemli olmadığı saptanmıştır. Bunun yanı sıra nikel uygulamalarında her iki genotipte de sürgün yaş ağırlıklarında önemli bir değişim belirlenmemiştir (Şekil 4.2B). Genotiplerin sürgün yaş ağırlık tolerans indeksi (%YATI) karşılaştırıldığında, Olas'ın daha yüksek değere sahip olduğu bulunmuştur (Şekil 4.3B).



Şekil 4.1. Aspir genotiplerinde nikel konsantrasyonlarının kök (A) ve sürgün (B) uzaması üzerine etkisi (Bütün şekillerde kullanılan, büyük harfler her bir uygulamadaki genotipler arası farkı, küçük harfler ise uygulamalar arası farkı göstermektedir).



Şekil 4.2. Nikel konsantrasyonlarının aspir genotiplerinin kök (A) ve sürgün (B) yaş ağırlığı üzerindeki etkisi.

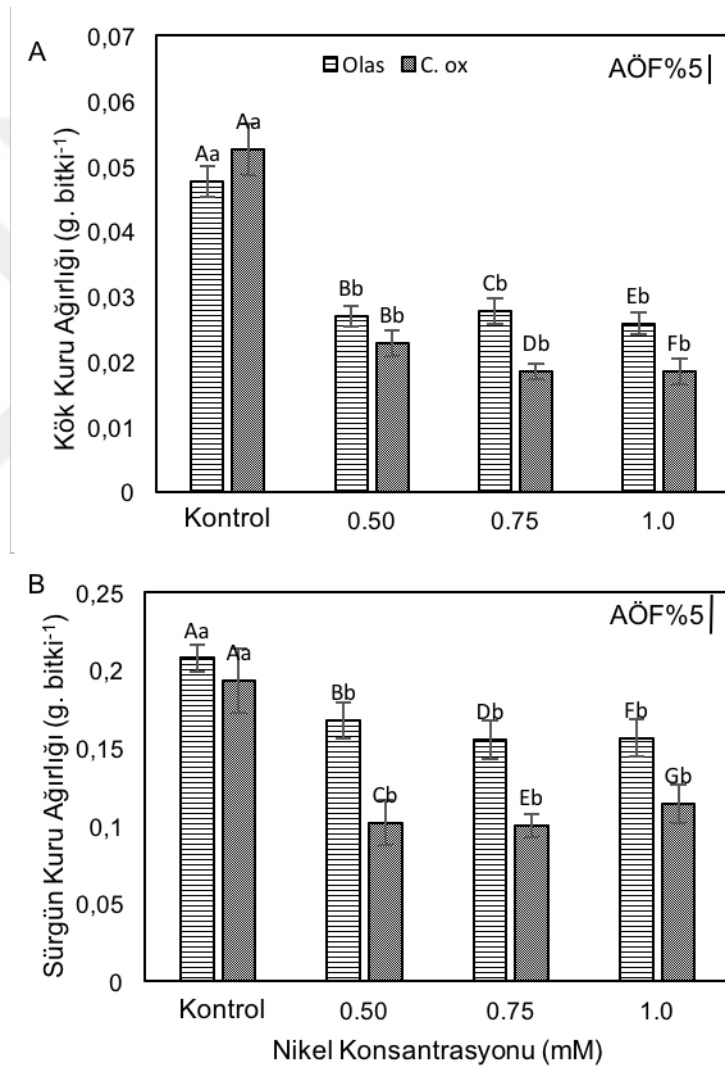


Şekil 4.3. Nikel konsantrasyonlarının aspir genotiplerinin kök (A) ve sürgün (B) yaş ağırlık tolerans indeksi (YATI) üzerindeki etkisi.

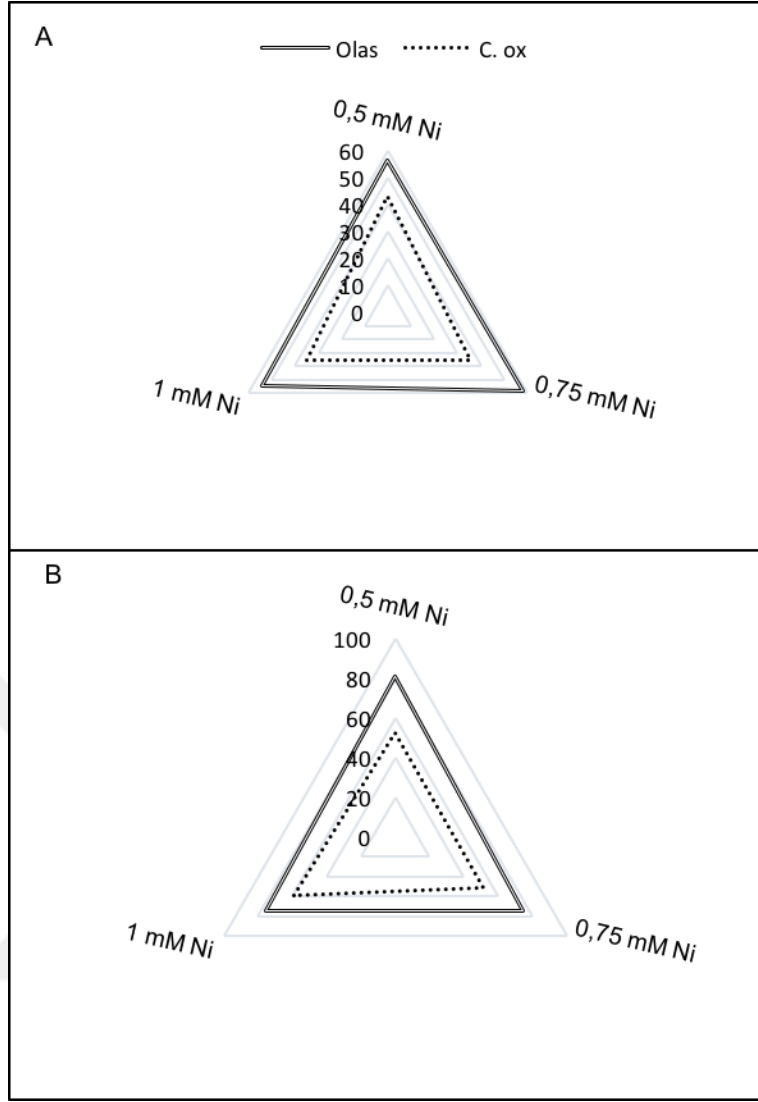
4.1.3. Kök ve Sürgün Kuru Ağırlıklarındaki Değişimler

Aspir genotiplerinin kontrol ve uygulama gruplarına ait bitkilerin kök kuru ağırlıkları incelendiğinde, 0.50; 0.75 ve 1.0 mM nikel uygulamalarında belirlenen değişimlerin anlamlı olmadığı fakat her üç konsantrasyonun da kök kuru ağırlığının kontrole göre önemli derecede azaldığı belirlenmiştir. Genotipler kök kuru ağırlıkları arasındaki farklılıkların ise 0.75 ile 1.0 mM nikel uygulamalarında önemli olduğu, kontrol ile 0.50 mM nikel uygulamasında ise önemli olmadığı saptanmıştır (Şekil 4.4A). Genotiplerin kökleri kuru ağırlık tolerans indeksleri (%KATI) karşılaştırıldığında, Olas'ın atasal genotipe göre daha yüksek değere sahip olduğu bulunmuştur (Şekil 4.5A).

Olas ve *C. oxyacantha*'da sürgün kuru ağırlıkları ölçümleri sonucunda, uygulama gruplarına ait kuru ağırlıklarının kontrol gruplarına göre önemli düzeyde azaldığı saptanmıştır. Artan nikel stresine maruz kalan uygulama grupları arasında iki genotip için de değişimler önemsiz bulunurken, yerel ve atasal genotipler karşılaştırıldığında ise kontrol grupları hariç tüm konsantrasyonlarda ortaya çıkan fark anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.4B). Genotiplerin sürgünleri kuru ağırlık tolerans indeksleri (%KATI) karşılaştırıldığında Olas'ın atasal genotipe göre daha yüksek kuru ağırlık değerine sahip olduğu bulunmuştur (Şekil 4.5B).



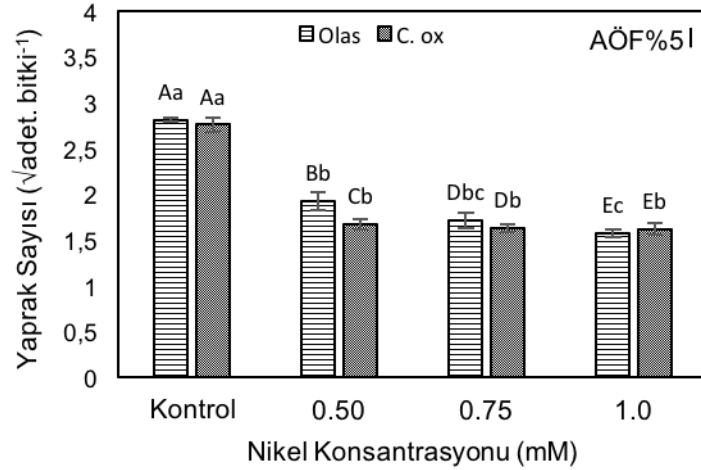
Şekil 4.4. Nikel konsantrasyonlarının aspir genotiplerinde kök (A) ve sürgün (B) kuru ağırlığı üzerindeki etkisi.



Şekil 4.5. Nikel konsantrasyonlarının aspir genotiplerinde kök (A) ve sürgün (B) kuru ağırlık tolerans indeksi (KATI) üzerine etkisi

4.1.4. Nikelin Yaprak Sayısı Üzerine Etkisi

Nikel konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak yerel ve atasal aspir genotiplerin yaprak sayısında azalma belirlenmiştir. Ancak bu azalma, Olas çeşidinde sadece 0.50 ve 1.0 mM nikel uygulamaları arasında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. *C. oxyacantha*'nın ise tüm nikel uygulamalarında belirlenen yaprak sayısındaki değişim anlamlı bulunmamıştır. Genotipler yaprak sayısı bakımından karşılaştırıldığında kontrolde ve 0.75 ve 1.0 mM nikel uygulaması gruplarında bir fark ortaya çıkmazken, 0.50 mM nikel uygulamasında Olas çeşidinin yaprak sayısı *C. oxyacantha*'ya göre daha fazla olduğu saptanmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Nikel düzeylerinin aspir genotiplerinin yaprak sayısı üzerine etkisi

4.2. Aspir Genotiplerde Artan Nikel Düzeylerinin Fizyolojik ve Biyokimyasal Değişimler Üzerine Etkileri

4.2.1. Aspir Genotiplerin Farklı Dokularındaki Nikel Akümüasyonu

Uygulanan nikel konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak aspir genotiplerinin kök>gövde>yaprak dokularında önemli miktarda nikel biriktirildiği tespit edilmiştir (Şekil 4.7A, B ve C). En yüksek nikel birikimi atasal genotip olan *C. oxyacantha*'nın köklerinde, yüksek nikel konsantrasyonunda (1.0 mM nikel) belirlenmiş olup, 186.5 ppm. g kuru ağırlık⁻¹ seviyesindedir. Bunun yanı sıra aynı konsantrasyonda yerel çeşidin köklerindeki akümüasyon seviyesi ise 135.4 ppm. g kuru ağırlık⁻¹ olarak tespit edilmiştir. İki genotipin uygulanan yüksek nikel konsantrasyonunda (0.75 ve 1.0mM) kök organlarındaki nikel akümüasyonu arasındaki sırası ile %24.2 ve %37.4'olarak belirlenen fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ve atasal genotipin köklerde daha fazla nikel biriktirdiği saptanmıştır. Genotipler arasında köklerde 0.50 mM nikel uygulamasında nikel akümüasyonu açısından önemli bir fark bulunmamıştır. Her iki genotip için de hem uygulama grupları ile kontrol grupları arasındaki, hem de uygulama gruplarının kendileri arasındaki artışlar anlamlıdır. Kök dokusundaki nikel birikimi yerel çeşit olan Olas'ta kontrollerine göre 0.50 mM nikel uygulamasında 178.8 kat, 0.75 mM nikel uygulamasında 278.0 kat ve 1.0 nikel uygulamasında 356.3 kat artarken; atasal genotip olan *C. oxyacantha*'da 0.50 mM nikel uygulamasında 189.8 kat, 0.75 mM nikel uygulamasında 357.4 kat ve 1.0 mM nikel uygulamasında 478.2 kat artış göstermiştir (Şekil 4.7A).

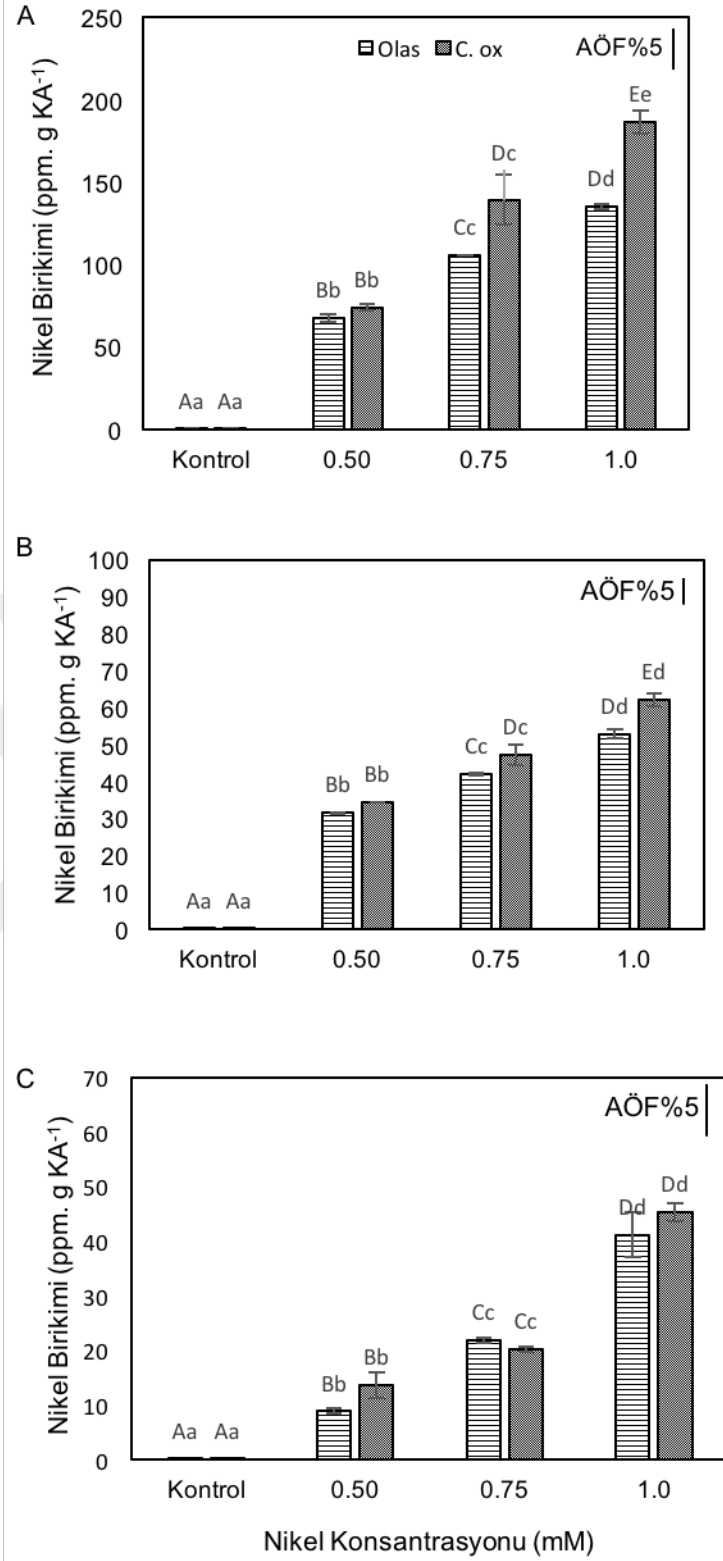
Genotiplerin gövde dokularındaki nikel akümülayonu Şekil 4.7B’de gösterilmiştir. Uygulanan nikel konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak genotiplerin gövdelerinde önemli düzeyde nikel biriktiği tespit edilmiştir. Kontrol ve 0.5mM uygulamasında gövdede nikel birikimi açısından genotipler arasında önemli bir fark olmazken, artan nikel konsantrasyonlarında genotiplerdeki nikel birikimi anlamlı olup, en yüksek birikim *C. oxyacantha*’nın 1.0 mM nikel uygulamasında tespit edilmiştir (62.1 ppm.g KA⁻¹). Aynı uygulamaya ait Olas çeşitinin nikel birikimi atasal genotipten %17.4 oranında daha düşük olup 52.9 ppm.g KA⁻¹’dir.

Genotiplerin kontrol ve uygulama grupların yapraklarında nikel birikimi açısından önemli bir fark belirlenmemiştir (Şekil 4.7C). En yüksek birikim *C. oxyacantha*’da 1.0 mM nikel uygulamasında 45.4 ppm. g kuru ağırlık⁻¹ düzeyinde, Olas çeşidinde ise 41.2 ppm. g KA⁻¹ seviyesindedir.

Nikelin bitki bünyesine alındıktan sonra taşındığı organlardaki düzeyleri esas alınarak hesaplanan translokasyon indeksine göre (Çizelge 4.1), her iki genotipte de kökten toprak üstü organlara nikel taşınımı azalmıştır. En yüksek miktarda akümülayon köklerde olmuş daha sonra kökü gövde ve yapraklar izlemiştir. Bunun yanı sıra, *C. oxyacantha*’nın köklerde daha fazla nikel biriktirmesine rağmen, Olas çeşidine göre yapraklara transfer ettiği nikel miktarının daha az olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. Nikelin bitki bünyesindeki translokasyon indeksi.

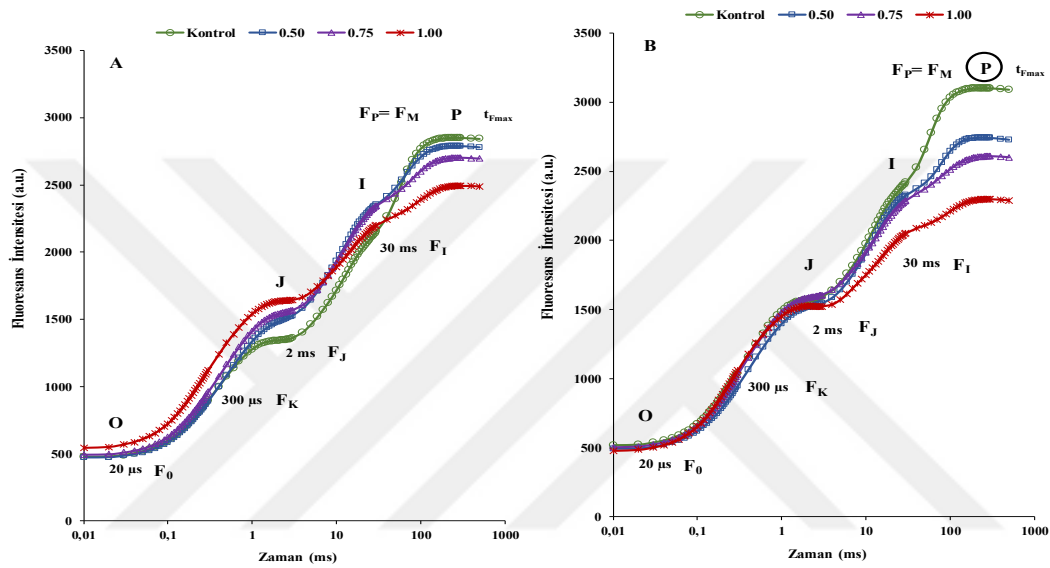
Genotip	Uygulama (mM)	Ti
Olas	0.50	0,595
	0.75	0,604
	1.0	0,695
<i>C.oxyacantha</i>	0.50	0,652
	0.75	0,484
	1.0	0,576



Şekil 4.7. Aspir genotiplerinde kök (A) ve gövde (B) ve yaprak (C) dokularındaki nikel akümülayonu.

4.2.2. Fotokimyasal Aktivitedeki Değişimler

Klorofil floresans ölçümleri, kontrol ve nikel uygulamaları sonunda yapraklarının 30 dk karanlığa adapte olmasının ardından yapılmıştır. Floresans ölçüm verilerinin analizi, fotosentetik aparatındaki enerji akışları teorisi temeline dayanan ve “JIP-testi” olarak bilinen teste göre yapılmaktadır. Artan nikel düzeylerinin yerel ve atasal aspir genotiplerinin yapraklarında ölçülen polifazik klorofil *a* floresans geçişleri kaydedilmiş ve veriler logaritmik zaman skalasında grafiği çizilmiştir (Şekil 4.8 A ve B).



Şekil 4.8. Artan nikel düzeylerinin yerel (A) ve atasal (B) aspir genotiplerinin yapraklarındaki karakteristik polifazik O-J-I-P eğrisi üzerine etki.

O-J-I-P polifazik floresans eğrisinde “O” ile “P” fazları arasında “J” ve “I” olmak üzere iki faz bulunmaktadır. Bu fazların her biri farklı fotosentetik süreçler ile ilgili bilgi içermektedir. O-J bölümü, kinon A (Q_A)’nın redüksiyonunu ve redükte Q_A^- ’nin yeniden oksidasyonu, J-I bölümü ise plastokinon (PQ) havuzunun redüksiyon durumunu yansıtır. Son olarak I-P bölümü PSI’deki elektron alıcılarının redüksiyon durumunu gösterir. OJIP eğrileri incelendiğinde; artan nikel düzeylerinde yerel genotipte O-J bölümünde kontrollerine göre artış belirlenirken, atasal genotipte J-I bölümündeki düşüş anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.8 A ve B). Bununla birlikte her iki genotipte IP genişliğindeki (amplitude) düşüş önemli düzeydedir ancak nikelin olumsuz etkisinin atasal genotipte daha dramatik olduğu görülmektedir.

Tilakoid membranlarda enerji akışları teorisine dayanan JIP testi hesaplamaları sonucunda nikel uygulamalarının her iki genotipin spesifik (PSII'nin her bir ölçüm yapılan RC başına hesaplanan; membran modeli) ve fenomenolojik (fotosentetik örneğin ölçüm yapılan her birim alanından hesaplanan; yaprak modeli) enerji akışları ve bazı JIP testi parametreleri üzerine etkileri incelenmiştir (Şekil 4.9 -10).

Spesifik enerji akışları nikel uygulamalarından etkilenmiştir: Reaksiyon merkezi başına absorbe edilen veya ortalama anten büyüklüğünü ifade eden ABS/RC'nin, sadece en yüksek nikel konsantrasyondaki (1.0 mM) artışı, kontrole göre önemli bulunmuştur (Şekil 4.9A ve B). Her iki genotip kontrolleri ile kıyaslandığında, 0.75 mM nikel uygulamasında gerçekleşen değişim önemsiz bulunmuştur. Genotipler karşılaştırıldığında ise, tüm uygulamalardaki değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Atasal genotipin ABS/RC değerlerinin daha yüksek olduğu ve Olas çeşidine göre, reaksiyon merkezi başına daha fazla enerji absorbe ettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.9A ve B).

Artan nikel uygulamalarında aspir genotiplerinin yakalanan enerji akışındaki (TR_0/RC) değişimler ABS/RC'de belirlenen sonuçlara benzerdir. Atasal genotipte TR_0/RC değerinin daha yüksek olduğu ve Olas çeşidine kıyasla, reaksiyon merkezi başına fazla enerji yakalandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.9A-B). Bunun yanı sıra kontrol ve 1.0 mM nikel uygulamalarında TR_0/RC 'de genotipler arasındaki fark önemsizdir. Kontrole göre uygulamalar arasındaki TR_0/RC 'nin değişim tüm konsantrasyonlarda (0.50Mm'daki düşüş-1.0 Mm'daki artış) önemli bulunmuştur.

Nikel uygulamasına bağlı olarak genotiplerin reaksiyon merkezi başına absorbe edilen enerjinin elektron transportuna aktarılmasını yansıtan ET_0/RC 'deki değişim (Şekil 4.9A-B)'de verilmiştir. Nikel uygulamaları genotiplerin ET_0/RC değerinde kontrollerine göre anlamlı bir azalma neden olmuş, ancak belirlenen değişimler uygulama grupları ve genotipler arasında önemsiz olmuştur.

Nikel uygulamasına bağlı olarak genotiplerin PSI'inin en son elektron alıcılarını redükleyen ve her bir aktif reaksiyon merkezine transfer edilen elektron akışını yansıtan RE_0/RC 'deki değişim (Şekil 4.9A-B)'de verilmiştir. Nikel uygulamaları

genotiplerin RE_O/RC değerinde kontrollerine göre anlamlı bir azalma neden olmuş ve belirlenen değişimlerin ET_O/RC 'dekine benzer olduğu saptanmıştır.

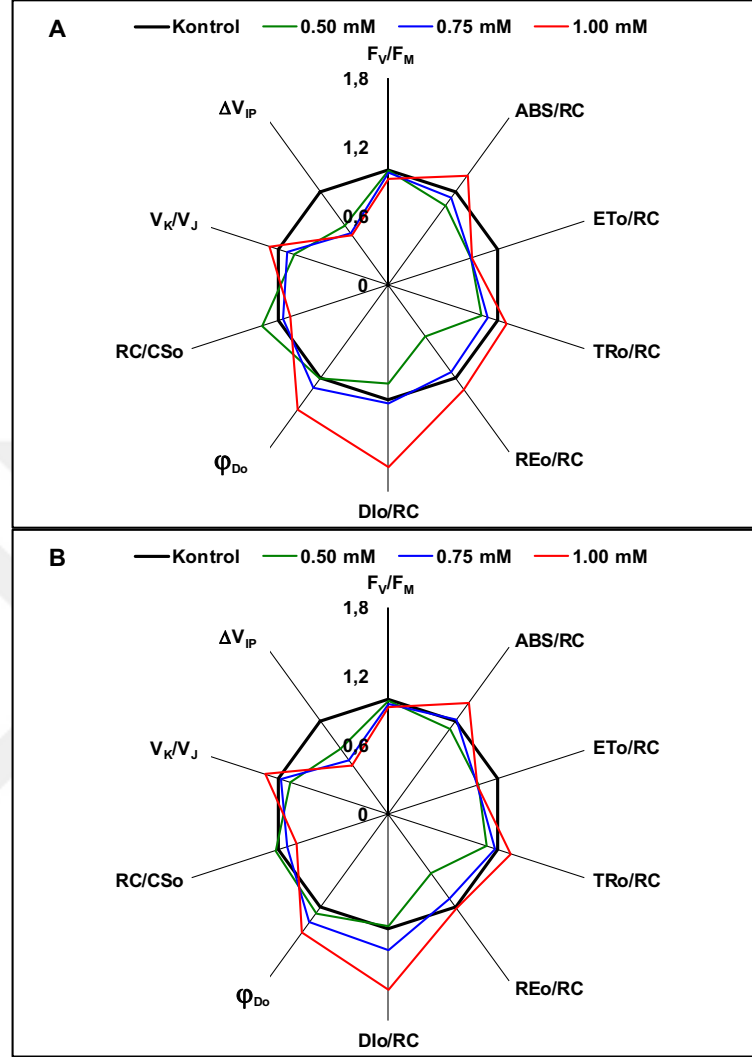
Reaksiyon merkezi başına fotokimya dışında ısı şeklinde kaybedilen enerjiyi gösteren DI_O/RC , yüksek nikel uygulamalarında kontrole göre önemli düzeyde artmıştır (Şekil 4.9A-B). Isı şeklinde kaybedilen enerjinin kuantum etkinliği (ϕ_{DO}) genotiplerde nikel konsantrasyonunun artışa bağlı olarak artmış ancak bu artış yüksek nikel düzeylerinde (0.75 ve 1.0 mM) önemli bulunmuştur.

Q_A 'yı indirgeme kapasitesine sahip reaksiyon merkezlerinin yoğunluğunu diğer bir ifade ile aktif reaksiyon merkezleri miktarını yansıtan RC/CS_O nikel uygulamalarından etkilenmiştir. Atasal genotipte konsantrasyonun artışına bağlı olarak reaksiyon merkezlerinin yoğunluğu önemli düzeyde azalmıştır. Buna karşın, yerel çeşit aktif reaksiyon merkezlerinin sayısını 0.75 mM nikel uygulamasına kadar artırırken, en yüksek nikel düzeyinde ise kontrol düzeyinde tutmayı başarmıştır (Şekil 4.9A-B).

Artan nikel uygulaması ile fotosistem II (PSII)'nin donör (verici) bölgesi ve PSI'nin akseptör (alıcı) bölgelerinin redoks durumu hakkında bilgi veren sırası ile V_K/V_J ve ΔV_{IP} parametrelerindeki değişimler de incelenmiştir (Şekil 4.9A ve B). Her iki genotipte de sadece en yüksek nikel konsantrasyonu (1 mM) kontrole göre V_K/V_J oranını diğer bir deyişle OEC'nin inaktivasyonunu önemli düzeyde arttırdığı bulunmuştur. Bunun yanı sıra nikel konsantrasyonunun artışına bağlı olarak ΔV_{IP} değeri istatistiksel olarak önemli düzeyde azalmıştır. Bu sonuç PSI'nin uygulamadan olumsuz yönde etkilendiğini göstermektedir.

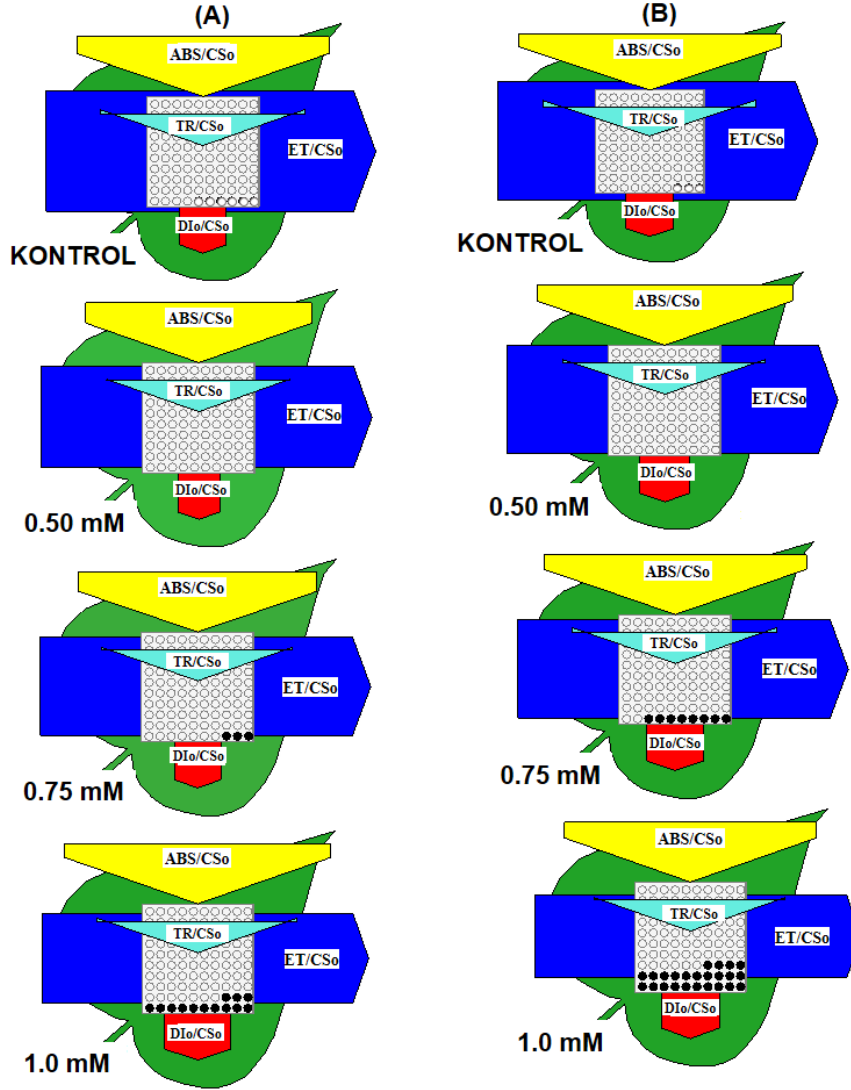
Aspir genotiplerinde PSII'nin potansiyel fotokimyasal kuantum verimini ifade eden F_v/F_m oranı Şekil 4.9A ve B'de gösterilmiştir. Genotipler arasında hem kontrol grubunda hem de nikel uygulama gruplarında F_v/F_m oranındaki değişim açısından önemli bir fark bulunamamış, genotipler benzer yanıtlar vermiştir. Yerel çeşit olan Olas'ta kontrol grupları ile karşılaştırıldığında sadece 1.0 mM nikel uygulamasında belirlenen azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Bunun yanı sıra, atasal

genotip olan *C. oxyacantha*'da ise 0.75-1.0 mM nikel uygulamaları arasındaki düşüşler önemli bulunmuştur.



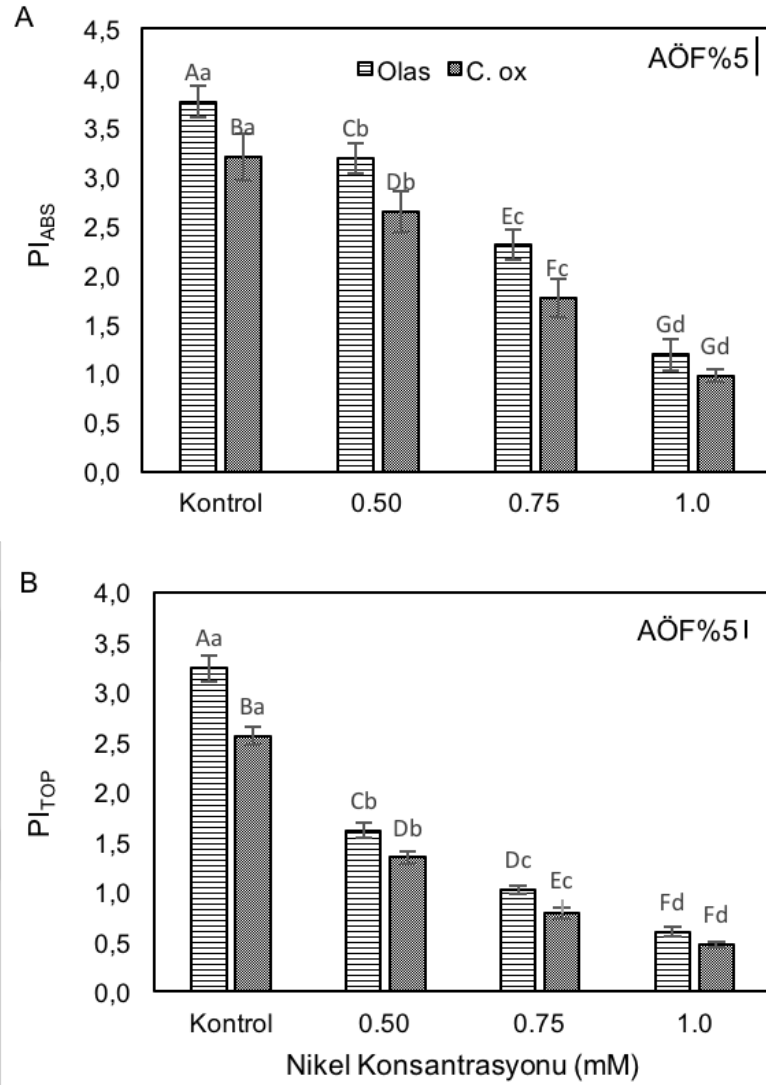
Şekil 4.9. Artan nikel düzeylerinin aspir genotiplerinin spesifik enerji akışlarına ve diğer bazı JIP parametrelerine etkisi (A; Olas ve B; *C. oxyacantha*).

Nikel konsantrasyonunun artışına bağlı olarak genotiplerin fenomenolojik enerji akışlarında da önemli değişimlerin olduğu saptanmıştır (Şekil 10A ve B). Birim yaprak alanı bazında absorblanan uyarılma enerjisi (ABS/CS₀), yakalanan enerji (TR₀/CS₀) toksik nikel konsantrasyonunda Olas çeşidinde önemli düzeyde artış sergilerken, atasal genotipte azalmıştır. Bunun yansira her iki genotipte de absorblanan enerjinin fotokimyasal kullanımı (ET₀/CS₀) azalmış, enerjinin büyük bir kısmı ısı şeklinde (DI₀/CS₀) kaybedilmiştir.



Şekil 4.10. Nikel uygulamalarının yerel (A) ve atasal (B) genotiplerin fenomenolojik enerji akışları üzerine etkisi

Fotosistemlerin (PSII ve PSI) tüm fotokimyasal aktiviteleri hakkında bilgi veren performans indeksleri incelenmiştir (Şekil 4.11.A ve B): Yerel ve atasal genotiplerde kontrole göre konsantrasyonun artışına bağlı olarak fotosentetik performanstaki (PI_{ABS}) azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Nikel uygulamalarında yerel genotipin atasal genotipe göre daha iyi fotosentetik performans sergilemiştir (Şekil 4.11.A). Toplam performans indeksi (PI_{TOP}), PI_{ABS} ilaveten PSI'in son elektron alıcısına kadar olan performansı da içermektedir (Şekil 4.11.B). PI_{TOP} , PSII tarafından foton absorpsiyonundan sistemler arası elektron alıcılarının indirgenmesine kadarki enerji korunumunun değerini ifade eden PI_{ABS} verileri ile oldukça paralel olduğu görülmektedir.



Şekil 4.11. Farklı nikel düzeylerinde aspir genotiplerinin fotosentetik performansları (A; PI_{ABS} ve B; PI_{TOP}).

4.2.3. Fotosentetik Pigment İçeriğindeki Değişimler

4.2.3.1. Klorofil a (kl a) miktarı

Aspir genotiplerinin yapraklarındaki klorofil a miktarı, nikel uygulamasının başlamasıyla önemli ölçüde azalmıştır (Çizelge 4.2). Her iki genotipte de nikel uygulaması, kontrollerine göre kl a içeriğinde önemli düzeyde düşüşe neden olmuştur. *Olas*'ta kontrol gruplarıyla kıyaslandığında, klorofil a miktarındaki düşüş, 0.5 mM nikel uygulamasında %49.0; 0.75 mM nikel uygulamasında %46.0 ve 1.0 mM nikel uygulamasında %61.9 oranında gerçekleşmiştir. *C. oxyacantha*'da ise bu oranların 0.5 mM nikel uygulamasında %48.4; 0.75 mM nikel uygulamasında %52.1

ve 1mM nikel uygulamasında %68.4 oranında olduğu hesaplanmıştır. Tüm uygulamalarda klorofil a içeriği bakımından genotipler arasında fark önemsiz bulunmuştur.

4.2.3.2. Klorofil b (kl b) miktarı

Yapılan ölçüm ve hesaplamalar sonucunda nikel konsantrasyonlarının (0.5, 0.75 ve 1.0 mM) aspir genotiplerinin yapraklarındaki klorofil b miktarında önemli düzeyde azalmaya neden olduğu görülmüştür. Her iki genotipte de kontrol gruplarıyla kıyaslandığı zaman, uygulama gruplarının klorofil b miktarı anlamlı düzeyde azalmıştır. Bu azalma kontrole göre konsantrasyonun artışına bağlı olarak, Olas çeşidinde sırası ile %48.5, %40.8 ve %47.7 olurken, atasal genotipte %42.7, %35.4 ve %57.3 oranında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Her bir uygulama gruplarında Olas çeşidi için klorofil b miktarındaki değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, *C. oxyacantha* genotipi içinse yalnızca en yüksek konsantrasyon olan 1.0 mM nikel uygulamasında gerçekleşen düşüşün önemli olduğu belirlenmiştir. Aspir genotiplerine ait uygulama grupları klorofil b miktarındaki değişim bakımından karşılaştırıldığı zaman 0.5 ve 0.75 mM nikel konsantrasyonlarında genotipler arasında bir fark görülmezken en toksik nikel konsantrasyonunda genotipler arasındaki fark, anlamlı bulunmuştur. Ayrıca, Olas çeşidinin klorofil b pigment miktarı atasal genotipe göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

4.2.3.3. Toplam klorofil (kl a+b) miktarı

Nikel uygulaması yapılan aspir genotiplerinin yapraklarındaki toplam klorofil (a+b) miktarı üzerine etkisi Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Klorofil a ve b içeriğinin nikel uygulamalarına bağlı olarak azalmasının etkisi ile toplam klorofil içeriği de her iki genotipte de önemli düzeyde azalmıştır. Toplam klorofil miktarı bakımından hem kontrol hem de uygulama gruplarında her iki genotip arasındaki farkların önemli olmadığı ve benzer sonuçların elde edildiği görülmüştür.

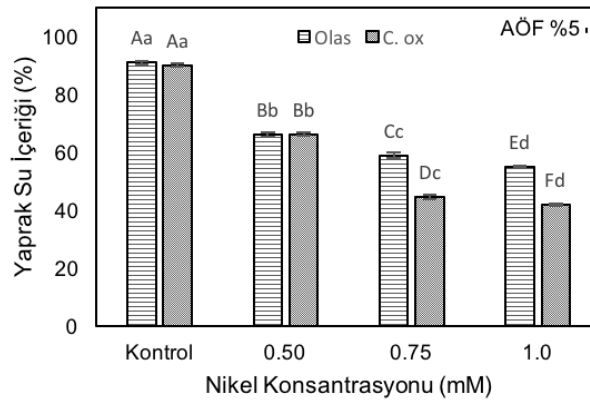
4.2.3.4. Toplam karotenoid (x+c) miktarı

Farklı konsantrasyonlardaki nikel stresine maruz kalmış aspir fidelerinin yaprak dokularındaki toplam karotenoid (x+c) miktarındaki değişim Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Genotiplerin kontrollerine göre nikel uygulamasına bağlı olarak

belirlenen karotenoid miktarındaki düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Genotiplerdeki toplam karotenoid miktarı karşılaştırıldığında; kontrol ve uygulama gruplarında benzer sonuçlar belirlenmiş ve aralarındaki farkların önemsiz olduğu saptanmıştır. Uygulama grupları ile kontroller arasındaki karotenoid miktarı değişim anlamlı olsa da, stres grupları arasındaki fark yalnızca atasal genotipte ve oldukça toksik nikel konsantrasyonunda (1.0 mM Ni) anlamlı düzeyde olmuştur.

4.2.4. Oransal Su İçeriğindeki Değişimler

Aspir genotiplerinin yaprak su içeriğinde, nikel konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak önemli düzeyde azalma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.12). Yerel çeşit olan Olas çeşidinde, kontrole göre artan nikel uygulamalarında sırası ile %31.6, %38.8 ve %43.0; atasal genotip olan *C. oxyacantha*'da ise %30.9, %53.5 ve %56.3 oranında yaprak su içeriklerinde azalma olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.12. Nikel konsantrasyonlarının aspir genotiplerinin yaprak su içeriği üzerine etkisi

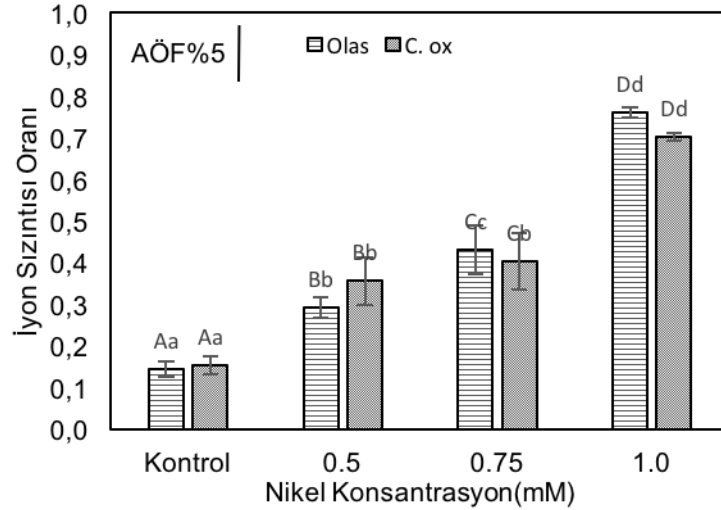
Çizelge 4.2. Artan nikel düzeylerine maruz kalan aspir genotiplerinin yaprak dokularındaki fotosentetik pigment içerikleri.

Genotip	Uygulama (mM)	KI a içeriği (mg. g KA ⁻¹)	KI b içeriği (mg. g KA ⁻¹)	KI a+b içeriği (mg. g KA ⁻¹)	KI a/b	Karotenoid içeriği (x+c) (mg. g KA ⁻¹)	KI / Karo	TKSI (%)
Olas	Kontrol	3,88 ± 0,06 Aa*	1,17 ± 0,04 Aa	5,05 ± 0,09 Aa	3,35 ± 0,10	0,98 ± 0,02 Aa	5,18 ± 0,09	
	0.50	1,98 ± 0,19 Bb	0,60 ± 0,06 Bb	2,58 ± 0,26 Bb	3,31 ± 0,04	0,59 ± 0,05 Bb	4,38 ± 0,10	51,07
	0.75	2,09 ± 0,06 Cb	0,69 ± 0,02 Cb	2,88 ± 0,07 Cb	2,65 ± 0,06	0,56 ± 0,02 Cb	5,18 ± 0,09	56,92
	1.0	1,48 ± 0,11Dc	0,62 ± 0,05 Db	2,10 ± 0,14 Dc	2,44 ± 0,22	0,47 ± 0,03 Db	4,46 ± 0,10	41,53
C. oxacantha	Kontrol	3,76 ± 0,06 Aa	1,09 ± 0,03 Aa	4,85 ± 0,09 Aa	3,45 ± 0,04	0,96 ± 0,02 Aa	5,05 ± 0,01	
	0.50	1,93 ± 0,09 Bb	0,63 ± 0,03 Bb	2,57 ± 0,11 Bb	3,08 ± 0,05	0,54 ± 0,04 Bb	4,78 ± 0,12	52,95
	0.75	1,80 ± 0,07 Cb	0,71 ± 0,03 Cb	2,71 ± 0,07 Cb	1,99 ± 0,11	0,52 ± 0,02 Cb	5,22 ± 0,15	55,88
	1.0	1,19 ± 0,14 Dc	0,47 ± 0,05 Ec	1,66 ± 0,18 Dc	2,55 ± 0,20	0,36 ± 0,02 Dc	4,72 ± 0,35	34,29
AÖF %5		0,35	0,14	0,46	0,40	0,09	0,51	

* Büyük harfler her bir uygulamadaki genotipler arası farkı, küçük harfler ise uygulamalar arası farkı göstermektedir.

4.2.5. İyon Sızıntısı Miktarındaki Değişimler

Aspir genotiplerinde artan nikel uygulamasına bağlı olarak yapraklarda iyon sızıntısı miktarında artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.13). Bu artış Olas çeşidinde kontrole göre, 0.50 mM nikel uygulamasında 2.07, 0.75 mM uygulamasında 2.99 ve 1.0 mM nikel uygulamasında 5.27 katı olarak bulunurken *C. oxyacantha* genotipinde kontrole göre, 0.50 mM nikel uygulamasında 2.40, 0.75 mM nikel uygulamasında 2.67 ve 1.0 mM nikel uygulamasında 4.67 katı olduğu bulunmuştur. Uygulama gruplarında tespit edilen iyon sızıntısı oranındaki artışlar, *C. oxyacantha* genotipine ait 0.50 ile 0.75 mM nikel uygulaması hariç, tüm konsantrasyonlarda anlamlıdır. Hem kontrol hem de uygulama gruplarında iyon sızıntısı oranı incelendiğinde; genotipler arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir.

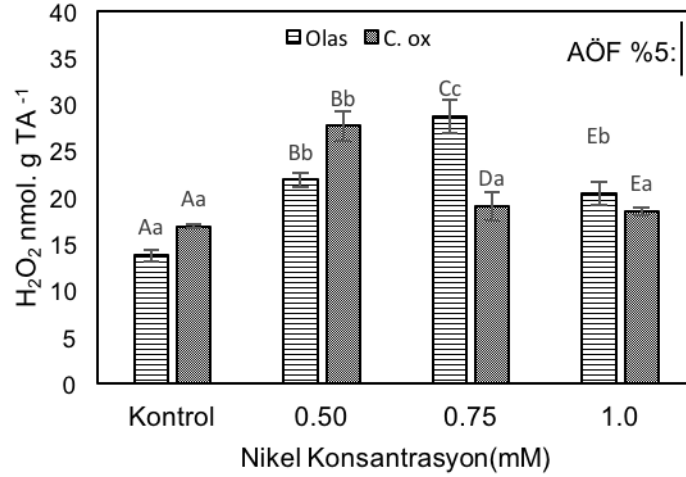


Şekil 4.13. Nikel uygulamalarının aspir genotiplerinin yapraklarındaki iyon sızması üzerine etkisi.

4.2.6. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Miktarındaki Değişimler

Aspir genotiplerinde nikel uygulaması sonucunda bir aktif oksijen türü olan H₂O₂ miktarındaki değişim incelenmiştir (Şekil 4.14). Olas çeşidinde kontrol grupları ile toksik nikel düzeylerinde H₂O₂ miktarında önemli düzeyde artış belirlenirken, *C. oxyacantha* genotipindeki H₂O₂ miktarındaki artış yalnızca 0.5 mM nikel uygulamasında önemli düzeyde bulunmuştur. Olas çeşidinde H₂O₂ miktarı kontrole göre kıyaslandığı zaman, 0.50 mM nikel uygulamasında 1.59; 0.75 mM nikel uygulamasında 2.10; 1.0 mM nikel uygulamasında ise 1.48 kat artmıştır. *C.*

oxyacantha genotipinde ise artışlar sırasıyla, 1.64; 1.12 ve 1.09 katı şeklinde gerçekleşmiştir. Genotiplerlerin H₂O₂ miktarındaki değişim sadece 0.75 mM nikel konstrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



Şekil 4.14. Nikel konsantrasyonlarının aspir genotiplerinde H₂O₂ miktarı üzerine etkisi.

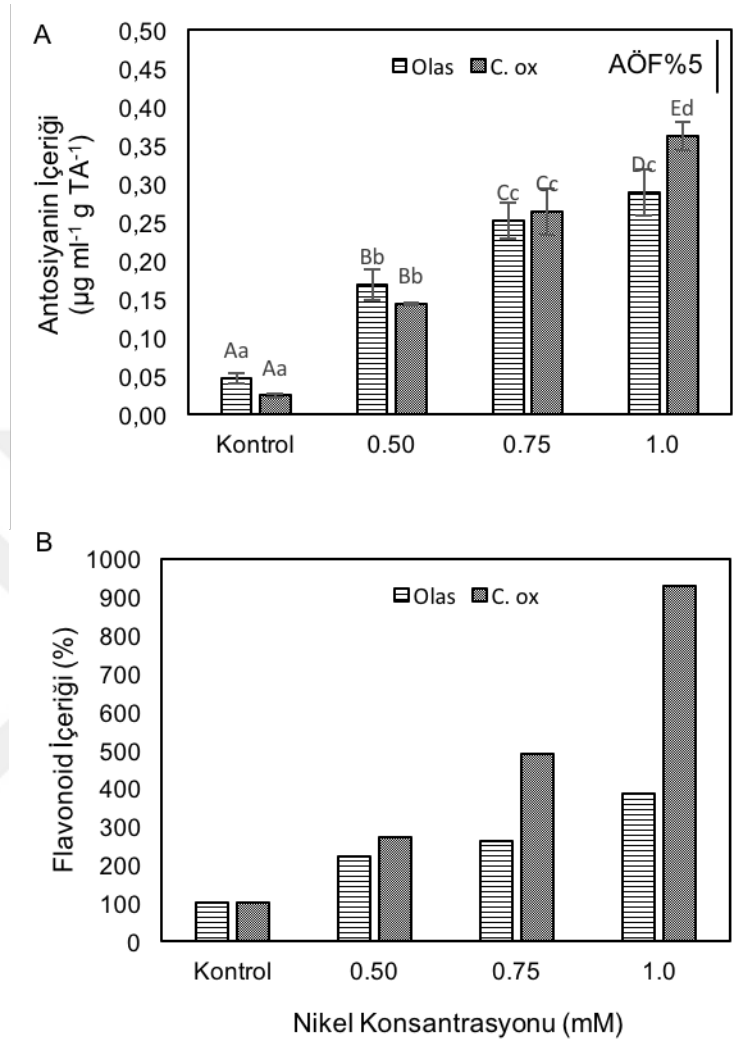
4.3. Aspir Genotiplerinde Artan Nikel Düzeylerinin Savunma Sistemleri Üzerine Etkisi

4.3.1. Antosiyanin ve Flavonoid Pigment İçeriklerindeki Değişimler

Genotiplerde antosiyanin içeriği, artan nikel düzeylerindeki artışa bağlı olarak artmıştır (Şekil 4.15.A). Atasal genotipte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 0.5 mM nikel uygulamasında 6, 0.75 mM nikel uygulamasında 11 ve 1.0 mM nikel uygulamasında 15 kat artmıştır. Yerel çeşit kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise, 0.5 mM nikel uygulamasında 3.6; 0.75 mM nikel uygulamasında 5.3 ve 1.0 mM nikel uygulamasında 6.1 kat artmıştır. Genotipler antosiyanin içeriği bakımından birbirleri ile kıyaslandığında 1.0 mM nikel uygulaması hariç herhangi bir anlamlı fark tespit edilmemiştir. En yüksek nikel konsantrasyonda atasal genotipin yerel genotipe göre 1.25 kat daha fazla antosiyanin biriktirdiği saptanmıştır.

Aspir genotiplerinde artan nikel düzeylerine bağlı olarak flavonoid içeriği de artmıştır (Şekil 4.15.B). Kontrolleri ile karşılaştırıldığı zaman en fazla artış, *C. oxyacantha*'da en yüksek konsantrasyonda belirlenmiştir (%921). En düşük artış ise Olas'ta en düşük konsantrasyon olan 0.50 mM nikel düzeyinde saptanmıştır (%221).

Genotipler arasındaki flavonoid içerikleri karşılaştırıldığında, atasal genotipteki flavonoid birikiminin özellikle 0.75 ve 1.0 mM nikel uygulamalarında yerel genotipe göre oldukça fazla olduğu bulunmuştur (sırasıyla %224.8 ve %540).



Şekil 4.15. Nikel konsantrasyonlarının aspir genotiplerinde antosiyanin (A) ve flavonoid (B) içeriği üzerine etkisi.

4.3.2. Enzimatik Antioksidan Enzim Aktivitelerindeki Değişimler

4.3.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi

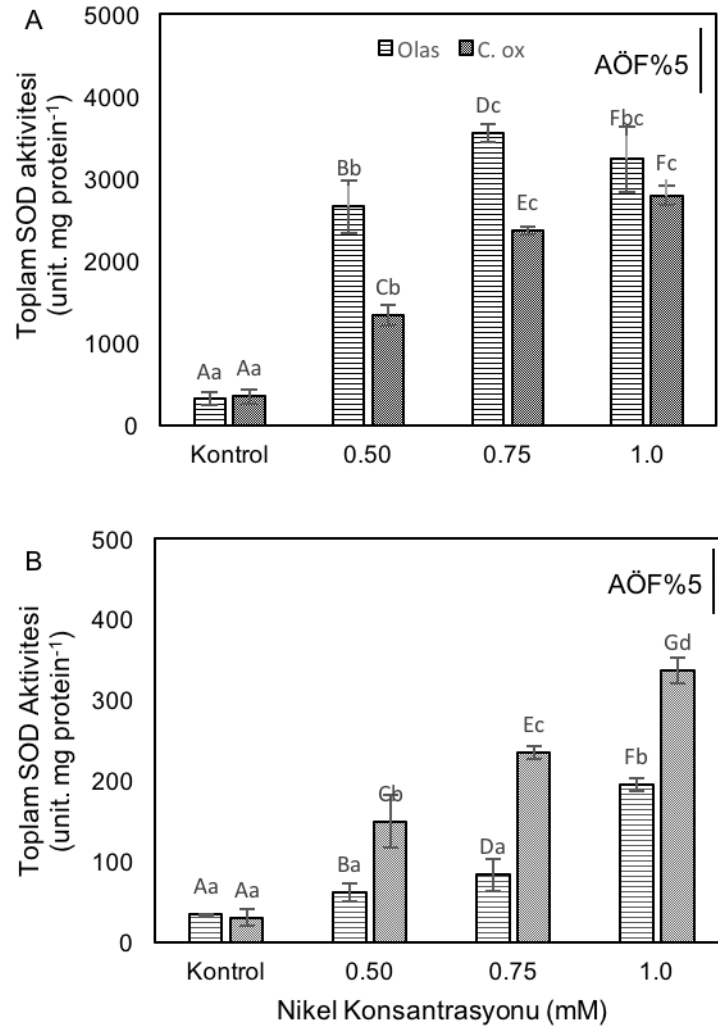
Aspir genotiplerinin köklerindeki toplam SOD enzimi aktivitesi nikel uygulamaları sonucunda her iki genotipte de önemli ölçüde artış göstermiştir. Bu artışlar genotiplerde 0.75 ve 1.0 mM nikel uygulamaları arasındaki farkları istatistiksel olarak önemsiz düzeyde bulunmuştur. Kontrollerine kıyasla 1 mM nikel uygulamasında Olas'ta 10.2, *C. oxyacantha*'da 8.0 kat artış olduğu belirlenmiştir.

Genotipler mukayese edildiğinde, 1.0 mM nikel uygulaması hariç diğer uygulanan tüm nikel konsantrasyonlarında yerel çeşit olan Olas'ın atasal genotip olan *C. oxyacantha*'ya göre kök dokusunda daha fazla SOD aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır.

Nikel uygulamasına maruz bırakılan aspir genotiplerinin yaprak dokularındaki toplam SOD aktivitesi ise nikel konsantrasyonunun artışına bağlı olarak artmıştır (Şekil 4.16B). Her iki genotipte de kontrol grubuna kıyasla en yüksek artış 1.0 mM nikel uygulamasında bulunmuştur (atasal genotipte 11.2 kat, yerel genotipte 5.7 kat). Olas çeşidinde 0.50 ve 0.75 mM nikel konsantrasyonları arasındaki değişim anlamsız bulunmuştur. Genotipler karşılaştırıldığında, kontrol grupları hariç tüm nikel uygulamalarında belirlenen SOD değişimi istatistiksel açıdan önemlidir. Atasal genotip olan *C. oxyacantha*'nın yapraklarındaki SOD aktivitesinin yerel çeşit olan Olas'a kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

4.3.2.2. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi

Artan nikel düzeylerinde aspir genotiplerinin köklerindeki toplam APX aktivitesindeki değişim Şekil 4.17A'de görülmektedir. Genotiplerin kontrol grupları ile 0.75 ve 1.0 mM nikel uygulamalarında APX aktivitesi değişim istatistiksel olarak önemsiz iken, 0.50 mM nikel uygulamasında atasal genotipin 1.2 kat daha fazla APX aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır. Olas çeşidinde kontrol ve uygulama grupları arasında anlamlı fark bulunmazken, *C. oxyacantha* genotipinde yalnızca kontrolüne kıyasla 0.50 mM nikeli uygulamasındaki (%26.6) artış anlamlı bulunmuştur. Aspir genotiplerinin yapraklarında artan nikel düzeylerde toplam askorbat peroksidaz enzimi aktivitesindeki değişim şekil 4.17B'de gösterilmiştir. Genotiplerin APX aktivitesindeki değişimler oldukça benzer olup hem kontrol hem de uygulama gruplarında genotipler arasında anlamlı bir fark ortaya çıkmamıştır. Nikel uygulamalarının tamamında kontrol gruplarına göre anlamlı düzeyde artış gözlenmesine rağmen iki genotipte de 0.75 ve 1.0 mM nikel uygulamalarındaki değişim önemsiz bulunmuştur. *C. oxyacantha*'da en toksik nikel uygulaması kontrolüne göre 4.13 kat artarak en yüksek artışı göstermiştir.

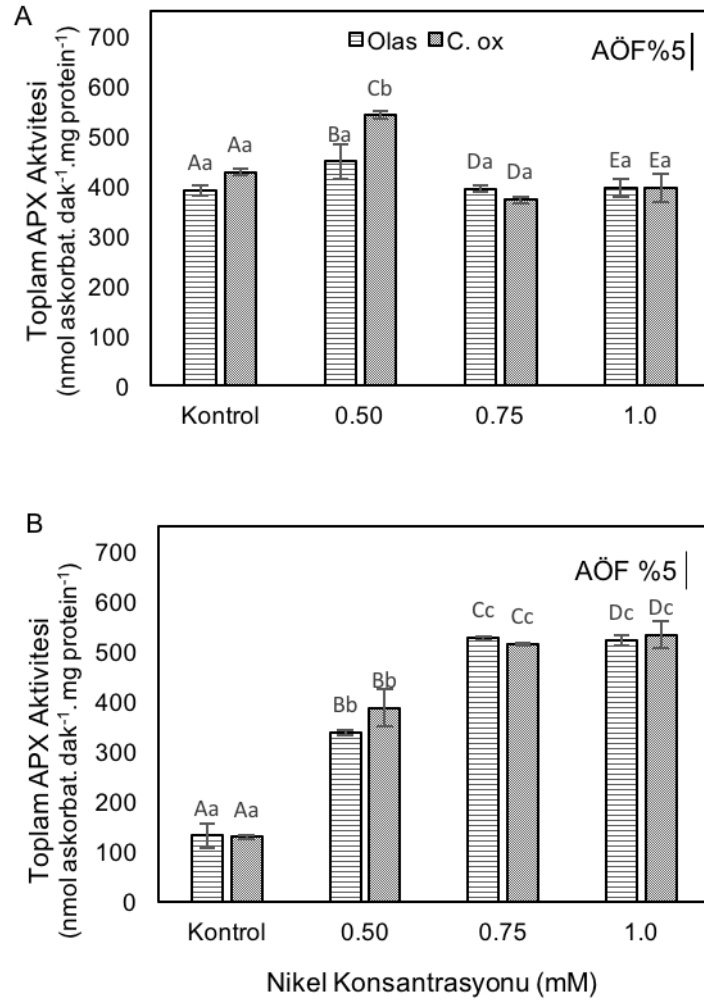


Şekil 4.16. Nikel konsantrasyonlarının aspir genotiplerinde kök (A) ve yaprak (B) dokularındaki toplam süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi üzerine etkisi.

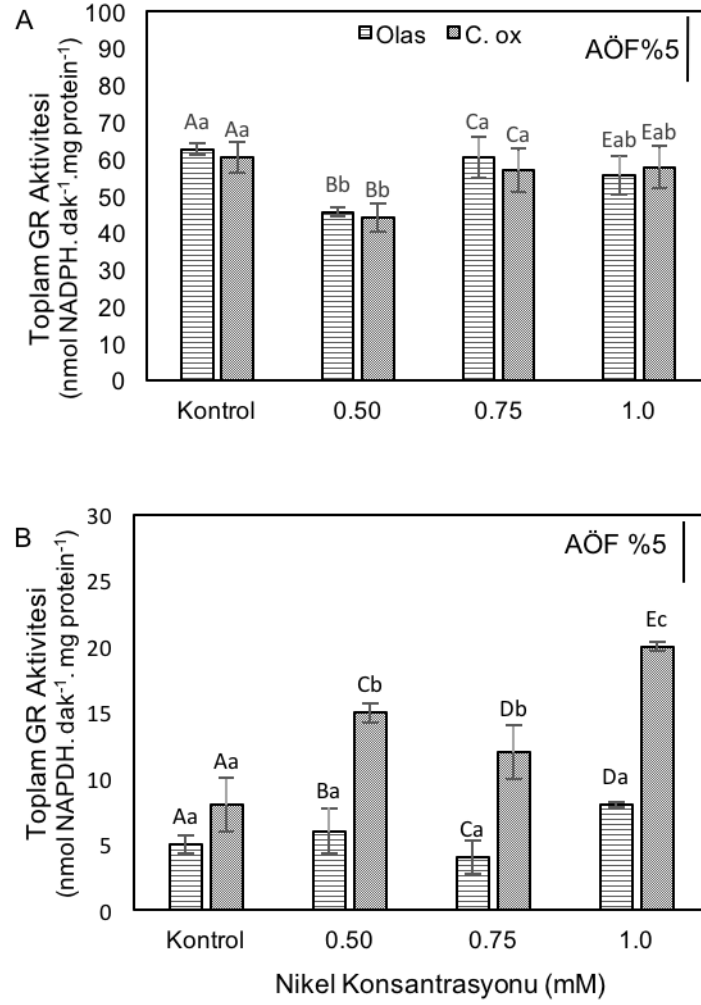
4.3.2.3. Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesi

Aspir genotiplerinde nikel uygulaması ile kök dokularındaki toplam GR aktivitesindeki değişim Şekil 4.18A'da verilmiştir. Genotipler karşılaştırıldığında; nikel konsantrasyonuna bağlı olarak GR aktivitesindeki değişim önemsiz bulunmuştur. İki genotipte de 0.75 ve 1.0 mM nikel uygulama gruplarında kontrol grubuna göre GR aktivitesinde önemli bir fark saptanmazken, 0.50 mM nikel uygulamasında Olas çeşidinde %28.2 oranında ve *C. oxyacantha* genotipinde %30.1 oranında enzim aktivitesinde azalma olduğu bulunmuştur. Farklı nikel düzeylerinin aspir genotiplerinin yaprak dokularındaki toplam GR enzim aktivitesi üzerine etkisi de incelenmiştir (Şekil 4.18B). Genotipler arasındaki fark kontrol grubu hariç tüm toksik nikel konsantrasyonlarında önemli düzeyde bulunmuş ve atasal

genotipin GR aktivitesinin, yerel genotipe göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra tüm uygulamalarda yerel çeşittin yaprak dokularındaki GR aktivitesindeki değişim önemli düzeyde bulunmazken, atasal genotipte sadece 0.50 ile 0.75 mM nikel uygulamalarında GR aktivitesindeki artış anlamlı bulunmuştur.



Şekil 4.17. Nikel konsantrasyonlarının aspir genotiplerinde kök (A) ve yaprak (B) dokularındaki toplam askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi üzerine etkisi



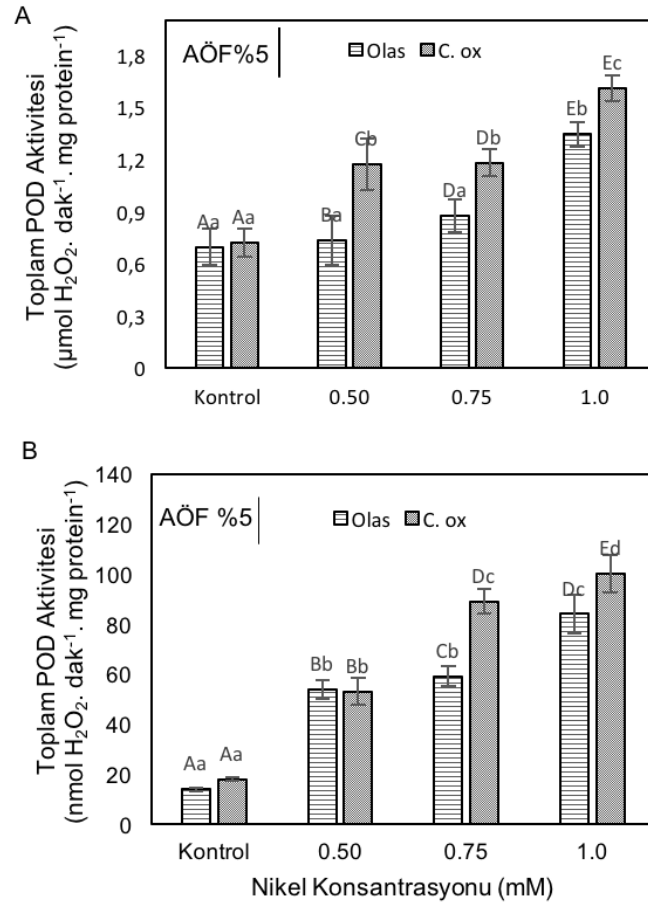
Şekil 4.18. Nikel konsantrasyonlarının aspir genotiplerinde kök (A) ve yaprak (B) dokusundaki toplam glutatyon redüktaz (GR) aktivitesi üzerine etkisi.

4.3.2.4. Peroksidaz (POD) Aktivitesi

Aspir genotiplerinde nikel uygulaması sonucunda köklerdeki toplam peroksidaz (POD) aktivitesi değişimi Şekil 4.19 A'da görülmektedir. Genotipler karşılaştırıldığında; POD enzim aktivitesi 0.50 mM nikel uygulamasında *C. oxyacantha*'da yerel çeşit olan Olas'ın 1.76 kat fazla olduğu saptanmıştır. Kontrol ve diğer uygulama gruplarında (0.75 ve 1.0 mM nikel) genotipler arasındaki farklar önemsiz bulunmuştur. Nikel uygulamasının genotiplerin köklerindeki POD aktivitesi açısından, Olas çeşidinde ancak 1.0 mM konsantrasyonda anlamlı fark olduğu (kontrolüne kıyasla 1.9 kat), *C. oxyacantha* genotipinde ise kontrol gruplarına kıyasla tüm uygulama gruplarında istatistiksel olarak farkların (0.50 ve 0.75 mM nikelde 1.6 kat, 1.0 mM nikelde 2.2 kat artış) anlamlı olduğu bulunmuştur. İki

genotipte 0.50 ve 0.75 mM nikel uygulamaları arasındaki kök POD aktivitesindeki değişimin önemsiz olduğu belirlenmiştir.

Aspir genotiplerinin yapraklarındaki toplam POD aktivitesinin nikel düzeyinin artışına bağlı olarak artmıştır (Şekil 4.19B). En yüksek artış her iki genotipte de en toksik nikel konsantrasyonda tespit edilmiştir (Olas'ta 6 kat, *C. oxyacantha*'da 5.6 kat). Olas çeşidinin yaprak dokusundaki POD aktivitesi tüm nikel uygulamalarında kontrol grubuna göre önemli düzeyde artış gösterirken, 0.5 ile 0.75 mM nikel uygulamaları arasında, fark önemsiz bulunmuştur. Buna karşın, *C. oxyacantha*'da ise 0.75 ile 1.0 mM nikel uygulaması arasındaki artışın önemsiz düzeyde olduğu belirlenmiştir. Genotipler birbiriyle karşılaştırıldığında ise yalnızca 0.75 ve 1.0 mM nikel uygulamalarındaki POD aktivitesindeki değişim anlamlı bulunmuştur.



Şekil 4.19. Nikel konsantrasyonlarının aspir genotiplerinde kök (A) ve yaprak (B) dokusundaki toplam peroksidaz (POD) aktivitesi üzerine etkisi.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Nikel, bitkinin normal büyüme ve gelişim sürecinde metabolik aktivitelerini etkili bir şekilde sürdürebilmeleri için mutlak gerekli mikro besin elementlerinden biri olmasına rağmen yüksek konsantrasyonları bitkiler için son derecede toksiktir (Cobbett ve Goldsbrough, 2002). Tarımsal topraklarda genelde çok az olması ile birlikte, serpantin gibi ultra bazik kayalardan oluşan toprakların nikel içeriği 100-5000 mg Ni/kg arasında değişmektedir. Bitkilerde nikel toksisitesinin dünya çapında sürdürülebilir tarımı tehdit eden önemli bir problem olduğu bildirilmiştir (Yusuf ve ark., 2011). Genel olarak, bitkide toksik nikel düzeyleri bitki büyüme ve gelişmesini olumsuz yönde etkileyerek tarımsal üretim ve verimde kayıplara neden olmaktadır. Nikelin bitkiler üzerindeki etkisi bitki türüne, gelişim evresine, maruz kaldığı süreye ve şiddete bağlı olarak değişim göstermektedir (Guo ve Marschner, 1995). Artan nikel akümüasyonu bitkilerin fizyolojik, biyokimyasal ve metabolik süreçlerinde değişimlere yol açarak, büyüme ve biyokütle üretiminde azalmaya neden olmaktadır (Edelstein ve Ben-Hur, 2018).

Bu tez kapsamında, artan nikel düzeyleri (0.50, 0.75 ve 1.0 mM Ni)'nde aspir genotiplerinin farklı dokularındaki nikel birikimi belirlenmiştir (Şekil 4.7A, B ve C). Nikel konsantrasyonunun artışına bağlı olarak toksisite semptomlarının ve dokulardaki nikel seviyelerinin arttığı ve her iki genotipte de nikelin, yüksek oranda köklerde akümüle olduğu, bitkinin toprak üstü organlarında ise nikel birikiminin giderek azaldığı (gövde>yaprak) belirlenmiştir. Atasal genotipin nikel biriktirme kapasitesinin yerel genotipe oranla daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.7). En yüksek nikel uygulaması (1.0 mM) atasal ve yerel genotiplerin köklerinde kontrole göre sırası ile 356 ve 278 kat nikel birikimine neden olmuştur (Şekil 4.7A). Bunun yanı sıra her iki genotipte de köklerden alınan nikelin yaklaşık olarak %35-60' toprak üstü organlara transloke edilmiştir. Atasal genotip Olas çeşidine göre, yapraklara daha az nikel transfer etmiştir (Çizelge 4.1).

Aspir genotiplerinde bitki sistemlerine giren nikelin büyük çoğunluğu kökte biriktirilmiş olup, bu cevap nikelin immobilizasyonunun çeşitli stratejiler ile kök seviyesinde gerçekleştiğini göstermektedir. Hiperakümülatör olmayan bitkilerde

ortamdan alınan nikelin büyük bir kısmı kök hücrelerinde alıkonulmakta ve bunlar kök hücrelerinin sitozolunda şelatlanarak detoksifiye edilmekte veya vakuolde zararsız şekilde depo edilmektedir (Maestri ve ark., 2010). Birçok araştırmada da nikelin büyük oranda köklerde akümüle edildiği bildirilmiştir (Drazkiewicz ve Baszynsky, 2010; Merlot ve ark., 2014; Chami ve ark., 2015; Pietrini ve ark., 2015; Fourati ve ark., 2016; Syama ve ark., 2016; Kotapati ve ark., 2017; Rizwan ve ark., 2017). Bunlara ilaveten artan nikel konsantrasyonuna bağlı olarak her iki genotipte de yan kök oluşumunun azaldığı gözlenmiştir (Şekil 3.3). Bu yanıt, mısır ve pirinçte nikel alımı ile yan kök oluşumunun azalmasının nikelin endoderma bariyerini geçerek perisikl hücrelerinde biriktirilmesi ile açıklanabilir (Samantaray, Rout ve Das, 1997, Seregin ve ark., 2003). Aspir genotiplerinin morfolojik karakterlerindeki (kök ve sürgün uzunluğu, yaş-kuru ağırlığı ve yaprak sayısı) değişimler genel olarak değerlendirildiğinde; artan nikel düzeylerinin incelenen parametreleri olumsuz yönde etkilediği görülmektedir (Şekil 4.1, 4.2, 4.4). Köklerin metal iyonlarının birincil hedefi olmasından dolayı, kök büyümesinin bitkinin toprak üstü organlarının büyümesine göre nikel toksisitesinden daha çok etkilendiği bildirilmiştir (Burd, Dixon ve Glick, 2000; Pandey ve Sharma, 2002; Gajewska ve ark., 2006; Rizwan ve ark., 2017; Chami ve ark., 2015). Benzer şekilde sürgün uzunluğu da Olas'ta kontrol grubuna kıyasla en yüksek nikel düzeyinde %62.9 azalırken, atasal genotipte ise %74.5 azalmış; ancak bu değişim uygulama grupları arasında anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.1B). Ashraf ve ark. (2011)'lerinin ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) yaptıkları çalışmada da sürgün uzunluğunun nikel uygulamasıyla, kontrol grubuna oranla azaldığı fakat uygulanan nikel konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark olmadığı bildirilmiştir.

Bitkilerde yüksek verim göstergesi, biyokütle üretimi açısından kuru ağırlıktaki artıştır. Toplam kuru ağırlık üretimine katkı sağlayan önemli parametreler ise yaş ve kuru kütledir. Genotiplerin hem sürgün hem de kök biyokütlelerinde, artan nikel uygulamalarında kontrole göre önemli derecede azalma olduğu saptanmıştır (Olas'ın kök ve sürgününde sırası ile, 1.0 mM nikelde kontrole göre, %46.8, %44.3; C. ox'ta ise sırası ile %65.4, %41 azalma) (Şekil 4.2.ve 4.4). Özellikle nikel uygulamaları arasında kök uzunluğunda herhangi bir değişim olmamasına rağmen kuru ağırlığın önemli düzeyde azalmasının nedeni, kökün mevcut stratejiyi büyümeden çok metal toksisitesine karşı toleransta kullanıyor olmasından

kaynaklanmış olabilir. Elde edilen bulgular, *C. tinctorius*'ta 5 ve 10 mg/L nikel uygulayan Chami ve ark. (2015) ile benzerlik göstermektedir. Morfolojik parametrelerden hesaplanan yaş ve kuru ağırlık tolerans indeksleri karşılaştırıldığında, yerel çeşit olan Olas'ın, nikelin toksik etkilerini atasal genotipe göre morfolojisine daha az yansıttığı saptanmıştır (Şekil 4.3 ve 4.5).

Ağır metallerin (Cd, Zn gibi) ve özellikle nikelin toksik düzeyleri köklerden su alımını ve transpirasyon hızını olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir (Pandolfini, Gabbrielli ve Comparini, 1992; Pandey ve Sharma, 2002; Gajewska, Sklodowska ve Slaba, 2006; Llamas, Ullrich ve Sanz, 2008). Yerel ve atasal aspir genotiplerinde özellikle yüksek nikel konsantrasyonlarında (0.75-1.0 mM) yaprak oransal su içeriğinin kontrole göre önemli düzeyde azaldığı belirlenmiş (Şekil 4.12) ve yaprak kenarlarında kurumalar gözlenmiştir. Aspir genotiplerinin yaprak su içeriğindeki azalma; yüksek nikel düzeylerinin bitkiye su alımını, ksileme taşınımını, transpirasyon hızını olumsuz yönde etkilenmesinin bir göstergesi olabilir. Ayrıca, genotiplerin yaş ağırlıklarındaki kayıp da oransal su kapsamındaki bu azalma ile ilişkili olabilir (Şekil 4.2, 4.4 ve 4.12).

Bitki bünyesine alınan nikel bitkide bazı metabolik yolların, özellikle karbon metabolizmasının, sekteye uğramasına ve yapısal bileşenlerin hasar görmesine neden olmaktadır (Ahmad ve Ashraf, 2011). Metal toksitesine karşı son derece hassas olan fotosentez metabolizması üzerine nikelin inhibisyon etkisi, doğrudan veya dolaylı olabilmektedir. Fotosentez hızındaki azalma kloroplast yapısının bozulması, fotosentetik pigmentlerin sentezinde, elektron taşınımında, Calvin döngüsü enzimlerinin aktivitesinde inhibisyon ve stomanın kapanması sonucu CO₂ konsantrasyonun azalması nedeni ile olabilir (Seregin ve Kozhevnikova, 2006; Drazkiewicz ve Baszynski, 2010). Nikelin toksik etkisi fotosentezin ışık ve karbon reaksiyonlarının bileşenlerini inhibe ederek gerçekleşmekte olup, özellikle birincil hedefi ışık reaksiyonlarının gerçekleştiği fotosistemlerdir. Fotosistemlerin (PSI ve PSII) aktivitesi ve yapısı hakkında önemli bilgiler, klorofil a floresansı kinetiklerindeki değişimlerin analizi ile ortaya konulmaktadır (Oukarroum ve ark., 2007). Bu tez kapsamında, toksik nikel düzeylerine maruz kalan yerel ve atasal aspir genotiplerinin fotosentetik aparatlarında nikelin indüklediği değişiklikler polifazik klorofil a floresans ölçümleri ile incelenmiştir. Karanlığa adapte edilen

bitkiler ışıklandırıldığında; Kautsky Eğrisi olarak da adlandırılan tipik bir polifazik floresans geçiş eğrisi (OJIP) elde edilir ve bu eğri fotosentetik aparatların durumu hakkında önemli bilgiler içerir (Kautsky ve Hirsch, 1931; Strasser ve ark., 2000). Artan nikel düzeyleri genotiplerin OJIP kinetiklerini önemli derecede etkilemiştir (Şekil 4.8). Tipik OJIP eğrisinde; O-J, J-I ve I-P olmak üzere üç ana faz bulunmaktadır (Strasser ve Strasser., 1995).

OJIP eğrileri incelendiğinde; artan nikel düzeylerinde yerel genotipte O-J bölümünde kontrollerine göre artış belirlenirken, atasal genotipte J-I bölümündeki düşüş anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.8 A ve B). O-J fazındaki artış; PSII'nin akseptör kısmının redüksiyonundaki, J-I fazındaki azalma ise PQ havuzunun redüksiyonundaki inhibisyonun bir göstergesidir (Yusuf ve ark., 2011; Ripoll ve ark., 2016; Oukarroum ve ark., 2018). Bununla birlikte her iki genotipte de nikel uygulaması ile IP genliğindeki önemli düzeyde düşüş, PSI'nin alıcı kısmındaki inhibisyon ve/veya PSI miktarındaki azalma ile ilişkili olabilir. I-P genliğindeki bu düşüş ΔV_{IP} parametrelerindeki değişimler ile de uyumludur (Şekil 4.9A ve B). Bu parametrelerdeki etkileneşimin atasal genotipte yerel genotipe göre daha belirgin olduğu belirlenmiştir. Çeşitli çevresel streslerin I-P genliğini ve ΔV_{IP} parametrelerini önemli düzeyde etkilediği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Oukarroum ve ark., 2009; Ceppi ve ark., 2012). Bu sonuçlar genotiplerde PSI'nin nikel toksisitesinden etkilendiğini göstermektedir. Ancak; D1 ve D2 proteinleri ile OEC proteinlerini içeren PSII'nin çevresel değişkenlere daha çok duyarlı olduğu bildirilmektedir (Goltsev ve ark., 2016; Stirbet ve ark., 2018). Toksik nikel düzeyinde (1.0 mM) PSII'nin maksimum fotokimyasal kuantum verimi (F_V/F_M) her iki genotipte de önemli düzeyde azalırken, enerji yayılımının kuantum etkinliği (ϕ_{DO}) artmıştır. Buna ilaveten, OEC'de inaktivasyon ve/veya zararı gösteren V_K/V_J değerini (Goltsev ve ark., 2016) her iki aspir genotipinde de toksik nikel düzeyi arttırmıştır (Şekil 4.9A ve B). Bu F_V/F_M ve V_K/V_J sonuçları da nikelin PSII'nin hem donör hem de akseptör kısımlarını etkileyerek, fotosentetik kapasitede azalmaya neden olduğunu göstermektedir. Bu bulgular diğer araştırmacıların belirttiği çevresel değişkenlerin özellikle PSII aktivitesini olumsuz etkilediği görüşünü desteklemektedir (Çiçek ve ark., 2008; Kalaji ve ark., 2012; Öz ve ark., 2014; Çiçek ve ark., 2015; Sitko ve ark., 2017; Arslan, Eyidoğan ve Ekmekçi, 2018)

Genotiplerde fotosistemlerinin nikel toksisitesinden olumsuz etkilendiği OJIP eğrisindeki değişimler ile belirlenmesinin ardından; JIP testi yaklaşımları, tilakoid membranlardaki spesifik ve fenomenolojik enerji akışlarındaki etkileneceği detaylı bir şekilde ortaya koymuştur (Şekil 4.9 -10). Reaksiyon merkezi başına absorplanan, yakalanan ve ısı şeklinde dağıtılan enerji akışları (ABS/RC, TR_O/RC, DI_O/RC) artan nikel uygulaması ile kontrollerine göre artarken; elektron taşınımı (ET_O/RC ve RE_O/RC) azalmıştır (Şekil 4.9). Genotiplerin verdiği bu yanıtlar, yakalanan eksitasyon enerjisini etkin bir şekilde elektron taşıma sistemine yönlendiremeyip, bu enerjiyi fotokimyasal olmayan işlevlerde kaybettiğini göstermektedir. Her iki genotipte de nikel toksisitesine karşı hem yaprak (fenomenolojik) hem de membran (spesifik) bazında enerji akış parametrelerindeki değişimler paralellik göstermektedir (Şekil 4.10). Sitko ve ark., (2017) ağır metal içeriğinin yüksek olduğu bölgelerde bulunan *Arabidopsis* populasyonlarının fotosentetik aparatlarındaki fenomenolojik enerji akışlarının olumsuz yönde etkilendiğini bildirmişlerdir.

Bitkilerin canlılığı ve fizyolojik durumunu ifade eden performans indeksleri (PI_{ABS} ve PI_{TOP}) fotosistemlerin (PSII ve PSI) tüm fotokimyasal aktiviteleri hakkında bilgi vermekte ve üç bağımsız bileşenden oluşmaktadır (Strasser ve ark., 2004; Tsimilli-Michael, 2008). Yerel ve atasal genotiplerde kontrole göre nikel konsantrasyonunun artışına bağlı olarak fotosentetik performansları azalmıştır (Şekil 4.11.A ve B). Toplam performans indeksinin (PI_{TOP}), PSI'nin son elektron alıcısına kadar olan performansı da içermesi nedeni ile PSII tarafından foton absorpsiyonundan sistemler arası elektron alıcılarının indirgenmesine kadar olan enerji korunumunun değerini ifade eden PI_{ABS} verileri ile oldukça paralel olduğu görülmektedir. Toksik nikel düzeylerinde genotiplerin sergiledikleri fotosentetik performanslar arasında farklılıklar belirlenememiş olup, genel olarak yerel çeşit atasal genotipe göre nikel uygulamalarında daha iyi performans sergilemiştir (Şekil 4.11A ve B). Hatta Olas'ın etkin fotosentetik performansının yanı sıra daha az sayıda inaktif reaksiyon merkezine (RC/CS_O) sahip olması (Şekil 4.9 ve 10) fotosentetik aparatlarını korumada daha başarılı olduğunun bir göstergesi olabilir.

Nikel uygulaması ile anten kompleksinde yer alan klorofil (kl a, kl b, kl a+b, kl a/kl b) ve karotenoid (x+c) içeriğindeki azalma, nikelin fotosentezde spesifik olmayan

inhibisyonlarının bir sonucudur (Drazkiewicz, 1994; Ouzounidou ve ark., 2006; Drazkiewicz ve Baszynski 2010). Bu tez kapsamında da uygulanan nikel stresinin aspir genotiplerinin yapraklarındaki fotosentetik pigment miktarlarında (kl a, b, kl a+b) önemli ölçüde azalttığı (yaklaşık %40-60) belirlenmiştir (Çizelge 4.2) ve bu değişimler kl a/b oranına da yansımıştır. Klorofil a/b oranının fotosistemlerin (PS I ve II) anten büyüklüğünün bir göstergesi olduğu bildirilmiştir (Çiçek ve Çakırlar 2008). Artan nikel uygulamaları (0.75 ve 1.0 mM) ile her iki genotipte bu oranın azalması, anten boyutunda ve fotosentetik aktivitede azalmaya neden olmuştur. Karotenoidler, ışık toplayıcı kompleks pigmentleri olmalarının yanı sıra, klorofilleri ve membranları foto-oksidatif hasarlara karşı koruyucu rollere sahiptir (Yao ve Liu, 2007; Ekmekçi, Tanyolaç ve Ayhan, 2008). Ayrıca nikel uygulaması ile genotiplerin karotenoid (x+c) miktarında azalma belirlenmiştir. *C. tinctorius*, *G. max*, *T. aestivum* ve *V. mungo*'da da nikel uygulamalarının pigment içeriğini azalttığı bildirilmiştir (Siddiqui, Al-Whaibi ve Basalah, 2011; Singh ve ark., 2012; Sirhindi ve ark., 2016; Rizwan ve ark., 2017).

Nikel elementinin yarattığı toksik etkilere karşı bitkilerin oluşturduğu yanıtlar; etkilerin giderilmesi, azaltılması ve ortadan kaldırılması gibi etkin mekanizmaları içermektedir. Bitkiler, nikel zararına karşı çeşitli savunma stratejilerini (metal bağlayan ligandlar, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidantlar, pigmentler, hormonlar ve şaperonlar ile düzenleme vb.) kullanarak dayanım sağlar. Yaprak dokularından fazla gelen ışığı yansıtarak klorofil pigmentlerini koruyan ve fotoinhibisyon ile klorofil parçalanmasını önleyen antosiyaninler, 400-600 nm dalga boyundaki ışığı absorbe ederler. Bununla birlikte antosiyaninler reaktif oksijen türevlerinin bertaraf edilmesinde de görev alırlar (Gould, McKelvie ve Markham, 2002; Close ve Beadle, 2005; Johnston, Harding ve Benson 2007). Yerel ve atasal aspir genotiplerinde antosiyanin miktarı kontrol gruplarına göre nikel uygulamalarında önemli düzeyde artmıştır (Şekil 4.15A). Araştırmacılar, antosiyanin birikiminin birçok abiyotik stres kaynağına karşı savunmada görev aldığını ve hem reaktif oksijen türevlerinden hem de aşırı yüksek enerjiden klorofilleri koruyarak fotooksidatif strese karşı mücadelede önemli savunma bileşikleri olduğunu bildirilmiştir (Chalker-Scott, 1999; Neill ve Gould, 2003; Kalefetoğlu Macar ve Ekmekçi, 2008). Bitkileri UV'nin zararlı etkilerinden koruyan flavonoidler, çevresel stres şartlarına maruz kalan dokularda guaiakol peroksidaz (POD)'a elektron verici

molekül olarak hidrojen peroksidin detoksifikasyonunda görev alırlar (Asada, 1999; Sakihama ve ark., 2002). Bitkilerdeki flavonoid akümülyasyonunun metal toksisitesine karşı bir savunma mekanizması olduğu düşünülmektedir. Flavonoidler birçok metal ile etkileşime girerek kompleks oluşturabilir, bu flavonoid-metal kompleksleri genellikle metalloenzimlere (SOD gibi) benzer aktivite göstererek antioksidant davranış sergiler ve oksidantlara karşı savunmada yalın durumdaki flavonoidlerden daha etkili olabilirler (Kasprzak, Erxleben ve Ochocki, 2012). Yapılan çalışmalarda greyfurttaki acı tadı veren başlıca flavonoid olan narinjinin, nikelin sebep olduğu oksidatif strese karşı savunmada etkili olduğu (Kasprzak, Erxleben ve Ochocki, 2012); alüminyuma toleranslı ve hassas pirinç varyeteleri karşılaştırıldığında taksifolin flavonoidi ve diğer bazı fenolik bileşiklerin akümülyasyonunun tolerant varyetelerde daha yüksek olduğu (Tolra, Barcelo ve Poschenrieder, 2009); *Populus*'da Cd stresine bir cevap olarak flavonoid miktarında artış olduğu bildirilmiştir (Pari ve Amudha, 2011). Radikallerle mücadelede rol almalarının yanı sıra moleküler yapılarına bağlı olarak metaller için şelatör fonksiyonu da görebilirler. Metallerin şelatlanması, bitki bünyesinde taşınımında ve biyomoleküllere hasar veremeyecek etkisiz formlarda depolanmasında oldukça önemlidir. Yapılarında bulundurdıkları serbest hidroksil gruplarının pozisyonu ve sayısının fazlalığı, flavonoidlerin iyi bir antioksidant ve şelatör olmalarının temel sebebidir (Symonowicz ve Kolanek, 2012). Chen ve ark. (2010) biyoçanın-A'nın nikel ve bakır ile şelat kompleksi oluşturduğunu ve bu kompleksin antioksidant, antiviral ve antikanser özellik gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da yerel ve atasal aspir genotiplerinde flavonoid miktarı kontrol gruplarına göre nikel uygulamalarının tamamında önemli miktarda artmıştır (Şekil 4.15B). Özellikle atasal genotipin 1.0 mM nikel uygulamasındaki artış yerel genotip ile karşılaştırıldığında oldukça fazladır. Nikel toksisitesine bağlı olarak oluşan oksidatif stresle mücadelede atasal genotipin flavonoidleri yüksek seviyede çalıştırarak yerel genotiple benzer seviyede oksidatif hasar görmüştür. Atasal genotipin flavonoidleri bu derece yüksek miktarda oluşturuyor olması metal stresine karşı savunma kapasitesi bakımından önemli iken yerel genotipin çok daha az miktarda flavonoidle bu işi başarması dikkat çekicidir.

Toksik düzeyde nikel, bitkilerdeki birçok fizyolojik sürece olumsuz etki etmektedir. Yapılan çalışmalar, nikel toksisitesinin bitkilerde solunum ve fotosentetik elektron

taşıma sistemlerinde meydana gelen aksamalar neticesinde ROT miktarında artışa sebep olduğunu ve bu ROT'ların oksidatif stres ile ilişkili olduğunu göstermektedir. ROT'lar membranların bütünlüğünü bozarak permeabilitenin değişmesi ile hasarlara yol açar ve bu değişimler de iyon sızıntılarına neden olmaktadır (Mittler, 2002; Yusuf ve ark., 2011; Khaliq ve ark., 2016; Khan ve ark., 2016). Artan nikel düzeylerine bağlı olarak genotiplerin membranlarında önemli düzeyde iyon sızıntısı saptanmıştır (Şekil 4.13). Bu sonuçları fotosentetik aktivite ve pigment içeriklerindeki değişimler de desteklemektedir.

Fotosentez ve solunum gibi metabolik işlevlerin bir ürünü olarak dokularında sürekli oluşan ROT'lar, bitki dokularındaki farklı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidantlar ile detoksifiye edilmektedir (Bhalerao, Sharma ve Poojari, 2015). Bitkilerde SOD enzimi, süperoksit radikalının (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyerek, ROT'lara karşı savunma hattının ilk basamağını oluşturur (Ali ve ark., 2003; Melchiorre ve ark., 2009). Aspir genotiplerinin kök ve yaprak dokularında artan nikel düzeylerine bağlı olarak toplam SOD enzim aktivitesinin arttığı ve bu artışın köklerde çok daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.16A ve B). Genel olarak değerlendirildiğinde; SOD aktivitesinin kök dokularında yaprağa göre çok yüksek olması, kökte nikel birikimi ile ilişkili olabilir. Nikel uygulamalarında bitkilerde oluşan oksidatif hasara (Şekil 4.13) karşı genotiplerin toplam SOD enzim aktivitelerindeki artış, oluşturulan savunma stratejisi olarak düşünülebilir. Yapılan diğer çalışmalarda da nikel toksisitesinin farklı bitkilerde SOD aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (Ali ve ark., 2003; Gajewska ve Skłodowska, 2007; Siddiqu, Al-Whaibi ve Basalah, 2011; Theriault, Michael ve Nkongolo, 2016). SOD enziminin katalize ettiği reaksiyonun bir ürünü olarak güçlü bir oksidant olan (H_2O_2) açığa çıkmaktadır. Nikel uygulamaları ile yaprak dokularındaki H_2O_2 miktarında yerel çeşitte artış gözlenirken, atasal genotipte yalnızca 0.50 mM nikel uygulamasındaki artış önemli bulunmuştur (Şekil 4.14). Hidrojen peroksitin zararsız hale getirilmesinde görev alan enzimler POD, APX, CAT vb. olup, bu enzimler de ROT'lara karşı ikinci savunma hattını oluştururlar (Ahmad ve Ashraf, 2011). Bunlardan biri, lignifikasyon ile süberinizasyonu içeren hücre çeperi biyosentezinde, IAA degradasyonunda ve etilen biyosentezinde rol oynayan POD'dur (Foyer, Lopez-Delgado ve Dat, 1997; Radić, Radić-Stojković ve Pevalek-Kozlina, 2006). Atasal ve yerel aspir genotiplerinde hem yaprak hem kök

dokusunda artan nikel düzeylerinde POD aktivitesi genel olarak artmış ve bu artışın kökte çok yüksek düzeyde olduğu saptanmıştır (Şekil 4.19A ve B). Farklı bitkilere nikel uygulamasının yapıldığı çalışmalarda da benzer şekilde POD miktarının nikel stresinde arttığı bildirilmiştir (Ali ve ark., 2003; Gajewska ve Skłodowska, 2007).

Bitki hücrelerinde H_2O_2 , POD'un yanı sıra askorbat-glutasyon döngüsünün (Halliwell-Asada) enzimleri ile de detoksifiye edilmektedir (Foyer ve Halliwell, 1976; Asada ve Takahashi, 1987). Bu döngünün ilk basamağında H_2O_2 'yi indirgeyen APX enzimi, askorbata karşı yüksek afinite ile özgülüğe sahiptir ve askorbatı elektron donörü olarak kullanır (Asada, 1999; Mittler ve Poulos, 2005; Ghasemi ve ark., 2014). Araştırmada yerel ve atasal aspir genotiplerinin kök dokusunda nikel stresine bağlı olarak APX enzim aktivitesinde önemli bir değişim olmazken, yaprak dokusunda kontrol grubuna oranla nikel uygulamalarında APX enzim aktivitesinde gerçekleşen artışlar anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.17A ve B). Çeşitli bitkilerde nikel toksisitesinin APX enzim aktivitesinde artışa neden olduğunu (Kumar ve Sharma, 2012; Ghasemi ve ark., 2014) veya değişime yol açmadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Boominathan ve Doran, 2002; Gajewska ve Skłodowska, 2007). Hidrojen peroksitin detoksifikasyon sürecinde yer alan Halliwell-Asada döngüsünün ilk enzimi APX'in yanı sıra döngünün sürdürülebilmesinde rol oynayan diğer bir enzim olan GR; genotiplerin kök ve gövde dokularında nikel stresine, APX enziminin aktivitesine benzer cevap vermiştir (Şekil 4.14A ve B). Yerel ve atasal genotipin nikel stresi altındaki GR aktivitesi karşılaştırıldığında kök dokusunda bir fark görülmezken (Şekil 4.14A), yaprak dokusundaki aktivitesi atasal genotipte yerel çeşide göre önemli düzeyde fazladır (Şekil 4.14B).

Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde;

- Toksik nikel düzeylerinin bitki büyüme ve gelişmesini olumsuz yönde etkilediği görülmektedir.
- Bitkinin kökleriyle aldığı nikelin büyük bir kısmını kök dokularında biriktirdiği, toprak üstü kısımlara daha az taşıdığı ve bu durumun biyokütledeki azalışa da yansıdığı belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, sürgüne transloke edilen nikelin daha az olmasına rağmen, yapraklarda fotosentetik performansları olumsuz etkilemiştir. Ayrıca toksik nikel iyonlarının köklerden alımı ve birikimi sonucunda

Üretilen ROT'lara karşı, bitkilerin oluşturduğu savunma stratejilerinden biri olan antioksidant enzimler aktive olmuştur. Bu bağlamda, nikel iyonlarının oluşturduğu oksidatif hasar ürünü O_2^- ve H_2O_2 'e karşı sırası ile her iki genotipte de köklerde SOD ve POD enzimlerinin yüksek aktiviteleri detoksifikasyonda yeterli olurken; yapraklarda bu savunmanın SOD, POD, APX ve GR'a ek olarak antosiyanin ve flavonoidlerdeki artışlarla birlikte başarıldığı görülmektedir.

- Atasal ve yerel genotipler arasında nikel toksisitesine karşı oluşturulan cevaplar açısından belirgin bir ayırım saptanamamıştır.
- Nikelin yüksek oranda köklerde akümüle olmasından dolayı, aspir genotiplerinin nikel fitoremediasyonunda kullanılma potansiyelleri, fitoekstraksiyondan ziyade fitostabilizasyon kapasitesi açısından değerlendirilebilir.
- Yapılan çalışmada kök, gövde ve yapraklardaki metal konsantrasyonu ile translokasyon indeksi dikkate alındığında; her iki genotipin de hiperakümülatör olmadığı tespit edilmiştir.
- Aspir bitkisinin nikel toleransı ile ilişkili proteom değişimleri incelenebilir ve bunların savunmadaki rolü daha detaylı ortaya konulabilir.
- Çalışılan aspir genotiplerinin yüksek konsantrasyonda nikeli köklerinde akümüle etmesi ve yüksek biyokütleye sahip olması sebebi ile özellikle yerel çeşit (Olas) ağır nikel kirliliği olan marjinal toprakların iyileştirilmesinde kullanılabilir.
- Yapılacak sonraki çalışmalarda nikelin köklerden tohumu kadar taşınım yolu izlenerek son ürün olan tohum ve yağındaki metal içerikleri saptanabilir ve gıda sektöründeki kullanım durumu belirlenebilir. Aksi durumda, nikel ile kirlenmiş alanların fitoremediasyonunda kullanılan aspir bitkilerinin tarımsal üretimden çok biyodizel üretiminde değerlendirilmesi düşünülebilir.
- Aspir genotiplerinin nikel kirliliği olan arazi koşullarında test edilmesi ile (biyokütle üretimi, nikel akümülasyonu, metal translokasyonu vb.) fitostabilizasyonda kullanım potansiyeli değerlendirilebilir.

- Yapılacak daha sonraki çalışmalarda glutatyon miktarı, glutatyon s-transferaz (GST) aktivitesi ile köklerde H₂O₂ miktarı, membran hasarın içeriğine bakılması ile savunma mekanizmaları hakkında daha detaylı bilgi edinilebilir.



KAYNAKLAR

- Adıgüzel, N., Reeves, R.D., Important Serpentine Areas of Turkey and Distribution Patterns of Serpentine Endemics and Nickel Accumulators, *Bocconeia*, 24 (2012) 7-17.
- Ahmad, M.S.A. and Ashraf, M., Essential Roles and Hazardous Effects of Nickel in Plants, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 214 (2011) 134-135.
- Ahmad, S., Ahmad, R., Ashraf, M. Y., Ashraf, M., Waraich, E. A., Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Response to Drought Stress at Germination and Seedling Growth Stages, *Pakistan Journal of Botany*, 41 (2009) 647-654.
- Ali, M.B., Vajpayee, P., Tripathi, R.D., Rai, U.N., Singh, S.N., Singh, S.P., Phytoremediation of Lead, Nickel, and Copper by *Salix acmophylla* Boiss.: Role of Antioxidant Enzymes and Antioxidant Substances, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70 (2003) 462–469.
- Alsher R.G., Donahue J.L. and Cramer C., Reactive Oxygenspecies and Antioxidants: Relationships in Green Cells, *Physiologia Plantarum*, 100 (1997) 224–233.
- Amari, T., Lutts, S., Taamali, M., Lucchini, G., Sacchi, G. A., Abdelly, C., Ghnaya, T., Implication of Citrate, Malate and Histidine in the Accumulation and Transport Nickel in *Mesembryanthemum crystallinum* and *Brassica juncea*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126 (2016) 122-128.
- Anjum, N.A., Singh, H.P., Khan, M.I.R., Masood, A., Per, T.S., Negi, A., Batish, D.R., Khan, N.A., Duarte, A.C., Pereira, E., Ahmad, I., Too Much is Bad an Appraisal of Phytotoxicity of Elevated Plant Beneficial Heavy Metal Ions, *Environmental Science And Pollution Research*, 22 (2015a) 3361-3382.
- Anjum, N.A., Hasanuzzaman, M., Hossain, M.A., Thangavel, P., Roychoudhury, A., Gill, S.S., Rodrigo, M.A.M., Adam, V., Fujita, M., Kizek, R., Duarte,

- A.C., Pereira, E., Ahmad, I., Jacks of Metal/Metalloid Chelation Trade in Plants, an overview, *Frontiers in Plant Science*, 6 **(2015b)** 1-17.
- Apel, K. and Hirt, H., Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction, *Annual Review of Plant Biology*, 55 **(2004)** 373–99.
- Aravind, P. and Prasad, M.N.V., Zn Protects Chloroplasts and Associated Photochemical Functions in Cadmium Exposed *Ceratophyllum demersum* L., a Freshwater Macrophyte, *Plant Science*, 166 **(2004)** 1321 – 1327.
- Arslan, Ö., Eyidoğan, F. and Ekmekçi, Y., Freezing tolerance of chickpea: biochemical and molecular changes at vegetative stage, *Biologia Plantarum*, 62 **(2018)** 140-148.
- Asada, K. and Takahashi, M. Production and Scavenging of Active Oxygen in Chloroplasts. In: Kyle, D.J., Osmond, C.B. and Arntzen, C.J., (Eds.), *Photoinhibition*, Elsevier, Amsterdam, 227-287, **1987**.
- Asada, K., Iho, K. and Yoshikawa, K., Univalent Reduction of Molecular Oxygen by Spinach Chloroplasts on Illumination, *The Journal of Biological Chemistry*, 49 **(1974)** 2175-2181.
- Asada, K., The Water-Water Cycle in Chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons, *Annual Review of Plant Biology*, 50 **(1999)** 601-639.
- Ashraf, M.Y., Sadiq, R., Hussain, M., Ashraf, M., Ahmad, M.S.A., Oxidic Effect of Nickel (Ni) on Growth and Metabolism in Germinating Seeds of Sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Biological Trace Element Research*, 143 **(2011)** 1695-1703.
- Aybar, M., Bilgin, A., Sağlam, B., Fitoremediasyon Yöntemi İle Topraktaki Ağır Metallerin Giderimi, *Doğal Afetler ve Çevre Dergisi*, 1 **(2015)** 59-65.
- Ayhan, B., Ekmekçi, Y., Tanyolaç, D., Bitkilerde ağır metal zararları ve korunma mekanizmaları, *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7 **(2006)** 1-16.
- Ayhan, B., Mısır (*Zea mays*)'ın Bazı Çeşitlerinde Ağır Metal (Cd^{+2} , Pb^{+2}) Stresinin Etkilerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2006**.
- Babaoğlu, M., Aspir Bitkisi Ve Tarımı, Trakya Tarımsal Araştırmalar Enstitüsü, Edirne, **2007**.

- Bauddha, K., Singh, K., Singh, B., Singh, R.P., *Ricinus communis*: A Robust Plant for Bio-Energy and Phytoremediation of Toxic Metals from Contaminated Soil, *Ecological Engineering*, 84 (2015) 640-652.
- Bergmeyer, H.U., Bernt, E., Glutamate-Oxaloacetate Transaminase, *Methods of Enzymatic Analysis*, 2 (1974) 727-733.
- Berti, W. R. and Cunningham, S.D., Phytostabilization Of Metals, 2000.
- Beyer, W. F., Fridovich, I., Assaying for Superoxide Dismutase Activity: Some Large Consequences of Minor Changes in Conditions, *Analytical Biochemistry*, 161 (1987) 559-566.
- Bhalerao, S.A., Sharma, A.S., Poojari, A.C., Toxicity of Nickel in Plants, *International Journal of Pure and Applied Bioscience*, 3 (2015) 345-355.
- Bishnoi, N.R., Sheoran, I.S., and Singh, R., Influence of Cadmium and Nickel on Photosynthesis and Water Relations in Wheat Leaves of Different Insertion Level, *Photosynthetica*, 28 (1993) 473–479.
- Blumenthal, C., Bekes, F., Wrigley, C., Barlow, E., The Acquisition and Maintenance of Thermotolerance in Australian Wheats, *Functional Plant Biology*, 17 (1990) 37-47.
- Boisvertetal, S., Inhibition of the Oxygen-Evolving Complex of Photosystem II and Depletion of Extrinsic Polypeptides by Nickel, *Biometals*, 20 (2007) 879 – 889.
- Boominathan, R., Doran, P. M., Ni-induced Oxidative Stress in Roots of the Ni Hyperaccumulator, *Alyssum bertolonii*, *New Phytologist* 156 (2002) 205–215.
- Bradford, M.M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*, 72 (1976) 248-254.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J. and Weretilnyk, Responses to Abiotic Stress. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Gruissem, W. and Jones, R., (Eds), American Society of Plant Physiologists, Rockville, 1158-1203, 2000.
- Breusegem, F.V., Vranová, E., Dat, J. and Inze, D., The Role of Active Oxygen Species in Plant Signal Transduction, *Plant Science* 161(2001) 405-414.

- Brooks, R.R., Shaw, S., Marfil, A.A., The Chemical Form and Physiological Function of Nickel in Some Iberian *Alyssum* species, *Physiologia Plantarum*, 51 (**1981**) 167 – 170.
- Burd, G.I., Dixon, D.G., Glick, B.R., Plant Growth-Promoting Bacteria that Decrease Heavy Metal Toxicity in Plants, *Canadian Journal of Microbiology*, 46 (**2000**) 237-245.
- Büyük İ., Soydam-Aydın S. ve Aras S., Bitkilerin Stres Koşullarına Verdiği Moleküler Cevaplar, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69 (**2012**) 97-110.
- Cai, H., Dong, Y., Peng, C., Li, Y., Xu, W., Li, D., Wana, X., Fluoride-Induced Responses in the Chlorophyll Content and the Antioxidant System in Tea Leaves (*Camellia sinensis*), *Research Report Fluoride*, 50 (**2017**) 59-78.
- Cakmak, I. and Horst, J.H. Effects of Aluminum on Lipid Peroxidation, Superoxide Dismutase, Catalase, and Peroxidase Activities in Root Tips of Soybean (*Glycine max*), *Physiologia Plantarum*, 83 (**1991**) 463-468.
- Cataldo, D.A., Garland, T.R., Wildung, E.R., Nickel in plants: I. Uptake Kinetics Using Intact Soybean Seedlings, *Plant Physiology*, 62 (**1978**) 563-565.
- Cempel, M., Nikel, G., Nickel: A Review of Its Sources and Environmental Toxicology, *Polish Journal of Environmental Studies*, 15 (**2006**) 375-382.
- Ceppi, M.G., Oukarroum, A., Çiçek, N., Strasser, R.J., Schansker, G., The IP Amplitude of the Fluorescence Rise OJIP is Sensitive to Changes in the Photosystem I Content of Leaves: A Study on Plants Exposed to Magnesium and Sulfate Deficiencies, Drought Stress and Salt Stress, *Physiologia Plantarum* 144 (**2012**) 277 – 288.
- Chalker-Scott, L., Environmental Significance of Anthocyanins in Plant Stress Responses, *Photochemistry and Photobiology*, 70 (**1999**) 1-9.
- Chami, Z., Amer, N., Bitar, L., Cavoski, I., Potential Use of *Sorghum bicolor* and *Carthamus tinctorius* in Phytoremediation of Nickel, Lead and Zinc, *International Journal Of Environmental Science and Technology*, 12 (**2015**) 3957-3970.
- Chaney, R.L., Angle, J.S., Broadhurst, C.L., Peters, C.A., Tappero, R.V., Sparks, D.L., Improved Understanding of Hyperaccumulation Yields Commercial Phytoextraction and Phytomining Technologies, *Journal of Environmental Quality*, 36 (**2007**) 1429-1443.

- Chen, C., Huang, D., Liu, J., Functions and Toxicity of Nickel in Plants: Recent Advances and Future Prospects, *Clean*, 37 (**2009**) 304-313.
- Chen, X., Tang, L.J., Sun, Y.N., Qiu, P.H., Liang, G.J., Syntheses, Characterization and Antitumor Activities of Transition Metal Complexes with Isoflavones, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 104 (2010) 379-384.
- Clemens S., Palmgren M.G. and Krämer U., A Long Way Ahead: Understanding and Engineering Plant Metal Accumulation, *Trends in Plant Science*, 7 (**2002**) 309–315.
- Clemens, S., Molecular Mechanisms of Plant Metal Tolerance and Homeostasis, *Planta*, 212 (**2001**) 475–486.
- Close, C.D., Beadle, C.L., Xanthophyll-Cycle Dynamics and Rapid Induction of Anthocyanin Synthesis in *Eucalyptus nitens* Seedlings Transferred to Photoinhibitory Conditions, *Journal of Plant Physiology*, 162 (**2005**) 37-46.
- Cobbet, C. and Goldsbrough, P., Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis, *Annual Review Of Plant Biology*, 53 (**2002**) 159-182.
- Cosge, B., Gurbuz, B., Kiralan, M., Oil Content and Fatty Acid Composition of Some Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Varieties Sown in Spring and Winter, *International Journal of Natural And Engineering Sciences*, 1 (**2007**) 11-15.
- Çamaş, N., Çırak, C., Esenal, E., Seed Yield, Oil Content and Fatty Acids Composition of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Grown in Northern Turkey Conditions, **2012**.
- Çelik, J., Aksoy, A. ve Leblebici, Z., Metal hyperaccumulating Brassicaceae from the ultramafic area of Yahyalı in Kayseri province, Turkey, *Ecological Research*, 33 (**2018**) 705-713.
- Çiçek, N., Arslan, Ö., Çulha-Erdal, Ş., Eyidoğan, F., Ekmekçi, Y., Are the Photosynthetic Performance Indexes and the Drought Factor Index Satisfactory Selection Criterion for Stress?, *Fresenius Environmental Bulletin*, 24 (**2015**) 4190-4198.
- Çiçek, N., Çakırlar, H., Effects of Salt Stress on Some Physiological and Photosynthetic Parameters at Three Different Temperatures in Six Soya Bean (*Glycine max* L. Merr.) Cultivars, *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194 (**2008**) 34-46.

- Çulha-Erdal, Ş., Aspir Genotiplerinde Kuraklığa Dayanıklılığın Fizyolojik, Biyokimyasal ve Moleküler Düzeyde İncelenmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, **2017**.
- Dajue, L. and Mündel, H.H. Safflower. *Carthamus tinctorius* L. Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops, 7th Edition, Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic, Rome, **1996**.
- Dorado, M.P., Ballesteros, E., Lopez, F.J. and Mittelbach, M., Optimization of Alkali-Catalyzed Transesterification of *Brassica carinata* Oil for Biodiesel Production, Energy & Fuels, 18 (**2004**) 77-83.
- Douchkov, D., Gryczka, C., Stephan, U.W., Hell, R., Baumlein, H., Ectopic Expression of Nicotianamine Synthase Genes Results in Improved Iron Accumulation and Increased Nickel Tolerance in Transgenic Tobacco, Plant, Cell and Environment, 28 (**2005**) 365 – 374.
- Drazkiewicz, M. and Baszynski, T., Interference of Nickel with the Photosynthetic Apparatus of *Zea mays*, Ecotoxicology and Environmental Safety 73 (**2010**) 982-986.
- Drazkiewicz, M., Effect of Nickel on the Photosynthetic Apparatus of Plants. Wiadomosci Botaniczne, 38 (**1994**) 77–84.
- Duman, F., Öztürk, F., Nickel Accumulation and Its Effect on Biomass, Protein Content and Antioxidative Enzymes in Roots and Leaves of Watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.), Journal of Environmental Sciences, 22 (**2010**) 526-532.
- Dushenkov, V., Kapulnik, Y., Phytofiltration of Metals. In: Raskin, I. Ve Ensley, B.D. (Eds.). Phytoremediation of Toxic Metals-Using Plants To Clean-Up The Environment. Wiley, New York, p. 89- 106, **2000**.
- Edelstein M. and Ben-Hur M., Heavy Metals and Metalloids: Sources, Risks and Strategies to Reduce Their Accumulation in Horticultural Crops, Scientia Horticulturae, 234 (**2018**) 431-444.
- Eitinger, T., Mandrand-Berthelot, M.A., Nickel Transport Systems in Microorganisms, Archives of Microbiology, 173 (**2000**) 1-9.
- Ekmekçi, Y., Tanyolaç, D., Ayhan, B., Effects of Cadmium on Antioxidant Enzyme and Photosynthetic Activities in Leaves of Two Maize Cultivars, Journal of Plant Physiology, 165 (**2008**) 600-611.

- El-Sheekh, M.M., Inhibition of Photosystem II in the Green Alga *Scenedesmus obliquus* by Nickel, *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 188 (1993) 363 – 372.
- EPA, Contaminants and Remedial Options at Select Metals-Contaminated Sites, EPA, 540, R-955, 1995.
- Esterbauer, H., Cheeseman, K. H., Determination of Aldehydic Lipid Peroxidation Products: Malonaldehyde and 4-Hydroxynonenal, *Methods in Enzymology*, 186 (1990) 407-421.
- Farrant, J. M., A Comparison of Mechanisms of Desiccation Tolerance among Three Angiosperm Resurrection Plant Species, *Plant Ecology*, 151 (2000) 29-39.
- Finkemeier, I. and Sweetlove, L.J., The Role of Malate in Plant Homeostasis, *Reproductive Biology*, 1 (2009) 47.
- Fourati, E., Wali, M., Vogel-Mikus, K., Abdelly, C., Ghnaya, T., Nickel Tolerance, Accumulation and Subcellular Distribution in the Halophytes *Sesuvium portulacastrum* and *cakile maritima*, *Plant Physiology and Biochemistry*, 108 (2016) 295-303.
- Foyer, C.H, Halliwell, B., The Presence of Glutathione and Glutathione Reductase in Chloroplasts: A Proposed Role in Ascorbic Acid Metabolism, *Planta*, 133 (1976) 21-25.
- Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F., Scott, I.M., Hydrogen Peroxide and Glutathione-Associated Mechanisms of Acclimatory Stress Tolerance and Signalling, *Physiologia Plantarum*, 100 (1997) 241–254.
- Fu, C., Olsen, J.W. and Maier, R. J., HypB Protein of *Bradyrhizobium japonicum* is a Metal-Binding GTPase Capable of Binding 18 Divalent Nickel Ions per Dimer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 (1995) 2333 – 2337.
- Gajewska, E., Skłodowska, M., Effect of Nickel on ROS Content and Antioxidative Enzyme Activities in Wheat Leaves, *BioMetals* 20 (2007) 27–36.
- Gajewska, E., Skłodowska, M., Slaba, M. and Mazur, J., Effect of Nickel on Antioxidative Enzyme Activities, Proline and Chlorophyll Contents in Wheat Shoots, *Biologia Plantarum*, 50 (2006) 653-659.

- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman J.F. and Dommes J., Concepts in Plant Stress Physiology. Application to Plant Tissue Cultures, Plant Growth Regulation, 37 **(2002)** 263–285.
- Gecgel, U., Demirci, M., Esendal, E., Tasan, M., Fatty Acid Composition of the Oil from Developing Seeds of Different Varieties of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.), Journal Of The American Oil Chemists' Society, 84 **(2007)** 47-54.
- Ghasemi, R., Chavoshi, Z.Z., Boyd, R.S., Rajakaruna, N., A Preliminary Study of the Role of Nickel in Enhancing Flowering of the Nickel Hyperaccumulating Plant *Alyssum inflatum* Nyár. (Brassicaceae), South African Journal of Botany, 92 **(2014)** 47-52,
- Gheibi, M.N., Malakouti, M.J., Kholdebarin B. and Ghanati, F., Significance of Nickel Supply for Growth and Chlorophyll Content of Wheat Supplied with Urea or Ammonium Nitrate, Journal of Plant Nutrition, 32 **(2009)** 1440-1450
- Ghosh, M., Singh, S.P., A Review on Phytoremediation of Heavy Metals and Utilization of Its Byproducts, Applied Ecology And Environmental Research 3 **(2014)** 1-18.
- Goltsev, V.N., Kalaji, H.M., Paunov, M., Baba, W., Horaczek, T., Mojski, T., Kociel, J. and Allakhverdiev, S.I., Variable Chlorophyll Fluorescence and Its Use for Assessing Physiological Condition of Plant Photosynthetic Apparatus, Russian Journal of Plant Physiology, 63 **(2016)** 869-893.
- Gould, K., McKelvie, J., Markham, K., Do Anthocyanins Function as Antioxidants in Leaves? Imaging of H₂O₂ in Red and Green Leaves After Mechanical Injury, Plant, Cell and Environment, 25 **(2002)** 1261-1269.
- Gratao, P.L., Polle, A., Lea, P.J. and Azevedo, R.A., Making the Life of Heavy Metal-Stressed Plants a Little Easier, Functional Plant Biology, 32 **(2005)** 481-494.
- Guerinot, M.L., The Zip Family of Metal Transporters, Biochimica Et Biophysica Acta, 1465 **(2000)** 190-198.
- Guo, Y and Marschner, H., Uptake, distribution, and binding of cadmium and nickel in different plant species, Journal of Plant Nutrition, 18 **(1995)** 2691-2706.

- Haber, F., Weiss, J., The Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Ion Salts, *Proceedings of the Royal Society*, 147 (**1934**) 332-351.
- Halimaa, P., Blande, D, Aarts, M.G.M., Tuomainen, M., Tervahauta, A., and Kärenlampi, S., Comparative Transcriptome Analysis of the Metal Hyperaccumulator *Noccaea caerulescens*, *Frontiers in Plant Science*, 5 (**2014**) 213.
- Hall, J.L., Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance, *Journal of Experimental Botany*, 53 (**2002**) 1–11.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. The Antioxidants of Human Extracellular Fluids, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 280 (**1998**) 1-8.
- Hamamci, C., Saydut, A., Tonbul, Y., Kaya, C., Kafadar, A., Biodiesel Production via Transesterification from Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Seed Oil, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects, *Energy Sources*, 33 (**2011**) 512-520.
- Hausinger, R.P., Metallocenter Assembly in Nickel-Containing Enzymes, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2 (**1997**) 279 – 286.
- He, S., He, Z., Yang, X., Baligar, V.C., Mechanisms of Nickel Uptake and Hyperaccumulation by Plants and Implications for Soil Remediation, *Advances in Agronomy*, 117 (**2012**) 118-122.
- Hoagland, D.R. and Arnon, D.I., *The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil*, California Agricultural Experiment Station, California, **1950**.
- Israra, M., Jewella, A., Kumarb, D., Sahia, S., Interactive Effects of Lead, Copper, Nickel and Zinc on Growth, Metal Uptake and Antioxidative Metabolism of *Sesbania drummondii*, *Journal of Hazardous Materials*, 186 (**2011**) 1520–1526.
- Jajic, I., Sarna, T. and Strzalka, K., Senescence, Stress, and Reactive Oxygen Species, *Plants*, 4 (**2015**) 393-411.
- Jakkeral, S.A., and Kajjidoni, S.T., Root exudation of organic acids in selected genotypes under phosphorus deficient condition in blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper), *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 24 (**2011**) 316–319.
- Johnston, J.W., Harding, K., Benson, E.E., Antioxidant Status and Genotypic Tolerance of Ribes in Vitro Cultures to Cryopreservation, *Plant Science*, 172 (**2007**) 524-534.

- Joshi, R., Pareek, A., Singla-Pareek, S.L., Plant Metallothioneins: classification, distribution, function, and regulation, Plant Metal Interaction, Emerging Remediation Techniques, (ed. Parvaiz, A.), Elsevier, Amsterdam, 239-253, **2015**.
- Kalaji, H.M., Goltsev, V., Bosa, K., Allakverdiev, S.I., Strasser, R.J., Govindjee, Experimental in Vivo Measurements of Light Emission in Plants: A Perspective Dedicated to David Walker, Photosynthesis Research, 114 (**2012**) 69-96.
- Kalefetoğlu, M.T., Ekmekçi, Y., PS II Photochemistry and Antioxidant Responses of a Chickpea Variety Exposed to Drought, Zeitschrift für Naturforschung C: A Journal of Biosciences, 63 (**2008**) 583-594.
- Kasprzak, M.M., Erxleben, A. and Ochocki, J., Properties and Applications of Flavonoid Metal Complexes, The Royal Society of Chemistry, 0 (**2012**) 1-24.
- Kautsky H, Hirsch A. Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. Naturwissenschaften 19 (**1931**) 964-974.
- Khaliq, A., Ali, S., Hameed, A., Farooq, M.A., Farid, M., Shakoor, M.B., Mahmood, K., Ishaque, W., Rizwan, M., Silicon Alleviates Nickel Toxicity in Cotton Seedlings Through Enhancing Growth, Photosynthesis, and Suppressing Ni Uptake and Oxidative Stress, Archives of Agronomy and Soil Science, 62 (**2016**) 633–647.
- Khan, M.I.R., Khan, N.A., Masood, A., Per, T.S., Asgher, M., Hydrogen Peroxide Alleviates Nickel-Inhibited Photosynthetic Responses Through Increase in Use Efficiency of Nitrogen and Sulfur, and Glutathione Production in Mustard, Frontiers in Plant Science, 7 (**2016**) 1-20.
- Kotapati, K.V., Palaka, B.K., Ampasala, D.R., Alleviation of Nickel Toxicity in Finger Millet (*Eleusine coracana* L.) Germinating Seedlings by Exogenous application of Salicylic Acid and Nitric Oxide, The Crop Journal, 5 (**2017**) 240-250.
- Koti, R. V., Prakash, S., Kiran, K., Ravikumar, T., An Investigation on the Performance and Emission Characteristics of a Direct Injection Diesel Engine Using Safflower Oil and Milk Scum Oil as a Biodiesel, International Refereed Journal Of Engineering And Science, 3, (**2014**) 103-112.

- Koutroubas, S.D., Papakosta, D.K., Doitsinis, A., Phenotypic Variation in Physiological Determinants of Yield in Spring Sown Safflower Under Mediterranean Conditions, *Field Crops Research*, 112 (**2009**) 199-204.
- Kozlow, M.V., Pollution Resistance of Mountain Birch, *Betula pubescens subsp. szerepanovii*, Near the Copper-Nickel Smelter: Natural Selection or Phenotypic Acclimation?, *Chemosphere*, 59 (**2005**) 189–197.
- Krüpa, Z. and Baszynski, T., Some Aspects of Heavy Metals Toxicity towards Photosynthetic Apparatus – Direct and Indirect Effects on Light and Dark Reactions, *Acta Physiologiae Plantarum*, 17 (**1995**) 177–190.
- Krüpa, Z., Siedleka, A., Maksymiec, W., Baszynski, T., In Vivo Response of Photosynthetic Apparatus of *Phaseolus vulgaris* L. to Nickel Toxicity, *Journal of Plant Physiology*, 142 (**1993**) 664 – 668.
- Kumar, H., Sharma, D., Kumar, V., Nickel-Induced Oxidative Stress and Role of Antioxidant Defence in Barley Roots and Leaves, *International Journal of Environmental Biology*, 2 (**2012**) 121-128.
- Küpper, H., Mijovilovich, H., Meyer-Klaucke, M., Kroneck, P.M.H., Tissue and Age Dependent Differences in the Complexation of Cadmium and Zinc in the Cadmium/Zinc Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Ganges Ecotype) Revealed by X-Ray Absorption Spectroscopy, *Plant Physiology*, 134 (**2004**) 748-757.
- Levitt J., Responses of Plants to Environmental Stresses, London Academic Press, New York, **1972**.
- Lichtenthaler, H.K., Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes, *Methods in enzymology*, 148 (**1987**) 350-382.
- Llamas, A., Ullrich, C. I., Sanz, A., Ni⁺² toxicity in rice: Effect on membrane functionality and plant water content, *Plant Physiology and Biochemistry* 46 (**2008**) 905-910.
- Llugany, M., Miralles, R., Corrales, I., Barcelo, J., Poschenrieder, C., *Cynara cardunculus* a Potentially Useful Plant for Remediation of Soils Polluted with Cadmium or Arsenic, *Journal of Geochemical Exploration*, 123 (**2012**) 122-127.
- Luo, Y. and Rimmer, D.L., Zinc-Copper Interaction Affecting Plant Growth on a Metal -contaminated soil, *Environmental Pollution*, 88 (**1995**) 79 – 83.

- Maestri, E., Marmioli, M., Visioli, G. and Marmioli N., Metal Tolerance and Hyperaccumulation: Costs and Trade-Offs Between Traits and Environment, *Environmental and Experimental Botany* 68 **(2010)** 1-13.
- Manara, A., Plant Responses to Heavy Metal Toxicity, *Plants and Heavy Metals*, Springer Briefs in Biometals, Verona, Chapter 2, **2012**.
- Mancinelli, A.L., Yang, C.P.H., Lindquist, P., Anderson, O., Rabino, I., Photocontrol of Anthocyanin Synthesis: III. The Action of Streptomycin on the Synthesis of Chlorophyll and Anthocyanin, *Plant Physiology*, 55 **(1975)** 251-257.
- Martens S.N. and Boyd R.S., The Defensive Role of Ni Hyperaccumulation by Plants: A Field Experiment, *American Journal Of Botany*, 89 **(2002)** 998–1003.
- Massey, L., Dietary Influences on Urinary Oxalate and Risk of Kidney Stones, *Frontiers in Bioscience*, 8 **(2003)** 584-594.
- Matthaus, B., Özcan, M., Al Juhaimi, F., Fatty Acid Composition And Tocopherol Profiles of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Seed Oils, *Natural Product Research*, 29 **(2015)** 193-196.
- Melchiorre, M., Quero, G.E., Parola, R., Racca, R., Trippi, V.S., Lascano, R., Physiological Characterization of Four Model Lotus Diploid Genotypes: *L. japonicus* (Mg20 and Gifu), *L. filicaulis*, and *L. burtii* under Salt Stress, *Plant Science*, 177 **(2009)** 618-628.
- Merlot, S., Hannibal, L., Martins, S., Martinelli, L., Amir, H., Lebrun, M., Thomine, S., The Metal Transporter PglREG1 from the Hyperaccumulator *Psychotria gabriellae* is a Candidate Gene for Nickel Tolerance and Accumulation, *Journal Of Experimental Botany*, 65 **(2014)** 1551-1564.
- Meshram, P. D., Puri, R. G., and Patil, H. V., Epoxidation of Wild Safflower (*Carthamus oxyacantha*) Oil with Peroxy Acid in Presence of Strongly Acidic Cation Exchange Resin IR-122 As catalyst, *International Journal Of Chem Tech Research*, 3 **(2011)** 1152-1163.
- Mirecki, R.M. and Teramura, A.H., Effects of Ultraviolet-B Irradiance on Soybean V. The Dependence of Plant Sensitivity on the Photosynthetic Photon Flux Density During and After Leaf Expansion, *Plant physiology*, 74 **(1984)** 475-480.

- Mishra, S. and Dubey, R.S., Heavy Metal Uptake and Detoxification Mechanisms in Plants, *International Journal of Agricultural Research*, 1 (2006) 122-141.
- Mittler, R. and Poulos, T., Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants, Smirnoff, N. (Ed.), Blackwell Publishing, Oxford p. 87-100, 2007.
- Mittler, R. and Poulos, T., Ascorbate Peroxidase, Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants, Smirnoff, N. (ed.), Blackwell Publishing, Oxford, 87-100, 2005.
- Mittler, R., Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance, *Trends in Plant Science*, 7 (2002) 405-410.
- Mittler, R., Poulos, T., Ascorbate Peroxidase, Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants, (ed. N Smirnoff), Blackwell Publishing, Oxford, 87-100, 2005.
- Mittler, R., ROS are Good, *Trends in Plant Science*, Elsevier, Mountain View, 22, 2017.
- Mohanty, N., Vaas, I., and Demeter, S., Impairment of Photosystem 2 Activity at the Level of Secondary Quinone Electron Acceptor in Chloroplasts Treated with Cobalt, Nickel and Zinc Ions, *Physiologia Plantarum*, 76 (1989) 386–390.
- Nagajyoti, P.C., Lee, K.D. and Sreekanth, T., Heavy Metals, Occurrence and Toxicity for Plants: A Review, *Environmental Chemistry Letters*, 8 (2010) 199-216.
- Nedelkoska, T.V. and Doran, P.M., Characteristics of Heavy Metal Uptake by Plant Species with Potential for Phytoremediation and Phytomining, *Minerals Engineering*, 13 (2000) 549-561.
- Neill, S.O., Gould, K.S., Anthocyanins in Leaves: Light Attenuators or Antioxidants?, *Functional Plant Biology*, 30 (2003) 865 – 873.
- Newman L.A. ve Reynolds C.M., Phytodegradation of Organic Compounds, *Current Opinion in Biotechnology*, 15 (2004) 225-230.
- Nishida, S., Aisu, A. and Mizuno, T., Induction of IRT1 by the Nickel-Induced Iron-Deficient Response in *Arabidopsis*, *Plant Signaling Behavior*, 7 (2012) 329–331.
- Oelke, E., Oplinger, E., Teynor, T., Putnam, D., Doll, J., Kelling, K., Durgan, B., Noetzel, D., Safflower, *Alternative Field Crops Manual*, 1992.

- Oller, A.R., Costa, M., Oberdörster, G., Carcinogenicity Assessment of Selected Nickel Compounds, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 143 (1997) 152–166.
- Oukarroum, A., Madidi S.E., Schansker, G. and Strasser, R.J., Probing the Responses of Barley Cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by Chlorophyll a Fluorescence OLKJIP Under Drought Stress and Re-Watering, *Environmental and Experimental Botany*, 60 (2007) 438-446.
- Oukarroum, A., Schansker, G. and Strasser, R.J., Drought Stress Effects on Photosystem I Content and Photosystem II Thermotolerance Analyzed Using Chl A Fluorescence Kinetics in Barley Varieties Differing in Their Drought Tolerance, *Physiologia Plantarum*, 137 (2009) 188–199.
- Oukarrouma, A., Lebrihia, A., Gharousb, M.E., Goltsevc, V. and Strasser, R.J., Desiccation-induced Changes of Photosynthetic Transport in Parmelinatiaceae (Hoffm.) Ach. Analysed by Simultaneous Measurements of The Kinetics of Prompt Fluorescence, Delayed Fluorescence and Modulated nm Reflection, *Journal of Luminescence*, 198 (2018) 302–308.
- Ouzounidou, G., Moustakas, M., Symeonidis, L., Karataglis, S., Response of Wheat Seedlings to Ni Stress: Effects of Supplemental Calcium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50 (2006) 346–352.
- Öz. M.T., Ö. Turan, Ö., Kayıhan, C., Eyidoğan, F., Ekmekçi, Y., YüCel, M. and Öktem, H.A., Evaluation of Photosynthetic Performance of Wheat Cultivars Exposed to Boron Toxicity by the JIP Fluorescence Test, *Photosynthetica* 52 (2004) 555-563.
- Pace, M., Israelsen, C., Creech, E. and Allen, N., Growing Safflower in Utah, Extension, 2015.
- Padmavathiamma, P.K., Loretta, Y.L., Phytoremediation Technology: Hyperaccumulation Metals in Plants, *Water Air Soil Pollution*, 184 (2007) 105-126.
- Pandey, N. Sharma, C.P., Effect of Heavy Metals Co^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} on Growth and Metabolism of Cabbage. *Plant Science*, 163 (2002) 753-758.
- Pari, L. and Amudha, K., Effects of Naringin on Physical Fatigue and Serum MMP-9 Concentration in Female Rats, *European Journal of Pharmacology*, 650 (2011) 364-370.

- Pearl, S. A., Bowers, J. E., Reyes-Chin-Wo, S., Michelmore, R. W., Burke, J. M., Genetic Analysis of Safflower Domestication, *Bmc Plant Biology*, 14 (2014) 43.
- Persans, M.W., Nieman, K., Salt, D.E., Functional Activity and Role of Cation-Efflux Family Members in Ni Hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (2001) 9995 – 10000.
- Petrucci, R.H. and Harwood, W.S., *General Chemistry: Principles and Modern Applications*, 6th Edition, Macmillan Publishing Company, New York, 1993.
- Peuke, A.D., Rennenberg, H., *Molecular Biology, Requirements for Application, Environmental Protection, Public Attention and Feasibility*, *European Molecular Biology Organization*, 6 (2005) 497-501.
- Pietrini, F., Iori, V., Cheremisina, A., Shevyakova, N.I., Radyukina, N., Kuznetsov, V.V., Zacchini, M., Evaluation of Nickel Tolerance in *Amaranthus paniculatus* L. Plants by Measuring Photosynthesis, Oxidative Status, Antioxidative Response and Metal-Binding Molecule Content, *Environmental Science and Pollution Research*, 22 (2015) 482-494.
- Radic, S., Radic-Stojkovic, M. and Pevalek-Kozlin, B., Influence of NaCl and Mannitol on Peroxidase Activity and Lipid Peroxidation in *Centaurea ragusina* L. roots and shoots, *Journal of Plant Physiology* 163 (2006) 1284—1292.
- Rao, M. V., Hale, B. A., Ormrod, D. P., Amelioration of Ozone-Induced Oxidative Damage in Wheat Plants Grown under High Carbon Dioxide (Role of Antioxidant Enzymes), *Plant Physiology*, 109 (1995) 421-432.
- Rascio, N. and Navari-Izzo, F. , Heavy Metal Hyperaccumulating Plants: How and Why Do They Do It? And What Makes Them so Interesting?, *Plant Science*, 180 (2011) 169–181.
- Redmann, R., Haraldson, J., and Gusta, L., Leakage of UV-Absorbing Substances as a Measure of Salt Injury in Leaf Tissue of Woody Species, *Physiologia Plantarum*, 67 (1986) 87-91.
- Ripoll, J., Bertin, N., Bidel, L. P., and Urban, L. A., User's View of the Parameters Derived From the Induction Curves of Maximal Chlorophyll a

- Fluorescence: Perspectives for Analyzing Stress, *Frontiers in Plant Science*, 7 **(2016)** 1679.
- Rizwan, M., Imtiaz, M., Dai, Z., Mehmood, S., Adeel, M., Liu, J., Tu, S., Nickel Stressed Responses of Rice in Ni Subcellular Distribution, Antioxidant Production, and Osmolyte Accumulation, *Environmental Science and Pollution Research*, 20587 **(2017)** 20598.
- Rizzi L., Petruzzelli, G., Poggio G., Guidi, V.G., Soil Physical Changes and Plant Availability of Zn and Pb in a Treatability Test of Phytostabilization, *Chemosphere*, 57 **(2004)** 1039-1046
- Robinson, B. H., Brooks, R. R., Gregg, P. E. H., Kirkman, J. H. the Nickel Phytoextraction Potential of Some Ultramafic Soils as Determined by Sequential Extraction, *Geoderma*, 87 **(1999)** 293-304.
- Roccoliello, E., Serrano, H.C., Mariotti, M.G., Branquinho, C., The Impact of Ni on the Physiology of a Mediterranean Ni-Hyperaccumulating Plant, *Environmental Science and Pollution Research*, 23 **(2016)** 12414-12422.
- Rubio, M.I., Escrig, I., Martinez-Cortina, C., Lopez-Benet, F.J., Sanz, A., Cadmium and Nickel Accumulation in Rice Plants. Effects On Mineral Nutrition and Possible Interactions of Absciscic and Gibberellic Acids, *Plant Growth Regulation* 14 **(1994)** 151-157.
- Sachan, P. and Lal, N., An Overview of Nickel (Ni²⁺) Essentiality, Toxicity and Tolerance Strategies in Plants, *Asian Journal of Biology*, 2 **(2017)** 1-15.
- Sachan, P. and Lal, N., Molecular Mechanisms of Nickel (Ni²⁺) Homeostasis in Plants: Uptake, Tolerance and Hyperaccumulation, Khan, M.M.A.A., Abid, M., Vermaand, D., Maheshwari, R.K. (Eds), *Discovery Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi*, 178-196, **2019**.
- Sagner, S., Kneer, R., Wanner, G., Cosson, J.P., Deus-Neumann, B., Zenk, M.H., Hyperaccumulation, Complexation and Distribution of Nickel in *Sebertia acuminata*, *Phytochemistry*, 47 **(1998)** 339 – 347.
- Sairam, K., Deshmukh, P.S. and Shukla, D.S., Tolerance of Drought and Temperature Stress in Relation to Increased Antioxidant Enzyme Activity in Wheat, *Journal of Agronomy and Crop Science*, 178 **(1997)** 171-177.
- Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C., Yamasaki, H., Plant Phenolic Antioxidant and Prooxidant Activities: Phenolics-Induced Oxidative Damage Mediated by Metals in Plants, *Toxicology*, 177 **(2002)** 67-80.

- Samantaray, S., Rout, G.R., and Das, P., Tolerance of Rice to Nickel in Nutrient Solution, *Biologia Plantarum*, 40 (**1997**) 295-298.
- Schor-Fumbarov, T., Goldsbrough, P.B., Adam, Z., Tel-Or, E., Characterization and Expression of a Metallothionein Gene in the Aquatic Fern *Azolla Filiculoides* Under Heavy Metal Stress, *Planta*, 223 (**2005**) 69 – 76.
- Seregin, I.V and Ivanov, V.B., Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants, *Russian Journal of Plant Physiology*, 48 (**2001**) 523-544.
- Seregin, I.V., Kozhevnikova A.D., Kazyumina M. and Ivanov, B., Nickel Toxicity and Distribution in Maize Roots, *Russian Journal of Plant Physiology*, 50 (**2013**) 711-717.
- Seregin, I.V., Kozhevnikova, A., Kazyumina, A.M. and Ivanov, V.B., Nickel Toxicity and Distribution in Maize Roots, *Russian Journal of Plant Physiology*, 50 (**2003**) 711-717.
- Seregin, I.V., Kozhevnikova, A.D., Physiological Role Of Nickel and Its Toxic Effects on Higher Plants, *Russian Journal of Plant Physiology*, 53 (**2006**) 257-277.
- Sgherry C.I.M., Pinzino C. ve Navari-Izzo F., Sunflower Seedlings Subjected to Increasing Water Stress by Water Deficit: Changes in O₂-Production Related to The Composition of Thylakoid Membranes. *Physiologia Plantarum*, 96 (**1996**) 446-452.
- Sharma, S.S. and Dietz, K.J., The Significance of Amino Acids and Amino Acid Derived Molecules in Plant Responses and Adaptation to Heavy Metal Stress, *Journal of Experimental Botany*, 57 (**2006**) 711-726.
- Sheoran, I.S., Singal, H.R. and Singh, R., Effects of Cadmium and Nickel on Photosynthesis and the Enzymes of the Photosynthetic Carbon Reduction Cycle in Pigeon Pea (*Cajanus cajan* L.), *Photosynthesis Research*, 23 (**1990**) 345 – 351.
- Shi, G., Liu, C., Cai, Q., Liu, Q., and Hou, C., Cadmium Accumulation and Tolerance of Two Safflower Cultivars in Relation to Photosynthesis and Antioxidative Enzymes, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 85 (**2010**) 256–263.

- Siddiqui, M.H., Al-Whaibi, M.H., Basalah, M.O., Interactive Effect of Calcium and Gibberellin on Nickel Tolerance in Relation to Antioxidant Systems in *Triticum aestivum* L. *Protoplasma* 248 (2011) 503–511.
- Siedlecka, A., Tukendorf, A., Skorzynska-Polit, E., Maksymiec, W., Wojcik, M., Baszynski, T. and Krupa, Z., Angiosperms (Asteraceae, Convolvulaceae, Fabaceae and Poaceae; other than Brassicaceae), Prasad, M.N.V. (Ed.), Metals in the Environment. Analysis by Biodiversity, New York, Basel: Marcel Dekker, p. 171-217, 2001.
- Singh G, Agnihotri RK, Reshma RS, Ahmad M Effect of Lead and Nickel Toxicity on Chlorophyll and Proline Content of Urd (*Vigna mungo* L.) Seedlings. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 4 (2012) 136–141.
- Singh, D. and Chauhan, S.K., Organic Acids of Crop Plants in Aluminium Detoxification, *Current Science*, 100 (2011) 1109–1515.
- Singh, D.P., Khare, P. and Singh, P.S., Effect of Ni^{2+} , Hg^{2+} and Cu^{2+} on Growth, Oxygen Evolution and Photosynthetic Electron Transport in *Cylindrospermum* IU 942, *Journal of Plant Physiology*, 134 (1989) 406 – 412.
- Sirhindi, G., Mir, M.A., Abd-Allah, E.F., Ahmad, P., Gucel, S., Jasmonic Acid Modulates the Physio-Biochemical Attributes, Antioxidant Enzyme Activity, and Gene Expression in *Glycine max* Under Nickel Toxicity, *Frontiers in Plant Science*, 7 (2016) 591.
- Sitko, K., Rusinowski, S., Kalaji, H.M., Szopiński, M., Małkowski, E., Photosynthetic Efficiency as Bioindicator of Environmental Pressure in *A. halleri*, *Plant Physiology*, 175 (2017) 290-302.
- Smirnoff, N., The Role of Active Oxygen in the Response of Plants to Water Deficit and Desiccation, *New Phytologist*, 125 (1993) 27-58.
- Smith, V. H., Jimmerson, J., Safflower, 2005.
- Sperdouli, I., Moustakas, M., Interaction of Proline, Sugars, and Anthocyanins During Photosynthetic Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to Drought Stress, *Journal of Plant Physiology*, 169 (2012) 577–585.
- Sreekanth, T., Nagajyothi, P.C., Lee, K.D., Prasad, T.N.V.K.V, Occurrence, Physiological Responses and Toxicity of Nickel in Plants, *International Journal of Environmental Science and Technology* 10 (2013) 1129-1140.

- Stadtman E.R. and Barlett B.S., Free Radical-Mediated Modification of Proteins, Wallace K.B., (Ed.) Free Radical Toxicology, Press Boca Raton, Miami, **1997**.
- Stirbet, A., Lazar, D., Kromdijk, J., Govindjee, Chlorophyll *a* Fluorescence Induction: Can Just a One-Second Measurement Be Used to Quantify Abiotic Stress Responses?, *Photosynthetica*, 56 (**2018**) 86-104.
- Strass A. and Horst W.J., Effect of Aluminum on Membrane Properties of Soybean (*Glycine max*) Cells in Suspension Culture, *Plant and Soil*, 171 (**1995**) 113–118.
- Strasser, B. J., Strasser, R. J., Measuring Fast Fluorescence Transients to Address Environmental Questions: The JIP-Test, *Photosynthesis: from light to biosphere*, Mathis, P. (Ed.), The Kluwer Academic, Dordrecht, 977-980, **1995**.
- Strasser, R. J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M., The Fluorescence Transient as a Tool to Characterize and Screen Photosynthetic Samples, *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*, Pathre Y.M., Mahanty, P. (Eds.), Taylor and Francis, London, 445-483, **2000**.
- Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M., Srivastava, A., Analysis of the Chlorophyll *a* Fluorescence Transient, *Chlorophyll *a* Fluorescence*, Govindjee, P.C.G. (eds), Springer, Netherlands, 321-362, **2004**.
- Syam, N., Wardiyati, T., Maghfoer, M.D., Handayanto, E., Ibrahim, B., Muchdar, A., Effect of Accumulator Plants on Growth and Nickel Accumulation of Soybean on Metal-Contaminated Soil, *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 9 (**2016**) 13-19.
- Syama, N., Wardiyatib, T., Maghfoerb, M. D., Handyantoc, E., Ibrahima, B., Muchdar, A., Effect of Accumulator Plants on Growth and Nickel Accumulation of Soybean on Metal-Contaminated Soil, *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 9 (**2016**) 13-19.
- Symonowicz, M. and Kolanek, M., Flavonoids and their Properties to form Chelate Complexes, *Biotechnology and Food Sciences*, 76 (**2012**) 35-41.
- Pandolfini, T., Gabbrielli, R., Comparini, C., Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L, *Plant Cell Environ.* 15 (**1992**) 719-725.

- Theriault, G. and Nkongolo, K., Nickel and Copper Toxicity and Plant Response Mechanisms in White Birch (*Betula papyrifera*), Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 97 (2016) 171-176.
- Theriault, G., Michael, P., Nkongolo, K., Comprehensive Transcriptome Analysis of Response to Nickel Stress in White Birch (*Betula papyrifera*), Plos One, 11 (2016) 1-21.
- Tolra, R., Barcelo, J. and Poschenrieder, C., Constitutive and Aluminium-Induced Patterns of Phenolic Compounds in Two Maize Varieties Differing in Aluminium Tolerance, Journal of Inorganic Biochemistry, 103 (2009) 1486-1490.
- Tóth, S. Z., Schansker, G., Kissimon, J., Kovács, L., Strasser, R. J., Biophysical Studies of Photosystem II-Related Recovery Processes after a Heat Pulse in Barley Seedlings (*Hordeum vulgare* L.), Journal of Plant Physiology, 162, (2005) 181-194.
- Trejo-Tellez, L.I., Gomez-Merino, F.C., and Schmitt, J.M., Citric Acid: Biosynthesis, Properties and Applications on Higher plants, in Citric Acid, Vargas, D.A. and Medina, J.V. (Eds), New York, NY: Nova Science Publishers, Inc., 43–70, 2012.
- Tripathi, V., Edrisi, S.A., Abhilashn, P.C., Towards The Coupling of Phytoremediation with Bioenergy Production, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 57 (2016) 1386-1389.
- Tsimilli-Michael, M., Strasser, R. J., In Vivo Assessment of Stress Impact on Plant's Vitality: Applications in Detecting and Evaluating the Beneficial Role of Mycorrhization on Host Plants, Mycorrhiza, Varma, A. (Ed), Springer, Berlin Heidelberg, 679-703, 2008.
- Van der Ent, A., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Pollard, A.J. ve Schat, H., Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction, Plant and Soil, 362 (2013) 319-334.
- Veeranjaneyulu, K. and Das, V.S.R., Intrachloroplast Localization of Zn and Ni in a Zn-Tolerant Plant, *Ocimum basilicum* Benth, Journal of Experimental Botany, 1982, 33 (1982) 1161–1165.
- Velasco, L., Pérez-Vich, B., Fernández-Martínez, J., Identification and Genetic Characterization of a Safflower Mutant with a Modified Tocopherol Profile, Plant Breeding, 124 (2005) 459-463.

- Visioli, G. and Marmioli, N., The Proteomics of Heavy Metal Hyperaccumulation by Plants, *Journal of Proteomics*, 79 (2013) 133–145.
- Wang, S. Y., Jiao, H. J., Faust, M., Changes in Ascorbate, Glutathione, and Related Enzyme Activities During Thidiazuron-Induced Bud Break of Apple, *Physiologia Plantarum*, 82 (1991) 231-236.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. and Altman A., Role of Plant Heat-Shock Proteins and Molecular Chaperones in the Abiotic Stress Response, *Trends In Plant Science*, 9 (2004) 244-245.
- Watt, R.K., Ludden, P.W., The identification, Purification, and characterization of CooJ. A Nickel-Binding Protein That is Co-Regulated with the Ni-Containing Co Dehydrogenase from *Rhodospirillum Rubrum*, *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (1998) 10019-10025.
- Wisniewski, L., Dickinson, N.M., Toxicity of Copper to *Quercus robur* (English Oak) seedlings from a Copper-Rich Soil, *Environmental and Experimental Botany*, 50 (2003) 99 – 107.
- Wojcik, M., Gonnellix, C., Selvix, F., Dresler, S., Rostanski, A. and Vangronsveld, J., Metallophytes of Serpentine and Calamine Soils: Their Unique Ecophysiology and Potential for Phytoremediation, *Advances in Botanical Research*, 83 (2017) 1-34.
- Wolfram, L., Friedrich, B., Eitinger, T., The *Alcaligenes Eutrophus* Protein HoxN Mediates, Nickel Transport in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 177 (1995) 1840 – 1843.
- Wycisk K., Kim E., Schroeder J. and Kramer U., Enhancing the First Enzymatic Step in the Histidine Biosynthesis Pathway Increases the Free Histidine Pool and Nickel Tolerance in *Arabidopsis thaliana*, *FEBS Letters*, 578 (2004) 128-134.
- Yadav N. and Sharma, S., An Account of Nickel Requirement, Toxicity and Oxidative Stress in Plants, *Biological Forum*, 8 (2016) 414-419.
- Yaman, H., Tarıkayha-Hacıoğlu, B., Arslan, Y., Subaşı, İ., Molecular Characterization of the Wild Relatives Of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) in Turkey as Revealed by ISSRs, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 61 (2014) 595-602.

- Yao, X. and Liu, Q., Changes in Photosynthesis and Antioxidant Defenses of *Picea asperata* Seedlings to Enhanced Ultraviolet-B and To Nitrogen Supply. *Physiologia Plantarum*, 129 (2007) 364–374.
- Yusuf, M., Fariduddin, Q., Hayat, S. and Ahmad, A., Nickel: An Overview of Uptake, Essentiality and Toxicity in Plants, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86 (2011) 1-17.
- Zacchini, M., Pietrini, F., Mugnozza, G.S., Iori, V., Pietrosanti, L., and Massacci, A., Metal Tolerance, Accumulation and Translocation in Poplar and Willow Clones Treated with Cadmium in Hydroponics, *Water Air and Soil Pollution*, 197 (2009) 23–34.
- Zoeller M., Stingl N., Krischke M., Fekete A., Waller F., Berger S. and Mueller M.J., Lipid Profiling of the *Arabidopsis hypersensitive* Response Reveals Specific Lipid Peroxidation and Fragmentation Processes: Bio-Genesis of Pimelic and Azelaic Acid, *Plant Physiology*, 160 (2012) 365–378.
- Zouboulis, A.I., Katsoyiannis, I.A., Recent Advances in the Bioremediation of Arsenic-Contaminated Groundwater, *Environment International*, 31 (2005) 213-219.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLERİ

Ad: Uğurcan

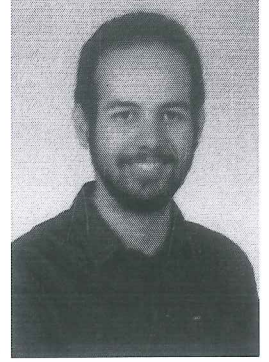
Soyad: Baran

Doğum Yılı: 1993

Doğum Yeri: Ankara

E-posta: ugurcanbaran@gmail.com

ubaran@akdeniz.edu.tr



EĞİTİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans: HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Biyoloji/Botanik, 2018

Lisans: HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2015

Lise: Cumhuriyet Lisesi, Ankara, 2011

YABANCI DİL

İngilizce, İyi

AKADEMİK UNVAN ve GÖREVİ

Arş. Gör., AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ, Fen Fakültesi, 2018 - Devam Ediyor

DENEYİM ALANLARI

Bitki Stres Fizyolojisi

Fotosentez ve Polifazik Klorofil a Fluoresansı

AKADEMİK FAALİYETLER (Projeler, Burslar ve Seminerler)

- UBFS 2018 III. Plant Physiology Symposium with International Participation, Çanakkale, 2018 (Sözlü Sunum)
- "Polifazik Klorofil A Fluoresans Kinetiklerindeki Değişimlere Bağlı Olarak Aspir (Carthamus tinctorius L.) Genotiplerinin Kuraklık Toleranslarının Belirlenmesi ve

Kuraklık Toleransı ile İlişkili Proteom Değişimlerinin Ortaya Konulması", TÜBİTAK Projesi, 214Z058, Bursiyer, 2016-2017.

- Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Laboratuvarları, Hacettepe Biyoloji ve Uygulamaları Kongresi, Botanik Çalıştay, Laboratuvar Sorumlu Eğitmeni. (2016)
- "Ayçiçeğinde (*Helianthus Annuus* L.) Kuraklığa Dayanıklı Genetik Materyalin Belirlenmesi ve Islah Programlarında Kullanılması", TÜBİTAK Projesi, 113O926, Bursiyer, 2015-2016.
- Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Laboratuvarları, Hacettepe Biyoloji ve Uygulamaları Kongresi, Botanik Çalıştay, Laboratuvar Sorumlu Eğitmeni. (2015)



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih:27/12/2018

Tez Başlığı/Konusu: Aspir Bitkisinin Yerel (*Carthamus tinctorius* L.) Ve Atasal (*Carthamus oxyacantha* M. Bieb) Genotiplerinin Nikel Toleranslarının Belirlenmesi ve Fitoremediasyonunda Kullanılma Potansiyellerinin Değerlendirilmesi

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 73 sayfalık kısmına ilişkin, 27/12/2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 3 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.


Tarih ve İmza

27.12.18

Adı Soyadı: Uğurcan BARAN
Öğrenci No: N15228747
Anabilim Dalı: BİYOLOJİ
Programı: BOTANİK
Statüsü: ☒ Y.Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.



Prof.Dr. Yasemin EKMEKÇİ