

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**HİPERAKÜMÜLATÖR *Centaurea ensiformis* P.H. Davis BİTKİSİNDEN İZOLE
EDİLEN BAKTERİLERLE ASPİR BİTKİSİNİN NİKEL TOLERANSININ VE
FİTOREMEDİASYON KAPASİTESİNİN ARTTIRILMASI**

Uğurcan BARAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

TEMMUZ 2025

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**HİPERAKÜMÜLATÖR *Centaurea ensiformis* P.H. Davis BİTKİSİNDEN İZOLE
EDİLEN BAKTERİLERLE ASPİR BİTKİSİNİN NİKEL TOLERANSININ VE
FİTOREMEDİASYON KAPASİTESİNİN ARTTIRILMASI**

Uğurcan BARAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

TEMMUZ 2025

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİPERAKÜMÜLATÖR *Centaurea ensiformis* P.H. Davis BİTKİSİNDEN İZOLE
EDİLEN BAKTERİLERLE ASİR BİTKİSİNİN NİKEL TOLERANSININ VE
FİTOREMEDİASYON KAPASİTESİNİN ARTTIRILMASI**

Uğurcan BARAN

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez TÜBİTAK tarafından KBAG-222Z011 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEMMUZ 2025

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİPERAKÜMÜLATÖR *Centaurea ensiformis* P.H. Davis BİTKİSİNDEN İZOLE
EDİLEN BAKTERİLERLE ASPİR BİTKİSİNİN NİKEL TOLERANSININ VE
FİTOREMEDİASYON KAPASİTESİNİN ARTTIRILMASI**

Uğurcan BARAN

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez 03/07/2025 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet AKSOY

Prof. Dr. Nuran ÇİÇEK

Prof. Dr. Okan ACAR

Prof. Dr. Şule ORMAN

Dr. Öğr. Üyesi Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK

ÖZET

HİPERAKÜMÜLATÖR *Centaurea ensiformis* P.H. Davis BİTKİSİNDEN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERLE ASİR BİTKİSİNİN NİKEL TOLERANSININ VE FİTOREMEDİASYON KAPASİTESİNİN ARTTIRILMASI

Uğurcan BARAN

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet AKSOY

İkinci Danışman: Prof. Dr. Yasemin EKMEKÇİ

Haziran 2025; 111 sayfa

Dünya genelinde artan nikel (Ni) seviyeleri bitkiler başta olmak üzere ekosistemin her bileşeni için giderek artan bir tehdit unsuru olmaktadır. Özellikle tarımsal faaliyet yürütülen karayollarına yakın alanlarda Ni kontaminasyonu nedeniyle hem ürün verimi düşmektedir hem de besin zincirinde ilerleyen Ni, diğer canlılarda birikim ve toksisiteye neden olmaktadır. Ni ile kontamine olmuş tarımsal alanların temizlenmesi veya bu alanlarda yetiştirilebilecek toleranslı bitkilerin geliştirilmesi için çeşitli stratejiler bulunmaktadır. Bu bağlamda öne çıkan fitoremediasyon tekniği, bitki büyümesini teşvik eden bakteriler (PGPB) vb. ajanlarla desteklenerek daha yüksek performansta icra edilebilmektedir. Bu çalışmada, Ni hiperakümülatörü olan *Centaurea ensiformis* P.H. Davis (Ece sarıbaşı) bitkisinin mikrobiyotasında yer alan, Ni dirençli ve PGPB özellikli olan 6 farklı cinse ait toplamda 13 farklı endofitik bakteri türü tanımlanmıştır. Tanımlanan türlerden 5 tanesi (*Peribacillus frigorigerans*, *Bacillus sanguinis*, *Streptomyces pseudovenezuelae*, *S. canus* ve *S. griseorubiginosus*) ayrı ayrı *Carthamus tinctorius* L. cv. Yenice (Aspir) bitkisine inoküle edilmiştir. Bu sayede aspir bitkisinin Ni toleransı ile fitoremediasyon kapasitesinin artırılması ve bu artışın hangi mekanizmalar ile gerçekleştiğinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Farklı PGPB türleri ile inoküle edilen aspir bitkileri, su kültüründe ve kontrollü iklim koşullarında (25°C sıcaklık, 16/8 saat fotoperiyot ve 250-350 $\mu\text{mol.m}^{-1}\text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, %45-55 nem) 21 gün boyunca yetiştirilmiş ve son 7 gün 0.75 mM Ni stresi uygulanmıştır.

Ni, aspir bitkisinin köklerinde sürgünlere oranla daha yüksek miktarda akümüle olmuştur. Ni iyonlarının bu dağılımını, uygulanan PGPB suşları farklı yönlerde değiştirebilmiş ve bu nitelikleri doğrultusunda seçilen iki farklı PGPB türü (*S. pseudovenezuelae* ve *S. griseorubiginosus*), fitoremediasyon stratejileri açısından değerlendirilmiştir. *S. pseudovenezuelae* inokülasyonu, aspir bitkisinin sürgünlerinde Ni akümülyasyonunu %29.9 artırırken; *S. griseorubiginosus* ise bu akümülyasyonu %21.2 azaltmıştır. *S. pseudovenezuelae*, sürgünlere yüksek Ni translokasyonuna rağmen klorofil miktarı, bitki boyu ve kuru biyokütle üzerinde olumsuz bir etkiye neden olmamış, hatta çeşitli tolerans mekanizmalarının (özellikle antioksidan sistemler; POD ve APX) daha etkin biçimde çalışmasını destekleyerek oksidatif hasardan bitkiyi korumuştur. *S. griseorubiginosus* ise sürgünde oluşan toksisiteyi Ni iyonlarını köklerde stabilize ederek sınırlamış, böylece bitkinin membran bütünlüğünü, su içeriğini, klorofil miktarını ve

fotosentetik yapıların fonksiyonel bütünlüğünü daha iyi korumasını sağlayarak kuru biyokütle üretimini yani verimini artırmıştır.

Sonuç olarak, *S. griseorubiginosus* inokülasyonu, gıda güvenliği kaygılarının ön planda olduğu Ni ile kirlenmiş tarım alanlarında aspir bitkisinin güvenli ve verimli şekilde yetiştirilmesi için biyolojik açıdan avantajlı bir seçenek sunmasının yanı sıra, fitostabilizasyon temelli fitoremediasyon uygulamaları için de önemli bir potansiyele sahip olduğu görülmüştür. Öte yandan, *S. pseudovenezuelae*–Aspir birlikteliği, yüksek Ni alımı ve translokasyonu sayesinde fitoekstraksiyon odaklı fitoremediasyon stratejilerinde öne çıkabilecek bir yaklaşım potansiyeli taşımaktadır. Dahası, bu iki bakterinin kombine uygulamalarıyla gerçekleştirilecek ileri çalışmalar, hem Ni ekstraksiyon kapasitesini hem de bitkisel toleransı artırarak, daha etkili ve bütüncül biyoremediasyon stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilecektir.

ANAHTAR KELİMELE: Antioksidan, *Carthamus tinctorius* L., Klorofil *a* floresansı, PGPB

JÜRİ: Prof. Dr. Ahmet AKSOY

Prof. Dr. Nuran ÇİÇEK

Prof. Dr. Okan ACAR

Prof. Dr. Şule ORMAN

Dr. Öğr. Üyesi Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK

ABSTRACT

ENHANCING NICKEL TOLERANCE AND PHYTOREMEDIATION CAPACITY OF SAFFLOWER USING BACTERIA ISOLATED FROM THE HYPERACCUMULATOR PLANT *Centaurea ensiformis* P.H. Davis

Uğurcan BARAN

PhD Thesis in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet AKSOY

Co-Supervisor: Prof. Dr. Yasemin EKMEKÇİ

June 2025; 111 pages

The increasing levels of nickel (Ni) across the globe are becoming a growing threat to ecosystems, particularly to plants. In agricultural areas, Ni contamination not only reduces crop yield but also poses a risk to food safety by allowing Ni to accumulate in organisms through the food chain. To address this issue, several strategies have been developed to either clean up contaminated soils or cultivate plants with enhanced tolerance. Among these, phytoremediation stands out as a promising approach, and its effectiveness can be significantly improved by integrating supportive agents such as plant growth-promoting bacteria (PGPB). In this study, a total of 13 endophytic bacterial strains identified from the microbiota of Ni-hyperaccumulator *Centaurea ensiformis* P.H. Davis (Ece sarıbaşı) were characterized for their Ni resistance and PGPB traits. Five selected strains (*Peribacillus frigoritolerans*, *Bacillus sanguinis*, *Streptomyces pseudovenezuelae*, *S. canus*, and *S. griseorubiginosus*) were individually inoculated into *Carthamus tinctorius* L. cv. Yenice (safflower). The objective was to enhance the plant's tolerance to Ni stress and its phytoremediation capacity, while also exploring the underlying physiological and biochemical mechanisms involved. Safflower plants inoculated with different PGPB strains were grown hydroponically under controlled environmental conditions (25°C, 16/8 h light/dark cycle, 250–350 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ light intensity, 45–55% humidity) for 21 days. During the final 7 days, 0.75 mM Ni stress was applied.

Ni was found to accumulate more in roots than in shoots, but the distribution varied depending on the bacterial strain used. Based on their contrasting effects, two strains—*Streptomyces pseudovenezuelae* and *S. griseorubiginosus*—were selected for further evaluation as part of different phytoremediation strategies. Inoculation with *S. pseudovenezuelae* increased Ni translocation to shoots by 29.9%, yet had no adverse effects on chlorophyll content, plant height, or biomass. On the contrary, it supported antioxidant defense mechanisms (especially POD and APX), helping the plant tolerate oxidative stress. *S. griseorubiginosus*, on the other hand, restricted Ni accumulation to the roots by 21.2%, effectively reducing shoot toxicity. This helped preserve membrane integrity, water content, chlorophyll levels, and photosynthetic functionality—ultimately enhancing dry biomass production and overall plant growth performance.

In summary, *S. griseorubiginosus* appears to be a promising and safe biotechnological tool for cultivating safflower in Ni-contaminated agricultural lands

where food safety is a concern, particularly through phytostabilization. In contrast, the *S. pseudovenezuelae*–safflower interaction shows greater potential for phytoextraction-based remediation due to its capacity to promote Ni uptake and translocation. Moreover, future research exploring combined applications of these two bacterial strains could lead to the development of more comprehensive and effective phytoremediation strategies by simultaneously enhancing metal removal efficiency and plant resilience.

KEYWORDS: Antioxidant, *Carthamus tinctorius* L., Chlorophyll *a* fluorescence, PGPB

COMMITTEE: Prof. Dr. Ahmet AKSOY

Prof. Dr. Nuran ÇİÇEK

Prof. Dr. Okan ACAR

Prof. Dr. Şule ORMAN

Asst. Prof. Dr. Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın temelini, tarım alanlarının giderek artan ağır metal kirliliği tehdidi karşısında, sürdürülebilir ve çevre dostu çözüm arayışları oluşturmuştur. Özellikle nikel gibi toksik metallerin toprak verimliliğini azaltmasının yanı sıra, bitkisel üretimi ve dolaylı olarak gıda güvenliğini tehdit etmesi, bu konunun ele alınmasında rol oynamıştır. Fitoremediasyon, çevresel kirleticilerin bitkiler aracılığıyla temizlenmesini hedefleyen yenilikçi ve sürdürülebilir bir yöntemdir. Ancak bu yöntemin etkinliği, yalnızca bitki seçiminden değil, aynı zamanda bitki ile etkileşime giren mikrobiyal bileşenlerden de etkilenmektedir. Bakterilerin, fitoremediasyon verimliliğini artırmanın yanı sıra bitkilerin ağır metal stresine karşı toleransını güçlendirebileceği düşüncesi ve bu etkileşimin altında yatan fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmaları anlama yönündeki bilimsel merakım, bu tezin temel araştırma odağını oluşturmuştur. Bu bağlamda, bu tez yalnızca stres fizyolojisi ve çevre biyoteknolojisine odaklanan bir çalışma olmanın ötesinde; sürdürülebilir tarımın geliştirilmesi, gıda güvenliğinin sağlanması ve mikrobiyal etkileşimlerin tarımsal sistemlerdeki işlevlerinin anlaşılması açısından da önemli bir içeriğe sahiptir.

Akdeniz Üniversitesi'nde araştırma görevlisi olarak göreve başladıktan kısa bir süre sonra doktora eğitimime başladım. Çalışma alanıma uygun altyapının başlangıçta mevcut olmaması, ne kontrollü bir bitki yetiştirme ortamı ne de temel ölçüm ve analizlerin yapılabilmesi için cihaz ve sarf malzemelerinin bulunmaması nedeniyle önemli zorluklarla karşılaştım. Tüm bu imkânsızlıklara rağmen, danışmanım Prof. Dr. Ahmet AKSOY'un da yoğun emekleri ve kararlılığı sayesinde Bitki-Metal Etkileşimleri Araştırma Laboratuvarı'nı sıfırdan kurma fırsatı bulduk. Bu laboratuvarın kurulmasında gösterdiği olağanüstü çabanın ve fedakarlığın yanı sıra, tez konusunun belirlenmesi, konak bitkinin arazi çalışmaları yapılarak toplanması ve tezin yürütülmesi sürecinde verdiği emekler ve bilimsel katkılar için en içten teşekkürlerimi sunarım. Danışmanlığı boyunca özgür tartışma ve çalışma ortamı sunduğu, haklı bulduğu her konuda içten bir şekilde desteklediği, eksik/hatalı gördüğü konularda yapıcı eleştirilerde bulunarak kendimi geliştirmeme imkan sağladığı için de ayrıca teşekkür ederim.

Laboratuvar ortamına ve bilimsel düşünce sistemime dair tüm temelleri atan, yüksek lisans eğitimimi danışmanlığında tamamlama ayrıcalığına sahip olduğum, birlikte çalışmaktan her zaman büyük keyif aldığım ve omuzlarında yükseldiğim Prof. Dr. Yasemin EKMEKÇİ'ye (Hacettepe Üniversitesi), bu tez sürecinde ikinci danışmanım olmayı kabul ettiği, her aşamada çok değerli bilimsel katkılar sunduğu, tez konusunun belirlenmesinde ve devamında kritik yönlendirmeleriyle çalışmamı şekillendirdiği için en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, antioksidan enzim analizlerini gerçekleştirebilmem için laboratuvarını bana defalarca açtığı ve her türlü imkânı sağladığı için minnettarım.

Yüksek lisans tez konumu belirlerken yaptığım literatür taramaları sonucu ilgimi çeken bakteri-bitki ilişkileri, danışmanımın bu konunun sınırlı süre içinde tamamlanamayabileceği ve uygun bir mikrobiyolog iş birliği gerektireceği yönündeki haklı görüşü doğrultusunda o dönem için ertelenmişti. Ancak bu hayalimi doktoramda gerçekleştirme fırsatı bulmamda önemli rol oynayan, tezimin mikrobiyolojik kısımlarının tasarlanması ve yürütülmesinde bilimsel bilgi ve laboratuvar olanaklarını cömertçe paylaşan Dr. Öğr. Üyesi Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK'e iş birliği ve desteği için içtenlikle teşekkür ederim. Ayrıca, bu süreçte değerli katkılarda bulunan lisansüstü

öğrencileri Fikriye Mehtap ŞEN ve Berfin EROĞLU'na emekleri için ayrıca teşekkür ederim.

Yüksek lisans sürecinde olduğu gibi doktora çalışmalarında da her zaman yanımda olan, tez izleme komitesi ve yeterlik jürimde yer alarak bilgi ve deneyimini benimle paylaşan, tezimde yer alan klorofil *a* floresans ölçümlerinin değerlendirilmesinde çok kıymetli katkılar sunan biricik hocam Prof. Dr. Nuran ÇİÇEK'e (Hacettepe Üniversitesi) en derin teşekkürlerimi sunarım.

Doktora sürecim boyunca yürüttüğüm laboratuvar çalışmalarında büyük emekleri bulunan, bilimsel tartışmalar ve beyin fırtınalarının yanı sıra birlikte vakit geçirmekten de her zaman keyif aldığım, bu sürecin eğlenceli bir şekilde ilerlemesinde büyük katkıları olan çok kıymetli ekip arkadaşlarım Mert Can VARDAR ve Sude TANIK'a da sonsuz teşekkür ederim.

Akademik yolculuğum boyunca eş zamanlı olarak benzer süreçlerden geçtiğimiz, kıymetli dönem arkadaşım ve dostum Dr. Onur ULUAR'a; tezin redaksiyonunda sunduğu katkılarının yanı sıra, her zaman yanımda olduğu, zorlu dönemlerde gösterdiği sabır ve destek için teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, zorluklar karşısında ilerleyebilmemi sağlayan içsel motivasyonumu, psikolojik dayanıklılığımı ve optimist yapımı, sevgi ve güven içinde büyüdüğüm bir aile ortamına borçluyum. Beni bu duygularla büyüten, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen sevgili anneme ve babama fedakârlıklarıyla bana sundukları imkanlardan dolayı gönülden teşekkür ederim.

Bu çalışmada kullanılan aspir bitkisi tohumlarını sağlayan Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne (Eskişehir), bakteri tanımlamalarının yapıldığı Akdeniz Üniversitesi Hastanesi, Merkezi Laboratuvarı'na ve mineral madde analizlerinin yapıldığı Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi'ne teşekkür ederim.

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 222Z011 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir. Sağladığı mali katkı ve araştırma sürecine verdiği destek nedeniyle TÜBİTAK'a teşekkür ederim. Dahası TÜBİTAK nezdinde bu çalışmanın gerçekleşmesini mümkün kılan maddi destek, doğrudan Türkiye Cumhuriyeti vatandaşlarının vergileriyle sağlanmıştır. Bilime ve araştırmaya sundukları dolaylı katkı için tüm vergi mükelleflerine teşekkür ederim. Bu kaynağın bir sorumluluk bilinciyle kullanıldığını ve elde edilen her sonucun topluma fayda üretme amacı taşıdığını belirtmek isterim.

Bu tezi hazırladığım süreç boyunca dünyada pek çok olumsuz gelişme yaşandı. Savaşlar, küresel salgınlar, pandemi, ekonomik krizler ve belirsizlikler zaman zaman odağımı kaybetmeme ve çalışmalarına yoğunlaşmakta zorlanmama neden oldu. Ancak tüm bu zorluklara rağmen bilime duyduğum inanç, emeğin dönüştürücü gücü ve üretmenin verdiği mutlulukla yoluma devam ettim. Biliyorum ki bilim yalnızca merak ve bilgiyle değil; aynı zamanda sabır, emek ve dirençle de sürdürülen uzun soluklu bir yolculuk. Vergilius'un yüzyıllar öncesinden aktardığı sözü "*Labor omnia vincit - Emek her şeyin üstesinden gelir*" ile tezimi bilim yolunda sabırla ilerleyenlere ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	5
2.1. Kayaçtan Kirliliğe: Ağır Metaller ve Antropojenik Deşarjları.....	5
2.2. Ağır Metal Kirliliğiyle Mücadelede Bitki-Bakteri İş birliği: Fitoremediasyon ve PGPB ile Desteklenmesi	8
2.2.1. Fitoremediasyon performansını artıran PGPB mekanizmaları	11
2.3. Ağır Metallerin Bitkilere Alımı ve Taşınımı	14
2.4. Bir Ağır Metal Olan Nikelin Fitotoksitesitesi	16
2.5. Sinyalizasyon.....	22
2.6. Ağır Metal Stresine Karşı Tolerans Mekanizmaları.....	23
2.6.1. Fitoşelatinler (PC)	24
2.6.2. Metallotiyoneinler (MT)	25
2.6.3. Antioksidan savunma sistemi.....	26
2.6.4. Sekonder metabolitlerin metal toleransındaki rolü: Antosiyanin ve flavonoidler	32
2.6.5. Ağır metal toleransında sessiz kalkan: hücre duvarı.....	33
2.6.6. Organik asitler	35
2.7. Konaktan Hedef Bitkiye: Hiperakümülatör Mikrobiyotasındaki PGPB ile Tarımsal Aspir Bitkisinde Fitoremediasyon Eksenli Kapasite Artışı.....	35

3. MATERİYAL VE METOT	38
3.1. Aşama I: PGPB Kültürasyonu	38
3.1.1. Hiperakümülatör bitkinin toplanması.....	38
3.1.2. Hiperakümülatör bitkiden bakteri izolasyonu	38
3.1.3. Bakteri izolatlarının PGPB niteliklerinin belirlenmesi	39
3.1.4. Bakteri izolatlarının karakterizasyonu	40
3.2. Aşama II: Aspir ile Uyumlu Bakteri Taraması.....	43
3.2.1. Bitki yetiştirme ve bakteri inokülasyonu yöntemi	43
3.2.2. PGPB suşlarının aspir bitkisinde biyokütle üretimine etkisinin belirlenmesi	44
3.2.3. PGPB suşlarının aspir bitkisinde fotosentetik pigment miktarına etkisinin belirlenmesi	44
3.2.4. PGPB suşlarının aspir bitkisinde klorofil a floresansına etkisinin belirlenmesi	44
3.2.5. PGPB suşlarının aspir bitkisinde mineral madde akümülyasyonuna etkisinin belirlenmesi	44
3.3. Aşama III: PGPS Suşlarının Aspir Bitkisinin Nikel Stresine Verdiği Fizyolojik ve Biyokimyasal Yanıtlar Üzerine Etkisi.....	45
3.3.1. Bitki yetiştirme ve bakteri inokülasyonu yöntemi	45
3.3.2. Nikel konsantrasyonunun belirlenmesi	45
3.3.3. Morfolojik ölçümler	46
3.3.4. Fizyolojik ve biyokimyasal ölçümler.....	46
3.3.5. Bakteri kolonizasyonunun kanıtlanması	48
3.3.6. İstatistiksel Analizler.....	49
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	50
4.1. Aşama I: Mikrobiyolojik İşlemler	50
4.1.1. Hiperakümülatör bitkiden bakteri izolasyonu ve karakterizasyonu ...	50
4.1.2. İzole edilen bakterilerin PGPB testleri.....	51

4.1.3. Aşama II için bakteri seçimi.....	52
4.2. Aşama II: Aspir ile Uyumlu Bakteri Taraması.....	54
4.2.1. PGPB'nin aspir bitkisinde mikro ve makro besin alımına etkisi	55
4.2.2. PGPB'nin aspir bitkisinin biyokütle üretimine etkisi	60
4.2.3. İnoküle edilen bakterilerin aspir bitkisinin fotosentetik pigment miktarına etkisi.....	62
4.2.4. İnoküle edilen bakterilerin aspir bitkisinin klorofil a floresansı üzerine etkisi	63
4.2.5. Aşama III için uygun bakterilerin seçimi.....	66
4.3. Aşama III: PGPS'nin Aspir Bitkisinde Nikel Akümülayonuna, Toleransına ve Büyüme Parametrelerine Etkisi	67
4.3.1. Mineral madde ölçümü.....	67
4.3.2. Morfolojik ölçümler	68
4.3.3. Fizyolojik ve biyokimyasal ölçümler	70
4.4. Bakteri kolonizasyonunun kanıtlanması	88
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	89
6. KAYNAKLAR	92
7. EKLER.....	111
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora tezi olarak sunduğum “**Hiperakümülatör *Centaurea ensiformis* P.H. Davis Bitkisinden İzole Edilen Bakterilerle Aspir Bitkisinin Nikel Toleransının ve Fitoremediasyon Kapasitesinin Arttırılması**” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

__/__/__

Uğurcan BARAN

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

±	: Artı eksi
%	: Yüzde
μM	: Mikromolar
μmol	: Mikromol
cm	: Santimetre
dak	: Dakika
g	: Gram
kg	: Kilogram
L	: Litre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
mol	: Mol
°C	: Santigrat derece
ppm	: Milyonda bir birim
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
s	: Saniye
sa	: Saat
kDA	: Kilodalton

Tezde ondalık ayıraç olarak nokta (.) kullanılmıştır.

Kısaltmalar

ABA	: Absisik asit
ABC	: ATP bağlayıcı kaset
ABS/RC	: Aktif reaksiyon merkezinin verimli anten büyüklüğü
ACC	: 1-aminosiklopropan-1-karboksilat
ANOVA	: Varyans analizi (Analyses of variance)
AÖF	: Anlamlı önemli fark
APR	: Adenosin 5'-fosfosülfat redüktaz
APX	: Askorbat peroksidaz
AsA	: Askorbat
ATP	: Adenozin trifosfat
BSA	: Sığır serum albümini (Bovine serum albumin)
C	: Karbon
Ca	: Kalsiyum
CaM	: Kalmodulin
CAT	: Katalaz
CBL	: Kalsinörin B-benzeri proteinler
Cd	: Kadmiyum
CDF	: Katyon difüzyon kolaylaştırıcıları
CDPK	: Kalsiyum bağımlı protein kinazlar
Co	: Kobalt
CO ₂	: Karbondioksit
Cr	: Krom
Cu	: Bakır
dH ₂ O	: Distile su
DI ₀ /RC	: Bir aktif reaksiyon merkezinin enerji dağılımı

EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
ET ₀ /RC	: Reaksiyon merkezi başına elektron transportu
ETS	: Elektron taşıma sistemi
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
Fe	: Demir
FM	: Karanlığa adapte olmuş yapraklardaki maksimum fluoresans
FV	: Karanlığa adapte olmuş yapraklardaki değişken fluoresans
FV/FM (φPo)	: PSII'nin potansiyel fotokimyasal etkinliği
GPOX	: Guaikol peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
GSSG	: Yükseltgenmiş glutasyon
H ₂ O	: Su
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HA	: Hidrate ağırlık
HCl	: Hidroklorik asit
HCO ₃ ⁻	: Bikarbonat
HMA	: Ağır metal ATPazları
HO ₂ ⁻	: Hidroperoksil
IAA	: İndol asetik asit
IAM	: İndol asetamid
IAN	: İndol-3-asetonitril
IPA	: İndol-3-piruvat
ISR	: İndüklenmiş sistemik direnç
JA	: Jasmonat
K	: Potasyum

KA	: Kuru ağırlık
MAC	: Metal-koordineli antosiyanin kompleksi
MAPK	: Mitojene bağlı protein kinaz
MDA	: Malondialdehit
Mg	: Magnezyum
Mn	: Mangan
MT	: Metalloitiyonein
mtETS	: Mitokondriyal elektron taşıma sistemi
N	: Azot
Na	: Sodyum
Na ₂ EDTA	: Di sodyum etilendiamin tetraasetik asit
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NBT	: Nitrobluetetrazolyum
NH ₄	: Amonyum
Ni	: Nikel
NO ₃ ⁻	: Nitrat
NRAMP	: Doğal Dirençle İlişkili Makrofaj Proteini
¹ O ₂	: Singlet oksijen
O ₂ ⁻	: Süperoksit
OH ⁻	: Hidroksil
P	: Fosfor
Pb	: Kurşun
PC	: Fitoşelatin
PCS	: Fitoşelatin sentaz
PGPB	: Bitki büyümesini teşvik eden bakteriler
PGPS	: Bitki büyümesini teşvik eden <i>Streptomyces</i> 'ler

PI _{TOT}	: Toplam performans indeksi
POD	: Peroksidaz, guaikol peroksidaz
POX	: Peroksidaz
PSI	: Fotosistem I
PSII	: Fotosistem II
PSM	: Bitki sekonder metabolitleri
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RT-qPCR	: Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RWC	: Oransal su içeriği
S	: Kükürt
SAR	: Sistemik kazanılmış direnç
SOD	: Süperoksit dismutaz
UV	: Ultraviyole
YA	: Yaş ağırlık
ZIP	: Çinko-Demir Permeaz
Zn	: Çinko

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. 2010-2022 yılları arasında Ni madenciliği ile yapılan üretimin seyri (Dilshara vd. 2024'ten değiştirilerek kullanılmıştır.).....	5
Şekil 2.2. 2040 yılına kadar tahmin edilen Ni talebi (Dilshara vd. 2024'ten değiştirilerek kullanılmıştır.).....	6
Şekil 2.3. Serpantin alanların dağılımı (Dilshara vd. 2024'ten değiştirilerek kullanılmıştır.).....	7
Şekil 2.4. Ağır metallerle kirlenmiş toprakların fitoremediasyonu için bitkiler tarafından uygulanan stratejiler (Görsel yapay zeka ile hazırlanmış, Panda vd. 2025'ten değiştirilerek kullanılmıştır.).....	9
Şekil 2.5. Bitki büyümesinin teşvik edilmesinde ve metal fitoremediasyonunda bakterilerin rolü (Alves vd. 2022'den değiştirilerek kullanılmıştır.)	11
Şekil 2.6. Bitkilerde metal alım ve taşınım mekanizmalarında rol alan taşıyıcılar (Anas vd. 2025)	15
Şekil 2.7. Bitkilerde Ni toksisitesinin meydana getirdiği değişimler (Görsel yapay zeka ile hazırlanmış, Mustafa vd. 2023'ten değiştirilerek kullanılmıştır.).....	21
Şekil 2.8. Bitkilerde ağır metal stresine karşı sinyal yollarının etkileşimi (Jalmi vd. 2018'ten değiştirilerek kullanılmıştır.).....	23
Şekil 2.9. Bitkilerde oluşan reaktif oksijen türevleri ve bunların detoksifikasyonunda görev alan bazı antioksidan enzimlerin katalizlediği temel reaksiyonlar (Rajput vd. 2021'den değiştirilerek kullanılmıştır.).....	27
Şekil 2.10. <i>Arabidopsis</i> bitkisinde glutatyon redüktaz (GR) aktivitesindeki değişimin sülfür asimilasyon yoluna etkisi. Kırmızı artmış, mavi ise azalmış metabolit düzeylerini; kırmızı ve mavi oklar ise gen ekspresyon düzeylerindeki artış ve azalışları göstermektedir (Cohen vd. 2020'den değiştirilerek kullanılmıştır.).....	30
Şekil 2.11. ROS tarafından melatonin sentezinden sorumlu MeASMT2 ve MeTDC2 enzimleri ile askorbat peroksidaz (MeAPX2) geninin ekspresyonunun artırılması; bitkinin oksidatif strese karşı toleransında protein-protein etkileşimlerinin stres yanıtındaki rolü (Bai vd. 2020)	32
Şekil 2. 12. Hücre duvarının metal toleransındaki rolü (Parrotta vd. 2015'ten değiştirilerek kullanılmıştır.).....	34
Şekil 2.13. Tez çalışmasının deneysel akış planı (biorender.com ile hazırlanmıştır.)....	37
Şekil 3.1. Hiperakümülatör <i>C. ensiformis</i> bitkisinin serpantin topraklarda bulunduğu durumu (A, B) ve herbaryum materyali halini (C) gösteren fotoğraflar.....	38
Şekil 3.2. Deneme deseni (biorender.com ile hazırlanmıştır.).....	43

Şekil 4.1. <i>C. ensiformis</i> bitkisinden izole edilen bakterilerin cins düzeyinde yüzdelik dağılımı	51
Şekil 4.2. Bakteri izolatlarının PGP test sonuçları grafiği (taralı çubuklar aşama II için seçilmiş olan bakteri suşlarına aittir).....	53
Şekil 4.3. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPB uygulanan gruplarda mikro besin akümülyasyonu. Bu ve tezin devamındaki diğer grafiklerde çubukların üzerindeki farklı harfler, uygulamalar arasındaki istatistiksel farkın anlamlı olduğunu ($p \leq 0.05$) göstermektedir	57
Şekil 4.4. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPB uygulanan gruplarda makro besin akümülyasyonu.....	58
Şekil 4.5. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPB uygulanan gruplarda kök (a) ve sürgün (b) yaş ağırlıkları .	60
Şekil 4.6. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPB uygulanan gruplarda kök (a) ve sürgün (b) kuru ağırlıkları	61
Şekil 4.7. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPB uygulanan gruplarda kök (a) ve sürgün (b) boy uzunlukları	61
Şekil 4.8. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPB uygulanan gruplarda fotosentetik pigment miktarları [klorofil a (a), klorofil b (b), toplam klorofil (c) ve karotenoid (d)]	62
Şekil 4.9. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPB uygulanan gruplarda fotokimyasal değişimler [kuantum verimi (a), fotokimya dışı kaybedilen enerji (b), absorbe edilen enerji (c), yakalanan enerji (d), elektron taşıma zincirine aktarılan enerji (e), PSI'e elektron iletim verimliliği (f)].....	64
Şekil 4.10. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPB uygulanan gruplardaki fotosentetik performans indeksleri [PI_{ABS} (a) ve PI_{TOT} (b)]	65
Şekil 4.11. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPS uygulanan grupların Ni akümülyasyon sonuçları.....	67
Şekil 4.12. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPS uygulanan grupların hasat günü genel görünümü	68
Şekil 4.13. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPS uygulanan grupların sürgün (a) ve kök (b) boy uzunlukları	69

Şekil 4.14. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPS uygulanan grupların yaş (a, b) ve kuru (c, d) biyokütle üretimi	70
Şekil 4.15. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPS uygulanan grupların iyon sızıntısı oranı	71
Şekil 4.16. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPS uygulanan grupların oransal su içeriği	73
Şekil 4.17. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPS uygulanan grupların fotosentetik pigment miktarı [klorofil <i>a</i> (a) , klorofil <i>b</i> (b) , toplam klorofil (c) ve karotenoid (d)].....	74
Şekil 4.18. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPS uygulanan grupların spesifik enerji akışları ve diğer bazı JIP test parametreleri.....	75
Şekil 4.19. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPS uygulanan grupların fotosentetik performans indeksleri [PI _{ABS} (a) ve PI _{TOT} (b)]	77
Şekil 4.20. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPS uygulanan grupların antosiyanin (a) ve flavonoid (b) içeriği	83
Şekil 4.21. Sp (a) ve Sg (b) inoküle edilen bitkilerden geri izole edilen bakterilerin SCA besiyerindeki morfolojileri	88
Şekil 4.22. Aspir bitkisinden geri izole edilen bakterilerin ISP agarda büyümeleri [ana stok (a) ve 10 ⁻³ seyreltmeden (b) gerçekleştirilen ekimler] ve koloni morfolojileri (c) (B1: Sp; B2: Sg).....	88
Şekil 4.23. Aspir bitkisinden geri izole edilen Sp (a, b) ve Sg (c) kolonilerinin mikroskop görüntüleri	88

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. 16S rRNA gen gölgesi için tasarlanan primerler	42
Çizelge 3.2. PCR Reaksiyonu karışımlarının hazırlanması	42
Çizelge 3.3. PCR Koşulları	42
Çizelge 4.1. <i>C.ensiformis</i> bitkisinden izole edilen endofitik bakterilerin moleküler tanımlamaları.....	50
Çizelge 4.2. <i>C.ensiformis</i> bitkisinden izole edilen suşların PGPB test sonuçları (+ PGPB aktivitesinin varlığını,- simgesi ise yokluğunu göstermektedir. Veriler üç tekrarın ortalama $\pm$ standart sapması olarak ifade edilmiştir	52
Çizelge 4.3. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPB uygulanan gruplarda Translokasyon Faktörü (TF), Biyoakümülyasyon Faktörü (BF) ve Biyokonsantrasyon Faktörü (BCF)	59
Çizelge 4.4. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPS uygulanan grupların H ₂ O ₂ miktarı ve antioksidan enzim aktiviteleri. Çizelgede verilen değerler ortalama ve standart hatalarını ($\pm$ STH) göstermekte olup farklı harfler, uygulamalar arasındaki farkın anlamlı olduğunu ($p \leq 0.05$) göstermektedir	87
Çizelge 7.1. JIP-testte kullanılan bazı terimlerin, tanımlamaların ve formüllerin özeti (Strasser vd. 2000; 2004; Tsimilli-Michael vd. 2008; Stirbet vd. 2018)	111

1. GİRİŞ

Ağır metal kirliliği son dönemlerde giderek artan şiddette dünyanın her bölgesinde önemli bir sorun haline gelmektedir (Qin vd. 2021). Ağır metallerin biyolojik olarak parçalanamaması ve yüksek kararlı yapıları sebebiyle tarım alanlarında birikimi söz konusudur. Bu birikime özellikle istikrarlı bir şekilde aşırı gübreleme ve herbisit-insektisit kullanımı neden olmaktadır. Tarımsal üretimde ağır metal konsantrasyonunun yükselmesi, besin güvenliğinde ve buna bağlı olarak da insan sağlığı açısından endişe vericidir. Ağır metaller ile doğrudan ilişkilendirilen başta kanser, demans, Alzheimer, Parkinson ve çeşitli kalp damar sorunları gibi birçok hastalık bilinmektedir (Rizwan vd. 2024). Yalnızca insanlarda değil, yabani hayvanlar ve çiftlik hayvanlarında da su, yem ve toprak yoluyla ağır metal zehirlenmesi veya toksisitesi yaşanabilir ve benzer nörolojik bozukluklar ile iç organ fonksiyonlarında bozulmalar meydana gelebilir. Bu nedenle özellikle tarımsal alanların ve bu alanlarda yetiştirilip gıda olarak tüketime sunulan tarımsal bitkilerin ağır metal kontaminasyonuna maruz kalması oldukça tehlikeli bir durumdur (Mao vd. 2025). İlaveten bu topraklarda yükselen ağır metal konsantrasyonu, yetiştirilen bitkilerde, bitki türüne göre değişen düzeylerde strese sebep olarak, düşük verim baskısına neden olabilmektedir. Bunun sonucunda da kaybedilen mahsul, verilen emek ve sermaye kaybı ile birleşince olumsuz bir ekonomik yansıması olmaktadır. Bu durumlar ile mücadele etmek için 11. Kalkınma Planı hedefleri ve politikaları çerçevesinde 405. madde ile ilişkili olarak, ağır metal kirliliği sebebiyle de düşük verim baskısı altındaki, atıl durumda bulunan tarımsal arazilerin ve seraların rehabilite edilmesi ve üretime döndürülmesi amaçlanmıştır. Ağır metal içeriği yüksek tarımsal alanlarda, etkin tarımsal faaliyette bulunabilmek için aynı anda yürütülebilen iki strateji mevcuttur. Birincisi, kontaminasyonu gidererek tarımsal toprağı rehabilite etmektir. İkincisi ise ağır metal toleransı yüksek bitkiler geliştirerek/kullanarak mevcut tarımsal alanlarda daha fazla verim elde etmektir. Tarımsal alandaki ağır metal konsantrasyonunu düşürerek ve/veya buradaki ağır metalleri inaktif formlara çevirip ekosistem için zararsız bir hale dönüştürerek toprağı rehabilite etmek için çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik teknikler bulunmaktadır. Diğer yöntemlerden, düşük maliyetli olması ve doğaya yan etkisinin bulunmaması yönleriyle ayrılan biyolojik remediasyon teknikleri, mikrobiyal canlılarla yapılabildiği gibi bitkilerle de yapılmaktadır. Bitkilerin kullanılması ile kirlenmiş arazilerin temizlenmesi/iyileştirilmesi işlemi ise fitoremediasyon ismini almaktadır. Fitoremediasyonun etkin bir biçimde yapılabilmesi için bitki seçimi önem arz etmektedir. Bu teknikte kullanılacak olan bitkinin öncelikle uygulanacak olan alandaki ağır metal konsantrasyonu altında büyüyüp gelişebiliyor olması gerekmektedir. Dolayısıyla ağır metal toleransı yüksek olan bitkiler için bu teknik öne çıkmaktadır. Dahası, aday bitkilerin topraktan ağır metalleri kendi bünyelerine alabiliyor, toprak üstü organlarına taşıyabiliyor, etkisizleştirerek depolayabiliyor veya rizosferlerinde ve köklerinde immobilize edebiliyor olmaları gerekmektedir. Fitoremediasyon özellikle Ni ile kirlenmiş alanlar için kullanılmaktadır, çünkü Türkiye de dahil olmak üzere birçok ülkede ultramafik topraklar olarak bilinen Ni açısından zengin geniş alanlar bulunmaktadır. Tanımlanmış 721 hiperakümülatör bitki türü arasında 532'si Ni hiperakümülatörü olarak kaydedilmiştir. Bunlardan 43'ü endemiktir ve 62 tür Türkiye'de bulunmaktadır (Çelik vd. 2018; Domka vd. 2020; Hazotte vd. 2020; Aksoy 2021; Revees vd. 2021; Soleymanifar vd 2024).

Hiperakümülatör türler doğal olarak ağır metal içeriği yüksek olan alanlardan olan serpantin topraklar ile yakından ilişkilidir. Genellikle ultramafik kayaçların (özellikle

serpantinit, peridotit ve harzburjit) ayrışması sonucu oluşan, kimyasal olarak alışılmadık ve ekstrem özellikler gösteren bu topraklarda nikel (Ni), krom (Cr) ve kobalt (Co) gibi metal içerikleri yüksek iken azot (N), fosfor (P) ve potasyum (K) gibi besin maddeleri oldukça düşük seviyededir. Yeryüzünde yamalı bir dağılımı olan bu alanlar, parçalı ve lokalizedir (dağ sıraları veya kıyı zonları gibi). Böylece, edafik özellikleri sayesinde çevresindeki habitatlardan ayrılarak ekolojik olarak izole bir yapı kazanır; adeta görünmez bir ada gibi davranır ve bu özgün koşullara uyum sağlamış türlere ev sahipliği yaparken onların diğer bölgelerden izole olmasını sağlayarak popülasyonların genetik alışverişini engeller ve yeni türlerin oluşumu ile endemizmi besler. Yaşam, yeryüzünün her alanını kapladığı gibi, bu bölgelerde de kendisine uygun yollar bulmuştur. Bazı özel bitkiler, metallofit veya hiperakümülatör türler, bu topraklarda yaşamayı başarmış ve bu ortamlara adapte olmuşlardır. Bu adaptasyonlar için farklı stratejilere sahip olsalar da, fitoremediasyon çalışmaları için dikkat çekici olan, hiperakümülatör bitkilerin durumudur. Hiperakümülatör bitkiler, bulundukları ortamda bulunan ağır metalleri normal bitkilere kıyasla olağanüstü yüksek oranlarda kök, gövde ve yaprak gibi dokularında biriktirebilen bitkilerdir. Hiperakümülatör eşiği bitki ve metalin cinsine göre değişmekle birlikte (örneğin Ni için >1000 ppm) normal bitkilerdeki metal birikiminin binlerce katı olabilir. Bu bitkiler kökleri ile aldıkları ağır metalleri ksilem aracılığı ile toprak üstü organlarına taşır ve yaprak vakuollerinde farklı ligandlar ile etkisiz hale getirir ve detoksifiye eder. Böylece hem yüksek ağır metal içeriğine sahip olur hem de bu ağır metalin toksisitesinden diğer bitkiler gibi etkilenmezler.

Serpantin gibi doğal olarak ağır metaller açısından zengin olan topraklarda Ni konsantrasyonu yüksek olmasına rağmen, katı mineral fazlarına bağlı oldukları için immobildir ve toksisiteleri görece düşüktür. Aksine, antropojenik faaliyetlerle kirlenmiş topraklardaki Ni ise hareketli, reaktif formlarda ve bitkiler için yüksek toksik etkiler gösterebilecek durumdadır (Rizwan vd. 2024). İnsan aktivitesi sonucunda doğaya deşarj edilen Ni'nin büyük bir kısmı; metal üretim atıkları, endüstriyel atıklar, atmosferik birikim, kanalizasyon çamuru, kömür uçucu külü, kömür dip külü, petrol rafinasyonu, tarımsal kimyasallar, çelik sanayi, madencilik ve eritme süreçleri gibi faaliyetlerden kaynaklanmaktadır. Bu tarz faaliyetler sonucunda Ni konsantrasyonunun artmasından dolayı endişe duyulan alanlardan en önemlisi tarım arazileridir. Tarımsal üretim yapılan toprakların Ni ile kirlenmesi ve bunun bitki sağlığı ürün verimi ve gıda güvenliği üzerindeki olası tehditleri, giderek artan bir endişe kaynağıdır. Tarım topraklarında Ni kirliliği, esas olarak Ni içeren pestisitlerin, fungusitlerin, herbisitlerin ve gübrelerin aşırı ve uzun dönemli düzenli kullanımından kaynaklanmaktadır. Bu sorun, asit yağmurları ile asidik hale gelen topraklarda nikelin mobilitesinin ve biyoyararlanımının artmasıyla daha da kötüleşmektedir (Palansooriya vd. 2020). Aşırı Ni konsantrasyonu, bitkilerde doğrudan veya dolaylı olarak birçok hasar verebilir. Bitkilerin klorofil pigmentlerini azaltabilir, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu tetikleyebilir, lipid peroksidasyonuna neden olabilir, fizyolojik işlevleri bozabilir, enzim aktivitelerini değiştirebilir ve fotosentetik protein kompleksleri ile kloroplast zar yapılarını bozarak fotosentez etkinliğini zayıflatabilir ve sonuçta daha düşük biyokütle ve ürün verimine yol açabilir (Sachan ve Lal 2017; Batool, 2018; Shafiq vd. 2024). İlâveten, Ni'e uzun süre maruz kalmak, tarım topraklarındaki mikrobiyal popülasyonların çeşitliliğinde de değişikliklere yol açtığı bilinmektedir (Li vd. 2015). Dahası, Ni'in denitrifikasyon, azot fiksasyonu ve metanogenesis gibi temel toprak mikrobiyal süreçlerini olumsuz etkilediği bilinmektedir (Plekhanova vd. 2017; Rizwan vd. 2024). Böylece, toprağın mikrobiyal

sağlığı ve biyokimyasal döngüleri bozulmakta, bu da toprak verimsizliğine ve bu topraklarda yetiştirilen bitkilerin büyüme ve gelişmelerinin sınırlanmasına neden olmaktadır. Öte yandan, çalışmalar PGPB'nin bitkilerde oksidatif stresi azaltabileceğini, klorofil sentezini artırabileceğini ve bitkinin Ni kirliliğine adaptasyonunu artırabileceğini göstermektedir (Ren vd. 2019). PGPB, ayrıca N, P ve K gibi temel besin elementlerinin alımını artırabilir, indol asetik asit (IAA) gibi bitki hormonlarını salgılayabilir veya endojen absisik asit düzeylerini azaltabilir, ayrıca metallotiyoneinler (MT) ve fitoşelatinler (PC) gibi şelatlayıcı protein genlerinin ve/veya metal taşıyıcılarının [HMA, YLS, CE, ZIP] ekspresyonunu artırabilir (Poria vd. 2022). Sonuç olarak, bu durum, kök uzamasına, hücre bölünmesinde artışa ve stomaların açılmasına neden olarak besin alımını artırabilir ve Ni stresi altında yetiştirilen bitkilerin büyümesini teşvik edebilir. Ayrıca, PGPB stresle ilişkili genlerin ekspresyonunu artırarak ve süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD), askorbat peroksidaz (APX) gibi enzimatik ve glutatyon, flavonoidler, askorbat gibi enzimatik olmayan antioksidan savunma mekanizmalarını aktive ederek bitkilerin stres direncini de artırabilir. Böylece, fotosentez için hayati olan fotosentetik pigmentler ve tilakoid zarlar, Nikelin zararlı etkilerinden korunarak fotosentetik verimlilik ve biyokütle üretimi artırılabilir. Bu gibi niteliklerinden dolayı, PGPB uygulamaları etkili bir fitoremediasyon için oldukça önemli olup, Ni ile kirlenmiş toprakların fitoremediasyonunda kullanılan bitkilerin performansını artırmak için kullanılabilir (Poria vd. 2022). İlk bakışta fitoremediasyon çalışmaları için hiperakümülatör bitki türleri, ideal bitkiler gibi görünse de, genellikle bu bitkilerin ekstrem seviyede düşük biyokütleli ve yavaş bir büyümeye sahip olmalarından dolayı fitoremediasyon çalışmasının uygulama süresini çok uzatacağı için son dönemlerde yüksek ve hızlı biyokütle üretimine sahip, metal tolerant ve akümülatör bitkiler öne çıkmaktadır. Özellikle bu bitkiler arasından tarımsal olanları, fitoremediasyon çalışmaları yürütülürken yan çıktı olarak da ürün eldesi vadettiği için, sürecin maliyet/fayda açısından avantajını artırmaktadır. Bu tez kapsamında, ağır metaller ile kirlenmiş topraklarda fitoremediasyon için gerekli potansiyele sahip bir bitki olduğu bildirilen aspir bitkisi (*Carthamus tinctorius* L.) (Madaan vd. 2011) ile çalışılmıştır. Ülkemizde tarımsal üretimi yapılan yüksek biyokütleli, 110-140 gün arasında kısa bir gelişim süresi olan, yağlı tohumlu bir multi biyo-enerji (etanol, biyogaz, biyodizel) bitkisi olmasının yanı sıra kuraklık, tuz ve Ni tolerans kapasitesinin de yüksek olmasıyla gıda, kozmetik, boya gibi pek çok endüstride de yararlanılmaktadır (Al Chami vd. 2015; Adalı 2016; Pourghasemian vd. 2019; Hashemi vd. 2020; Çulha-Erdal vd. 2021; Baran ve Ekmekçi 2022). Baran ve Ekmekçi (2022) yaptıkları çalışmada, aspir bitkisinin 1 mM Ni konsantrasyonuna kadar dirençli olduğunu ancak bu konsantrasyonlarda biyokütle üretiminde dramatik düşüşler meydana geldiğini bildirmiştir. Bu tez kapsamında aspir bitkisinin Ni toleransının ve fitoremediasyon kapasitesinin PGPB uygulamaları ile artırılması amaçlanmıştır. Bu noktada seçilecek olan PGPB'nin nitelikleri ve aspir ile uyumlu olup olmayacağı önemli bir konu olarak ele alınmıştır. Şimdiye kadar yapılan araştırmalarda steril bitki bulunamamış ve çalışılan tüm bitkilerde endofitik bakterilerin yer aldığı bildirilmiştir (Afzal vd. 2019). Fakat serpantin topraklarda yayılış gösteren hiperakümülatör bitkilerden izole edilen endofitik bakteri suşlarının, evrimsel süreçte hem yüksek metal konsantrasyonuna adapte olması, hem de metal akümüle eden bitkilerle birliktelik kurması nedeniyle fitoremediasyon çalışmaları için en iyi PGPB alternatifi olduğu bildirilmektedir (Barzanti vd. 2007). Bunun yanı sıra, endofitik bakterilerin yalnızca kendi konakları veya ekotipleri üzerinde teşvik edici özelliklerini gösterdiklerini bildiren çalışmalar olmasına rağmen (Li vd 2025), kendi konağı dışında yakın akraba

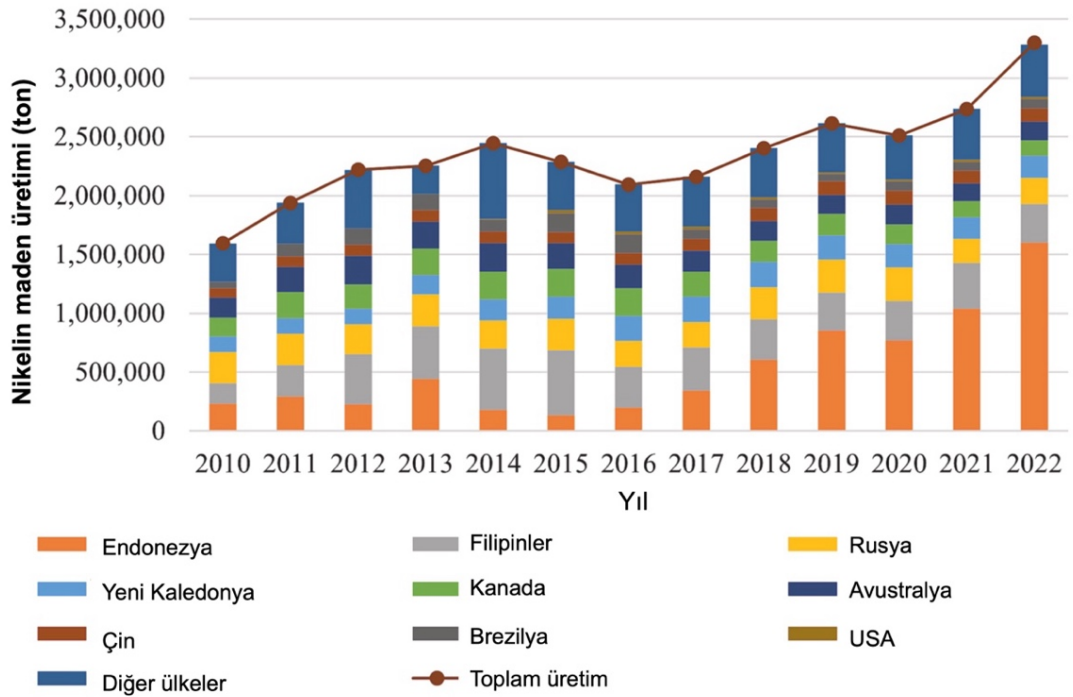
türlerde de etkili olduğu (Long vd. 2008) veya farklı bitkilerde de (Sessitsch vd. 2005; Ma vd. 2011) etkili olduğu bildirilmiştir. Dolayısıyla konak tercihinin oldukça geniş olduğu bilinmektedir (Afzal vd. 2019). Asteraceae familyasından *Centaurea ensiformis* P.H. Davis (Ece sarıbaşı) Türkiye’de Sandras Dağı’nda yayılış gösteren endemik bir Ni hiperakümülatörüdür (Revees ve Adıgüzel 2004). Alternatifleri arasında oldukça fazla miktarda Ni akümüle etme kapasitesi ve aspir bitkisine benzerlikleri sebebiyle bu tez kapsamında PGPB izolasyonunun gerçekleştirileceği yabancı hiperakümülatör bitki olarak seçilmiştir. Bu bağlamda, *C. ensiformis* bitkisinin bakteriyel kompozisyonuna dair bir çalışmanın ilk kez bu tez kapsamında yapılmasının yanı sıra, aspir bitkisinde Ni toksisitesi ve PGPB uygulamaları ile tolerans mekanizması arasındaki ilişkinin fizyolojik ve biyokimyasal temellerinin ilk defa bu kapsamda ortaya konulacak olması tezin özgün değerini oluşturmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında, aspir bitkisinin Ni toleransının ve fitoremediasyon kapasitesinin artırılması için *C. ensiformis*’ten izole edilen PGPB’lerden yararlanılmış ve meydana gelen değişimler morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal analizler ile ortaya konulmuştur. Bunun için izolatların Ni toleransı ve PGPB nitelikleri belirlenmiş ve önce en yüksek değerlere sahip olan 5 farklı tür seçilerek aspir bitkisine inoküle edilmiş ve bir tarama yapılmıştır. Bu aşamada seçilen 5 farklı bakteri türü arasından, tez amacına yönelik olarak aspir ile uyumu en iyi yüksek olan bakteri türü seçilmiş ve ileri ölçüm ve analizler yapılmıştır. Bu bağlamda yaş ve kuru biyokütle ölçümleri, boy uzunluğu ölçümleri, membran hasarı, su içeriği, pigment miktarları (klorofil, karotenoid, flavonoid ve antosiyanin), klorofil *a* floresansı, oksidan miktarı ve antioksidan enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Tezin kapsamının yanı sıra sınırlılıkları da bulunmaktadır ve en önemlisi de denemelerin kontrollü iklim odası koşullarında yürütülmüş olmasıdır. Bu durum, bilimsel düzlemde temel bir öngörü sunmasına rağmen, elde edilen bulguların farklı çevresel şartlara (farklı iklim ve toprak tipleri gibi) genellenebilirliğini kısıtlamaktadır. Dahası, kısa süreli çalışmalarda aklımasyon süresi, uzun vadeli etkileşimleri yansıtmayabilir. İlerleyen çalışmalarda bitkiler, tohum çimlenmesinden itibaren hasat gününe kadar strese maruz bırakılarak daha uzun süreli bir yetiştirme planı uygulanabilir. Ayrıca, kullanılan bakteriler doğada izole halde değil, mikrobiyal topluluklar içerisinde bulunur ve bu ortamlarda sinerjistik ve/veya antagonistik etkileşimler gösterebilirler. Dolayısıyla, tekil olarak uygulanan bir bakterinin çevresel koşullarda benzer etkiyi gösterip göstermeyeceği ve diğer mikroorganizmalarla olan rekabet gücü, genellenebilirlik açısından düşünülmelidir. Bu tezde kullanılan bakterilerin aspir bitkilerinde oluşturduğu moleküler düzeydeki etkiler (proteomik/transkriptomik yanıtlar gibi) analiz edilememiştir. Yapılacak ileri çalışmalar ile bakterilerin, bitkide meydana getirdiği değişimlerin moleküler düzeyde ayrıntılı şekilde ortaya konulması, bahsedilen tolerans mekanizmalarının aydınlatılmasında önemli katkılar sağlayacaktır.

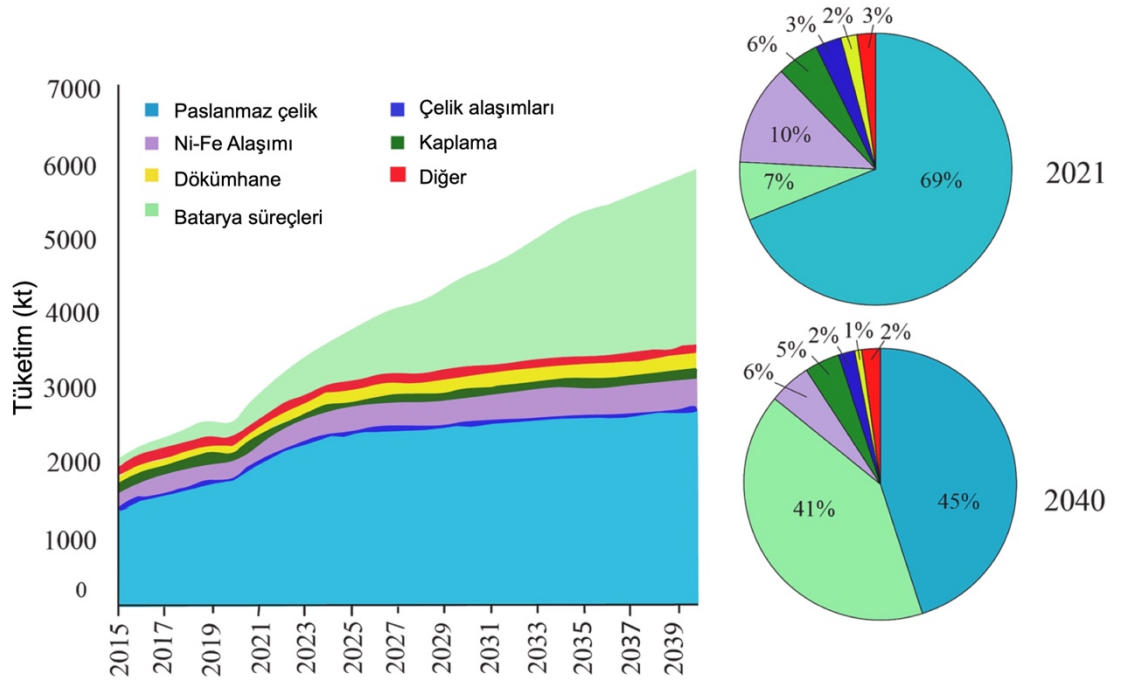
2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Kayaçtan Kirliliğe: Ağır Metaller ve Antropojenik Deşarjları

Sanayi Devrimi'nden bu yana, zararlı bileşiklerle toprakların kirlenmesi dramatik bir şekilde artmış ve günümüzde küresel bir sorun hâline gelmiştir. Dünyanın birçok bölgesi, çoğu zaman ağır metaller ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi bileşiklerin karışımıyla kirlenmekte ve bu durum toprak kirliliğine yol açmaktadır (Mustafa vd. 2023). Ni, hem doğal hem de insan kaynaklı faaliyetler sonucunda çevreye en sık salınan metallere aittir (Shahzad vd. 2018). Nikelin çevreye deşarjı, özellikle tarım topraklarında birikimi, büyük bir endişe kaynağı oluşturmaktadır. Son yıllarda Kuzey Amerika, Asya ve Avrupa dahil olmak üzere dünyanın birçok bölgesinde Ni kirliliği gözlemlenmektedir. Su kaynaklarında ve karasal ortamlarda Ni konsantrasyonlarının sırasıyla 0.2 mg L^{-1} ve 26 g kg^{-1} seviyelerine ulaştığı, bu değerlerin kirlenmemiş kaynaklardaki seviyelere göre yaklaşık 25 kat daha yüksek olduğu raporlanmıştır (Mustafa vd. 2023). Toprakta bulunan nikelin büyük bir kısmı, metal üretim atıkları, endüstriyel atıklar, atmosferik çökeltme, kanalizasyon çamurları, kömür uçucu külü, kömür alt külü, petrol rafinasyonu, tarımsal kimyasallar, madencilik ve ergitme işlemleri gibi insan faaliyetlerinden kaynaklanmaktadır. Bunun yanı sıra, son yıllarda ortaya çıkan ve kullanımı giderek yaygınlaşan temiz enerji teknolojilerinin gelişimiyle birlikte, özellikle elektrikli araçları çalıştırmak amacıyla daha büyük ve farklı türde lityum-iyon piller üretilmiştir. Bu lityum-iyon pillerin katotlarında da önemli bir bileşen olarak Ni yer almaktadır (Dilshara vd. 2024). Şekil 2.1'de 2010-2022 yılları arası Ni madenciliğinin üretim verileri verilmiştir. Üretiminin gün geçtikçe arttığı görülmektedir. Dahası dünyanın Ni talebinin de artarak devam edeceği öngörülmektedir (Şekil 2.2).



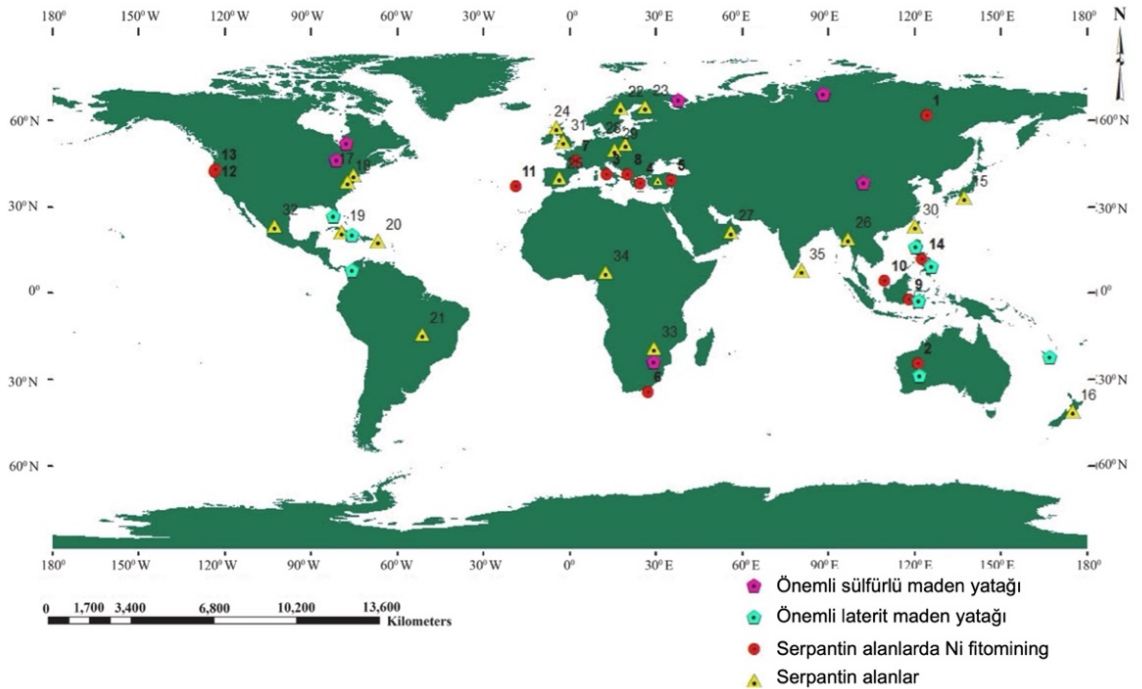
Şekil 2.1. 2010-2022 yılları arasında Ni madenciliği ile yapılan üretimin seyri (Dilshara vd. 2024'ten değiştirilerek kullanılmıştır.)



Şekil 2.2. 2040 yılına kadar tahmin edilen Ni talebi (Dilshara vd. 2024'ten değiştirilerek kullanılmıştır.)

Ni yoğunluğunun antropojenik faaliyetler nedeniyle bölgesel olarak en çok arttığı alanlardan biri tarım arazileridir. Tarım topraklarının Ni ile kirlenmesi ve bunun bitki sağlığı, gıda güvenliği ve gıda arzı üzerindeki olası tehditleri giderek artan bir problemdir. Tarım topraklarında görülen Ni kirliliği, esas olarak Ni bazlı pestisitlerin (thiram, ferbam, ziram ve sodyum dimetil ditiyokarbamat gibi), fungusitlerin, herbisitlerin ve gübrelerin aşırı kullanımı sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu sorun, asit yağmurları nedeniyle toprakta oluşan asidik koşullar altında Ni mobilitesinin artmasıyla daha da kötüleşmekte ve çevresel etkileri büyümektedir (Palansooriya vd. 2020). Çanakkale ilinde yapılan bir araştırmada, tarımsal topraklarda bulunan ağır metaller arasında en fazla miktarda nikelin bulunduğu, ayrıca potansiyel mobil fraksiyonları göz önüne alındığında nikelin en fazla indirgenabilir fraksiyonlar arasında olduğu belirlenmiştir (Özcan vd. 2022). Buna ek olarak, uzun süreli Ni birikimi, tarım topraklarındaki mikrobiyal toplulukların çeşitliliğinde de değişimlere yol açabilmektedir (Li vd. 2015). Ayrıca, nikelin denitrifikasyon, azot fiksasyonu ve metanogenesis gibi temel toprak mikrobiyal süreçlerini olumsuz etkilediği gösterilmiştir (Plekhanova vd. 2017; Rizwan vd. 2024). Bu durum, toprağın mikrobiyal sağlığını ve biyokimyasal döngülerini bozmakta, bunun sonucunda toprak verimliliği azalmakta ve bitki gelişimi kısıtlanmaktadır. Normalde, Ni konsantrasyonu toprakta 100 mg kg^{-1} , yüzey sularında ise 0.005 mg L^{-1} seviyesinin altındadır. Ancak kirlenmiş topraklarda ve yüzey sularında Ni konsantrasyonları sırasıyla 26 g kg^{-1} ve 0.2 mg L^{-1} 'ye kadar çıkabilmekte, bu da kirlenmemiş alanlara kıyasla 20–30 kat daha yüksek seviyede olduğu anlamına gelmektedir (Shahzad vd. 2018). Nikelin kontamine topraklardaki konsantrasyonu ayrıca toprak tipine bağlı olarak değişmektedir. Hafif kumlu topraklarda $7\text{--}33 \text{ mg kg}^{-1}$, orta derecede tınlı topraklarda $11\text{--}25 \text{ mg kg}^{-1}$, ağır tınlı topraklarda $23\text{--}50 \text{ mg kg}^{-1}$, kireçli topraklarda $18\text{--}92 \text{ mg kg}^{-1}$ ve organik topraklarda ise $4\text{--}12 \text{ mg kg}^{-1}$ arasındadır (Mustafa vd. 2023).

Antropojenik olarak Ni kirliliği olan alanlar olduğu gibi yeryüzünde doğal olarak da metal içeriği yüksek olan topraklar (serpantin gibi) bulunmaktadır. Küresel serpantinli alanlar, Akdeniz ve Avrasya bölgeleri ile Asya-Pasifik dahil olmak üzere kara yüzeyinin yaklaşık %1'ini kaplamaktadır. Şekil 2.3'te gösterildiği gibi serpantinli bölgelerin kapladığı alan küçük olmasına rağmen, tropikal (Brezilya, Malezya, Endonezya, Yeni Kaledonya ve Umman) ve ılıman iklim kuşaklarında (Avrupa, Kuzey Amerika, Türkiye ve Avustralya) yaygın bir dağılıma sahiptir (Dilshara vd. 2024). Ülkemizde 55 serpantin alan tanımlanmıştır (Aksoy 2021; Revees vd 2021). Serpantinit kayaçlar, çoğunlukla okyanusal litosferde ve dalma-batma zonlarındaki manto kayalarında oluşmuştur. Bu kayaçların oluşum süreci genellikle serpantinizasyon olarak adlandırılır ve düşük sıcaklıklı (300–600 °C) metamorfik değişim ve magmatik ya da metamorfik kayaçalarda suyla gerçekleşen değişim sonucu meydana gelir. Bu kimyasal süreç sırasında, başlıca magnezyum (Mg) veya demir (Fe) açısından zengin olivin $[(MgFe)_2SiO_4]$ ve piroksen $[(MgFe)_2Si_2O_6]$ veya $Ca(MgFe)Si_2O_6$ gibi mineraller; serpantin mineralleri (lizardit, antigorit ve krizotil), manyetit, karbonatit, talk ve brusit gibi ikincil minerallere dönüşerek yapısal, hidrolik, manyetik, mekanik ve sismik özelliklerinde değişime uğrarlar (Dilshara vd. 2024). Serpantinit kayaçlarındaki mafik mineraller, Mg ve Fe bakımından zengin olup ayrıca Ni, krom (Cr) ve kobalt (Co) gibi ekonomik açıdan değerli metallerin yüksek konsantrasyonlarını (serpantinli toprak ve kayalarda ortalama Ni konsantrasyonu sırasıyla 1700–10.000 mg/kg ve 1500–4000 mg/kg'dır) içerir (Vithanage vd. 2019; Dushyantha vd. 2021).



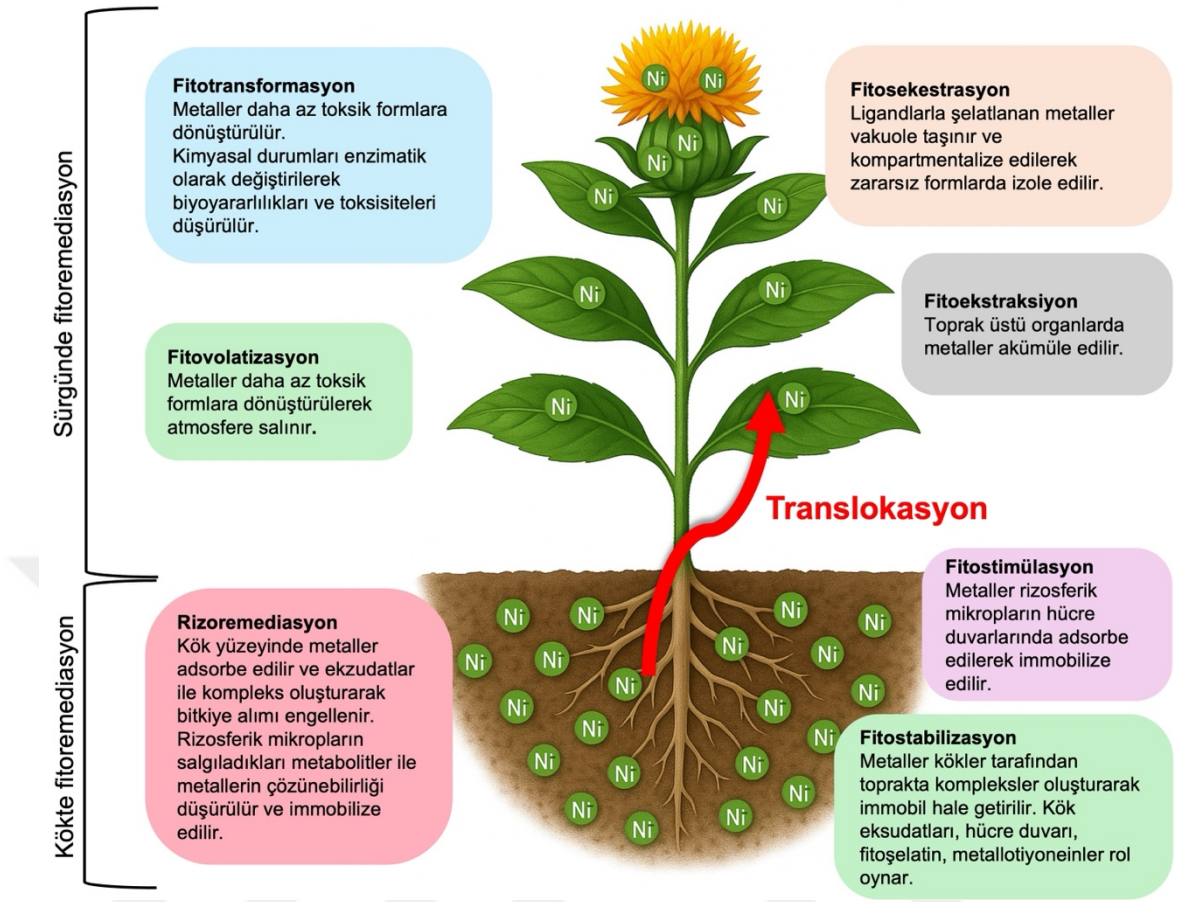
Şekil 2.3. Serpantin alanların dağılımı (Dilshara vd. 2024'ten değiştirilerek kullanılmıştır.)

Serpantinli alanlar ile düşük verim baskısı altındaki Ni ile kontamine olmuş tarımsal arazilerden faydalanmak mümkündür. Bu amaçla kullanılabilecek etkili yaklaşımlardan birisi bitki temelli madencilik yöntemi olan fitomadenciliktir

(fitomining). Fitomadencilikte gerçekleştirilen başarılı saha uygulamaları, serpantinli topraklardan Ni geri kazanımının ekonomik potansiyelini ortaya koymuştur. Bu yöntemle yaklaşık %99 saflıkta amonyum nikel sülfat hekzahidrat $[(NH_4)_2Ni(SO_4)_2 \cdot 6H_2O]$ tuzu elde edilebilmiş ve bu bileşiğin yüksek bir piyasa değerine sahip olduğu bildirilmiştir (Zhang vd. 2016). Ayrıca, Bani vd. (2014) tarafından Arnavutluk'taki serpantinli topraklarda hektar başına yaklaşık 1.116 USD (Amerikan Doları) net gelir elde edilmiştir. Serpantinli toprakların genellikle zayıf yapılı olması ve tarımsal üretime elverişli olmaması nedeniyle, Ni fitomadenciligi hem marjinal arazilerin değerlendirilmesini mümkün kılmakta hem de fiziksel madencilik yöntemlerinin çevreye verdiği zararları oluşturmadan ekonomiye önemli katkılar sunma potansiyeli taşımaktadır. Buna karşın serpantin olmadığı halde Ni ve diğer ağır metallerce kontamine olan (özellikle tarımsal üretim yapılan alanlar) arazilerin rehabilitasyonu ile ilgili olarak da bitkilerin kullanıldığı yeşil teknolojiler (fitoremediasyon) bulunmakta ve bu yöntemlerin verimini artırma yöntemleri üzerine çalışılmaktadır.

2.2. Ağır Metal Kirliliğiyle Mücadelede Bitki-Bakteri İş birliği: Fitoremediasyon ve PGPB ile Desteklenmesi

Tarımsal alanlardaki artan ağır metal kontaminasyonu ile mücadelede biyolojik remediasyon teknikleri arasında fitoremediasyon en çok kabul gören yöntemlerdendir. Fitoremediasyon terimi, kirleticileri azaltmak veya bir şekilde etkisizleştirmek amacıyla bitkilerin kullanıldığı tüm çevresel iyileştirme tekniklerini kapsamaktadır. Fitoremediasyon, geleneksel mühendislik tabanlı arıtma yöntemlerine kıyasla daha düşük maliyetli olması, ikincil kirleticiler oluşturmaması ve ortamdan uzaklaştırılan metallerin geri kazanılabilirliği (fitomining) gibi avantajları sayesinde çevresel iyileştirme teknikleri arasında dikkat çekmektedir. Fitoremediasyonun; fitoekstraksiyon, fitovolatilizasyon, fitodegradasyon, fitostabilizasyon, fitofiltrasyon gibi çeşitli alt teknikleri bulunmakla birlikte (Şekil 2.4), söz konusu kontaminant ağır metaller olduğunda en etkili yöntem olarak fitoekstraksiyon ve fitostabilizasyon öne çıkmaktadır.



Şekil 2.4. Ağır metallerle kirlenmiş toprakların fitoremediasyonu için bitkiler tarafından uygulanan stratejiler (Görsel yapay zeka ile hazırlanmış, Panda vd. 2025'ten değiştirilerek kullanılmıştır.)

Fitoremediasyon tekniğinin uygulanması için uygun bitki seçimi önem arz etmektedir. Bu konuda ilk dikkat çeken grup hiperakümülatör bitkilerdir. Serpantin topraklara, yüksek metal konsantrasyonu koşullarına rağmen gelişimini sürdürebilen ve bu metalleri diğer bitkilere kıyasla yüzlerce kat fazla oranda biriktirme yeteneğine sahip bitkiler adapte olmuştur. Hiperakümülatör ismi verilen bu bitkiler, özellikle Brassicaceae ve Asteraceae familyalarına ait türler arasında tanımlanmıştır (Adıgüzel ve Reeves 2012). Genellikle serpantin endemiği olan bu bitkiler, yüksek metal akümülyasyon kapasitelerine rağmen son derece düşük ve yavaş biyokütle üretimleriyle bilinirler; bu durum, pratik uygulamalarını ciddi şekilde sınırlandırmaktadır (Akinbile ve Mbohwa 2025). Bu nedenle, son yıllarda yapılan çalışmalar, metal toleransı ve biyokütle üretim kapasitesi yüksek, adaptasyon yeteneği fazla olup birçok coğrafyada yetiştirilebilecek tarımsal bitkilere odaklanmıştır (Vischetti 2022). Bu bitkilerin lif, yağ, pigment ve diğer çıktıları sayesinde sürecin yürütülmesi esnasında ekonomik bir katkı da sunarak, maliyeti düşürmesi söz konusudur. Dahası, bu bitkilerin fitoremediasyon performanslarını artırıcı çeşitli yöntemler de mevcuttur. Fitoremediasyon süreçlerinde bitki performansını artırmak için uygulanan çeşitli stratejiler, hem metal alım kapasitesini hem de bitkinin stres koşullarına karşı dayanıklılığını geliştirmeye yöneliktir. Bu stratejiler arasında öncelikle toprak özelliklerinin düzenlenmesi yer alır. Kontamine topraklarda pH düzeyinin ayarlanması, metallerin çözünürlüğünü ve bitki tarafından alınabilirliğini

doğrudan etkileyen önemli bir faktördür. Bununla birlikte organik madde uygulamaları (kompost, biyokömür vb.), hem toprağın fiziksel yapısını hem de mikrobiyal aktiviteyi artırarak fitoremediasyon verimini yükseltir. Yine gübreleme ve besin takviyesi uygulamaları ile özellikle azot (N), fosfor (P) ve potasyum (K) gibi temel makro besinlerin dengeli şekilde sağlanması, bitkinin genel büyümesini desteklerken metal stresine karşı toleransını da artırabilir. Ayrıca şelatör maddelerin (örneğin sitrik asit, EDTA) kontrollü kullanımı, metallerin toprakta daha mobil hale gelmesini sağlayarak bitki tarafından alımlarını kolaylaştırır. Ancak son yıllarda giderek daha fazla ilgi gören uygulamaların başında biyolojik temelli yaklaşımlar gelmektedir. Bu kapsamda, mantarlar ve bakterilerin bitkiler ile kurdukları simbiyotik ilişkilerden yararlanılmaktadır. Mikorizaların oldukça konak spesifik olmaları dolayısıyla uygun eşleşmenin belirlenmesi daha nadir olsa da konak spesifitesi daha düşük olan bakterilerin kullanımı fitoremediasyonun sürdürülebilirliği ve verimliliğini artırmak açısından oldukça etkili ve çevre dostu çözümler sunmaktadır.

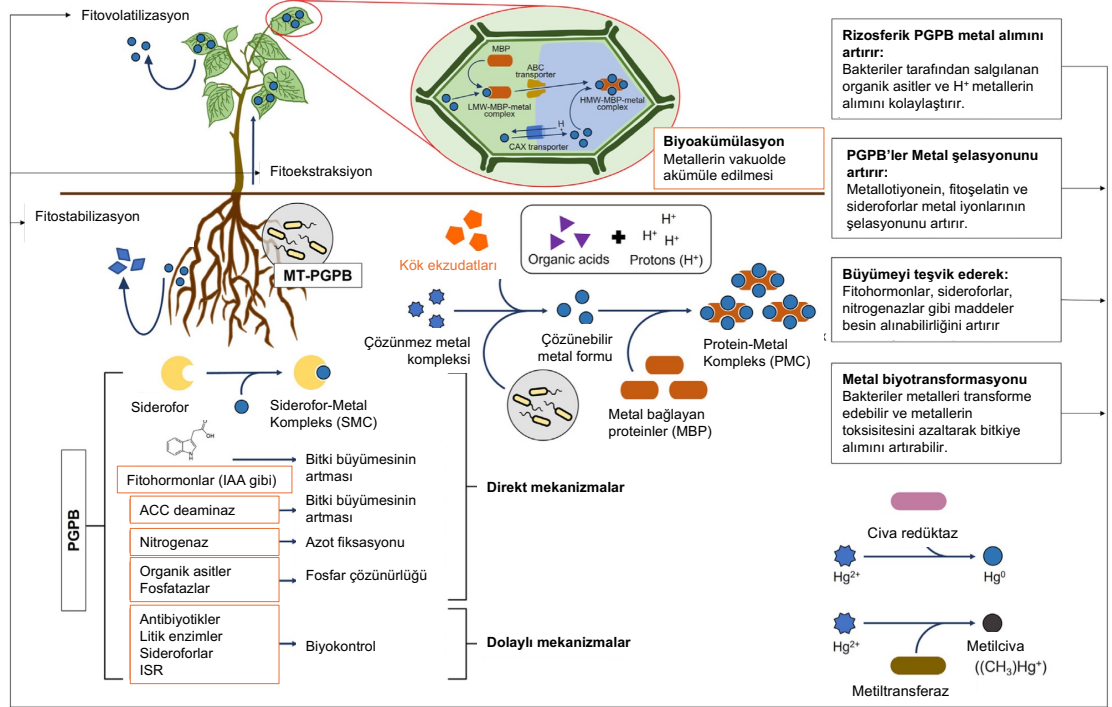
Bitki bünyesinde (endofitik) veya rizosferinde (rizosferik) kolonize olarak bitkilere pozitif katkı sağlayan bakterilere genel olarak “bitki büyümesini teşvik eden bakteriler” (PGPB, plant growth promoting bacteria) adı verilmektedir. PGPB, bitkilerin büyüme ve gelişmesini doğrudan (hormonal veya besin alımı kolaylaştırması gibi) teşvik etmesinin yanı sıra, salgıladıkları antibiyotikler, besin/yer rekabetine girmeleri ve patojenlerin virulans faktörlerini detoksifiye edebilme yetenekleri sayesinde patojenlerin biyokontrolünde rol oynayarak bitki büyüme ve gelişmesine katkı sağlayabilir (Compant vd. 2005). Rizosferik popülasyonlarından sonra genellikle bitki köklerinden içeriye girebilen (genellikle yan kök oluşumu ve kök ucu büyümesi sırasında) ve bitki ile daha yakın temas kurabilmesi ile avantaj sahibi olan endofitik bakteriler, rizosferik bakterilerin bir alt kümesi olarak nitelendirilmektedir. Patojen bakterilerin aksine, bitki bünyesine giren endofitik bakterilerin sınırlı sayıda üremeleri ve bitkinin savunma sistemlerini tetikleyecek stres koşulunu oluşturmadıkları (selülaz vb. enzim aktivitesinin düşük olması) için konağa zarar vermedikleri bildirilmiştir (Afzal vd. 2019). Ayrıca teşvik edici özellikleri bakımından ele alındığında endofitik bakterilerin, rizobakterilere göre daha etkili olduğu bilinmektedir (Ma vd. 2011). PGPB, bitki büyümesini teşvik etmesinin yanı sıra ağır metallerin sebep olduğu toksik etkilerin hafifletilmesini kapsayan mekanizmalar ile metal toksisitesine karşı da tolerans sağlayabilmektedir (Manoj vd. 2020).

Şimdiye kadar yapılan araştırmalarda steril bitki bulunamamış ve çalışılan tüm bitkilerde endofitik bakterilerin yer aldığı bildirilmiştir (Afzal vd. 2019). Fakat serpentin topraklarda yayılış gösteren hiperakümülatör bitkilerden izole edilen endofitik bakteri suşlarının, evrimsel süreçte hem yüksek metal konsantrasyonuna adapte olması, hem de metal akümüle eden bitkilerle birliktelik kurması nedeniyle fitoremediasyon çalışmaları için en iyi PGPB alternatifi olduğu bildirilmektedir (Barzanti vd. 2007). Bunun yanı sıra, endofitik bakterilerin yalnızca kendi konakları üzerinde teşvik edici özelliklerini gösterdiklerini bildiren çalışmalar olmasına rağmen, kendi konağı dışında yakın akraba olduğu (Long vd. 2008) veya daha uzak akrabalık ilişkisi içinde olduğu farklı bitkilerde de (Sessitsch vd. 2005; Ma vd. 2011) etkili olduğu bildirilmiştir. Dolayısı ile konak tercihlerinin oldukça geniş olduğu bilinmektedir. Asteraceae familyasından *Centaurea ensiformis* P.H. Davis, 19550-37750 mg.kg⁻¹ Ni akümüasyonu ile Türkiye’de Sandras Dağı’nda yayılış gösteren endemik bir hiperakümülatör bitkidir (Revees ve Adıgüzel 2004). Alternatifleri arasında oldukça fazla miktarda Ni akümüle etme kapasitesi ve aspir

bitkisine benzerlikleri sebebiyle bu tez kapsamında PGPB izolasyonunun gerçekleştirileceği bitki olarak seçilmiştir.

2.2.1. Fitoremediasyon performansını artıran PGPB mekanizmaları

Literatürde Ni hiperakümülatörü olan farklı bitkilerden elde edilen PGPB özelliği bulunan bakterilerin çeşitli bitkilere inokülasyonu sonucunda Ni toleransı ve fitoremediasyon kapasitesinin artırılmasına yönelik çalışmalar bulunmaktadır: PGPB'nin Ni ve diğer ağır metal uygulamaları altında çeşitli mekanizmalar (asidifikasyon, siderofor, fitohormon, N fiksasyonu vb.) ile bitki biyokütlesini arttırdığına dair birçok çalışma bulunmaktadır (Rajkumar vd. 2010; Tak vd. 2015; Carlos vd. 2016; Saadani vd. 2016; Pinter vd. 2017; Manoj vd. 2020; Meraklı ve Memon, 2020; Mesa-Martin vd. 2020). PGPB, asidifikasyon, şelatör üretimi, siderofor üretimi, demineralizasyon gibi yollarla ağır metallerin biyoyararlanımlarını, mobilitesini, çözünürlüğünü ve taşınımını arttırabilirler (Şekil 2.5). Böylece ağır metallerin bitkideki akümülayonu ve sonucunda fitoekstraksiyon ya da fitostabilizasyon kapasitesi önemli ölçüde artırılabilir (Ma vd. 2011; Manoj vd. 2020; Alves vd. 2022).



Şekil 2.5. Bitki büyümesinin teşvik edilmesinde ve metal fitoremediasyonunda bakterilerin rolü (Alves vd. 2022'den değiştirilerek kullanılmıştır.)

2.2.1.1. Siderofor üretimi

Hem bitki hem de mikroorganizma gelişimi, metabolizması için hayati bir mikro besin olan demirin eksikliği ile mücadele etmek için bakteriler tarafından üretilen sideroforlar, Fe afinitesi yüksek ligandlardır. Yapısal olarak 250'den fazla siderofor türü tanımlanmış olup Fe bağlayan bileşenlerine göre hidroksamatlar, fenolatlar ve karboksilatlar olarak sınıflandırılırlar (Fanai vd. 2024). Siderofor üreten bakterilerin

hücre yüzeyinde, ferrik Fe–siderofor kompleksini taşıyan ve demiri metabolik süreçler için alınabilir kılan Fe regülatör proteinleri bulunur. Bitkide Fe eksikliği olduğunda, bakteriyel sideroforlar bitki için birincil Fe kaynağı hâline gelir (Perez vd 2019). Dahası, rizobakterilerin siderofor üretme yeteneği sayesinde endofitik bakteriler kökleri kolonize etmede diğer mikroorganizmalara göre avantaj sağlarlar. Bu durum, siderofor üretebilen PGPB'nin başka hiçbir biyokontrol mekanizması kullanmaksızın ürettikleri sideroforlar aracılığıyla biyokontrol ajanı olarak işlev görebildikleri anlamına gelmektedir. Böylece bazı fitopatojenlerin yeterli miktarda Fe almasını engelleyerek çoğalma yeteneklerini sınırlar. Bu mekanizmanın etkili olmasının sebebi özellikle fungal patojenlere kıyasla demire çok daha yüksek afinitesi olan sideroforlar üretebilmeleridir (Glick 2012). Öte yandan, biyokontrol amaçlı PGPB tarafından üretilen sideroforların rizosferde neden olduğu Fe eksikliği genellikle bitki büyümesini olumsuz etkilemez. Çünkü çoğu bitki, PGPB'nin Fe-siderofor kompleksini bağlayabilir ve kullanabilir (Fanai vd. 2024).

2.2.1.2. Fosfat çözünürlüğü

Toprakta genellikle yüksek miktarda P bulunmasına rağmen (çoğunlukla 400-1.200 mg kg⁻¹), bu fosforun büyük bir kısmı çözünmez formda bulunduğundan bitki büyümesinde kullanılmak için ulaşılabilir değildir. Çözünürlüğü düşük P, genellikle apatit gibi inorganik mineraller veya inositol-fosfat, fosfomonoesterler ve fosfotriesterler gibi çeşitli organik formlar şeklinde bulunur. Ayrıca, tarımda kullanılan kimyasal gübre olarak uygulanan çözünür inorganik fosforun önemli bir kısmı da kısa süre içinde immobilize olur ve sabitlenerek bitkiler için kullanılamaz hale gelir. Topraktaki fosforun sınırlı biyoyararlanımı ile bu elementin bitki büyümesi için hayati önemde olması birlikte değerlendirildiğinde, yeterli fosforun temin edilememesi bitki büyümesini sıklıkla kısıtlayan bir faktör haline gelmektedir (Rodríguez ve Fraga 1999). Bu nedenle, P çözünürlüğünü artırabilen bakteriler tarafından gerçekleştirilen çeşitli süreçler PGPB'ler için önemli bir özelliktir. Genellikle inorganik fosforun çözünürlüğü, PGPB tarafından sentezlenen glukonik asit ve sitrik asit gibi düşük moleküler ağırlıklı organik asitlerin ve fosfataz enzimlerinin sentezi ile gerçekleşir (Glick 2012). Ni stresi, kök gelişimini baskılayarak P alımını sınırlandırırken; PGPB, fosforu bitkiler için yararlanılabilir hale getirerek stres altındaki bitkilerde enerji metabolizmasının sürdürülmesini, kök morfolojisinin iyileştirilmesini ve büyüme performansının artmasını sağlar. Ayrıca, bazı PGPB suşları, yalnızca fosforu çözünür hale getirmekle kalmaz; aynı zamanda ağır metallerle şelat oluşturarak onların biyoyararlanımını azaltabilir ve bitki dokularında toksik birikimi önleyebilir (Kan vd. 2024).

2.2.1.3. ACC deaminaz üretimi

Bitkiler, stres durumlarında etilen sentezlerler ve bu durum yüksek seviyelerde olursa stresin bitki üzerindeki etkilerini daha da şiddetlendirir. Bu nedenle, stresin bitkilere verdiği hasarı azaltmanın yollarından biri, bitkinin etilen yanıtını düşürmektir. 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit (ACC) deaminaz enzimi, bitkilerde stres koşullarında (özellikle ağır metal, tuz, kuraklık ve patojen kaynaklı stresler gibi) artan etilen üretimini düzenlemede kritik bir rol oynar. Bitkilerde, stres altında metiyoninden türeyen bir ara metabolit olan ACC üretimi artar. ACC, etilen üretiminin doğrudan öncüsüdür ve bitki hücrelerinde ACC oksidaz enzimi tarafından etilene dönüştürülür. Ancak, yüksek düzeyde etilen özellikle genç dokularda büyüme inhibisyonu, klorozis,

yaprak dökümü ve hatta programlı hücre ölümüne neden olabilir. PGPB tarafından sentezlenen ACC deaminaz enzimi bitkide biriken ACC'yi parçalayarak etilen üretimini azaltır ve bu sayede bitkinin stres tepkilerini hafifletir. Böylece bitkiler, ağır metal toksisitesi gibi olumsuz çevresel koşullarda daha iyi büyüme ve gelişme gösterebilirler (Glick 2012, 2014).

2.2.1.4. IAA üretimi

İndol-3-asetik asit (IAA), bitkilerde doğal olarak bulunan ve en yaygın görülen oksin hormonudur. Bitki büyüme ve gelişiminde çok sayıda temel süreci düzenler. IAA, bitki hücre bölünmesini, uzamasını ve farklılaşmasını etkiler; tohum çimlenmesini uyarır; ksilem ve kök gelişim oranını artırır; vejetatif büyüme süreçlerini düzenler; yan ve adventif kök oluşumunu başlatır; ışık, yerçekimi gibi çevresel uyaranlara karşı bitki tepkilerini düzenler; fotosentezde pigment oluşumu, çeşitli metabolitlerin biyosentezi ve stres koşullarına karşı toleransı etkiler. Köklerde optimal IAA düzeyi, sürgünlere kıyasla yaklaşık 100.000 kat daha düşüktür. Bununla birlikte, bitkideki endojen IAA havuzu, toprak bakterilerinin salgıladığı IAA'nın alınmasıyla değiştirilebilir. Bu bağlamda, bakterilerin sentezlediği IAA miktarı, bitki büyümesini teşvik mi edeceği yoksa baskılayıcı mı olacağını belirlemede kritik rol oynar. Bitki köklerinde endojen IAA seviyesi büyüme için ya optimal ya da suboptimal olabilir ve bakteriyel IAA'nın alınması bu seviyeyi ya optimal düzeye çıkarabilir ya da aşırıya taşıyabilir. Bakteriler, IAA'yı birden fazla yolla sentezler; bunlar arasında indol-3-asetamid (IAM), indol-3-pirüvik asit (IPA) yolları ve mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamış birkaç başka yol bulunur (Etesami ve Glick 2024). Bakteriyel IAA üretimi bitkilerde kök sistemini, besin alımını ve ağır metal toksisitesi gibi çeşitli abiyotik streslere karşı direnci etkileyerek bitkilerin toleransını artırmasının yanı sıra, kök yüzey alanını ve uzunluğunu artırarak bitkinin topraktaki besinlere erişimini güçlendirir, hücre duvarlarının gevşemesini sağlayarak kök salgılarının artmasına yol açar; bu da rizosferdeki bakterilerin büyümesini ve bitkiye doğru hareket etmelerini destekler (Glick 2014).

2.2.1.5. İndüklenmiş sistemik direnç (ISR)

PGPB, bitkilerde indüklenmiş sistemik direnç (ISR) olarak bilinen bir olguyu tetikleyebilir. Bu durum, bitkilerin bir patojen enfeksiyonuna yanıt olarak savunma mekanizmalarını aktive ettiği sistemik kazanılmış direnç (SAR) ile fenotipik olarak benzerdir. ISR-pozitif bitkilerin, savunma mekanizmalarını daha hızlı ve güçlü bir şekilde aktive edecek şekilde "hazır" (primed) hale geldiği öne sürülmektedir (Pieterse vd. 2009). ISR, bitki içinde jasmonat (JA) ve etilen sinyalleme ile bağlantılıdır ve bu hormonlar, konak bitkinin çeşitli streslere karşı savunma tepkilerini uyarır. ISR mekanizmasının metal stresi altında da önemli bir rolü olduğu giderek daha fazla çalışmayla ortaya konmaktadır. Geleneksel olarak ISR, biyotik streslere (patojen saldırıları) karşı savunma yanıtı olarak tanımlansa da son yıllarda yapılan araştırmalar, abiyotik stresler, özellikle de ağır metal toksisitesi gibi durumlarda da ISR'nin tetiklenebileceğini göstermektedir. ISR yoluyla aktive olan etilen ve JA sinyalleme, ağır metal kaynaklı hücre hasarlarına karşı mücadelede rol oynayan genlerin ekspresyonunu da düzenler. Dahası bu süreçte proteazlar, glukanazlar gibi çeşitli enzimlerin de bitkilerin ağır metal stresine karşı direnç kazanmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir (Shaffique vd. 2023).

PGPB'nin metal fitoremediasyonunda kullanımıyla ilgili ilk yayın, Ni dirençli bir bakterinin kanola bitkileri üzerindeki Ni toksisitesini azaltabildiğini bildiren Burd vd. (1998)'dir. Ardından PGPB'nin inokülasyonu ile metal fitoremediasyonunun kolaylaştırıldığına dair çok sayıda çalışma yayımlanmıştır. Kullanılan bakteriler genellikle önce hedef toksik metale karşı dirençli olmaları bakımından seçilmekte, ardından P-çözünürlüğü, ACC deaminaz üretimi, IAA ve siderofor sentezleme gibi PGPB yetenekleri açısından test edilmektedir. Ardından bitkilere uygulanarak fitoremediasyon kapasitelerinin veya metal toleranslarının artırılması için çalışmalar yürütülmektedir. Bu noktada önemli seçimlerden biri PGPB'nin ağır metalleri bitki bünyesine alımına olan etkisidir. PGPB, çeşitli mekanizmalar ile ağır metal iyonlarının alımını hem artırabilir hem de azaltabilir. Bu yüzden ağır metallerin bitkiye alımı ve bitki içerisinde taşınım süreçlerinin anlaşılması önem arz etmektedir.

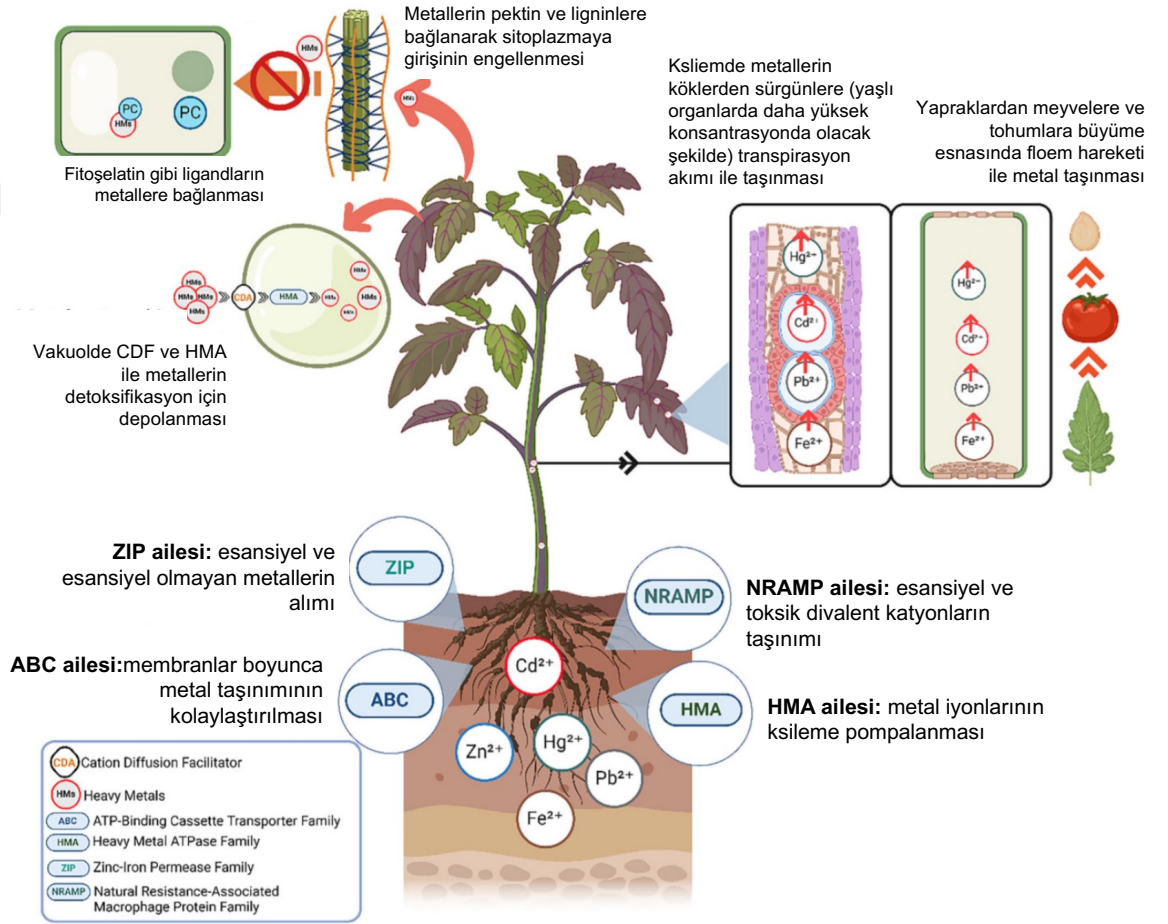
2.3. Ağır Metallerin Bitkilere Alımı ve Taşınımı

Bitkilerde ağır metal alımı öncelikli olarak bitkinin kök sisteminde gerçekleşmekte olup metaller toprak çözeltisinden absorbe edilirler. Metal iyonlarının hücresel zarlar boyunca taşınmasını kolaylaştıran spesifik metal taşıyıcıları bulunmaktadır (Şekil 2.6). Başlıca metal taşıyıcı aileleri arasında ZIP (Çinko-Demir Permeaz), NRAMP (Doğal Dirençle İlişkili Makrofaj Proteini), HMA (Ağır Metal ATPazı) ve ABC (ATP-Bağlayıcı Kaset) taşıyıcıları yer almaktadır. Örneğin ZIP ailesi, Zn^{+2} , Fe^{+2} ve Mn^{+2} gibi iki değerlikli metal katyonlarının alımından sorumlu olup, metal stresi altında Cd^{+2} ve Pb^{+2} gibi esansiyel olmayan toksik metalleri de taşıyabilmektedir (Yang vd. 2022; Anas vd. 2025). Ni^{+2} iyon formunda bitki bünyesine yarışmalı olarak metal taşıyıcılarından (ZIP, NRAMP vb.) ve kanallardan girebildiği gibi; bu girişin diğer metallerden daha kolay olduğu belirtilmektedir (Guerinot 2000).

Metal iyonlarının hücre içerisine alınmasının ardından, bu iyonların hücre içi taşınımı, detoksifikasyonu ve depo organellerine yönlendirilmesi süreçlerinde de çeşitli özgül proteinler görev almaktadır. Metal tolerans proteinleri (örneğin MTP1), tonoplasta lokalize olan ve CDF (Katyon Difüzyon Kolaylaştırıcıları) ailesinin grup-1 üyelerine ait proteini kodlayan bir gen olup, Ni hiperakümülatör bitkilerin yapraklarında önemli ölçüde fazla ifade edilmektedir (Mustafa vd. 2023). Benzer şekilde, tütün bitkisinde (*Nicotiana tabacum* L.) bulunan NtCBP3 (Kalmodulin Bağlayıcı Protein), plazma zarında yer alan bir protein olup aşırı üretimi sürgünlere Ni taşınımını artırmıştır (Sobczyk vd. 2017).

Metaller kök sistemine alındıktan sonra ksilem ve floem aracılığıyla bitkinin toprak üstü kısımlarına taşınmaktadır. Ksilem aracılığıyla yapılan taşınım, transpirasyon akımı ile köklerden gövde ve yapraklara doğru gerçekleşmekte; HMA taşıyıcıları ise metallerin ksilem borularına yüklenmesinde görev almaktadır. Bu dağılım genellikle homojen olmayıp, yaşlı yapraklar ve kökler daha yüksek miktarda metal akümülayonu göstermektedir (Anas vd. 2025). Floem ise yaprak gibi kaynak dokulardan tohum ve meyve gibi depo dokularına metal taşınımını gerçekleştirir. Ancak toksik metallerin yenilebilir bitki kısımlarında birikimi, gıda güvenliği açısından önemli bir risk oluşturmaktadır. Bu nedenle, metallerin bu dokulara taşınımının sınırlandırılması tarımsal bitkilerde büyük önem arz etmektedir (Zakaria vd. 2021).

Bitkilerin fizyo-anatomik özelliklerine ek olarak, metal alımını etkileyen çevresel ve biyolojik etmenler çeşitlilik göstermektedir. Bitkiler tarafından metal alımını belirleyen başlıca faktörler arasında toprağın pH değeri (asiditesi), kation değişim kapasitesi, organik madde ve kireç oranı, toprak nemi, tane yapısı (granülometrik yapı), makro ve mikro besin düzeyleri, sıcaklık, kök yüzey alanı ve toprak mikrobiyotası yer almaktadır (Chen vd. 2009). Örneğin, nikelin toprak tarafından en fazla absorbe edildiği sıcaklık aralığı 23–30°C, pH aralığı 5.5–6.0'dır. Bununla birlikte, yüksek kation değişim kapasitesine sahip topraklar ve geniş kök yüzey alanına sahip bitkiler, metal alımını daha etkin bir şekilde gerçekleştirebilmektedirler (He vd. 2012).



Şekil 2.6. Bitkilerde metal alım ve taşınım mekanizmalarında rol alan taşıyıcılar (Anas vd. 2025)

Toprak çözeltisinden alınarak hücre içine taşınan ağır metallerin, bitki bünyesindeki taşınımı ve detoksifikasyon mekanizmaları, bitkinin bu elementlere karşı tolerans düzeyini belirleyen temel süreçlerdir. Ancak bu savunma her zaman yeterli olmayabilir. Özellikle esansiyel olmayan ya da yüksek konsantrasyonlardaki ağır metaller, fizyolojik sınırların ötesine geçtiğinde bitki metabolizmasını olumsuz yönde etkileyebilir. Bu durumda ağır metaller, hücresel yapıların bütünlüğünü bozarak büyüme, gelişme ve verimlilik üzerinde ciddi toksik etkilere yol açmaktadır. Bu tez kapsamında çalışılan nikelin bitkilerde neden olduğu başlıca fitotoksik etkiler aşağıda ele alınmıştır.

2.4. Bir Ağır Metal Olan Nikelin Fitotoksisitesi

Bitki dokularına alınan nikelin bir kısmı metabolik süreçlerde kullanılsa da çoğu zaman hücre içi, çeperi ve dokular arası alanlarda birikerek toksik etkilere yol açar. Özellikle köklerden başlayarak toprak üstü organlara taşınan ve biriken Ni, fizyolojik ve anatomik yapı ve işlevleri olumsuz yönde etkileyerek belirgin stres belirtilerine neden olur. Bu bağlamda, nikelin bitki morfolojisi ve fizyolojisi üzerindeki zararlı etkilerinin incelenmesi, toksisite mekanizmasının daha iyi anlaşılması açısından oldukça önemlidir.

2.4.1. Çimlenmeye etkisi

Ni toksisitesinin, bitkinin yaşamının ilk aşaması olarak kabul edilebilen tohumların çimlenme süreçlerine olumsuz etkisi bulunmaktadır (Mao vd. 2025). Bu durumun başlıca nedenleri arasında metabolik süreçlerdeki azalma, hücre duvarı elastikiyetinin bozulması, hücre bölünmelerinin yavaşlaması ve hidrolitik enzimlerin aktivitesindeki düşüş yer almaktadır (Hassan vd. 2019). Ni stresi, protein sentezinin aksamasına ve endospermde depolanan besin maddelerinin gelişmekte olan embriyoya taşınmasını sağlayan enzimlerin aktivitesinde azalmaya neden olarak, çimlenme sürecinin ve erken dönem fide gelişiminin baskılanmasına yol açmaktadır.

2.4.2. Morfolojiye etkisi

Ni toksisitesi yalnızca bitkinin çimlenme aşamasında değil, gelişme ve büyüme döneminin tamamında yıkıcı etkilere neden olabilmektedir. Topraktaki Ni varlığına ilk maruz kalan organlar genellikle bitki kökleri olup, bu durum önemli morfolojik ve gelişimsel bozulmalara yol açmaktadır. Kök uçlarında karar ve gelişim geriliği Ni toksisitesinin semptomlarındandır. Leskova vd. (2020), kök uçlarına uygulanan Ni toksisitesinin, kökün diğer bölgelerine göre çok daha belirgin bir şekilde kök uzunluğunu azalttığını bildirmiştir. Ni fitotoksisitesi kök ucu meristematik hücrelerde kromozomal anormalliklere yol açmakta; hücre sayısını, meristematik alan büyüklüğünü ve hücre uzamasını azaltmakta ve hücre deformasyonlarına neden olmaktadır (Kohanova vd. 2018). Ni toksisitesi yalnızca köklerle sınırlı olmayıp vasküler sistem aracılığı ile toprak üstü organlara taşınabilmekte ve bu organlarda hasarlar meydana getirmektedir. Rao ve Sresty (2000), nikelin iletim demetleri ve yapraklarda bozulmalara neden olduğunu bildirmiştir. Ayrıca Ni, palizat ve sünger parankiması hacmini, grana boyutunu ve hücreler arası boşlukları azaltarak mezofil dokusunun organizasyonunda değişikliklere neden olmasının yanı sıra, stomatal iletkenliği bozmakta ve yaprak lamina yapısını etkilemektedir (Ribeiro vd. 2020). Ni stresine karşı bitkilerde multilamellar cisimcikler ve mikroveziküller oluşmakta; bu durum kök ve sürgün uzunluklarında, kuru ağırlıkta ve büyüme kapasitesinde düşüşe yol açmaktadır (Wiszniewska vd. 2018; Naveed vd. 2020). Dahası, Ni toksisitesi, mitotik aktivitenin baskılanması, kök morfolojisinin ve aquaporinlerin bozulması nedeniyle su ve besin alımını da engelleyerek bitki gelişimini sekteye uğratmaktadır (Fashola vd. 2016). Ni toksisitesi bitki yapraklarında oransal su içeriği ve su potansiyelinin düşmesine de neden olduğu bilinmektedir (Pandey ve Sharma 2002; Jahan vd. 2020). Ni toksisitesi, bitkilerde su dengesinin bozulmasına neden olarak osmotik stres ve hücrel dehidrasyon gibi olumsuz fizyolojik süreçleri tetikler. Bitkiler, bu koşullarda su potansiyelini dengelemek ve hücre içi su tutulumunu artırmak amacıyla çeşitli osmotik dengeleyici bileşikler sentezler. Bu bileşikler arasında en yaygın ve etkili olanlardan biri prolin dir. Prolin birikimi, hücre zarlarının stabilizasyonu, proteinlerin

korunması ve oksidatif stresin tamponlanması gibi çok yönlü koruyucu işlevler üstlenmektedir. Yapılan çalışmalarda, Ni stresi altındaki bitki yapraklarındaki su içeriğinin azalmasına yanıt olarak prolin seviyelerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir; bu durum, bitkinin kuraklığa benzer stres koşullarına karşı verdiği bir adaptif tepki olarak değerlendirilmiştir (Jahan vd. 2020). Ni, ksilemden sürgünlere taşındığında apoplast önemli bir Ni deposu olarak işlev görmektedir (Deng vd. 2018). Sürgünlerdeki taze ağırlık kaybı, genellikle Ni birikimi ve apoplastik bağlanma kapasitesi ile ilişkilidir (Karimi ve Ghasempour 2019). Apoplastik bağlanma kapasitesi ne kadar fazlaysa, nikelin o bölgede birikmesi de o kadar artar ve bu da hücrelerde su kaybı ve stres yaratabilir. Çünkü apoplasttaki Ni akümüasyonu arttığında bu alanda iyon birikimi ve iyonik dengesizlik oluşacağından suyun ozmotik potansiyeli düşer, yani suyun hareketi yavaşlar ya da durabilir (Ghaderian vd. 2015). Aşırı Ni birikimi, osmotik stres yaratmasının yanı sıra, fotosistem hasarına, zar bütünlüğünün bozulmasına, azot metabolizmasının aksamasına ve bunun sonucunda klorozis, senesens ve nekroz gibi yapısal bozulmalara yol açmaktadır (Hussain vd. 2020). Bu etkiler sonucunda büyümede ciddi aksaklıklar, kloroz, nekroz ve bitkisel solgunluk gibi belirgin toksisite semptomları morfolojiye yansımaktadır (Seregin ve Kozhevnikova, 2006).

2.4.3. Diğer elementlere ve iyon dengesine etkisi

Ni, bitkilerde makro ve mikro besin elementlerinin alımı ve taşınımı süreçlerinde bu elementlerle yarışmalı olarak bitki bünyesinde girdiği için, bu rekabette baskın hale gelmesi durumunda kökten sürgün, meyve ve hatta tohumlara kadar olan taşınımını engelleyebilir. Böylece ilgili elementin bitki bünyesinde yeterince alınamamasına ve buna bağlı olarak eksiklik semptomlarının ortaya çıkmasına neden olabilir. Dolayısıyla yüksek düzeyde Ni birikimi, bu besin maddelerinin alımını ve taşınımını bozarak bitki dokularındaki genel besin içeriğini düşürebilmektedir (Seregin ve Kozhevnikova, 2006). Nikelin P taşınımı üzerine etkisi ise Ni seviyesine bağlıdır. 20 mg L⁻¹ Ni uygulamasında P taşınımı artarken, 40 mg L⁻¹ gibi daha toksik düzeylerde P içeriği azalmaktadır. Bu durum, Ni ile P arasında yüksek konsantrasyonlarda belirgin bir rekabet olduğunu göstermektedir (Amjad vd. 2020). Diğer yandan, bakır (Cu) ve çinko (Zn) ile girdiği rekabet sonucunda nikelin baskın olması, bu iki elementin kofaktörü olduğu süperoksit dismutaz enziminin aktivitesini azaltabilir. Bu durum, reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonunda yetersizliklere yol açarak oksidatif stresin artmasına neden olabilir. Ayrıca, Ni ve Fe hem nikotinamid hem de sitrat tarafından şelatlanabilir ve benzer taşıyıcı proteinler aracılığıyla hücreye alınır. Bu nedenle ortamda nikelin yüksek dozlarda bulunması, demirin taşınmasını engelleyerek Fe yerine Ni alınmasına yol açabilir. Bu da bitkide Fe eksikliği belirtilerinin görülmesine neden olur. Öte yandan, nikelin Fe ile rekabeti sadece alım düzeyinde değildir; aynı zamanda demirin ligand yapısını bozarak kökten sürgünlere olan taşınımını da engelleyebilir. Bunun sonucunda, köklerde aşırı Fe birikimi ve buna bağlı Fe toksisitesi gelişebilir (Nishida vd. 2012). Batool vd. (2018), Ni toksisitesinin bitki sürgünlerinde kalsiyum (Ca²⁺), K⁺ ve sodyum (Na⁺) içeriklerini azalttığını bildirmiştir. Nikelin neden olduğu bu durumun, hücre zarına bağlı ATPaz enzimlerinin inhibisyonu ve plazma zarı lipid bileşiminin değişmesi (sterollerin ve fosfolipitlerin olumsuz etkilenmesi) ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Gill 2014).

Artan Ni konsantrasyonları, bitkilerde besin alım kinetiğini etkileyerek zar geçirgenliğini ve hücre içi iyon dengesini de bozmaktadır (Shahzad vd. 2018). Özellikle Ca²⁺, Cu²⁺ ve mangan (Mn²⁺) gibi iki değerlikli katyonların alımı ve asimilasyonu

engellenir. Ni stresi, sitozolik Ca^{2+} gibi sekonder haberci konumundaki sinyal iyonlarının konsantrasyonunu düşürerek stomatal açıklık mekanizmalarını da bozar (Edel ve Kudla 2016). Ayrıca Ni, PSII'de yer alan oksijen oluşturan kompleksteki (OEC) Ca^{2+} bağlama bölgelerinde Mg^{+2} ile yer değiştirerek fotokimyasal reaksiyonları aksatabilir (Boisvert vd. 2007). Yüksek Ni toksisitesi aynı zamanda elektron taşıma zincirini de bozarak enerji üretimini azaltmakta ve böylece dolaylı olarak besin alımını kısıtlamaktadır (Liu 2008). Ni, fotosentezde önemli rolü olan Mn alımını engelleyerek PSII kompleksindeki katalitik aglomeratların oluşumunu aksatır (Schmidt vd. 2016).

Ni iyonlarının yarıçapı, Mg^{+2} (78 pm), Fe^{+2} (82 pm) ve Zn^{+2} (83 pm) gibi diğer elementlere çok benzerdir. Bu benzerlik, taşıyıcı proteinler düzeyinde rekabete yol açarak bu besinlerin alımını sınırlar (Chen vd. 2009; Mustafa vd. 2023). Klorofil sentezinde rol alan Mg^{+2} ve Fe^{+2} alımının azalmasına bağlı olarak bitkide kloroz ve nekroz oluşumu meydana gelebilmektedir (Mustafa vd. 2023). Ni, bitki bünyesine alımı sırasında diğer besin elementleriyle rekabete girmesinin yanı sıra, NO_3^- indirgenmesinden NH_3 molekülünün karbon (C) bileşiklerine katılımına kadar olan N asimilasyon basamaklarında da bozulmalara neden olur. Bu durum, glutamat dehidrogenaz, glutamat sentaz, glutamin sentetaz, nitrit redüktaz ve nitrat redüktaz gibi enzimlerin aktivitesindeki düşüşle ilişkilendirilmekte ve dolayısıyla azotun taşınımını da olumsuz yönde etkilemektedir (Gajewska vd. 2009; Ameen vd. 2019).

Yüksek Ni stresi ayrıca kadmiyum (Cd), Co, Cr ve kurşun (Pb) gibi diğer ağır metallerin alımını da baskılayabildiği gibi, nikelin bu metallerle birlikte oluşturduğu kombine stres, bitkilerde daha şiddetli bir toksisiteye yol açtığı da bilinmektedir (Athar ve Ahmad 2002). Metal konsantrasyonu yüksek olan alanların çoğunda, özellikle madencilik bölgelerinde, tek bir metalin bireysel baskınlığından ziyade birden fazla metalin konsantrasyonu oldukça yüksektir. Bu metallerin bir arada bulunması durumunda ortaya çıkan etkiler genellikle üç farklı şekilde sınıflandırılmaktadır: sinerjistik etki (bileşiklerin toplam etkisi, her birinin tek başına oluşturduğu etkilerin toplamından daha fazladır), antagonistik etki (toplam etki, bireysel etkilerin toplamından daha düşüktür) veya katkısız etki (toplam etki, bileşiklerin ayrı ayrı etkilerinin toplamına eşittir). Örneğin yapılan bir çalışmada, düşük konsantrasyonlardaki Ni (300 nM) ve Cd (3 nM) kombinasyonunda fotosentetik parametreler üzerinde sinerjistik bir etkileşim gözlenmiştir. Bu dozdaki Cd tek başına olumsuz bir etki göstermezken Ni ise yalnızca hafif düzeyde inhibisyon göstermiştir. Ancak Cd ve Ni birlikte uygulandığında, fotosentez üzerindeki inhibisyonun önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir (Küpper ve Andersen 2016).

2.4.4. Fizyolojik süreçlere etkisi

Ni stresi, bitkilerde fotosentezle ilişkili çeşitli mekanizmaları baskılayarak stomatal kapanmaya, karbondioksit (CO_2) alımı ve asimilasyon oranlarında azalmaya yol açmaktadır (Aqeel vd. 2021). Fotosentez verimi klorofil içeriğiyle yakın ilişkilidir ve Ni stresi klorofil biyosentezini inhibe ederek fotosentetik kapasitenin azalmasına neden olur. Bu etkinin, Ni ve Fe-Mg arasındaki rekabet sonucu Fe-Mg alımının azalmasına bağlı olduğu bildirilmiştir (Seregin ve Kozhevnikova, 2006; Khalid vd. 2017). Ni konsantrasyonundaki artış, klorofil biyosentezinde yer alan protoklorofilid redüktaz ve δ -aminolevulinik asit dehidrataz enzimlerinin aktivitesini de baskılamakta; bunun yanında klorofilaz aktivitesini artırmakta ve klorofilin merkezindeki Mg iyonunu

yerinden ederek pigment bozulmasına yol açmaktadır (Zaid vd. 2019). Ayrıca Ni, CO₂ asimilasyonu ile glikoz sentezlendiği Calvin-Benson döngüsünde yer alan bazı temel enzimler üzerinde (rubisko, fosfoglisarat kinaz, gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz ve fruktoz-1,6-bisfosfataz) inhibe edici bir etki göstermektedir. Bu enzimlerin inhibisyonu, Calvin-Benson döngüsündeki reaksiyonları sekteye uğratarak, ışık reaksiyonları sonucunda üretilen ATP ve NADPH'nin tüketilememesine ve bu moleküllerin birikmesine yol açmaktadır. Bunun sonucunda tilakoid zar boyunca yüksek bir pH gradyanı oluşmakta ve bu durum PSII aktivitesinin azalmasına neden olabilmektedir (Seregin ve Kozhevnikova 2006; Mustafa vd 2023).

Ayrıca Ni stresi, kloroplast ve tilakoid zarlarının yapısında, protein bileşiminde ve plazma zarının akışkanlığında değişimlere neden olarak iç CO₂ seviyesini ve karbonik anhidraz gen ifadesini azaltmaktadır (Azmat ve Riaz 2012; Kumar vd. 2025). CO₂, su (H₂O) ve bikarbonat (HCO₃⁻) dönüşümünde görev alan önemli bir fotosentetik enzim olan karbonik anhidrazın inhibisyonu (Nazir vd. 2019) kloroplast stromasında CO₂ molekülünün HCO₃⁻ ile dönüşümünü yavaşlatarak Rubiskoya sağlanan CO₂ miktarını sınırlar ve böylece Calvin-Benson döngüsündeki karbon fiksasyonunu olumsuz etkiler. Bu durum, fotosentez hızının düşmesine, ATP ve NADPH'nin verimsiz kullanımına ve dolayısıyla besin üretiminde azalmaya neden olur.

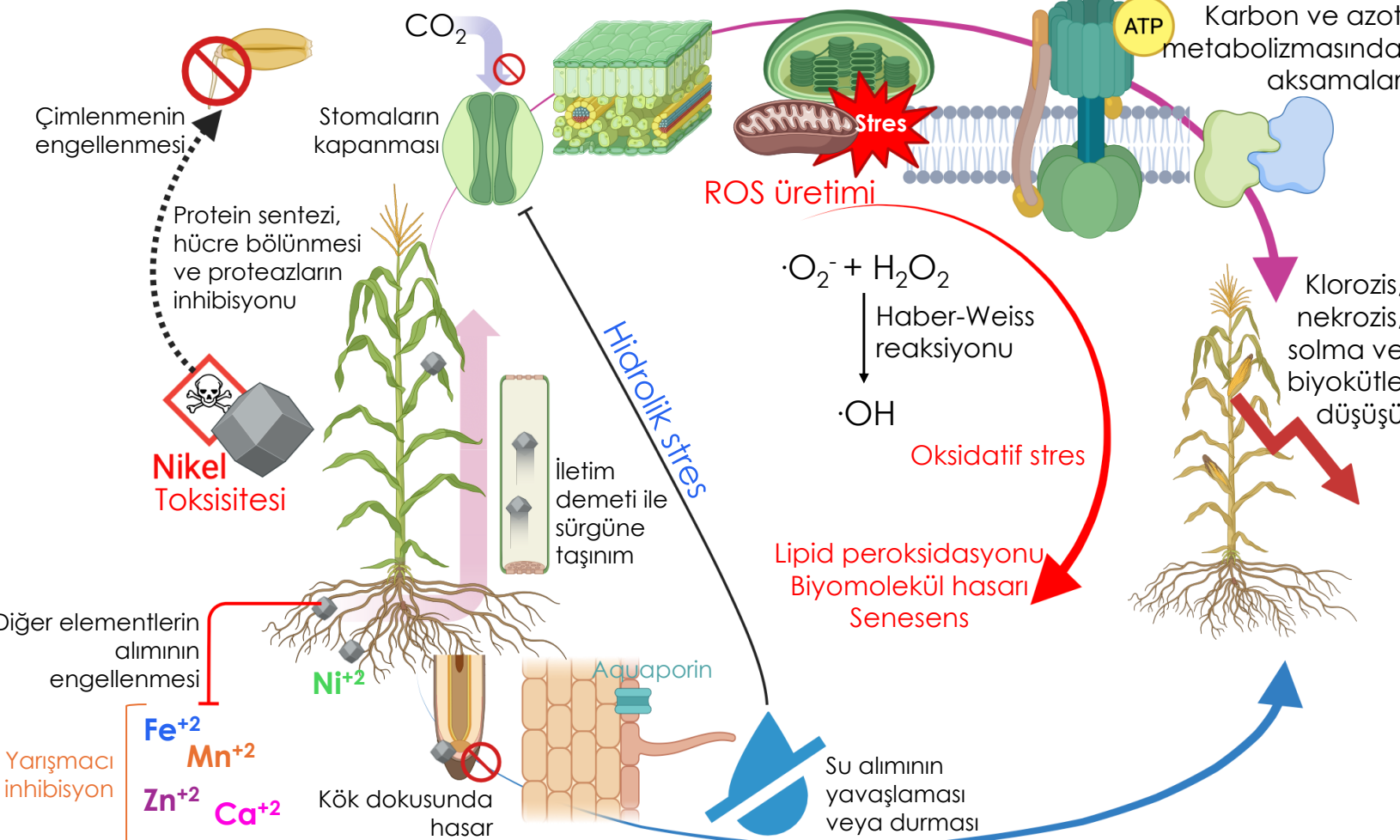
Azot metabolizması, fotosentetik karbon alımıyla ilişkili olup bitki gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Bitkiler azotu esas olarak topraktan NO₃⁻ (nitrat) ve NH₄⁺ (amonyum) formunda alırlar. NO₃⁻ kökler tarafından alınır ve nitrit redüktaz ile nitrat redüktaz enzimleri aracılığıyla NH₄⁺ şeklinde dönüştürülür. *Oryza sativa* L. ile yapılan çalışmalarda Ni stresinin, OsNRT1 nitrat taşıyıcısının baskılanması, nitrat redüktazın inhibisyonu ve OsNR1 geninin transkript seviyesinin azalmasına neden olarak köklerdeki NO₃⁻ içeriğini, toprak üstü organlara taşınmasını ve birikimini olumsuz etkilediğini ortaya konmuştur (Mustafa vd. 2023). Ayrıca Ni stresi, OsAMT1 transkript seviyelerinin yukarı regülasyonu yoluyla hücre içindeki NH₄⁺ konsantrasyonunu artırarak hücre içinde toksik etki gösterecek seviyeye ulaşmasına neden olmaktadır. Bu durum da hücre içi pH dengesini bozmakta, nekroz ve mineral eksikliklerine yol açmaktadır (Gajewska vd. 2009).

Ni toksisitesi glutamat dehidrojenaz aktivitesini artırır, alanin ve aspartat gibi amino asitlerin sentezinden sorumlu olan glutamat pirüvat transaminaz ve glutamat okzaloasetat transaminaz gibi aminotransferazların aktivitesini ise inhibe eder (Liang vd. 2011). Sonuçta birçok enzim ve yolağı üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı Ni stresi altında bitkilerde N metabolizması sekteye uğrar ve bitki gelişimi yavaşlar veya durur.

Ni stresi, hücre turgor basıncını ve ozmolit dengesini bozarak hücre zarlarının geçirgenliğinde azalmaya neden olur. Bu durum, hücre zarlarından iyon sızıntısı ile sonuçlanır (Seregin ve Kozhevnikova, 2006). Yüksek Ni konsantrasyonu altında oluşan oksidatif stres, ROS artışına bağlı olarak PSI'de P700 ve PSII'de P680 reaksiyon merkezlerinin aktivitesini bozar, klorofil sentezini engeller ve zar lipitleri, DNA ve proteinlerde hasara yol açar (Küpper ve Andresen, 2016; Sirhindi vd. 2016; Mustafa vd. 2023). Sonuçta fotosentetik etkinlik zayıflar ve bitki büyüme ve gelişmesi sınırlanır.

2.4.5. ROS üretimine etkisi

Aşırı Ni birikimi, hidroksil radikali ($\bullet\text{OH}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit ($\bullet\text{O}_2^-$) ve alkoksi radikalleri gibi ROS'ların aşırı üretimini tetikler (Rizwan vd. 2018). Bu reaktif türler, hücre zarındaki lipid ve proteinlere oksidatif hasar vererek zar bütünlüğünü bozmaktadır. Ni toksisitesine bağlı olarak malondialdehit (MDA) içeriğinde ve iyon sızıntısındaki artışlar, hücre zarı bütünlüğünün bozulduğunu ve ROS üretiminin arttığını göstermektedir (Jahan vd. 2020). Ni, redoks-aktif bir metal olmadığı için doğrudan ROS üretimine neden olmaz; ancak özellikle enerji akışlarının gerçekleştiği mitokondri ve kloroplasttaki membran ve aygıtlarda meydana gelen hasarlar nedeniyle dolaylı olarak ROS üretimini tetikler. Ni stresi altında aşırı H_2O_2 üretimi, yüksek oksitleyici potansiyeli nedeniyle çok sayıda biyokimyasal reaksiyonu bozabilir. H_2O_2 , özellikle hem grubuna bağlı Fe içeren proteinlerle etkileşime girerek, yüksek oksidasyon basamağında reaktif Fe türlerinin oluşmasına neden olabilir. Bu reaktif Fe formları, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi serbest radikal reaksiyonlarını başlatarak güçlü oksidatif etkilere yol açabilir (Asada ve Yoshikawa 1974). $\bullet\text{OH}$, biyolojik sistemlerde bilinen en reaktif oksidanlardan biridir ve bu radikali doğrudan detoksifiye edebilecek spesifik bir enzim sistemi bulunmamaktadır. Bu nedenle $\bullet\text{OH}$, hücre içerisindeki tüm biyomoleküllerle yüksek reaksiyon hızında etkileşime girerek, aşırı üretildiği durumlarda hücre yapısının ciddi şekilde zarar görmesine ve hücre ölümüne yol açabilmektedir. Bu radikal, daha az toksik olan H_2O_2 ve $\bullet\text{O}_2^-$ gibi öncül ROS'ların, geçiş metalleri (örneğin Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^+ , Cu^{2+}) eşliğinde katıldığı Haber–Weiss ve Fenton reaksiyonları sonucunda oluşmaktadır (Haber ve Weiss 1934; Smirnoff 1993). Dolayısıyla bitkiler $\bullet\text{OH}$ radikali ile mücadeleyi H_2O_2 ve $\bullet\text{O}_2^-$ radikalleri oluştuğunda, kısa sürede bunları detoksifiye ederek ve ortamda yüksek konsantrasyonda serbest metal iyonları bulundurmamaya çalışabilirler. Ayrıca H_2O_2 molekülünün yüksek seviyelerde bulunması, hücre zarındaki aquaporin kanalları yoluyla taşınabildiği için bitkinin farklı bölgelerine iletilerek oksidatif hasarın yayılmasına neden olabilir (Wudick vd. 2015). H_2O_2 hücre farklılaşması, yaşlanma, programlı hücre ölümü ve hücre duvarı oluşumu gibi süreçlerde de görev alır (Zeng vd. 2017). Ni stresine yanıt olarak aynı zamanda metilglioksal üretimi de artar ve bu bileşik bitkideki normal metabolik süreçleri aksatabilir (Nahar vd. 2016). Yüksek oranda metilglioksal üretimi DNA ve proteinlerin yapısını bozarak, mutasyonlara ve hücre yapısının oksidatif hasarına neden olur (Mustafa vd. 2023).

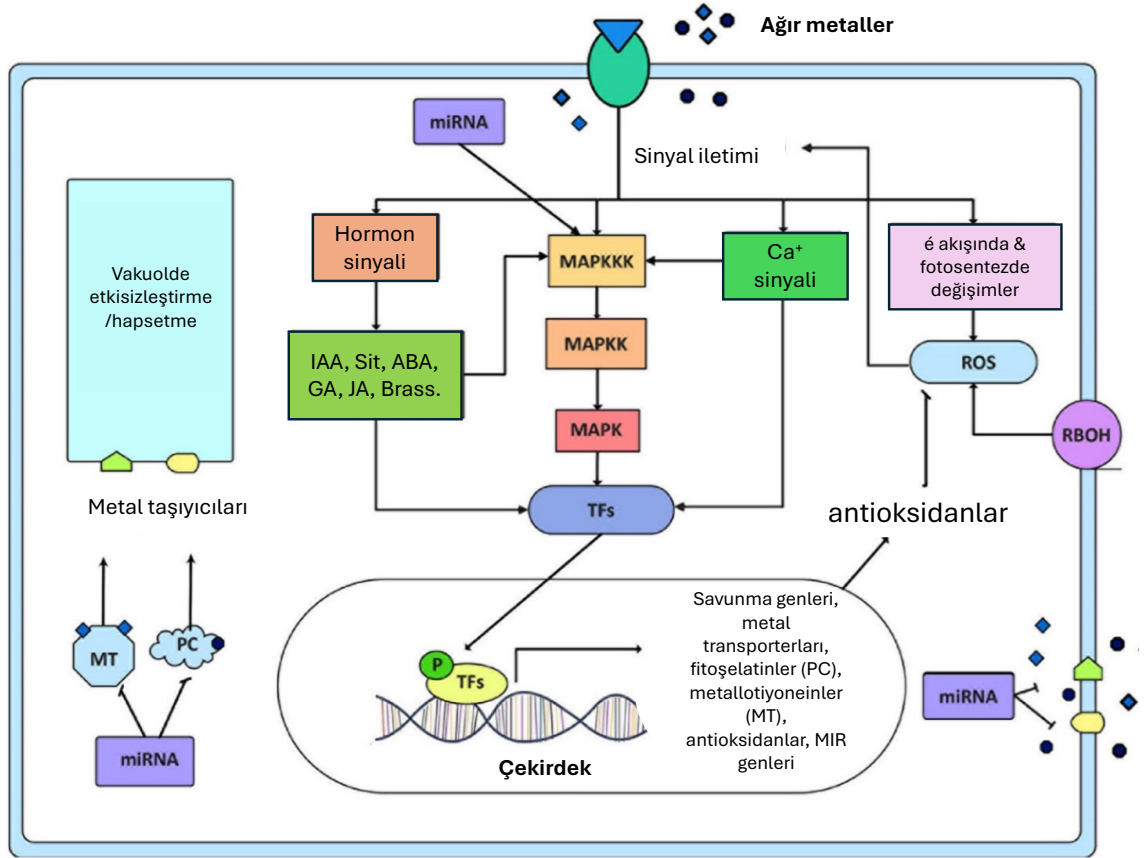


2.5. Sinyalizasyon

Bitkilerin metal stresiyle etkili bir şekilde mücadele edebilmeleri ve buna yönelik savunma mekanizmalarını aktive edebilmeleri için, öncelikle maruz kaldıkları metal stresini algılamaları gerekmektedir. Bu algılama süreci, hücresel düzeyde çeşitli sinyal iletim yollarının tetiklenmesiyle başlar ve stresin şiddetine bağlı olarak gen ekspresyonu, enzim aktivitesi ve metabolik düzenlemeler gibi savunma yanıtlarını harekete geçirir. Ağır metal stresine yanıt olarak ifade edilen çok sayıda gen tanımlanmış ve bu genlerin işlevleri transkriptomik/proteomik gibi moleküler tekniklerle araştırılmıştır. Bu yöntemler sayesinde bitkilerde ağır metal detoksifikasyonuna katkı sağlayan bazı hedef proteinler ve transkripsiyon faktörleri belirlenebilmiştir. Proteinlerin yanı sıra amino asitler, aminler, organik asitler, fenolik bileşikler, glutatyon, α -tokoferol ve serbest radikal süpürücü bileşikler gibi metabolitlerin de ağır metal stresine karşı toleransın artırılmasında önemli katkılar sunduğu bilinmektedir. Ancak bitkilerin bu tür streslere karşı verdikleri tepkilerin karmaşıklığı nedeniyle bu metabolitlerin birçok özelliği hala tam olarak anlaşılamamıştır (Roy vd. 2023).

Ağır metal stresinin hücre içi sinyalizasyonu çeşitli hücresel reseptörler aracılığıyla sağlanmaktadır. Ağır metaller hücrelere iyon kanalları ve zar proteinleri yoluyla girerek hücresel işleyişi bozmakta ve sonucunda ROS, Ca^{+2} , H^{+} ve bazı fitohormonlar moleküller sinyalizasyon yollarını aktive edebilirler (Şekil 2.8). Kinazlar, fosforilazlar ve fosfatazlar gibi çok işlevli enzimler ise bu sinyalleri ileterek transkripsiyon faktörleriyle ilgili genlerin ekspresyonuna ve ağır metal detoksifikasyonunda görevli peptit ve proteinlerin sentezini sağlarlar. Bu transkripsiyon faktörleri; metal taşıyıcıları, fitoşelatin sentazları, metalloitiyoneinleri, antioksidan enzimleri ve mikroRNA (miRNA/MIR) genleri gibi stresle ilişkili genlerin ifadesini düzenleyerek bitkinin strese karşı savunma yanıtını şekillendirir (Jalmi vd. 2018). Ayrıca, ağır metal varlığına bağlı olarak mitojene bağlı protein kinaz (MAPK) sinyaliyle hızlı şekilde sentezlenebilen transkripsiyon faktörleri de bulunmaktadır.

Kalsiyum düzeylerindeki değişimler, kalmodulin (CaM), kalsinörin B-benzeri proteinler (CBL) ve kalsiyum bağımlı protein kinazlar (CDPK) gibi Ca^{+2} sensörleri tarafından algılanır ve iletilir. Bu proteinlerin bitkilerdeki ağır metal yanıtlarında önemli rolleri bulunmaktadır (Steinhorst ve Kudla, 2014). MAPK kaskadı da MYB, ABRE, bZIP, DREB, NAC, MYC ve WRKY gibi transkripsiyon faktörlerini fosforile edebilme kapasitesi sayesinde, stres yanıtlarında önemli rol oynamaktadır (Roy vd. 2023). Ağır metal toksisitesi sonucunda oluşan ROS'lar IAA, etilen ve JA gibi fitohormonların sinyal yollarını etkileyerek metabolik süreçlerde aksamalara neden olabileceği gibi MAPK aktivitesini tetikleyerek antioksidan sistemlerin uyarılmasını da sağlayabilir. Singh ve Shah (2014) JA uygulamasının, pirinçte metal stresine karşı antioksidan yanıtı artırarak toleransı yükselttiğini bildirmiştir. Bitki büyümesini teşvik etmesinin yanı sıra, PGPB metal stresinde stresle ilişkili genlerin ekspresyonunu artırarak önemli katkılar sağlamaktadır. Örneğin, *Bacillus amyloliquefaciens* ile inoküle edilen pirinç bitkilerinde MAPK5 ekspresyonu artmıştır (Nautiyal vd. 2013). *Pseudomonas fluorescens* ve *P. putida* inokülasyonu *Arabidopsis* bitkisinde Ca ve CaM bağımlı *At3g57530* geninin ekspresyonunu etkilemiştir (Srivastava vd. 2012). Ayrıca PGPB uygulamalarının, JA ve absisik asit (ABA) gibi fitohormon düzeylerini de etkileyerek bitkinin stres toleransını artırdığı belirlenmiştir (Tiwari vd. 2016).



Şekil 2.8. Bitkilerde ağır metal stresine karşı sinyal yollarının etkileşimi (Jalmi vd. 2018'ten değiştirilerek kullanılmıştır.)

2.6. Ağır Metal Stresine Karşı Tolerans Mekanizmaları

Bitkilerin ağır metallere karşı verdiği iki strateji vardır; kaçınmak veya tolerans. Bazı bitkiler rizosferdeki metallerin bünyelerine girişini engellemek için çeşitli yöntemler kullanırlar ve kirleticiden kaçınırlar. Böylece büyüme ve gelişmelerini sekteye uğratmadan yaşamlarına devam edebilirler. Diğer bir yöntem ise tolerans olup bünyelerine aldıkları ağır metallere karşı, geliştirdikleri savunma mekanizmaları ile mücadele ederek oluşabilecek toksisiteyi engellemek veya en aza indirmektir. Bitkilerin ağır metallere karşı oluşturdukları çok sayıda mekanizma bulunmaktadır. Bitkiler ağır metal stresıyla karşılaştıklarında bazı yapılar bariyer işlevi görebilir. Örneğin, tüyler (trikomlar), detoksifikasyon amacıyla ağır metallerin depolandığı alanlar olarak hizmet edebilir ya da metallerin toksik etkilerini azaltmak için çeşitli sekonder metabolitler salgılayabilir. Öte yandan, ağır metaller bu biyofiziksel bariyerleri aştığında ve metal iyonları dokulara ve hücrelere girdiğinde, bitkiler bu olumsuz etkileri ortadan kaldırmak ve hafifletmek amacıyla çeşitli hücrel savunma mekanizmalarını devreye sokabilir. Bu süreçte çeşitli hücrel biyomoleküllerin biyosentezi gerçekleşebilir ve bu moleküller metal toksisitesine karşı tolerans geliştirmek veya onu detoksifiye etmek için rol oynayabilir. Nikotianamin, putresin, spermin, muginik asitler, organik asitler, glutatyon, fitoşelatinler ve metallothioneinler gibi düşük molekül ağırlıklı metal taşıyıcı proteinler veya şelatlayıcılar ile flavonoid ve fenolik bileşikler, protonlar, ısı şok proteinleri, prolin ve histidin gibi bazı amino asitler ile salisilik asit, JA ve etilen gibi hormonlar hücrel

salgılar bu biyomoleküller arasında yer almaktadır (Emamverdian vd. 2015). Bu stratejilerin yanında, ağır metal toksisitesi ile mücadelede bitki hücreleri, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), guaiakol peroksidaz (GPOX veya POD) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimatik antioksidanlar ile askorbat (AsA), glutatyon (GSH), karotenoidler, alkaloidler, tokoferoller, prolin ve flavonoidler, tanenler ve lignin gibi fenolik bileşikler içeren enzimatik olmayan antioksidanlardan oluşan bir savunma sistemi geliştirmiştir. Hücrel metal detoksifikasyonunda görev alan bazı biyomoleküller çok işlevli olabilir ve aynı anda antiradikal, şelatlayıcı veya antioksidan özellikler gösterebilir. Bu mekanizmaların ve biyomoleküllerin kullanımı ve yukarı regülasyonu, bitki türüne, metal tolerans düzeyine, bitkinin gelişim evresine ve metale bağlı değişebilir.

2.6.1. Fitoşelatinler (PC)

Bitkilerin ağır metalleri detoksifiye etmek amacıyla kullandığı mekanizmalardan biri, kükürt (S) açısından zengin GSH molekülünden, fitoşelatin sentaz (PCS) enzimi aracılığıyla sentezlenen, düşük moleküler ağırlıklı, kısa zincirli ve tiyol bakımından zengin peptit olan fitoşelatinlerin üretilmesidir. Fitoşelatin (PC) peptitleri, ilk olarak bölünerek çoğalan bir maya türünde Cd bağlayan "Cadystin A ve B" molekülüleri olarak keşfedilmiş, ardından birçok bitkide Cd bağlayıcı komplekslerin başlıca bileşenleri olarak tanımlanmıştır (Inouhe 2005). Genel yapısı (γ -glutamil-sisteinil)_n-glisin ($n = 2$ ila 11) olan bu molekül, toksik seviyelerdeki ağır metallerle yüksek afiniteyle bağlanabilir. PC'lerin, metal homeostazı ve detoksifikasyonu sağlamasının yanı sıra, aşırı sıcaklık, tuzluluk, UV-B radyasyonu ve herbisit gibi diğer stres etmenlerine karşı da savunma amacıyla üretildiği bildirilmiştir (Zagorchev vd. 2013). Ayrıca PC'ler, bitkilerde ağır metal stresinin erken tespiti için biyomarker olarak kullanılabilir. PC üretimi sitozolde gerçekleşmekte olup, Metal-PC kompleksleri halinde Mg-ATP'ye bağımlı taşıyıcılar veya ATP-bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıları aracılığı ile vakuollere aktif taşınmaktadır.

PC'ler hem köklerde hem de toprak üstü organlarda sentezlenip birikebilir de çalışmaların büyük çoğunluğu ilk sentezin ve birikimin köklerde gerçekleştiğini göstermektedir. Fidalgo vd. (2013), *Solanum nigrum* L. bitkisinde, 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ Cu uygulaması sonrası köklerde PC üretiminin arttığını ve bunun aşırı Cu miktarının kökte sabitlenerek sürgün bölgelere taşınmasını engellediğini ortaya koymuştur. Böylece bitki için toksik metallerin fotosentez gibi hayati işlemlerin gerçekleştiği yapraklardan uzak tutulması sağlanabilmekte iken tarımsal üretim açısından ürünlerinin tüketilebilir kısımlarına toksik metallerin ulaşmasının önlenmesi açısından etkili olmaktadır. Diğer bir yandan, bazı çalışmalar zamana bağlı olarak ağır metal stresine uzun süre maruz kalan bitkilerde, PC düzeylerinin yapraklarda arttığını göstermektedir. Örneğin, Heiss vd. (2003), *Brassica juncea* (L.) Czern. bitkisinin uzun süreli ağır metal stresine maruz bırakılmasının, yapraklarda köklere göre 3 kat daha fazla PC birikimine yol açtığını göstermiştir. Bunlara ek olarak, bitkinin ağır metal fazlalığına karşı tolerans derecesinin, PC üretimi, birikimi, taşınma yeri ve bitkideki hareket yolu üzerinde belirleyici bir rol oynadığı bilinmektedir. Hiperakümülatör bitkilerde, kökten sürgüne doğru uzun mesafeli PC taşınımını içeren mekanizmaların etkili çalıştığı bildirilmiştir (Inouhe 2005). PC zincir uzunluklarının, bitkiler arasında ve ağır metal türlerine göre değişiklik gösterdiği bilinmektedir. Tütün (*N. tabacum*) fidelerinde en baskın oligomerin PC4 olduğu, *Arabidopsis*'te ise PC3'ün daha yüksek konsantrasyonda bulunduğunu bildirmiştir.

Baklagillerde, uzun zincirli PC'lerin, kısa zincirliye kıyasla Pb bağlama kapasitesinin daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Ancak yapılan çalışmalarda zincir sayısının PC'lerin etkinliği üzerindeki etkisi ile ilgili kesin bir kanıya varılamamıştır (Emamverdian vd. 2015).

2.6.2. Metallothioneinler (MT)

İlk olarak 1957 yılında at böbreğinden izole edilen metallothioneinler (MT), düşük molekül ağırlıklı, sistein bakımından zengin, sitoplazmik metal bağlayıcı proteinler veya polipeptitler ailesine ait olup; mantarlar, omurgasızlar, memeliler ve bitkiler dahil olmak üzere çok çeşitli ökaryotik organizmalarda ve bazı prokaryotlarda bulunmaktadır (Emamverdian vd. 2015). Enzimatik olarak sentezlenen peptitlerin ürünü olan PC'lerin aksine, MT'ler mRNA'nın translasyonu sonucunda sentezlenir. MT'ler, farklı organizmalarda farklı özellikler ve işlevler sergiler; ancak bitki MT'lerinin moleküler özellikleri ve yapısal çeşitliliği göz önüne alındığında, bitkilerde diğer organizmalara kıyasla daha fazla ve çeşitli işlevlere sahip oldukları anlaşılmaktadır. Bitkilerde bu ligandlar, hücrel sekestrasyon (hapsetme) yoluyla ağır metallerin toksisitesinin ortadan kaldırılması, hücre içi metal iyonlarının homeostazı ve metal taşınımının düzenlenmesi gibi süreçlerde rol alır. MT'ler, ağır metal detoksifikasyonundaki rollerinin yanı sıra, ROS temizliği, redoks seviyesinin korunması, plazma zarının onarımı, hücre proliferasyonu, büyümesi ve hasarlı DNA'nın onarımı gibi çeşitli hücrel olaylarda da aktif ajanlar olarak görev yapabilmektedir (Emamverdian vd. 2015). Dahası, ağır metal stresi dışında osmotik stres, kuraklık, aşırı sıcaklıklar, besin eksikliği, çeşitli hormonların salınımı, yaralanmalar ve viral enfeksiyonlar gibi birçok endojen ve ekzojen faktör de MT üretimini ve ekspresyonunu uyarabilir.

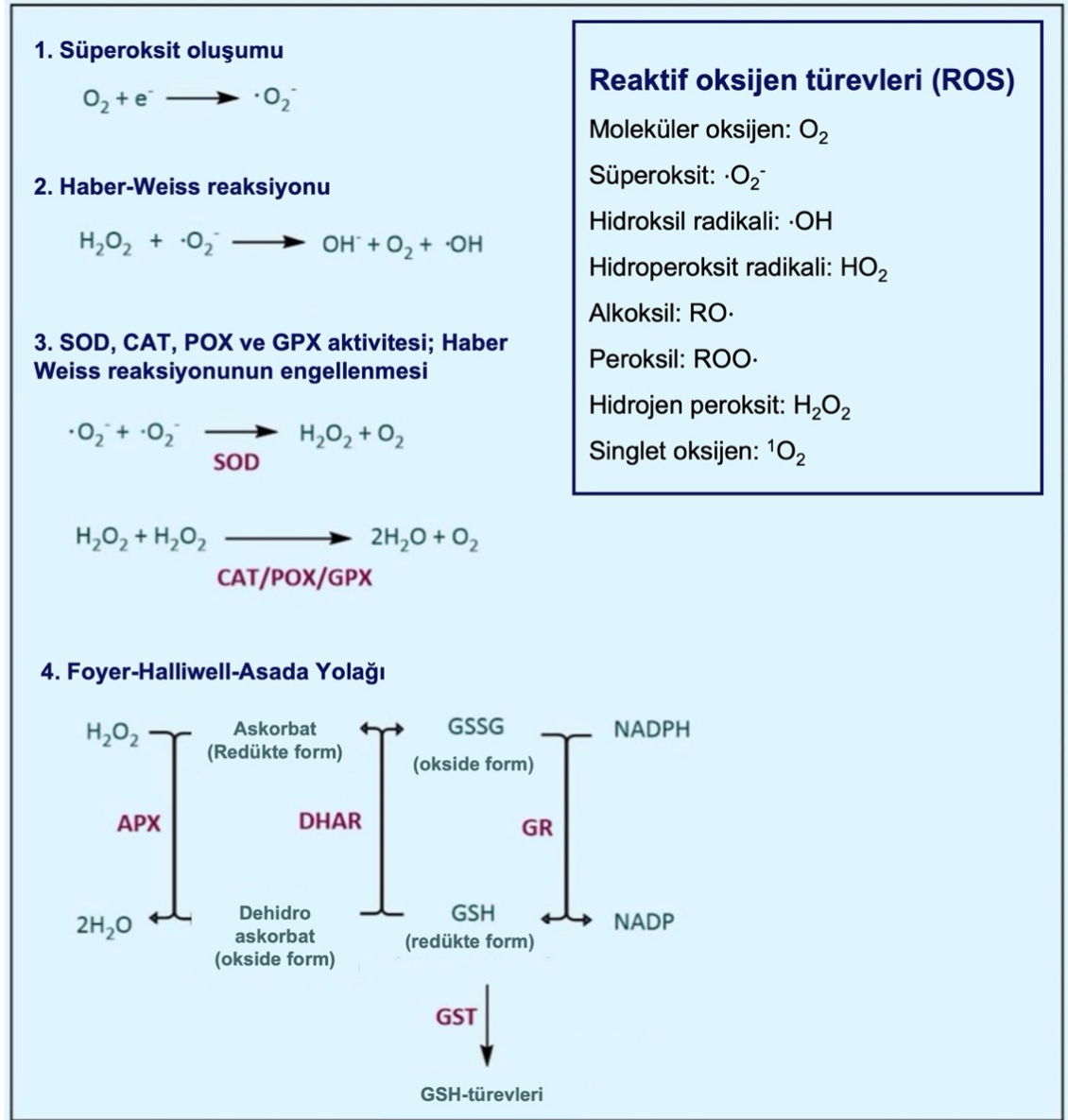
Bitkilerde, genellikle sistein rezidülerinin dizilimlerine göre dört ana alt gruba ayrılan birden fazla MT tipi bulunur. Bu tipler, organ ve gelişim evresi özgülüğü gösterirler: Tip 1 MT'ler esas olarak köklerde, Tip 2 MT'ler daha çok sürgünlerde, Tip 3 MT'ler yapraklarda ve meyve olgunlaşması sırasında, Tip 4 MT'ler ise gelişen tohumlarda ifade edilir. Bitki MT'lerinin yüksek sekans çeşitliliği dikkate alındığında her bir MT alt grubu daha küçük alt sınıflara ayrılır ve izoformlar olarak adlandırılır. Örneğin Guo vd. (2013) MT2'yi üç alt sınıfa (MT2-1, MT2-2 ve MT2-3) ayırmış, MT4 iki izoforma (MT4a ve MT4b) ayırmıştır. Tüm MT tipleri ve izoformlarının metallere bağlanabildiği ve şelatör/metal depo yapıları olarak işlev görebildiği düşünülmesinin yanında, MT'lerin farklı metallere karşı farklı davranışlar sergilediğini ve işlevlerinin, metal bağlama kapasitelerinin, metal-affinite özelliklerinin ve dokuya özgü lokalizasyonlarının bitki türleri arasında farklılık gösterebileceği de bilinmektedir. Grennan (2011), *Arabidopsis*'te Tip 1, Tip 2 (1a, 2a ve 2b) ve Tip 3'e ait MT izoformlarının Cu şelasyonu ile ilişkili olduğunu, Tip 4 (4a ve 4b) izoformlarının ise Zn bağlayıcı olarak işlev gördüğünü bildirmiştir. Dahası, García-Hernández vd. (1998), *Arabidopsis* mutantlarında MT1'in yaprak damarlarında Cu detoksifikasyonunda, yaprak mezofilinden daha önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir. Soya fasulyesinde, MT1, MT2 ve MT3'ün Cd detoksifikasyonunda, MT4'ün ise Zn bağlamada daha fazla görev aldığı belirlenmiştir (Pagani vd. 2012). Bu bulgular, farklı MT tiplerinin ve izoformlarının ağır metal homeostazı ve detoksifikasyonunda hem özgün hem de örtüşen işlevlere sahip olduğunu göstermektedir. Bitki MT'lerinin metallere karşı farklı ve seçici davranışlarının olası nedenlerini açıklamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulsa da bitkilerin genetik yapılarındaki farklılıklar, MT'lerin metal bağlama bölgelerindeki karmaşık çeşitlilik ve

izoformların dizi ile işlev farklılıklarının, bu özgün işlevselliklerin bir kısmını açıklayabileceği düşünülmektedir (Emamverdian vd. 2015). Ni stresinin bitkilerde MT gen ailesi ve PCS1 (fitoşelatin sentaz 1) gen ekspresyonu üzerindeki etkileri hakkında sınırlı sayıda araştırma vardır. Afonseca vd. (2024) artan Ni konsantrasyonlarına maruz bırakılan *A. thaliana* bitkisinin genç yaprakları ile yaptıkları RT-qPCR analizlerinde, yüksek Ni seviyelerinde *AtMT1A*, *AtMT2A*, *AtMT2B*, *AtMT3* ve *AtPCS1* genlerinin ekspresyonlarında farklı düzeylerde azalma olduğunu bildirmiştir. Genç yapraklarda bu genlerin Ni dozuna bağlı olarak farklı biçimlerde regüle edildiğini ve yüksek konsantrasyonların, çoğu gen üzerinde baskılayıcı etki göstermesine rağmen *AtMT1B* ve *AtMT1C* genlerinin artan ekspresyonlarının, bu gen ürünlerinin yapraklara ulaşan yüksek Ni seviyelerini kontrol altına almak için gerekli olabileceğini bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada ise Kim ve Kang (2018), 2 haftalık *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. bitkilerinin 100 µM nikel 24 sa maruz bırakılması sonucunda MT1A, MT1C, MT2A, MT2B ve MT3 genlerinin transkript düzeylerinde azalma gözlemlendiğini; ancak MT4A ve MT4B genlerinde herhangi bir değişikliğin olmadığını bildirmiştir. Bu sonuçlar için Afonseca vd. (2024), araştırmacıların farklı doku tiplerini ayırmaksızın tüm bitkiyi kullanmaları ve organlar arasındaki ağırlık farkları nedeniyle sürgün/kök oranlarının dengesiz olmasının, RNA'nın büyük ölçüde yapraklardan elde edilmesine yol açtığını ileri sürmüştür. Buna karşılık, Jaskulak vd. (2019), *Lupinus luteus* L. bitkisinin sürgünlerinde Ni uygulaması sonrası MT genlerinin ekspresyonunda artış olduğunu bildirmiştir. Her ne kadar farklı bitki türleri ile çalışılmış olsa da bu çelişkili sonuçlar, nikelin bitkiler üzerindeki etkilerinin ve ilgili gen ekspresyonlarının organ düzeyinde incelenmesinin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Kökler, ağır metal stresine ilk temas eden organlar olduğundan, bu organların yüksek düzeydeki metale karşı kendilerini koruma ihtiyacı nedeniyle MT gen ekspresyonunun arttığı düşünülmektedir. Yapraklarda gözlemlenen MT ve PCS1 ekspresyonundaki azalma ise bitki içinde köklerden sürgünlere MT ve PC taşınması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Özellikle MT1A, MT1C ve MT3 genlerinin köklerde nikel 24 sa maruz bırakılması sonucunda ekspresyon düzeylerinde artış gözlenmesi, bu gen ürünlerinin köklerdeki Ni içeriğini azaltmak amacıyla sürgünlere translokasyonunu sağlayan bir mekanizma olabileceği ileri sürülmüştür (Afonseca vd. 2024).

2.6.3. Antioksidan savunma sistemi

Bitkiler, hareketsiz olmaları nedeniyle biyotik ve abiyotik (ağır metal toksisitesi gibi) çevresel stres faktörlerinden uzaklaşamazlar. Bu stres etmenleri, bitkilerin büyüme-gelişim ve verimliliklerini doğrudan etkiler. Stres durumlarında hücresel homeostazis ve iyon dengesi bozulabilir. Dahası çeşitli fizyolojik işlemlerde gerçekleşen enerji akışlarında aksamalara neden olabilir ve bu gibi durumlar ROS birikimine neden olur. ROS birikimi ise hücresel organellerin yapısını ve işlevini bozarak membran peroksidasyonuna, biyomoleküllerin parçalanmasına ve nihayetinde hücre ölümüne neden olmaktadır. Bitkilerin bu toksik molekülleri etkisiz hale getirme kapasitesi, farklı stres koşullarına karşı toleranslarının belirleyici unsurlarından biridir. Bu bağlamda, antioksidan bileşikler serbest radikallerin neden olduğu zararlara karşı ilk savunma hattını oluşturarak bitki hücrelerinin işlevselliğini korumada kritik rol üstlenir. Bitkisel antioksidanlar, gelişimsel süreçleri destekleyen çok çeşitli biyolojik mekanizmalar aracılığıyla bitkilerin çevresel streslere adaptasyonuna katkı sağlar.

Bitkilerde ROS'ların neden olduğu oksidatif stresin etkilerini azaltmak amacıyla görev yapan çeşitli antioksidan enzimler bulunmaktadır. Bu enzimlerin üretimi, bitkiler oksidatif strese maruz kaldığında belirgin şekilde artar. ROS'lar, hem serbest radikalleri hem de radikal olmayan oksijen türevlerini içerir. Serbest radikaller arasında $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$, perhidroksil radikali (HO_2^-) ve alkoksi radikalleri bulunurken; radikal olmayan formlar ise H_2O_2 ve singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) gibi moleküllerdir (Şekil 2.9). Bu zararlı türler, bitki hücrelerinin hem sitoplazmasında hem de organellerinde (örneğin kloroplastlar, mitokondriler ve peroksizomlar) üretilebilir ve birikebilir.



Şekil 2.9. Bitkilerde oluşan reaktif oksijen türevleri ve bunların detoksifikasyonunda görev alan bazı antioksidan enzimlerin katalizlediği temel reaksiyonlar (Rajput vd. 2021'den değiştirilerek kullanılmıştır.)

Kloroplastlar, bitki hücrelerinde ROS üretilen başlıca organellerdir. Fotosentetik elektron taşıma sistemi (ETS), ROS üretiminin önemli merkezlerinden biridir ve bu sistem özellikle $^1\text{O}_2$ ve $\bullet\text{O}_2^-$ gibi türlerin oluşumuna neden olabilir. Mitokondriyal elektron taşıma zinciri (mtETC) de içerdiği yüksek enerjili elektronlar sayesinde O_2 indirgemeye yeterli potansiyele sahiptir ve bu nedenle ROS üretiminin bir diğer kaynağıdır (Noctor vd. 2007). Ayrıca mitokondri matriksinde bulunan çeşitli enzimler de ROS oluşumuna katkı sağlayabilir. ROS üretimi yalnızca bu iki organelle sınırlı değildir; endoplazmik retikulum, hücre zarı, hücre duvarı ve apoplast gibi diğer hücresel yapılar da ROS üretiminde rol alabilir (Rajput vd. 2021). Bu radikaller oldukça reaktiftir ve hücresel bileşenlerle etkileşime girerek lipid peroksidasyonuna, proteinlerin yapısal bozulmasına ve DNA hasarına neden olabilir. Bu nedenle, bitkiler bu tür molekülleri etkisiz hale getirmek için SOD, CAT, POD ve GR gibi çeşitli antioksidan enzim sistemlerini devreye sokarak detoksifiye etmeye çalışırlar.

2.6.3.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

SOD (EC 1.15.1.1), süperoksit anyonunun H_2O_2 ve O_2 oluşturacak şekilde dismutasyonunu katalizler (Şekil 2.9). Dismutasyon reaksiyonları, aynı reaktan (burada $\bullet\text{O}_2^-$) üzerinde hem oksidasyon hem de indirgenme reaksiyonlarının gerçekleştiği biyolojik reaksiyonlardır. Bu reaksiyonlar sonucunda biri daha yüksek (O_2 gibi), diğeri ise daha düşük (H_2O_2 gibi) oksidasyon durumuna sahip iki bileşik oluşmaktadır. Bu enzim, bitkilerde stres kaynaklı oluşan $\bullet\text{O}_2^-$ serbest radikallerini temizlemeye yönelik en önemli enzimatik sistemlerden biri olarak kabul edilmektedir. Diğer antioksidan enzimler ile (CAT, POD gibi) eş zamanlı çalışarak hem $\bullet\text{O}_2^-$ hem de H_2O_2 gibi daha zararlı ROS'ların Haber-Weiss reaksiyonu yoluyla oluşumunu önlemektedir (Rajput vd. 2021). SOD, içerdiği metal kofaktörlere (örneğin Cu, Zn, Mn, Fe ve Ni) bağlı olarak farklı izoformlara sahiptir. Bu izoformlar arasında Cu/Zn-SOD, Mn-SOD ve Fe-SOD yer almaktadır (Fink ve Scandalios 2002). Ni-SOD'un gen dizisi diğer SOD'lardan farklı olup bakteriler ve siyanobakterilerde bulunduğu bildirilmiştir, ancak henüz yüksek yapılı bitkilerde rapor edilmemiştir (Zhou vd. 2017; Rajput vd. 2021). Cu/Zn-SOD sitoplazma, peroksizom, kloroplast ve apoplast; Fe-SOD kloroplast; Mn-SOD ise mitokondri matriksi ve peroksizomda bulunmaktadır (Stephenie vd. 2020). Dehury vd. (2012)'nin yaptığı filogenetik analiz, Mn- ve Fe-SOD'lar arasında homoloji olduğunu, Cu/Zn-SOD'un ise bunlardan farklı olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmada elde edilen filogenetik ağaca göre aynı bitki türünde birden fazla SOD izoformunun bulunması bu türlerin, farklı kofaktör bağımlı SOD'lar aracılığıyla çok yönlü antioksidan savunma sistemleri geliştirdiklerini düşündürmektedir. Özellikle Fe-SOD ve Mn-SOD izoformları, genellikle mitokondri ve kloroplast gibi ROS üretiminin yoğun olduğu organellere lokalize oldukları için, bu proteinlerin filogenetik olarak korunmuş yapısı, stres koşullarında içsel savunma kapasitesinin güçlülüğünü yansıtabilir. Yine aynı çalışmada Cu/Zn-SOD'lar ayrı ve tutarlı bir küme (Cluster I) oluşturmakta ve genetik olarak birbirlerine daha yakın bir gruba temsil etmektedir. Bu durum, Cu/Zn-SOD gen ailesinin Fe ve Mn bağımlı SOD izoformlarından farklı bir evrimsel yol izlediğini ve muhtemelen ökaryotik bitki evriminde daha özelleşmiş bir role sahip olduğunu düşündürmektedir. Bu kofaktörlerin rolü, ara ürünlerin metabolizmasında geçici bağ oluşumunu stabilize etmektir. Ni, Cu, Zn, Mn ve Fe gibi metaller genellikle +2 değerliğe sahiptir; çünkü kararlı bir elektron konfigürasyonu için iki elektron kaybederler. $\bullet\text{O}_2^-$, fazladan bir elektrona sahiptir ve bu elektronlar reaksiyon ara ürünleri sırasında kofaktörlere

aktarılabılır. Sonuçta, bu fazla elektronlar H_2 ile birleşerek H_2O_2 oluşturur ve O_2 serbest bırakılır.

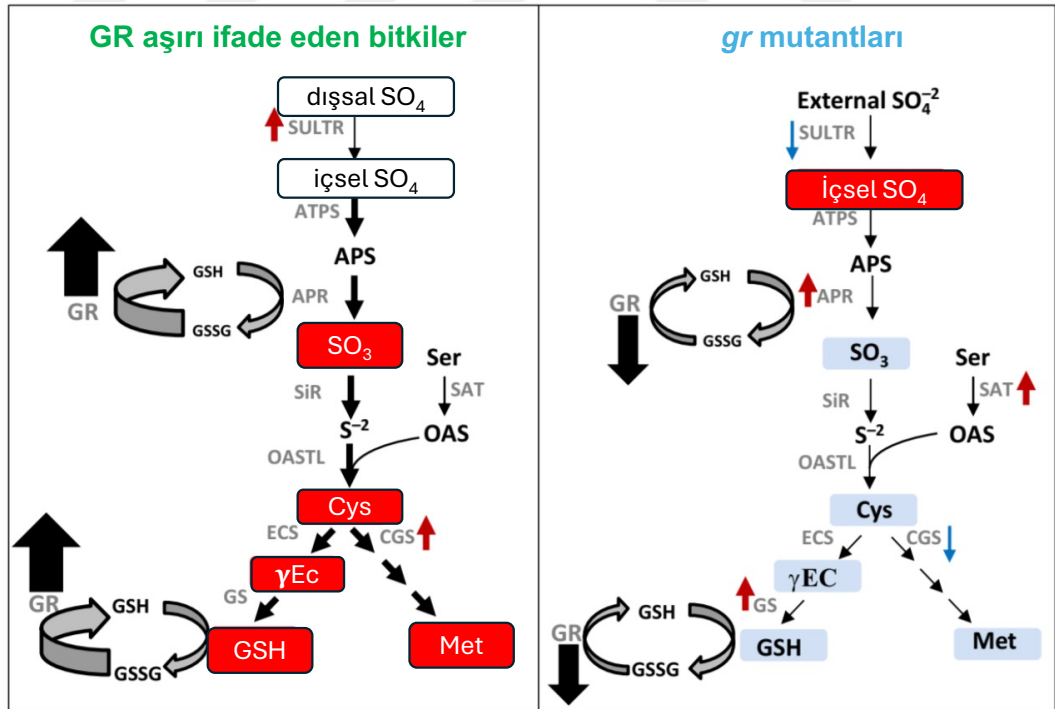
2.6.3.2. Peroksidazlar

Bitki peroksidaz ailesi, fonksiyonlarına ve yapısal özelliklerine göre üç ana sınıfa ayrılır: Sınıf I peroksidazlar, genellikle askorbik asit peroksidaz (APX) ve glutatyon peroksidaz (GPX) gibi antioksidan savunmada görev alan enzimleri içerir ve sitoplazma, kloroplast veya mitokondri gibi organellerde bulunur. Sınıf II peroksidazlar daha çok mantarlarda bulunur ve lignin yıkımı gibi süreçlerde görev alırken, bitkilerde bu sınıfa ait enzimler nadirdir. Sadece bitkilere özgü olan Sınıf III peroksidazlar ise hücre duvarında, apoplastta veya vakuolde yer alır; lignin ve süberin sentezi, patojen savunması ve hücre duvarı modifikasyonu gibi pek çok fizyolojik süreçte önemli roller üstlenmekle birlikte bitki peroksidazları (POD; EC 1.11.1.7), H_2O_2 'yi temizlemek için ekstraselüler alanda çalışan tek gruptur (Rajput vd. 2021). Peroksidazlar, endoplazmik retikulum ve golgi aygıtı üzerinden sentezlenen ve ardından hücre dışı alana ya da vakuollere taşınan glikoproteinlerdir. Doğal formunda POD, çoğu bitkide 300–350 amino asitten oluşan tek bir polipeptit olarak görev yapar. Bazı istisnai örnekler de bildirilmiştir. Örneğin *Fagopyrum esculentum* türünden karakterize edilen POD'un, 46.1 ve 58.1 kDa moleküler ağırlığa sahip iki izoenzimi (POD I ve POD II) bulunmuştur ve optimum aktivite sıcaklıkları 30°C (POD I) ve 10°C (POD II) olarak belirlenmiştir (Pandey vd. 2011). Ölçüm kolaylığı nedeniyle deneysel çalışmalarda yaygın olarak kullanılan guaiakol peroksidaz, guaiakol (o-metoksifenol) molekülünü elektron verici substrat olarak kullanarak, H_2O_2 'nin indirgenmesini sağlayan bir bitki peroksidaz enzimidir. Antioksidan mekanizma açısından bakıldığında, askorbat-glutatyon sistemi Foyer-Halliwell-Asada yolağı aracılığıyla redoks homeostazını sağlayan başlıca sistemi oluştururken; flavonoidler, fenolik bileşikler ve POD enzimleri ise bitkilerin aşırı H_2O_2 ile başa çıkmasında ikinci savunma hattını oluşturmaktadır (Agati vd. 2012). Bununla birlikte POD, bitki büyümesi ve gelişmesinde çok çeşitli roller üstlenir. H_2O_2 molekülünün detoksifikasyonu ve redoks dengesinin sağlanmasının yanı sıra bu enzim ailesi, hücre duvarı çapraz bağlanması, hücre duvarının gevşemesi, lignifikasyon, süberizasyon ve oksin yıkımında da rol oynar. POD, H_2O_2 molekülünü elektron alıcısı olarak kullanarak fenolik substratların oksidasyonunu katalizler ve bu yolla H_2O_2 molekülünü temizler. Bu süreç sonucunda monodehidroaskorobil radikali (MDHA), askorbat ve dehidroaskorbat (DHA) gibi ürünler ile lignin ve süberin gibi fenolik bileşiklerin çapraz bağlanma (cross-linking products) ürünleri oluşur. Bu çapraz bağlanma ürünleri, hücre duvarını güçlendirerek bitkinin kuraklık, tuzluluk, ağır metal stresi ve patojen saldırılarına karşı savunmasını artırır. Ayrıca bu yapıların oluşumu, lignifikasyon, süberizasyon ve hücre duvarı modifikasyonu gibi gelişimsel süreçlerde de kritik öneme sahiptir (Rajput vd. 2021).

2.6.3.3. Glutatyon redüktaz (GR)

Glutatyon redüktaz (GR; EC 1.8.1.7), NADPH bağımlı bir flavoprotein oksidoredüktaz enzim olup, askorbat-glutatyon yolunun önemli bir bileşenini oluşturmaktadır. GR, oksitlenmiş glutatyonu (GSSG; dimerik) indirgenmiş glutatyon (GSH; monomerik) dönüşümü katalizler. Bu enzim birçok bitkide tanımlanmış olup, doğal hâlinde her biri bir flavin adenin dinükleotid (FAD) içeren homodimerler (100–150 kDa moleküler ağırlıkta) şeklinde bulunmakta, aktif bölgesinde ise iki sistein kalıntısı

barındırmaktadır. GR'nin katalizlediği reaksiyon, “Ping-pong” mekanizmasıyla iki aşamada gerçekleşmektedir. Ping-pong mekanizması (veya diğer adıyla çift yer değiştirme mekanizması, double displacement mechanism), enzimatik reaksiyonlarda görülen bir kinetik mekanizmadır. Bu mekanizmada, enzim önce bir substratla reaksiyona girer, onunla etkileşime geçerek bir ürün oluşturur ve enzimin yapısını değiştirir. Daha sonra, bu modifiye enzim ikinci bir substratla etkileşerek ikinci ürünü oluşturur ve tekrar eski hâline döner. GR bağlamında, ilk aşamada, FAD molekülü NADPH tarafından indirgenmektedir. İndirgenen FAD, elektronları aktif bölgedeki sistein tiol grubuna aktarmaktadır. İkinci aşamada ise GSSG, tiol-disülfid değişim reaksiyonu yoluyla indirgenmektedir; bu sırada, dimerik GSSG, GSH'ye dönüştürülmektedir (Gill vd. 2013). Cohen vd. (2020), yaptıkları çalışmada GR'nin antioksidan savunmanın yanı sıra çok önemli metabolizmal bir rolünü de ortaya koymuşlardır (Şekil 2.10). Sistein, S asimilasyonu sürecinde sentezlenen ilk aminoasit olup, GR'nin adenosin 5'-fosfosülfat redüktaz (APR) enziminin aktivitesini destekleyerek S asimilasyonunda önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. GR, GSSG'yi tekrar GSH'ye dönüştürerek APR için gerekli elektron kaynağını sağlamakta, böylece S asimilasyonu sürecinde pozitif geri besleme döngüsü oluşturmaktadır. S metabolizması, bitkilerde metal toleransı açısından hayati bir rol oynamaktadır çünkü bu metabolik yol, ağır metal stresine karşı savunma sistemlerinin temel bileşenlerini üretmekte kullanılır. Özellikle GSH ve PC'ler, S içeren bileşikler olup ağır metallerin şelatörleri olarak görev yaparlar. S metabolizmasının bir ürünü olan sistein, hem GSH hem de diğer savunma bileşiklerinin sentezi için öncü molekül olarak işlev gördüğünden S alımı, taşınımı ve asimilasyonu gibi süreçlerin düzenlenmesi, bitkinin metal stresine karşı tolerans geliştirmesinde önem taşımaktadır.



Şekil 2.10. *Arabidopsis* bitkisinde glutatyon redüktaz (GR) aktivitesindeki değişimin sülfür asimilasyon yoluna etkisi. Kırmızı artmış, mavi ise azalmış metabolit düzeylerini; kırmızı ve mavi oklar ise gen ekspresyon düzeylerindeki artış ve azalışları göstermektedir (Cohen vd. 2020'den değiştirilerek kullanılmıştır.)

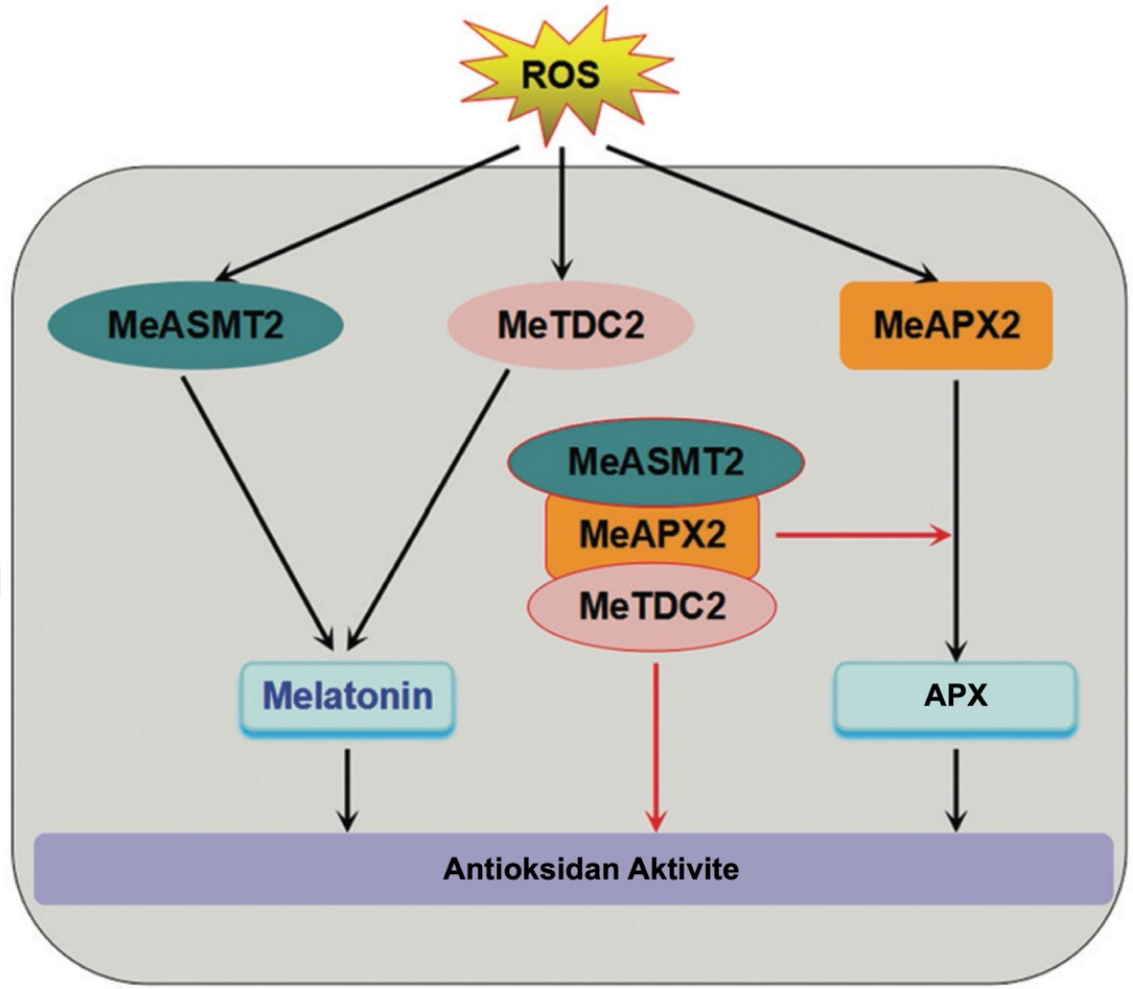
GR aktivitesinin büyük bir kısmı (%80) fotosentetik dokularda, özellikle kloroplastlarda gerçekleşmekte; bununla birlikte sitozol, çekirdek, peroksizom ve mitokondride de bulunmaktadır. *Arabidopsis* bitkisinde GR proteinleri, N-terminal sinyal dizisinin varlığına göre GR1 ve GR2 olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. GR1, daha kısa yapılı olup sitozol, çekirdek ve peroksizomlarda bulunmakta; GR2 ise kloroplast ve mitokondriye taşınmasını sağlayan transit peptit dizisini içermektedir (Trivedi vd. 2013).

2.6.3.4. Askorbat peroksidaz (APX)

Askorbat peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11), sınıf I hem-peroksidazlardan biridir ve AsA bağımlı peroksidaz olarak da bilinir. Bu enzim, bitki hücreleri içinde hem H₂O₂ detoksifiye edici hem de redoks değişimlerinin bir algılayıcısı olarak işlev görür ve Foyer-Halliwell-Asada yolağının anahtar enzimi olarak kabul edilir. APX, H₂O₂ molekülünü suya indirgemek için spesifik bir elektron vericisi olarak askorbatı kullanır. Askorbat yokluğunda APX kararsız hale gelir ve askorbat konsantrasyonu 20 µM'nin altına düştüğünde hızla aktivitesini kaybeder. Benzer şekilde, Fe de APX aktivitesi için gereklidir. Bu enzim, bitkilerde sitozol, mitokondri, kloroplast, peroksizom ve glikoksizom gibi farklı alt hücrel bölgelelerden bildirilmiştir (Rajput vd. 2021). APX'in katalizlediği reaksiyon sırasında, MDHA bir ara ürün olarak oluşur ancak MDHA kararsızdır ve kendiliğinden DHA'ya dönüşür. Ayrıca yapılan bir araştırma, lignin biyosentezinde görevli olan 4-Kumarat 3-hidroksilaz enziminin aynı zamanda sitozolik APX aktivitesi gösterdiğini ve hem askorbatı hem de 4-kumaratı benzer oranlarda okside edebildiğini ortaya koymuştur (Barros vd. 2019).

Bitkilerde ROS dengesi ile temel fizyolojik süreçler arasında karmaşık ve hassas bir ilişki bulunmaktadır. Özellikle antioksidan savunma sisteminin etkinliği, fotosentetik performansın korunmasında kritik bir rol oynamaktadır. Guo vd. (2020)'nin yaptığı çalışma sonucunda *Gossypium sp.* bitkisinde, ROS seviyesi ile fotosentetik aktivite arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Sitozolik APX'in RNA müdahalesi (RNAi) ile inhibe edilmesi, stoma hücrelerinde ROS seviyesinin artmasına neden olmuş; bu da stomaların açılmasını engelleyerek CO₂ alımını azaltmış ve dolayısıyla fotosentezi düşürmüştür. Bu çalışma, antioksidan sistemdeki tek bir enzimin önemini ve bitki büyümesi ve verimi üzerindeki etkilerini göstermektedir.

Bitkilerde melatonin sentezinin stres koşullarıyla başa çıkmada yardımcı olduğu bilinmektedir. Ancak melatoninin bir antioksidan enzimle doğrudan ilişkisi Bai vd. (2020) tarafından ortaya konulmuştur. *Manihot esculenta* Crantz bitkisinin melatonin biyosentezine katılan iki enzimin (MeTDC2 ve MeASMT2), APX (MeAPX2) ile doğrudan etkileşim gösterdiği ve bu etkileşimin saflaştırılmış APX'e kıyasla enzimatik aktiviteyi önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir. Bu durum, MeTDC2–MeAPX2 ve MeASMT2–MeAPX2 etkileşimlerinin yani protein-protein etkileşimlerinin APX aktivitesini aktive ederek bitkinin antioksidan kapasitesini artırdığını göstermiştir. Altaf vd. (2021)'in Ni stresi altında yetiştirilen domates bitkisinde yaptığı çalışmada melatoninin sadece APX üzerinde değil (Şekil 2.11); SOD, GR, CAT gibi diğer antioksidan enzimler üzerinde de uyarıcı etkisi olduğu gösterilmiştir. Böylece oksidatif stres ile tolerans artırılmış ve bitkinin büyüme parametrelerinde önemli iyileşmeler kaydedilmiştir.



Şekil 2.11. ROS tarafından melatonin sentezinden sorumlu MeASMT2 ve MeTDC2 enzimleri ile askorbat peroksidad (MeAPX2) geninin ekspresyonunun artırılması; bitkinin oksidatif strese karşı toleransında protein-protein etkileşimlerinin stres yanıtındaki rolü (Bai vd. 2020)

2.6.4. Sekonder metabolitlerin metal toleransındaki rolü: Antosiyanin ve flavonoidler

Bitkilerdeki sekonder metabolitler (PSM), bitki büyüme ve gelişmesi ile doğrudan ilgisi bulunmayan geniş bir organik molekül sınıfını tanımlamaktadır. PSM'ler, genellikle fenoller, terpenoidler, steroidler, alkaloidler ve flavonoidler gibi makromolekül ailelerini içermektedir. Bu gruplar, bitkilerde farklı biyolojik işlevler üstlenen ve çevresel streslere, patojenlere veya zararlılara karşı savunma sağlayan bileşiklerdir. PSM'ler bitkilerde stres yanıtı ile ilgili birçok alanda görev alırlar (Li ve Ahammed, 2023).

Antosiyaninler, flavonoid ailesine ait bir sekonder metabolittir. Bitkilerde antosiyanin biyosentezi, genellikle MBW olarak kısaltılan üç tip transkripsiyon faktörü (MYB/bHLH/WD40) tarafından kontrol edilir. Bu faktörler, antosiyanin biyosentezine ait yapısal genlerin transkripsiyonunu düzenler. ROS'lar sinyal molekülleri olarak stres sinyalizasyon yollarına katılabilir, MAPK yolu aracılığıyla söz konusu

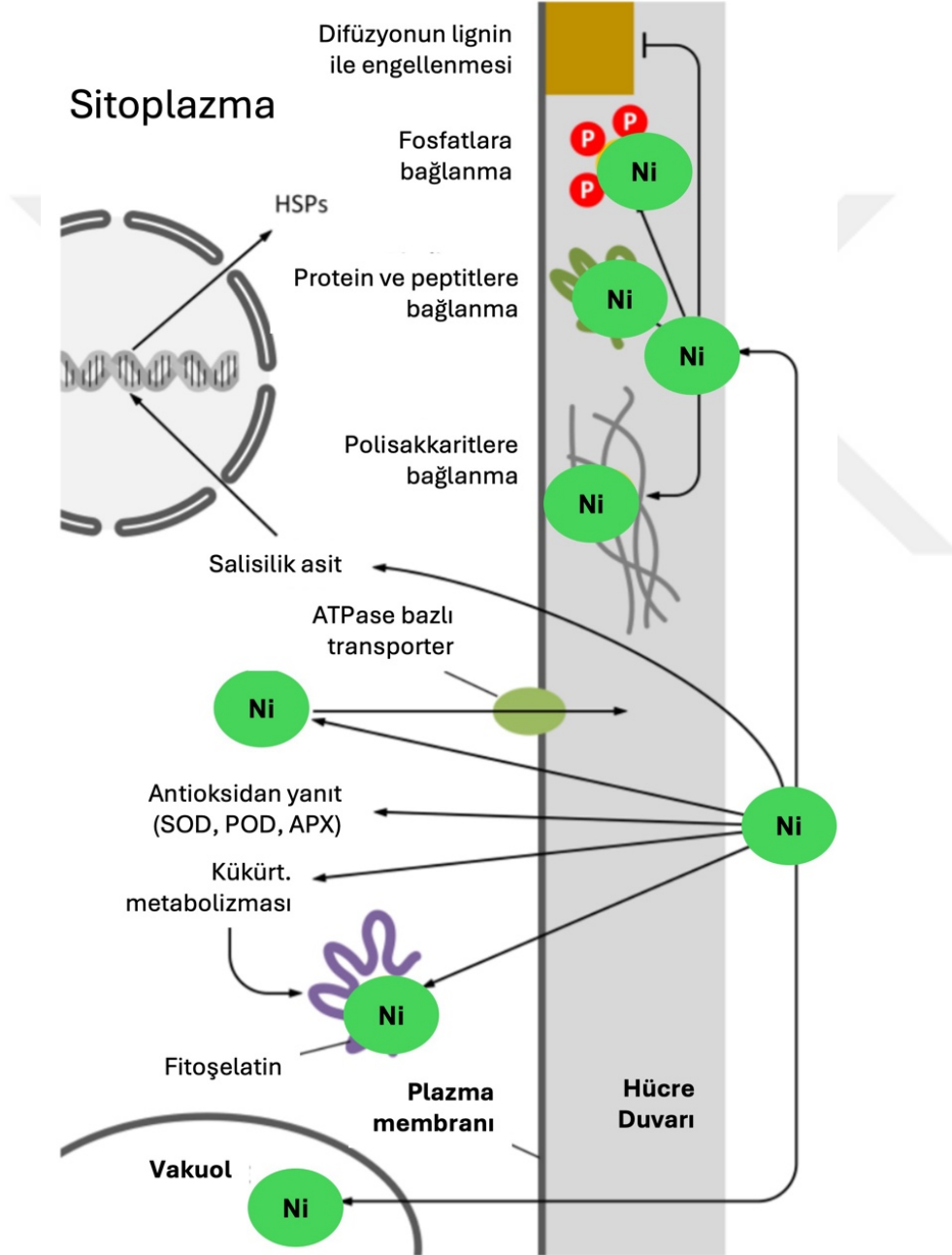
MYB/bHLH/WD40 gibi transkripsiyon faktörlerini düzenleyerek antosiyaninle ilişkili genlerin transkripsiyonunu teşvik eder ve sonuç olarak antosiyanin sentezini indükleyerek bitkinin strese adaptasyonuna katkı sağlarlar (Zuluaga vd 2008). Bu katkı yalnızca UV radyasyonundan koruma veya ROS hasarlarına karşı antioksidan aktivite olarak değil, aynı zamanda metallerle şelat oluşturarak metal detoksifikasyonunda rol oynayarak da olabilmektedir (Li ve Ahammed, 2023). Antosiyaninler, metal iyonlarıyla kolayca şelat yapabilen bir polifenol yapısına sahiptir; özellikle B halkasındaki orto hidroksil grubu, metal iyonlarıyla doğrudan şelat oluşturabilir. Metal-koordineli antosiyanin kompleksi (MAC) ismi verilen bu yapı ile hücredeki serbest metal iyonlarının seviyesi azalmakta, toksik metaller periferel hücre kısımlarında yer alan vakuollere taşınarak fizyolojik olarak daha az hassas dokularda izole edilebilmektedir (Landi vd. 2019; Li ve Ahammed, 2023).

Normalde antosiyaninler, Fe ve Cu gibi geçiş metalleriyle kompleks oluşturabilir ve Fe^{+2} gibi iyonların H_2O_2 ile tepkimeye girerek $\bullet OH$ üretmesini ifade eden Fenton reaksiyonunu engeller. Böylece ROS miktarının artışı önlenir ve biyomoleküller oksidatif hasardan korunabilir. Buna karşın, özellikle yüksek konsantrasyonda antosiyanin birikimi olduğunda, yüksek pH ve ışık varlığında pro-oksidan davranış gösterebilirler. Bu durum, ağır metal stresi altında doğrudan ve dolaylı mekanizmalarla artan ROS seviyelerinin, antosiyaninlerin aşırı birikimiyle birlikte daha da yükselmesine neden olabilir; bu da proteinlerin oksidasyonuna ve DNA hasarına yol açarak hücre düzeyinde oksidatif krize neden olabilir. Yapılan bir araştırmada, antosiyanin aşırı birikiminin baskılanmasının, JA sinyal yoluyla MBW kompleksinin regülasyonu ile ilişkili olduğunu ve bu mekanizmanın pirinçte Cr stresini hafifletmeye katkı sağladığı gösterilmiştir (Zang vd. 2022).

2.6.5. Ağır metal toleransında sessiz kalkan: hücre duvarı

Ağır metal stresi altında bitkilerde gözlenen savunma yanıtlarının önemli bir parçası, hücre duvarında gerçekleşen yapısal ve kimyasal değişikliklerdir. Bu süreçte özellikle lignin, pektin ve süberin gibi sekonder metabolitler, bitkiyi toksik iyonların zararından koruyan kritik bileşikler olarak öne çıkar. Fenilpropanoid yolak üzerinden sentezlenen lignin, hücre duvarının sertliğini ve hidrofobikliğini artırarak geçirgenliği azaltır; bu da ağır metallerin apoplastik yolla ksilem dokusuna geçişini sınırlar. Hiperakümülatör bitkilerde lignin ve süberin biyosentezine ilişkin genlerin yüksek düzeyde ifade edildiği, bu durumun kök endodermisinde karakteristik lignifikasyon ve süberizasyon desenleriyle sonuçlandığı gösterilmiştir. Lignin oluşumu, fenilpropanoid yolak üzerinden sentezlenen monolignollere dayanmakta olup, bu metabolik yolun aktivasyonu genellikle ağır metal stresiyle tetiklenmektedir. Bu bulgular, lignifikasyonun metal stresine karşı fizyolojik bir adaptasyon olduğunu ortaya koymaktadır (Berni vd. 2019). Birincil hücre duvarlarında meydana gelen modifikasyonlardan biri de düşük metil esterleşmiş, asidik karakterdeki pektinlerin miktarında artıştır. Şekil 2.12’de de verildiği gibi bu pektinler özellikle $+2$ değerlikli ağır metal iyonlarını (Ni^{+2} gibi) “yumurta kutusu (egg-box)” modeli olarak tanımlanan yapılar içerisinde bağlayarak, hücre duvarında hapsedmektedir (Parrotta vd. 2015). Bu durum, ağır metallerin sitoplazmaya geçişini engelleyerek bitki hücrelerini toksik etkilerden koruyan pasif bir bariyer mekanizması oluşturur. Benzer şekilde, süberin endodermis hücrelerinde birikerek metal iyonlarının kökten gövdeye taşınmasını engelleyen ek bir fiziksel ve kimyasal bariyer oluşturur. Bu sekonder metabolitlerin birikimi, sadece pasif bir koruma sağlamaz; aynı zamanda ağır

metal iyonlarını bağlayarak bitki dokularında lokalize edilmesini ve sistemik yayılımının engellenmesini mümkün kılar. Dolayısıyla, lignin ve süberin gibi bileşiklerin hücre duvarında birikimi, ağır metal toleransının kazanılmasında etkin bir adaptif savunma mekanizması olarak değerlendirilmektedir (Berni vd. 2019). Dahası, kök musilajı, metal adsorpsiyonunda önemli rol oynayan bir diğer faktördür ve bu durum, ayçiçeğinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Yang ve Pan 2013). Berni vd. (2019), köklerin yapısal farklılıklarının, bitkiler arasında metal taşınımındaki farklılıkları ve aynı taksonomik grup içindeki türler arasında bile bu taşınımın neden değişkenlik gösterebileceğini açıklayabileceğini öne sürmüştür.



Şekil 2. 12. Hücre duvarının metal toleransındaki rolü (Parrotta vd. 2015'ten değiştirilerek kullanılmıştır.)

2.6.6. Organik asitler

Bitkilerin Ni fitotoksitesine yanıt olarak geliştirdiği tolerans mekanizmalarından biri de organik asit üretimidir. *Stackhousia tryoni* Bailey adlı hiperakümülatör bitkinin ksileminde bulunan nikelin yalnızca üçte birinin sitrat ile bağlandığı, ancak *Stackhousia acuminata* Sm. gibi çok daha başarılı Ni hiperakümülatörlerinin lateksinde neredeyse tüm nitratin sitrat ve diğer organik asitlerle kompleksleşmiş halde bulunduğu bildirilmiştir (Mustafa vd. 2023). Sitrik asit, çeşitli hiperakümülatör bitki türlerinde Ni taşınması açısından önemli bir şelatlayıcı olarak belirlenmiş olup (Shahzad vd. 2018) çeşitli çalışmalar farklı bitki türlerinde sitrik asit aracılığıyla Ni alımının arttığını bildirmiştir (He vd. 2012; Hassan vd. 2019). Bunun yanı sıra, buğdayın (*Triticum aestivum* L.) kökleri tarafından salgılanan malat miktarının, rizosfer ortamındaki Ni konsantrasyonu ile doğrudan ilişkili olduğu; rizosferden Ni uzaklaştırıldığında malat salgısının da azaldığı bildirilmiştir (Kumar vd. 2021). Bitkilerin köklerinden organik asit anyonlarının salınım mekanizmaları, nikelin rizosfere girişini değiştirmeye yönelik bir strateji olup farklı organik asitlerin (malat, oksalat ve sitrat gibi) nikeli şelatlama kabiliyetleri birbirinden farklıdır (Mustafa vd. 2023).

2.7. Konaktan Hedef Bitkiye: Hiperakümülatör Mikrobiyotasındaki PGPB ile Tarımsal Aspir Bitkisinde Fitoremediasyon Eksenli Kapasite Artışı

Bitkilerin Ni de dahil olmak üzere ağır metallerin sebep olabileceği hücrel toksisiteye karşı geliştirmiş oldukları çok sayıda ve birbiri ile ilişki halinde olan savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Bu savunma sistemlerinin etkinliği bitkiden bitkiye değişmekle birlikte bitkilerin simbiyotik veya kommensal kurduğu ilişkiler (PGPB veya mikorizal) bu sistemleri uyarabilmekte ve bitkinin metal stresi koşullarına karşı hem önceden hem de strese maruz kaldığı dönemde daha başarılı yanıt vermesini sağlayabilmektedir. Böylece, bitkinin metal akümülasyonu ve doğal ortamda hayatta kalma başarısı artarken; eğer söz konusu bitki tarımsal bir ürünse, tohum, lif, yağ gibi çıktılarının veriminde artış sağlanabilmekte ve aynı zamanda kontamine olmuş, düşük verimli alanlarda tarımsal üretim yapılması mümkün hale gelebilmektedir. Bu durum, fitoremediasyon tekniğinde kullanılan bitkiler için ise, hem sürecin maliyetini düşürebilecek hem de birim zamanda daha etkin remediasyon performansı gösterebilecektir. Kültür bitkileri arasında özellikle endüstriyel bitkiler (enerji bitkileri gibi) fitoremediasyon çalışmaları için birincil adaylardır (Angelova vd. 2015). Yapılan çeşitli araştırmalarda, *B. juncea*, *Helianthus annuus* L., *Brassica napus* L., *Zea mays* L., *Corchorus capsularis* L. gibi tek yıllık, metal toleransı yüksek tarımsal kültür bitkileri fitoremediasyon çalışmaları için aday gösterilmiştir (Vamerali vd. 2010; Angelova vd. 2015; Alaboudi vd. 2018; Saleem vd. 2020). Aspir bitkisinin (*Carthamus tinctorius* L.) de ağır metaller ile kirletilmiş topraklarda fitoremediasyon için gerekli potansiyele sahip bir bitki olduğu bildirilmiştir (Ciaramella vd. 2022; Madaan vd. 2011). Ülkemizde tarımsal üretimi yapılan yüksek biyokütleli, 9-23 adet kapituluma sahip ve her bir kapitulumunda 20 ile 30 tohum gelişen, 110-140 gün arasında kısa bir gelişim süresi olan, yağlı tohumlu bir multi biyo-enerji (etanol, biyogaz, biyodizel) bitkisi olmasının yanında (Ciaramella vd. 2022) kuraklık, tuz ve Ni tolerans kapasitesinin yüksek olduğu bildirilen aspir bitkisinden gıda, kozmetik, boya gibi pek çok endüstride de yararlanılmaktadır (Al Chami vd. 2015; Adalı 2016; Pourghasemian vd. 2019; Hashemi vd. 2020; Çulha-Erdal vd. 2021; Baran ve Ekmekçi 2022). Bu tez kapsamında, PGPB inokülasyonu ile aspir bitkisinin Ni toleransı ve fitoremediasyon kapasitesinin artırılması amaçlanmıştır.

Bu bağlamda, hiperakümülatör *C. ensiformis* bitkisinin endofitik bakteriyel kompozisyonuna dair bir çalışmanın ilk kez yapılmış olmasının yanı sıra, aspir bitkisinde Ni toksisitesi ve PGPB uygulamaları ile tolerans mekanizması arasındaki ilişkinin fizyolojik ve biyokimyasal temellerinin ilk defa bu kapsamda ortaya koyulmuştur. Bu doğrultuda, “Ni ile kirlenmiş düşük verim baskısı altındaki tarımsal alanların fitoremediasyonu için aspir bitkisine PGPB uygulanarak bitkinin Ni toleransının ve fitoremediasyon kapasitesinin artırılması sağlanabilir mi?” ana araştırma sorusuna eşlik eden hipotezler (1 ve 2) ve alt hipotezler (A, B, C ve D) ise aşağıda sıralanmıştır:

Hipotez 1. Toksik Ni koşullarında PGPB inokulasyonu ile aspir bitkisinin Ni fitoremediasyon kapasitesi artırılabilir.

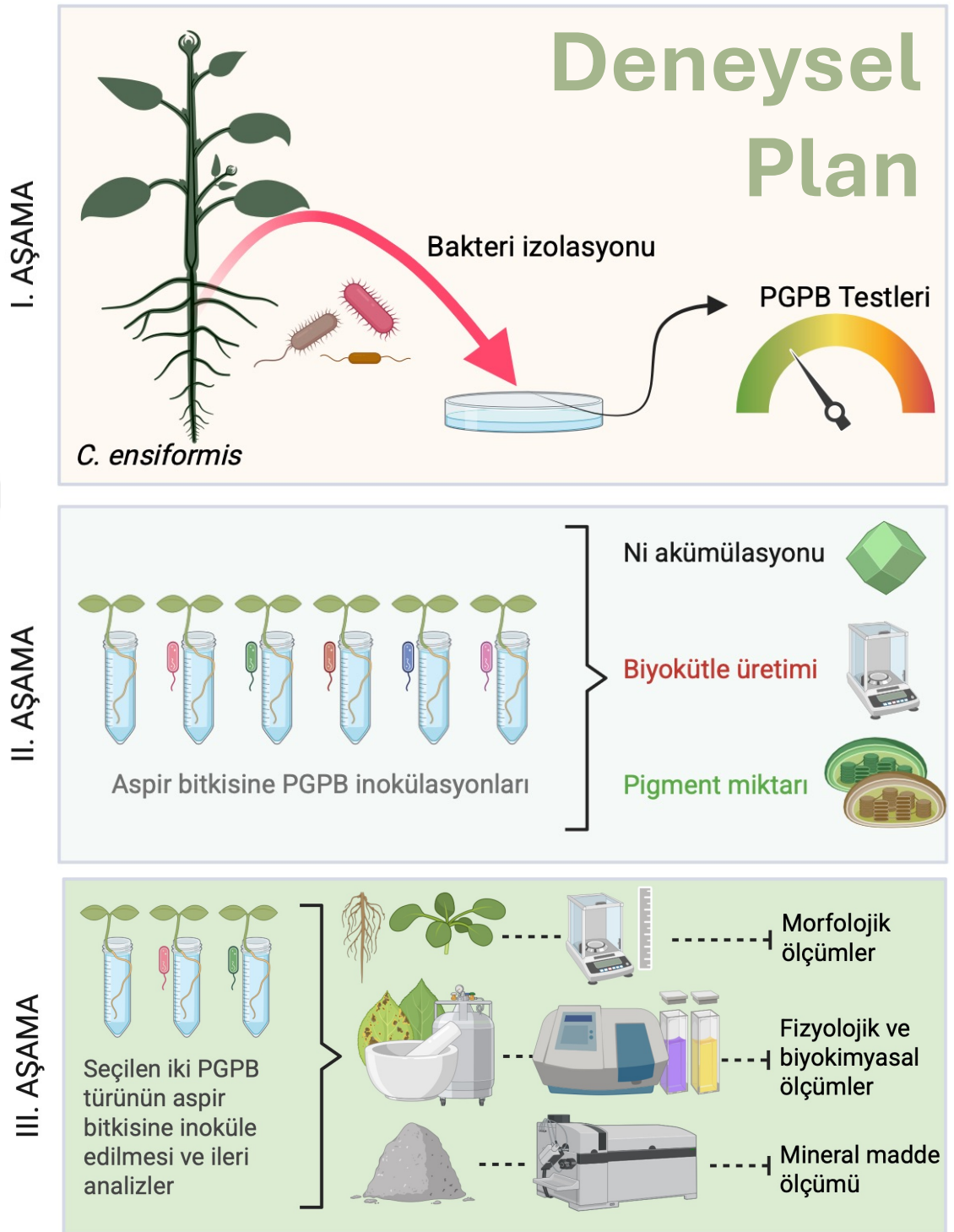
- A. PGPB’nin aspir bitkisinde Ni birikimini artırıcı yönde etkisi vardır.
- B. PGPB aspir bitkisinde toprak üstü organlara Ni translokasyonunu artırır.
- C. PGPB Ni uygulamasında aspir bitkisinin biyokütlesini artırır.

Hipotez 2. Toksik Ni koşullarında PGPB inokulasyonu ile aspir bitkisinin Ni toleransı artırılabilir.

- A. PGPB aspir bitkisinde antioksidant savunma bileşenlerinin aktivitelerini artırır.
- B. PGPB aspir bitkisinde fotosentetik performansı artırır.
- C. PGPB aspir bitkisinde membran hasarını azaltır.
- D. PGPB aspir bitkisinde oransal su içeriğini artırır.
- E. PGPB aspir bitkisinde pigment miktarını artırır.

Formüle edilen hipotezler, fizyolojik ve biyokimyasal yaklaşımlar ile test edilmiş; böylece PGPB inokülasyonunun, aspir bitkisinin Ni toksisitesine karşı toleransı ve fitoremediasyon kapasitesi üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Bu doğrultuda, üç aşamalı bir deneysel plan tasarlanmıştır (Şekil 2.13):

- **I. Aşamada**, hiperakümülatör *C. ensiformis* bitkisinden bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiş ve bu izolatlar arasından nikele dirençli ve PGPB özellikleri taşıyan suşlar belirlenmiştir.
- **II. Aşamada**, belirlenen PGPB suşları arasından yüksek potansiyele sahip beş farklı PGPB türü seçilerek aspir bitkisine inoküle edilmiş; ardından aspir-PGPB birlikteliğinin Ni stresi altındaki uyumu; bitki büyüme performansı, Ni akümüülasyon düzeyleri ve kritik bazı fizyolojik ölçümler ile değerlendirilmiştir.
- **III. Aşamada** ise, ikinci aşamada test edilen bakteriler arasından iki farklı PGPB türü, iki stratejik etki yönüne göre (Ni akümüülasyonunu artıran ve azaltan; fitoekstraksiyon ve fitostabilizasyon) seçilmiş; bu bakterilerle yapılan ileri analizler sonucunda, etki mekanizmaları fizyolojik ve biyokimyasal açılardan araştırılmıştır.



Şekil 2.13. Tez çalışmasının deneysel akış planı (biorender.com ile hazırlanmıştır.)

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Aşama I: PGPB Kültürasyonu

3.1.1. Hiperakümülatör bitkinin toplanması

Muğla ili Sandras Dağı'nda (37°02'843'' K; 28°47'024'' D) 1525 m yükseklikte 15.04.2023 tarihinde arazi çalışması yapılmış ve serpantin taşlı yamaçlardan *Centaurea ensiformis* L. (Ece sarıbaşı) bitkisi örnekleri rizosferi bozulmadan toplanarak laboratuvara ulaştırılmıştır. Yapılan arazi sonucu bulunan bitkinin doğadaki durumunu gösteren bir fotoğraf ve toplanan bitki örneklerinden hazırlanan herbaryum materyalinden (Aksoy 3245, AKDU) bir görsel Şekil 3.1'de sunulmuştur.

Doğadan toplanan *C. ensiformis* bitkisi laboratuvara getirilerek mikrobiyolojik iş paketleri gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda öncelikle endofitik bakteri izolasyonu yapılmıştır. Ardından izole edilen bakteri suşlarının PGPB niteliklerini belirleyebilmek için IAA üretim düzeyleri, fosfat çözünürlüğü aktivitesi, ACC deaminaz aktivitesi ve siderofor üretme kapasitesi belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Hiperakümülatör *C. ensiformis* bitkisinin serpantin topraklarda bulunduğu durumu (A, B) ve herbaryum materyali halini (C) gösteren fotoğraflar

3.1.2. Hiperakümülatör bitkiden bakteri izolasyonu

Bitkilerden bakteri izolasyonları Govarthan vd. (2016)'nın yöntemi takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle göre laboratuvara getirilen bitkilerin kök, gövde, yaprak gibi farklı organları distile su (dH₂O) ile yıkanarak temizlenmiştir. Yıkanan örneklerden 1'er g tartılmış ve %95'lik etil alkol ve %3 sodyum hipoklorit (NaOCl) içerisinde 3 dak bekletilerek sterilizasyonları gerçekleştirilmiştir. Numuneler 3 kez steril dH₂O ile durulanmıştır. Ardından tüm numuneler 5 mL %0.85 NaCl eklenerek havanda ezilmiştir. Elde edilmiş özütlerden 1'er mL alınarak 9 mL %0.85 NaCl içerisinde seyreltilmiştir. Seyreltilmiş bitki özütleri 1 mM NiCl₂ içeren Nutrient Agar (NA) besiyerlerine 100 µL ekilmiştir ve 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından gelişme gösteren kolonilerin saf kültürleri elde edilerek gliserol stokları yapılmış ve -80°C'de saklanmıştır.

3.1.3. Bakteri izolatlarının PGPB niteliklerinin belirlenmesi

3.1.3.1. İndol-3-asetik asit (IAA) üretim düzeyinin belirlenmesi

IAA testleri Akbari vd. (2007) ve Akköprü (2012)'nin yöntemleri modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Buna göre ilk olarak izole edilen bakteri örnekleri NA besiyerinde 24 sa inkübe edilmiştir. Ardından taze büyütülmüş bakteri örnekleri OD 600'de 0.1 olacak şekilde ayarlanmış ve %0.1 L-triptofan çözeltisi içeren triptofanlı NB besiyerine (NBt) 100 µL eklenmiştir. Hazırlanan kültürler 30°C'de 150 rpm'de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından kültürler 4000 rpm'de 10 dak santrifüjlenmiştir ve elde edilen süpernatantlar Whatman 110 mm filtre kağıdından geçirilerek filtrelenmiştir. Filtre edilen solüsyonun 2 mL'sine 4 mL Salkowski ayracı (2 mL 0.5 M FeCl₃ ve 98 mL %35'lik HClO₄) eklenerek oda sıcaklığında karanlık ortamda 30 dak bekletilmiştir. Bekleme süresinin ardından OD 535'te ölçüm yapılarak absorbans değerleri belirlenmiştir. Elde edilen absorbans sonuçlarının µg/mL cinsinden ifade edilebilmesi için 1'den 50'ye kadar farklı ppm değerlerinde IAA süspansiyonları hazırlanarak ölçümleri yapılmış ve standart eğri oluşturulmuştur. Bakteri izolatlarının IAA üretme kapasiteleri oluşturulan standart eğriye göre hesaplanmıştır. Deneyler sırasında pozitif kontrol olarak IAA üretme kapasitesine sahip *Salmonella enterica*, negatif kontrol olarak bakteri içermeyen NBt kullanılmıştır.

3.1.3.2. Fosfat çözünürlüğü aktivitesinin belirlenmesi

İzolatların P çözme yetenekleri National Botanical Research Institute's Phosphate (NBRIP) besin ortamında Rathaur vd. (2012)'nin yöntemine göre belirlenmiştir. Deneyler sırasında kullanılan NBRIP besiyeri Perez vd. (2007)'nin belirttiği talimatlara uygun şekilde hazırlanmıştır. İlk olarak bakteri izolatları NBRIP sıvı besiyerinde 30°C'de 180 rpm de 3 gün inkübe edilerek hücre büyümesini teşvik etmek için ön zenginleştirmeye tabi tutulmuştur. İnkübasyonun ardından NBRIP katı besiyerine bakterilerin nokta ekimleri yapılmıştır ve 30°C'de 14 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından kolonilerin etrafında şeffaf zon oluşup oluşmadığı kontrol edilerek bakteri izolatlarının P çözme kapasiteleri kalitatif olarak belirlenmiştir. Deneyler sırasında pozitif kontrol olarak P çözebilme özelliği olduğu bilinen *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) (Saharan vd. 2011), negatif kontrol olarak bakteri içermeyen NBRIP besiyeri kullanılmıştır.

3.1.3.3. ACC deaminaz aktivitesinin belirlenmesi

İzolatların ACC deaminaz aktivitelerinin belirlenebilmesi için Dworkin ve Foster (1958) belirttiği yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu yöntemle göre NA besiyerinde bulunan bakteriler N kaynağı olarak yalnızca ACC içeren Dworkin-Foster (DF) besiyerlerine çizgi ekim metodu ile ekilmiştir. Hazırlanan kültürler 30°C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından ACC ortamında gelişim gösteren bakterilerin ACC deaminaz aktivitesinin olduğu, gelişim göstermeyen bakterilerin ise ACC deaminaz aktivitesinin olmadığı kabul edilmiştir. Deneyler sırasında pozitif kontrol olarak ACC deaminaz aktivitesinin olduğu bilinen *P. aeruginosa* (ATCC 27853), negatif kontrol olarak bakteri içermeyen DF besiyeri kullanılmıştır.

3.1.3.4. Siderofor üretme kapasitesinin belirlenmesi

Bakterilerin siderofor üretimini inceleyebilmek için Schwyn ve Neilands (1987)'ın yöntemine göre Modifiye Chrome Azurol S Agar (MCASA) besiyeri hazırlanmıştır. MCASA besiyeri sırasıyla solüsyon 1 (0.06 g CAS/50 mL dH₂O), solüsyon 2 (0.0027 g FeCl₃.6H₂O/10 mL 10 mM HCl) ve solüsyon 3'ün (0.073 g Hekzadesiltrimetilamonyum (HDTMA)/40 mL dH₂O) karıştırılması ve 15 dak 121°C'de steril edilmesi ile hazırlanmıştır. İzole edilen bakterilerin taze kültürlerinin kullanılması için izolatlar öncelikle NA besiyerine ekilerek 24 sa 30°C'de inkübe edilmiştir. Ardından test edilecek izolatlar önceden hazırlanmış MCASA besiyerine eşit uzaklıkta nokta ekim yöntemi ile ekilerek 28°C'de 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda bakteri kolonilerinin çevresinde oluşan turuncu-sarı zonlar siderofor üretiminin pozitif olduğu yönünde değerlendirilmiştir ve zon çapları kaydedilmiştir. Siderofor deneyi sırasında pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* (ATCC 27853) içeren MCASA besiyeri, negatif kontrol olarak bakteri içermeyen MCASA besiyeri kullanılmıştır.

3.1.4. Bakteri izolatlarının karakterizasyonu

Seçilen bakterilerin DNA izolasyonları ticari olarak satın alınan DNA izolasyon kiti (Zymo Research, ABD) kullanılmıştır. Öncelikle NA besiyerinde büyütülen taze bakteri kültürlerinin konsantrasyonları %0.85 NaCl içerisinde 1 McFarland'a ayarlanmıştır. Ardından lizis tüplerine aktarılan 500 µL bakteri kültürünün üzerine 750 µL lizis solüsyonu eklenerek tüpler alt üst edilip en az 10 dak karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım 5 dak 8.500 g'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant Zymo-Spin III-F filtresine aktararak 1 dak 8.500 g'de santrifüjlenmiştir. Filtreden kolona geçen solüsyonun üzerine 1200 µL Binding Buffer (bağlama tamponu) eklenmiştir. Hazırlanan bu karışım IC filtresine alınarak 1 dak 8.500 g'de santrifüjlenmiş, kolona geçen sıvı atılmıştır. Ardından filtreye 400 µL Wash Buffer-1 (yıkama tamponu) eklenip 1 dak maksimum hızda santrifüjlenmiş, kolona geçen sıvı tekrar atılmıştır. Daha sonra filtreye öncelikle 700 µL Wash Buffer-2 aktararak 2 dak 8.500 g'de santrifüjlenmiş, ardından tekrar 200 µL Wash Buffer-2 eklenerek 1 dak 8.500 g'de santrifüjlenip kolona geçen sıvı atılmıştır. Son olarak filtreye 30 µL DNaz-RNaz içermeyen su aktararak 5 dak oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından 3 dak 12.000 g'de santrifüjlenmiştir. Son olarak elde edilen DNA solüsyonları yeni bir santrifüj tüpüne aktararak +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Kit ile izole edilemeyen DNA'lar için aynı zamanda Syn ve Swarup (2000) belirttiği manuel yöntem modifiye edilerek izolasyon gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem göre taze olarak hazırlanan 3 mL bakteri kültürü %0.85'lik NaCl ile iki kez 12.000 g'de 5 dak santrifüjlenerek yıkanmıştır. Ardından hücre pelleti 750 µL TES (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0, %2 SDS) solüsyonu içinde yeniden süspanse edilerek 75°C'de 10 dak inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücre lizatlarına 750 µL fenol:kloroform çözeltisi (3:1, v/v) eklenerek hafifçe vortekslenmiş ve 12.000 g'de 10 dak santrifüjlenmiştir. Oluşan faz ayırımına göre üstteki berrak faz ayrı bir santrifüj tüpüne dikkatlice alınmıştır ve 0.1 hacim 3 M sodyum asetat (C₂H₃NaO₂) (pH 5.2) ve 1 hacim izopropanol (oda sıcaklığı) eklenerek tüpler birkaç kez hafifçe ters çevrilerek karıştırılmıştır. Bu aşamadan sonra görünür hale gelebilen DNA iplikçikleri 5 dak santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Ardından DNA pelleti %95'lik soğuk etanol ile yıkanıp kurutulmuş ve 50 µL TE (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8.0) içinde yeniden süspanse edilmiştir.

Syn ve Swarup (2000)'in belirttiği manuel DNA izolasyon yöntemi ile DNA'sı izole edilemeyen örneklerin DNA izolasyonları Nikodinovic vd. (2003)'ün belirttiği manuel yöntem modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Bunun için ilk olarak taze büyütülen bakteri kültürleri 4000 rpm'de 5 dak santrifüjlenmiş ve süpernatant atılmıştır. Ardından pellet %10 sakkaroz çözeltisi içerisinde yeniden çözündürülmüş ve sakkaroz içerisinde çözündürülen örnekler 9000 rpm'de 7 dak santrifüj edilmiştir. Bu adım 3 kere tekrarlanmıştır. Pelletin %10 sükröz ile yıkanmasının ardından süpernatant atılmış ve pellet 1 mL lizis tamponu (0.3 M sükröz, 25 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH: 7.5) içerisinde çözündürülmüştür. Bakterilerin enzimatik yol ile parçalanmasını sağlamak için örnekler üzerine son konsantrasyon 4 mg/mL olacak şekilde kristal halinde lizozim eklenmiştir ve örnekler 37 °C'de 2 sa inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonun ardından örnekler üzerine 100 µL SDS eklenmiş ve örnekler 55°C'de 30 dak bekletilmiştir. Otuz dak sonunda örnekler üzerine 360 µL 5 M NaCl ve 1.5 mL kloroform eklenerek tüpler birkaç kez hafifçe ters çevrilerek karıştırılmıştır. Ardından örnekler 4000 rpm'de 6 dak santrifüjlenerek faz ayrımı gerçekleştirilmiştir. Faz ayrımının ardından üstteki berrak faz ayrı bir santrifüj tüpüne dikkatlice alınmış ve üzerine 1 hacim izopropanol eklenerek DNA çöktürülmüştür (Bu aşamada DNA iplikçığının oluşumu gözlemlenmiştir). Oluşan DNA iplikçığı 200 µL %70'lik soğuk etanol ile yıkanmıştır ve örnekler etanol uçana kadar oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İzole edilen DNA örnekleri 50 µL TE (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8.0) içinde yeniden süspanse edilmiştir.

Her iki manuel DNA izolasyon yöntemi ile DNA'sı izole edilemeyen örneklerin DNA izolasyonları sıvı azot içerisinde dondur – çöz yöntemi kullanılarak tekrarlanmıştır. Sıvı azot içerisinde dondur – çöz yöntemi Chen vd. (2020) belirttiği prosedür kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle göre taze olarak büyütülmüş bakteri hücreleri 10000 g'de 1 dak santrifüjlenerek çöktürülmüş ve pellet üzerine 450 µL DNA ekstraksiyon tamponu (%10 setiltrimetil amonyum bromür (CTAB), %4 NaCl, 20 mM etilendiamin tetraasetik asit, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0; %1 polivinilpirolidon) eklenerek çözündürülmüştür. Ardından hazırlanan örnekler 10 saniye boyunca sıvı azot tankına daldırılarak dondurulmuş ve hemen ardından 65°C'de 1 dak tutularak çözündürülmüştür. Bu adım 2 kere tekrarlanmıştır. Dondur çöz basamağının ardından örnekler üzerine 50 µL 5 M NaCl ve 100 µL %10 SDS eklenerek tekrar sıvı azot içerisinde dondur – çöz basamağı uygulanmıştır. Dondur – çöz basamağı tekrarlanan örnekler üzerine eşit hacimde fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1) eklenmiş ve kuvvetlice çalkalanarak karıştırılmıştır. Ardından örnekler 10000 g'de 10 dak santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant ayrı bir mikro santrifüj tüpüne alınarak üzerine eşit hacimde kloroform-izoamil alkol (24:1) karışımı eklenmiştir. Örnekler dikkatlice karıştırılmış ve tekrar 10000 g'de 10 dak santrifüj edilmiştir. Bu adım 2 kere tekrarlanmıştır. Gerçekleştirilen son santrifüj adımının ardından elde edilen süpernatant ayrı bir mikro santrifüj tüpü içerisine alınarak moleküler tanımlama deneylerinde kullanılmıştır. Bu yöntem sonrasında DNA izolasyonları gerçekleştirilemeyen örnekler için yöntem sıvı azot içerisinde dondur – çöz adımının çözündürme kısmı 100°C'de 1 dak olacak şekilde, ayrıca dondur– çöz basamağının tekrar sayısı arttırılarak tekrarlanmıştır.

Bakteri izolatlarının moleküler tanımlanması için 16S rRNA gen bölgesi hedef gen bölgesi olarak seçilmiştir. Bu bölgenin PCR (Polymerase Chain Reaction; Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile çoğaltılması için Çizelge 3.1'de belirtilen evrensel primerler (forward primer 8F, reverse primer 1492R) kullanılmıştır (Sentebiolab, Türkiye). PCR

reaksiyonları Çizelge 3.2'ye uygun olarak hazırlanmış ve Çizelge 3.3'teki koşullara uygun olarak Biorad T100 Thermal Cycler (Biorad, ABD) cihazında PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. 16S rRNA gen gölgesi için tasarlanan primerler

Primerler	Oligonükleotit Dizilimi (5'-3')	Kaynak
8F forward	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3	Icgen ve Yılmaz (2014); Eden vd. (1991)
1492R reverse	5'-GGTGTTTGATTGTTACGACTT-3'	

Çizelge 3.2. PCR Reaksiyonu karışımlarının hazırlanması

Karışım Reaktifi	Miktar
Taq Tampon Solüsyonu (10X)	2.5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2.5 µL
İleri Primer (10 µM)	0.5 µL
Geri Primer (10 µM)	0.5 µL
dNTP karışımı	0.5 µL
Genomik DNA	0.5 µL
Taq polimeraz enzimi	0.5 µL
dH ₂ O (nükleaz içermeyen)	17.5µL
Toplam	25 µL

Çizelge 3.3. PCR Koşulları

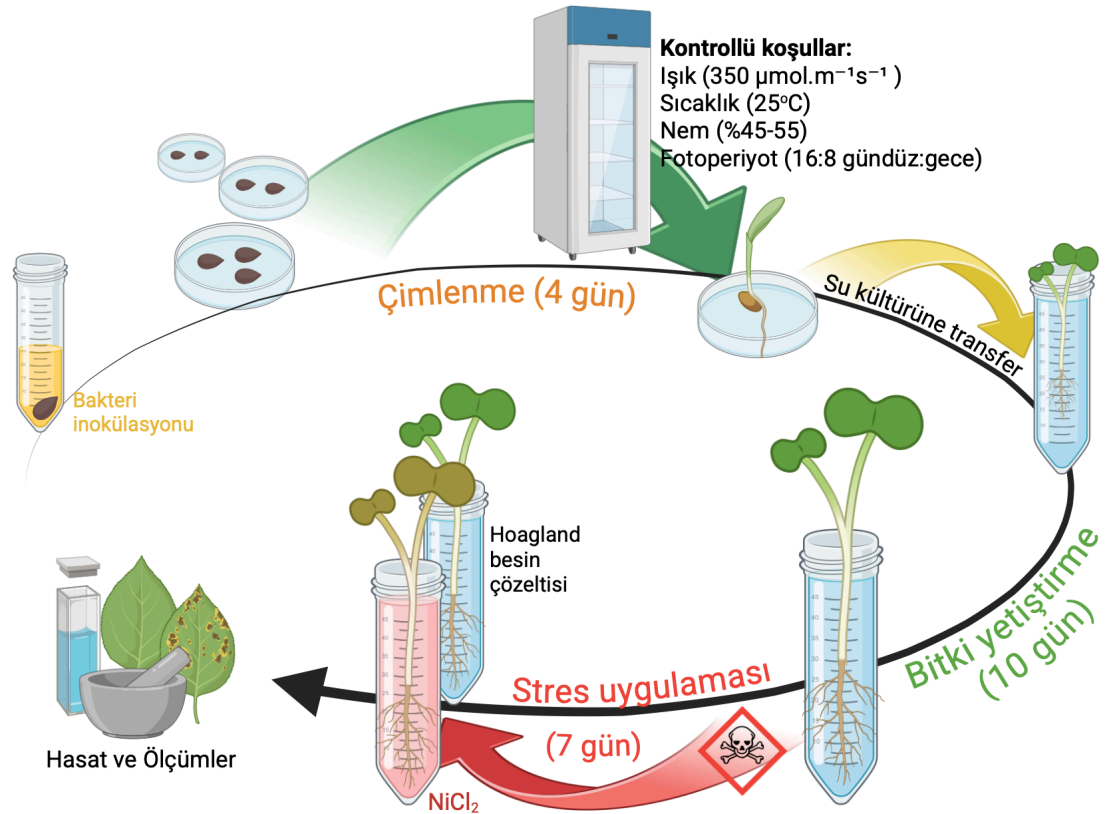
Aşama	Sıcaklık	Süre
İlk denatürasyon	95°C	10 dak
Denatürasyon	95°C	1 dak
Primer bağlanması	47°C	1 dak
Uzama	72°C	1 dak
Son Uzama	72°C	10 dak

DNA izolasyonları ve PCR reaksiyonları gerçekleştirilen örneklerin hedef bantları ticari olarak satın alınan jel ekstraksiyon kiti (Zymo Research, ABD) kullanılarak, üreticinin yönergelerine göre saflaştırılmış ve ürünler çift yönlü DNA sekans analizleri yapılmak üzere BM Laboratuvar Sistemleri, Türkiye firmasına gönderilmiştir. Elde edilen DNA sekansı sonuçları National Center for Biotechnology Information (NCBI), Basic Local Alignment Search Tool nucleotide (BLASTn) programı kullanılarak analiz edilmiş ve izolatların tanımlamaları yapılmıştır. Ticari olarak satın alınan kit ve manuel yöntem ile DNA'sı izole edilemeyen bakteri izolatları hizmet alımı gerçekleştirilerek desteklenmiş lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi [Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)] yöntemi ile Akdeniz Üniversitesi Hastanesi, Merkezi Laboratuvarı'nda hizmet alımı ile tanımlanmıştır.

3.2. Aşama II: Aspir ile Uyumlu Bakteri Taraması

3.2.1. Bitki yetiştirme ve bakteri inokülasyonu yöntemi

Aspir bitkisine ait (*C. tinctorius* cv. Yenice) tohumlar, Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden (Eskişehir) temin edilmiştir. Bitki yetiştirme yöntemi olarak Jan vd. (2019), Wang vd. (2019) ve Baran ve Ekmekçi (2022)'nin bitki yetiştirme metotları değiştirilerek kullanılmıştır. Tohumların, %5'lik sodyum hipoklorit çözeltisi ile 5 dak kabuk sterilizasyonu yapılmış, ardından yaklaşık 10 defa distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra 3 sa boyunca kontrol grubuna ait olan tohumlar steril NB besiyerinde; uygulama grubuna ait olan tohumlar ise Aşama I kapsamında seçilen 5 ayrı bakteri suşunun 10^8 CFU/mL konsantrasyonuna sahip NB besiyeri süspansiyonunda şişmeye bırakılmıştır. Bakteriyel rizosfer popülasyonu rizosfer toprağında 10^7 - 10^9 CFU/g arasında değişiklik gösterdiği bilinmektedir (Afzal vd. 2019). İmbibisyon işlemi tamamlandıktan sonra tohumlar 2 kat kurutma kağıdı içeren petri kaplarında 2 mL sulanarak çimlenmeye bırakılmıştır. 4 günlük çimlenme periyodunun ardından fideler, Hoagland besin çözeltisi içeren 50 mL'lik vida kapaklı santrifüj tüplerine transfer edilmiştir. Köklerin ışık alması ve alg üremesinin engellenmesi için tüpler renkli (amber) tercih edilmiştir. Köklerin havasız kalmasını engellemek ve besin eksikliğinin önüne geçmek için tüplerdeki çözeltiler ilk 10 gün boyunca tam kuvvet Hoagland besin çözeltisi ile gün aşırı, son 7 gün ise 0.75 mM Ni ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) içeren Hoagland besin çözeltisi ile her gün değiştirilmiştir. Toplam 21 gün süren denemeler, 25°C sıcaklıkta, 16 saat ışık/8 saat karanlık fotoperiyotta ve $250\text{-}350 \mu\text{mol.m}^{-1}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde, %45-55 nemde, kontrollü iklim odası koşullarında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Deneme deseni (biorender.com ile hazırlanmıştır.)

3.2.2. PGPB suşlarının aspir bitkisinde biyokütle üretimine etkisinin belirlenmesi

Hasat edilen kontrol ve uygulama gruplarına ait aspir bitkilerinin kök ve sürgünlerinin yaş ağırlıkları (g. bitki⁻¹) belirlendikten sonra 80°C'lik etüvde 48 sa kurutulmuş ve yeniden tartılmasıyla kuru ağırlıkları (g. bitki⁻¹) belirlenmiştir.

3.2.3. PGPB suşlarının aspir bitkisinde fotosentetik pigment miktarına etkisinin belirlenmesi

Aspir bitkisinin yaprak dokularındaki klorofil (*a*, *b*) ve karotenoid (ksantofil+β-karoten) miktarları (mg. mL⁻¹ cm⁻²) Lichtenthaler (1987)'ye göre belirlenmiştir. Bu yöntemde kontrol ve uygulama gruplarına ait bitkilerin yaprak dokusundan her bir uygulama için 6 tekrarlı olacak şekilde diskler çıkartılarak (R=0.6 cm) mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve üzerlerine 1 mL %100'lük aseton eklenmiştir. Örnekler bir hafta +4°C'de karanlıkta bekletilerek pigment içeriğinin asetona geçmesi sağlanmıştır. Süreç sonunda bir baget yardımı ile örnekler ezilmiş ve tüm pigment içeriğinin asetona geçtiğinden emin olunmuştur. Ardından spektrofotometre ile 470, 644.8 ve 661.6 nm dalga boylarında absorpsiyonlar kaydedilmiştir. Elde edilen bu verilere göre, pigment miktarları Lichtenthaler (1987)'deki formüllere göre hesaplanmıştır.

3.2.4. PGPB suşlarının aspir bitkisinde klorofil *a* floresansına etkisinin belirlenmesi

Fotosentetik örneklerin fotokimyasal etkinliğini ölçmek için kullanılan hızlı, kolay ve güvenilir bir araç olan klorofil *a* floresansı (Strasser vd. 2000; Oukarroum vd. 2007) ölçümleri için portatif Floresans Ölçüm Cihazı (Handy PEA, Hansatech Ltd.) kullanılmıştır. Kontrol ve uygulama gruplarına ait fidelerden seçilen bitkilerin 30 dak karanlığa adapte edilen yapraklarında ölçüm yapılmıştır. Florometre, floresansı kırmızı ışıkla (maksimum 650 nm'de emisyon) uyarır ve 700 nm üzerindeki floresansı algılar. Ölçümler 3 adet düzenli ışık yayan diyodun ürettiği bir sn süreli 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. Hızlı floresans kinetikleri (minimum floresans, F₀-maksimum floresans, F_M) 10 µs'den 1 s'ye kadar kaydetmekte ve 20 µs'de kaydedilen floresans şiddeti minimum floresans (F₀) olarak kabul edilmektedir (Strasser ve Strasser, 1995). Ölçümler PEA+ programı ile analiz edilmiş olup fotosentetik aparatlarındaki spesifik enerji akışları [kuantum verimi (F_v/F_m), fotokimya dışı kaybedilen enerji (DI₀/RC), absorbe edilen enerji (ABS/RC), yakalanan enerji (TR₀/RC), elektron taşıma zincirine aktarılan enerji (ET₀/RC), PSI'e elektron iletim verimliliği (RE₀/RC)] ile çeşitli floresans parametrelerini (ışık enerjisi absorpsiyonu, eksitasyon enerjisinin yakalanması, enerjinin elektron taşınımına dönüşümü ve elektron transport sisteminin en son alıcısına elektronun iletimi etkinliği) içeren performans indeksleri (PI_{TOP} ve PI_{ABS}) analiz edilmiştir (Oukarroum vd. 2007; Strasser vd. 2010; Ceppi vd. 2012; Goltsev vd. 2016; Stirbet vd. 2018). Detaylı formülleri tezin Ek bölümünde Çizelge 8'de sunulmuştur.

3.2.5. PGPB suşlarının aspir bitkisinde mineral madde akümülyasyonuna etkisinin belirlenmesi

Bu analiz Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nden hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Bitkilerin kök ve yaprak dokularındaki mineral madde birikimini

belirlemek için öncelikle dokular 80°C'lik etüvde 48 sa kurutulmuştur. Ardından doku örnekleri mikrodalga ile çözündürme işleminden geçirilip özütlerdeki elementlerin miktarı, ICP-OES (İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi) cihazında standart çözeltileri ile kalibre edildikten sonra 3 tekrarlı olacak şekilde belirlenmiştir. Element miktarı kuru ağırlık (KA) temelinde ppm. g KA⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu verilere göre, Ni için çeşitli alım-taşınım indeksleri [Translokasyon Faktörü (TF: Sürgün/Kök Ni) ve Biyoakümülyasyon Faktörü (BAF: Bitki/Çözelti Ni) Al Chami vd. (2015) ve Liu vd. (2009)'a göre hesaplanmıştır.

3.3. Aşama III: PGPS Suşlarının Aspir Bitkisinin Nikel Stresine Verdiği Fizyolojik ve Biyokimyasal Yanıtlar Üzerine Etkisi

3.3.1. Bitki yetiştirme ve bakteri inokülasyonu yöntemi

Aspir bitkilerine uygulanmak üzere seçilen iki bakteri türünün de *Streptomyces* olarak belirlenmiş olmasının ardından yapılan araştırmalar sonucunda *Streptomyces* grubunun dirençli toprak bakterileri olduğu ve boyutlarının büyük olup dallı filamentli bir yapıya sahip olmalarından dolayı bitki-bakteri etkileşimini güçlendirmek ve inokülasyonu arttırmak için daha önceden steril edilmiş tohumları bakteri solüsyonunda 3 sa bekleterek yapılan inokülasyon metodunda da çeşitli düzenlemeler yapılmıştır. Bu kapsamda, bitkiler petri kaplarında çimlendirdikten sonra aseptik koşullarda, 2x10³ CFU konsantrasyonuna sahip bakteri/spor süspansiyonu içeren %0.25 agarlı yarı-katı ½ F Hoagland besin çözeltisine transfer ederek 5 gün boyunca büyümeye bırakılmıştır. Ardından 3x10³ CFU konsantrasyonuna sahip bakteri/spor süspansiyonu içeren %0.10 agarlı yarı-katı ½ F Hoagland besin çözeltisine transfer edilmiş ve 10 gün boyunca güneşli değişim yapılarak devam edilmiştir. Devamında ise negatif kontrol hariç tüm gruplar 3x10³ CFU konsantrasyonuna sahip bakteri/spor süspansiyonu içeren %0.10 agarlı yarı-katı 0.75 mM Ni içeren ½ F Hoagland besin çözeltisine transfer edilerek 7 gün strese maruz bırakılmış ve her gün değişim yapılmıştır.

İnokülasyon yöntemindeki değişiklik sayesinde bakterilerin rizosferde kolonize olmaları için daha elverişli bir ortam sağlanmış ve bitki ile etkileşimi güçlendirilmiştir. Ayrıca her zaman Hoagland besin çözeltisinin bakterili halde tutulması ile su değişimi sırasında ortamdan bakteri kaybı riski engellenmeye çalışılmıştır.

3.3.2. Nikel konsantrasyonunun belirlenmesi

Bu analiz Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nden hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Aspir bitkilerin kök ve yaprak dokularındaki Ni konsantrasyonunu belirlemek için öncelikle dokular 80°C'lik etüvde 48 sa kurutulmuştur. Ardından doku örnekleri mikrodalga ile çözündürme işleminden geçirilmiştir. Bunun için her bir örnek üzerine 5 mL %65'lik derişik nitrik asit (HNO₃) ve 2 mL %30'luk H₂O₂ eklenmiş ve kapalı sistem mikrodalga çözündürme cihazında 180°C sıcaklıkta 30 dak boyunca çözündürme işlemi uygulanmıştır. Sonrasında numuneler soğutulmuş, hacimleri saf su ile 50 mL'ye tamamlanmış ve Whatman No. 42 filtre kağıdından süzülerek analiz için hazır hale getirilmiştir. Özütlerdeki elementlerin konsantrasyonu, ICP-OES (İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi) cihazında standart çözeltileri ile kalibre edildikten sonra 3 tekrarlı olacak şekilde belirlenmiştir. Ni konsantrasyonu kuru ağırlık (KA) temelinde ppm. g KA⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

3.3.3. Morfolojik ölçümler

21 günün sonunda hasat edilen kontrol ve uygulama gruplarına ait aspir bitkilerinin boy uzunlukları kök ve sürgün kısmı için cm. bitki⁻¹ şeklinde belirlenmiştir. Ardından yaş ağırlıkları (g. bitki⁻¹) belirlenen bitkiler, 80°C'lik etüvde 48 saat kurutulup yeniden tartılmasıyla kuru ağırlıkları (g. bitki⁻¹) belirlenmiştir.

3.3.4. Fizyolojik ve biyokimyasal ölçümler

3.3.4.1. İyon sızıntısı (ELC)

Bitkilerde iyon sızıntısı (ELC; electrolyte leakage) oranı Redmann vd. (1986)'ya göre belirlenmiştir. Her grup için 6 farklı bitkinin yapraklarından alınan 1 cm²'lik kesitler (n=6), içerisinde 10 mL distile su bulunan santrifüj tüplerine konulmuştur. 24 sa boyunca 100 rpm'de çalkalanan örnekler, alüminyum folyoya sarılarak sıvı azotta 30 dak bekletilmiştir. Bu esnada santrifüj tüpü içerisinde bulunan sıvı, spektrofotometre cihazı ile 280 nm'de ölçülmüştür (A₂₈₀). Sıvı azota maruz bırakılan örnekler yeniden santrifüj tüpü içerisine alınıp 24 sa boyunca orbital çalkalayıcıda 100 rpm'de çalkalanmıştır. 24 sa sonra 280 nm'de ölçülen sıvı örneklerinin absorbansları kaydedilmiş (B₂₈₀) ve ardından iyon sızıntısı A₂₈₀/B₂₈₀ oranı ile hesaplanmıştır.

3.3.4.2. Oransal su içeriği (RWC)

Aspir bitkilerinde oransal su içeriği (RWC; relative water content) Farrant (2000)'in metoduna göre belirlenmiştir. Her uygulama grubu başına 6 farklı bitkiye ait yaprak materyalinden 1 cm² kesitler alınarak yaş ağırlıkları alınmıştır. Yaş ağırlığı alınan yaprak örnekleri 24 sa süreyle 10 ml distile su içeren santrifüj tüplerine aktararak 120 rpm'de çalkalandıktan sonra hidrate ağırlıkları alınmıştır. Ardından 24 sa ve 70°C etüvde kurutulmuş ve kuru ağırlıkları alınmış ve Farrant (2000)'de yer alan formüle göre yaprak oransal su içerikleri yüzdesel olarak hesaplanmıştır.

3.3.4.3. Fotosentetik pigment miktarı

3.2.3 numaralı başlık altında anlatılan yöntem ile aynı şekilde yapılmıştır.

3.3.4.4. Klorofil *a* floresansı

Klorofil *a* floresans ölçümleri, ışık pulsunun 2000 µmol m⁻²s⁻¹ olması dışında, II. Aşamada yer alan 3.2.4 numaralı başlıkta açıklanan yöntemle aynı şekilde gerçekleştirilmiştir. Ölçümler kapsamında, fotosentetik aparatlardaki spesifik enerji akışları ve performans indekslerine (ABS/RC, TR₀/RC, ET₀/RC, DI₀/RC, PI_{ABS} ve PI_{TOT}) ek olarak; bazı akış oranları ve tamamlayıcı parametreler de analiz edilmiştir. Bu parametreler arasında, PSII'nin termal enerji kayıplarının kuantum verimliliği (ψ_{Do}), yapısal ve fonksiyonel durum indeksi (SFI), PSI'nin fonksiyonel durumu (ΔV_{IP}) ile oksijen oluşturan kompleksin inaktivasyonunu gösteren oran (VK/VJ) yer almaktadır.

3.3.4.5. Antosiyanin ve Flavonoid miktarı

Aspir bitkilerine ait yaprak dokularındaki antosiyanin içeriği Mancinelli (1975)'e göre, flavonoid içeriği ise Mirecki ve Teramura (1984)'e göre belirlenmiştir. Her bir

uygulama için 6 farklı bitkiden 0.1 g örnek alınmıştır. Taze yaprak örnekleri 6 mL ekstraksiyon çözeltisi (%79 metanol, %20 distile su ve %1 HCl) eklenerek homojenize edilmiştir. Homojenat +4°C'de 10000 rpm'de 20 dak boyunca santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatandan spektrofotometrede 530 ve 657 nm dalga boylarında absorbans değerleri kaydedilmiş ve antosiyanin içeriği (mg. mL⁻¹ g YA⁻¹) belirlenmiştir. Flavonoid içeriğini belirleyebilmek için ise, elde edilen süpernatanın spektrofotometrede 300 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunup, yaprak dokularındaki flavonoid miktarı kontrole göre oranlanarak (%) hesaplanmıştır.

3.3.4.6. Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarı

Aspir bitkisi yaprak dokularındaki H₂O₂ miktarları, Alexieva vd. (2001)'in yöntemine göre 5 tekrarlı olarak belirlenmiştir. Aspir bitkilerinden alınan 0.3 g yaprak örneği, %0.1 trikloroasetik asit (TCA) içeren 12 mL çözelti ile 4°C'de homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat, 10000 rpm'de 15 dak santrifüj edilmiş ve süpernatant ayrılarak H₂O₂ miktarları ölçülmüştür. Bunun için örneklerden 0.5 ml süpernatant, bir cam tüpe alınmış ve üzerine 0.5 ml pH 7.6 olan 0.1 M Tris/HCl tamponu ile 1 mL 1 M KI çözeltisi eklenmiştir. Bu karışım, 90 dak karanlıkta bekletilmiş ve spektrofotometrede 390 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Yaprak dokularındaki H₂O₂ miktarı, nmol. g TA⁻¹ cinsinden hesaplanmıştır.

3.3.4.7. Toplam protein miktarı

Aspir bitkilerine ait yaprak örneklerinin antioksidan enzim aktivitelerini belirleyebilmek için ilk olarak örneklerdeki protein konsantrasyonları ölçülmüştür. Bradford (1976) yöntemine göre sığır serum albümini (BSA) standardı kullanılarak yapılan bu ölçümlerde 20 µL örnek çözelti ile 480 µL distile su karıştırıldıktan sonra, karışıma 5 mL Bradford çözeltisi eklenmiştir. Vorteks ile yaklaşık 30 sn homojen hale getirilen karışım oda sıcaklığında 10 dak inkübe edilmiştir. Çözeltinin absorbans değerleri spektrofotometrede (Shimadzu UV-Vis Double Beam) 595 nm dalga boyunda üç tekrarlı olacak şekilde okunmuştur.

3.3.4.8. Toplam süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi

Toplam SOD (EC 1.15.1.1) enzim aktivitesi, nitrobluetetrazolyumun (NBT) fotokimyasal indirgenmesini esas alan metoda uygun şekilde 5 tekrarlı şekilde spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Beyer ve Fridovich, 1987). Aspir bitkilerinin yaprak 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 dak +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 40 µL süpernatant eklenmiştir. Örneğin konulmasının ardından reaksiyonu başlatmak için karışıma 10 µl riboflavin ilave edilmiştir. Ardından tüpler 375 µmol.m⁻² s⁻¹ yoğunluğunda ışığa maruz bırakılmıştır ve absorbans değerleri spektrofotometrede 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.

3.3.4.9. Toplam guaikol peroksidaz (POD) enzim aktivitesi

Toplam POD (EC 1.11.1.7) enzim aktivitesi Pütter (1974)'e göre 5 tekrarlı şekilde belirlenmiştir. Yaprak 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 4 dak 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.

3.3.4.9. Toplam glutatyon redüktaz (GR) enzim aktivitesi

Rao vd. (1995)'in metodu ile belirlenen toplam GR (EC 1.6.4.2) aktivitesi için uygulama ve kontrol gruplarına ait bitkilerin yaprak dokularından 5 tekrarlı olacak şekilde her uygulama için 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 dak 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 özütü son hacim 1 mL olacak şekilde hazırlanmıştır. NADPH'nin ortama eklenmesi ile reaksiyon başlamış örnekler 340 nm'de spektrofotometrede okunmuştur. NADPH'ın enzimatik olmayan oksidasyonu için 340 nm dalga boyunda GSSG eklenmeyerek kaydedilen azalışla düzeltme yapılmıştır. Toplam GR aktivitesi NADPH'nin ekstinksiyon katsayısı (6.2 mM.cm⁻¹) kullanılarak enzimatik olmayan oksidasyon çıkarıldıktan sonra reaksiyon başlangıç hızından (nmol NADPH dak⁻¹. mg protein⁻¹) hesaplanmıştır.

3.3.4.10. Toplam askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitesi

Toplam APX (EC 1.11.1.11) enzim aktivitesi Wang vd. (1991)'in metoduna göre 5 tekrarlı şekilde 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 Na₂EDTA ve 2 mM askorbat içeren 1.5 mL'lik çözelti eklenmiştir. Bu karışım +4°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 H₂O₂ ile son hacim 1 mL olacak şekilde ilave edilmiştir. H₂O₂'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 (nmol askorbat dak⁻¹. mg protein⁻¹) hesaplanmıştır.

3.3.5. Bakteri kolonizasyonunun kanıtlanması

Bakteri uygulanmış aspir bitkisi gruplarında, uygulanan bakteri suşlarının bitki dokularındaki varlığının kanıtlanması için uygulama sonunda bitki örneklerinden tekrar bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Rizosferik bakteri izolasyonu Çelikten ve Bozkurt (2018)'in belirttiği yöntemin modifiye edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için ilk olarak 1'er g bitki kök örnekleri 5 mL NaCl (%0.85'lik) çözeltisi içerisine konularak 150

rpm’de 1 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından karışımın sıvı kısmı alınmış ve steril %0.85 NaCl çözeltisi kullanılarak seri seyreltmeleri hazırlanmıştır. Hazırlanan seri seyreltmelerden 100’er µL alınarak *Streptomyces* cinsi bakterilerin büyütülmesinde ve spor oluşturmada yaygın olarak kullanılan Maya Malt Agar olarak da bilinen Uluslararası *Streptomyces* Projesi-2 (International Streptomyces Project-2, ISP-2) besiyerine (Shirling ve Gottlieb 1966) ve *Streptomyces* cinsi bakteriler için seçici besiyeri olarak da kullanılan Nişasta Kazein Agara (Starch Casein Agar, SCA) (Ellaiah vd. 1996; Peela ve Porana 2017) ekimleri yapılmıştır. Hazırlanan petriler 30°C’de 5 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından morfolojik özellikler karşılaştırılmış ve *Streptomyces* cinsine ait olduğu düşünülen bakteri izolatları belirlenerek ışık mikroskobu yardımı ile morfolojileri incelenmiştir.

3.3.6. İstatistiksel Analizler

Denemelerde değişkenler için uygulanan örneklem adeti (n=) ilgili ölçüm açıklamasında yazılmıştır. Elde edilen sonuçlara, istatistik paket programı (SPSS, versiyon 20) kullanılarak istatistiki varyans analizi (ONE-WAY ANOVA) uygulanmıştır. Her bir değişken için uygulamalar arasındaki farkın anlam kontrolü, anlamlı önemli fark (AÖF) %5 düzeyinde ($p<0.05$) hesaplanmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

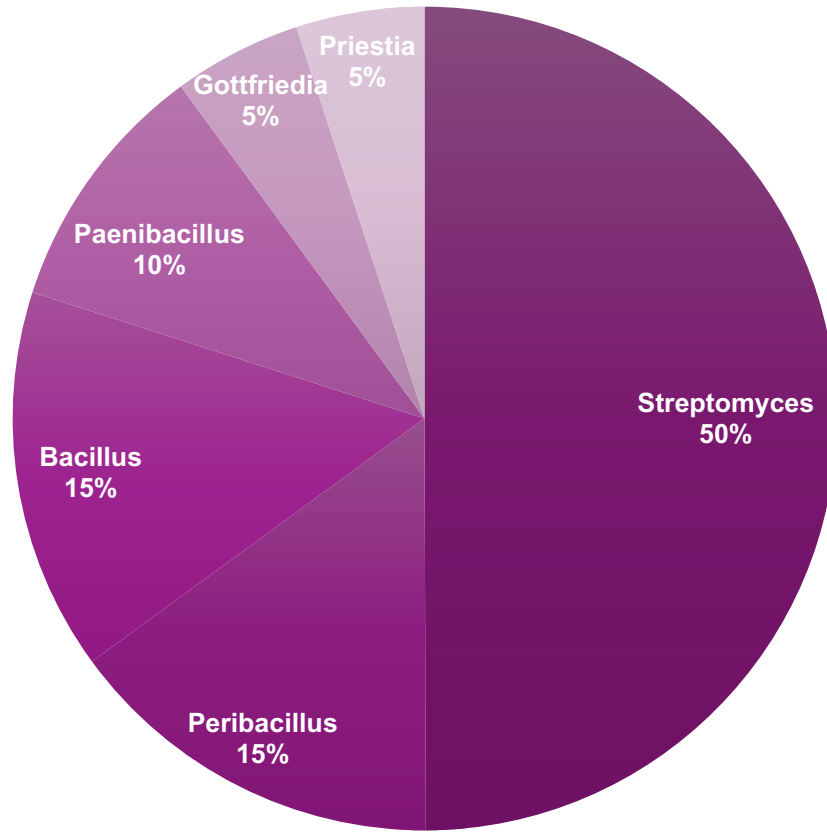
4.1. Aşama I: Mikrobiyolojik İşlemler

4.1.1. Hiperakümülatör bitkiden bakteri izolasyonu ve karakterizasyonu

C. ensiformis bitkisinden izole edilen endofitik bakterilerin moleküler tanımlamaları Çizelge 4.1’de gösterilmiştir. Yapılan analizler sonucunda izole edilen bakterilerin *C. ensiformis* bitkisinden izole edilen 6 farklı cinse ait toplamda 13 farklı endofitik bakteri türü tanımlanmıştır. Tanımlanan bakteri cinslerinden *Bacillus* cinsine ait 2 tür, *Peribacillus* cinsine ait 3 tür, *Streptomyces* cinsine ait 3 tür, *Gottfriedia*, *Paenibacillus* ve *Priestia* cinslerine ait 1’er tür tanımlanmıştır. En baskın türün *Streptomyces canus* (%29) olduğu görülmüştür. İzole edilen bakterilerin cins düzeyinde yüzdelik dağılımı da Şekil 4.1’de sunulmuştur. Mikrobiyal dağılımın önemli bir kısmı *Streptomyces* olup, toplam bakterilerin %50’sini oluşturmaktadır. Bunu %15 oranlarıyla *Peribacillus* ve *Bacillus* cinsleri takip etmektedir. *Paenibacillus* cinsi %10 oranında yer alırken, *Gottfriedia* ve *Priestia* cinsleri ise eşit oranlarda %5’lik bir dağılıma sahiptir. Genel olarak, *Streptomyces* cinsi araştırmada en yüksek oranda bulunurken, diğer cinsler daha dengeli bir dağılım göstermiştir.

Çizelge 4.1. *C.ensiformis* bitkisinden izole edilen endofitik bakterilerin moleküler tanımlamaları

Koloni	Tür Adı	Giriş Numarası
C1	<i>Peribacillus simplex</i>	MALDI-TOF Analizi
C2	<i>Gottfriedia solisilvae</i>	PV876124
C9	<i>Paenibacillus xylanexedens</i>	PV876125
C11	<i>Bacillus tropicus</i>	MALDI-TOF Analizi
C12	<i>Peribacillus frigoritolerans</i>	PV876126
C13	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	MALDI-TOF Analizi
C14	<i>Peribacillus muralis</i>	MALDI-TOF Analizi
C17	<i>Bacillus cereus</i>	MALDI-TOF Analizi
C30	<i>Priestia aryabhatai</i>	PV876383
C31	<i>Bacillus sanguinis</i>	MALDI-TOF Analizi
C35	<i>Streptomyces canus</i>	MALDI-TOF Analizi
C43	<i>Streptomyces canus</i>	MALDI-TOF Analizi
C49	<i>Bacillus sanguinis</i>	MALDI-TOF Analizi
C52	<i>Streptomyces pseudovenezuelae</i>	MALDI-TOF Analizi
C53	<i>Streptomyces canus</i>	MALDI-TOF Analizi
C54	<i>Streptomyces canus</i>	MALDI-TOF Analizi
C55	<i>Streptomyces canus</i>	MALDI-TOF Analizi
C65	<i>Streptomyces canus</i>	MALDI-TOF Analizi
C66	<i>Streptomyces griseorubiginosus</i>	MALDI-TOF Analizi
C68	<i>Streptomyces pseudovenezuelae</i>	MALDI-TOF Analizi
C70	<i>Streptomyces griseorubiginosus</i>	MALDI-TOF Analizi



Şekil 4.1. *C. ensiformis* bitkisinden izole edilen bakterilerin cins düzeyinde yüzdelik dağılımı

*C. ensiformis*ten izole edilen bakteriler phylum düzeyinde incelendiğinde, Firmicutes (%52.4) ve Actinobacteria (%47.6) olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Firmicutes phylumu içinde *Peribacillus* (*P. simplex*, *P. frigoritolerans*, *P. muralis*), *Bacillus* (*B. tropicus*, *B. cereus*, *B. sanguinis*), *Paenibacillus* (*P. xylanexedens*, *P. amylolyticus*), *Gottfriedia* (*G. solisilvae*) ve *Priestia* (*P. aryabhatai*) cinsleri yer almaktadır. Actinobacteria filumu ise tamamen *Streptomyces* (*S. canus*, *S. pseudovenezuelae*, *S. griseorubiginosus*) türlerinden oluşmaktadır. Genel olarak Firmicutes phylumu daha baskın olmakla birlikte, *Actinobacteria* da önemli bir temsil oranına sahiptir.

4.1.2. İzole edilen bakterilerin PGPB testleri

C. ensiformis bitkisinden izole edilen bakterilerin PGPB test sonuçları Çizelge 4.2’de sunulmuştur. İzole edilen bakterilerin IAA üretme kapasiteleri karşılaştırıldığı zaman en yüksek IAA üretme kapasitesinin C66 kolonisi başta olmak üzere C70, C12, C52, C54 ve C13 numaralı kolonilerin yüksek IAA üretme kapasitelerine sahip olduğu tespit edilmiştir. En düşük IAA üretme kapasitesinin ise sırasıyla C43, C2 ve C55 numaralı kolonilerde olduğu belirlenmiştir. İzole edilen bakterilerden hiçbirinde fosfat çözünürlüğü aktivitesi saptanamamış olup ACC deaminaz aktiviteleri karşılaştırıldığı zaman ise, yalnızca C31, C55 ve C66 kolonilerinin ACC deaminaz aktivitesine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bakteri izolatlarının siderofor üretme kapasiteleri

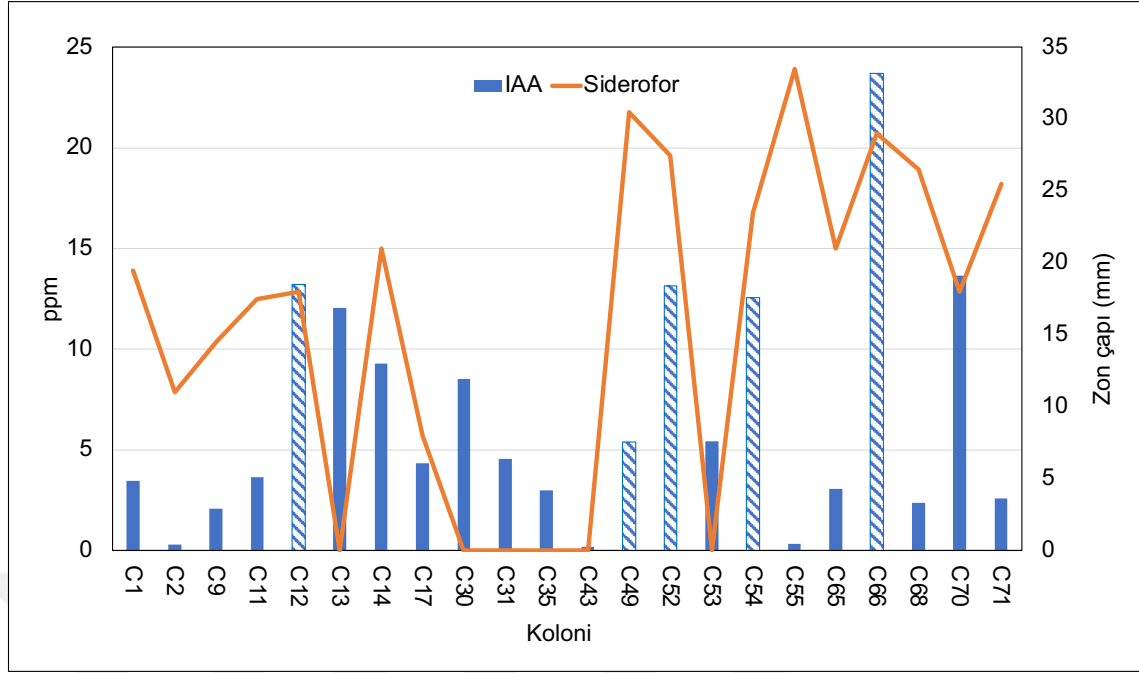
karşılaştırıldığında, en yüksek siderofor üretme kapasitesinin C55 ve C49 (sırasıyla 33.5 ve 30.5 mm) kolonilerinde olduğu gözlemlenmiştir. Takiben C66, C52, C68 ve C71 numaralı kolonilerinin geldiği görülmektedir. Ancak hiçbir koloninin pozitif kontrol olarak kullanılan *P. aeruginosa*'dan (40 mm) daha yüksek siderofor üretme kapasine sahip olmadığı gözlemlenmiştir. İzole edilen bakterilerden C13, C30, C31, C35, C43 ve C53 numaralı kolonilerin ise siderofor üretme yeteneğine sahip olmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. *C. ensiformis* bitkisinden izole edilen suşların PGPB test sonuçları (+ PGPB aktivitesinin varlığını,- simgesi ise yokluğunu göstermektedir. Veriler üç tekrarın ortalama $\pm$ standart sapması olarak ifade edilmiştir

Koloni	IAA Üretme Kapasitesi ($\mu\text{g/ml}$)	Fosfat Çözünürlüğü Kapasitesi	ACC Deaminaz Aktivitesi	Siderofor Üretme Kapasitesi (mm)
C1	3.47 $\pm$ 0.03	-	-	19.5 $\pm$ 0.5
C2	0.32 $\pm$ 0.02	-	-	11.0 $\pm$ 0.0
C9	2.09 $\pm$ 0.06	-	-	14.5 $\pm$ 0.5
C11	3.65 $\pm$ 0.05	-	-	17.5 $\pm$ 0.5
C12	13.23 $\pm$ 0.11	-	-	18.0 $\pm$ 0.0
C13	12.05 $\pm$ 0.10	-	-	0.0 $\pm$ 0.0
C14	9.31 $\pm$ 0.03	-	-	21.0 $\pm$ 0.0
C17	4.33 $\pm$ 0.05	-	-	8.0 $\pm$ 0.0
C30	8.53 $\pm$ 0.05	-	-	0.0 $\pm$ 0.0
C31	4.56 $\pm$ 0.06	-	+	0.0 $\pm$ 0.0
C35	2.99 $\pm$ 0.04	-	-	0.0 $\pm$ 0.0
C43	0.20 $\pm$ 0.03	-	-	0.0 $\pm$ 0.0
C49	5.40 $\pm$ 0.13	-	-	30.5 $\pm$ 0.5
C52	13.14 $\pm$ 0.06	-	-	27.5 $\pm$ 1.5
C53	5.44 $\pm$ 0.05	-	-	0.0 $\pm$ 0.0
C54	12.58 $\pm$ 0.06	-	-	23.5 $\pm$ 1.5
C55	0.35 $\pm$ 0.05	-	+	33.5 $\pm$ 0.5
C65	3.07 $\pm$ 0.03	-	-	21.0 $\pm$ 1.0
C66	23.72 $\pm$ 0.17	-	+	29.0 $\pm$ 1.0
C68	2.39 $\pm$ 0.12	-	-	26.5 $\pm$ 0.5
C70	13.66 $\pm$ 0.10	-	-	18.0 $\pm$ 0.0
C71	2.61 $\pm$ 0.02	-	-	25.5 $\pm$ 0.5

4.1.3. Aşama II için bakteri seçimi

Her bir PGPB testine göre bakteriler yüksekten düşüğe doğru sıralanmış ve puanlanmıştır. Böylece aspir bitkisine uygulanacak olan 5 farklı bakteri Şekil 4.2'de de gösterildiği gibi C12 (*P. frigiditolerans*), C49 (*B. sanguinis*), C52 (*S. pseudovenezuelae*), C54 (*S. canus*) ve C66 (*S. griseorubiginosus*) olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.2. Bakteri izolatlarının PGP test sonuçları grafiği (taralı çubuklar aşama II için seçilmiş olan bakteri suşlarına aittir)

Literatürde seçilen bu bakteriler ve bitki uygulamalarının sonuçları ile ilgili çeşitli çalışmalar bildirilmiştir. Swiateczak vd. (2024), *P. frigoritolerans* 2RO30 suşu, kanola bitkisinde büyümeyi teşvik edici etkileri nedeniyle değerlendirilmiştir. Steril koşullarda yapılan sera denemelerinde bu suşun, klorofil içeriği, kök ve sürgün uzunluğu gibi büyüme parametrelerini anlamlı şekilde artırdığı belirlenmiştir. Ancak, aynı etki doğal koşullarda gözlemlenmemiştir. Bu durum, suşun yerli rizosfer mikrobiyotasıyla rekabet edememesiyle ilişkilendirilmiştir. Bu tezde tespit edilen fosfat çözünürlüğü inaktivitesinin aksine genom analizleri, 2RO30 suşunun fosfat çözünürlüğü ve IAA üretimi ile ilişkili genler taşıdığını göstermiştir. Bu durum izole edilen suş farklılığından kaynaklanabilmektedir. Araştırmacılar *P. frigoritolerans*'ın kontrollü ortamda büyümeyi destekleyici etkiler gösterebildiğini, ancak bu etkinin tarla koşullarında sınırlı kalabileceğini bildirmiştir. Mevcut bilimsel literatürde *P. frigoritolerans* türünün PGPB olarak ağır metal ve benzeri abiyotik stresler ile ilişkili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar, özellikle cıva (Hg) ve tuz stresi gibi abiyotik stres koşullarında bu bakterinin bitki gelişimini destekleyici potansiyelini ortaya koymaktadır. Gonzalez-Reguero vd. (2024)'ün çalışmasına göre, *Peribacillus frigoritolerans subsp. mercuritolerans* adlı yeni bir alt tür, Hg stresine karşı tolerans göstererek *Lupinus albus* bitkisinde büyümeyi teşvik edici etkiler sergilemiştir. Bu bulgular, bu bakterinin ağır metal stresi altında bitki büyümesini teşvik edici potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Literatürde Hg stresindeki etkilerine dair bir çalışma olmasına karşın Ni ile yapılmış herhangi bir yayın bulunmamakta olup bu tez kapsamında ilk defa araştırılmıştır.

Navarro vd. (2023)'ün çalışmasında, kahve bitkisinin rizosferinden izole ettikleri *Bacillus sanguinis* suşunun PGPB özellikler taşıdığını bildirmiştir. Bu suş, hidrojen

siyanür (HCN) üretimi ve amilaz ile proteaz gibi litik enzimleri sentezleme yeteneği göstermiştir. Bu enzimlerin, toprakta bulunan fungal patojenlerin hücre duvarlarını parçalayarak biyokontrol mekanizmasında rol oynadığı belirtilmiştir. Ayrıca *B. sanguinis*, 800 ppm Pb, 400 ppm Cu ve 800 ppm Mn gibi ağır metal konsantrasyonlarına karşı tolerans sergilemiştir. Bu özellikler, söz konusu bakterinin abiyotik stres koşullarında bitki gelişimini destekleyici ve biyogübre olarak potansiyel taşıdığını göstermektedir. Muñoz-Torres vd. (2024), *B. sanguinis* suşunu domates bitkilerine inoküle ederek, bu bakterinin tuz stresine karşı toleransı artırdığını bildirmiştir. Literatür taramasına göre, *B. sanguinis* türü ile Ni stresi başta olmak üzere herhangi bir ağır metal stresi altında bitki inokülasyonuna dayanan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu doğrultuda, söz konusu bakteri türünün ağır metal stresine karşı bitki yanıtları üzerindeki etkileri ilk kez bu tez kapsamında araştırılmıştır.

Wu vd. (2019), *S. canus* GLY-P2 suşunun salatalık rizosferinde ferulik asit ve p-hidroksibenzoik asidi etkin şekilde parçalayarak bitki gelişimini artırdığını ve oksidatif stresi azalttığını bildirmiştir. GLY-P2 uygulaması, yapraklarda SOD, CAT, APX, DHAR gibi antioksidan enzim aktivitelerini ve AsA ile GSH düzeylerini artırmış; buna karşılık MDA, H₂O₂ ve O₂⁻ seviyelerini düşürmüştür. Ayrıca rizosfer mikrobiyal çeşitliliği ve toprak enzim aktiviteleri de olumlu yönde etkilenmiştir. Bu sonuçlar, *S. canus*'un hem oksidatif stresin hafifletilmesinde hem de rizosfer sağlığının iyileştirilmesinde etkili olabileceğini göstermektedir. Chen vd. (2024a) çalışmasında, *Streptomyces* cinsine ait bazı türlerin bitkilerin kuraklık stresine karşı direncini artırmada önemli roller üstlendiği ortaya konmuştur. Bu kapsamda *S. griseorubiginosus*, *Saccharum officinarum* bitkisinde IAA üretimi yoluyla kök morfolojisini düzenleyerek su kullanım etkinliğini artırmakta; böylece bitkinin kuraklık koşullarındaki fizyolojik dayanıklılığını geliştirmektedir. Benzer şekilde, *S. pseudovenezuelae* türü de *Solanum lycopersicum* ve *Z. mays* bitkilerinde ACC deaminaz enzimi üretimi ile stres kaynaklı etilen birikimini azaltmakta, transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu düzenlemekte ve antioksidan enzim aktivitelerini artırmaktadır. Ayrıca bu türün, toplam şeker miktarını artırarak metabolik enerji dengesine katkı sağladığı; fitohormon modifikasyonları, eksopolisakkarit üretimi ve osmolite birikimi yoluyla da hücresel homeostazı koruduğu bildirilmiştir. Her iki *Streptomyces* türünün de bu çok yönlü mekanizmaları sayesinde yalnızca büyümeyi teşvik etmekle kalmayıp, aynı zamanda oksidatif stres, osmotik denge bozulmaları ve kök gelişimi gibi temel süreçleri destekleyerek bitkilerin abiyotik stres koşullarına adaptasyonunu önemli ölçüde kolaylaştırdığı görülmektedir. Bu bulgular, söz konusu türlerin ağır metal stresi gibi diğer çevresel baskılara karşı da potansiyel biyotik savunma ajanları olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Literatürde *S. griseorubiginosus* ve *S. pseudovenazuale* türünün bitkilere inokülasyonu ile bitki büyümesini teşvik ettiği ve bazı stres koşullarına karşı direnç sağladığı gösterilmesine rağmen ağır metal stresi, özellikle de Ni stresi altında bitkilere inokülasyonu üzerine spesifik bir çalışma bulunmamakta olup ilk defa bu tez ile araştırılmıştır.

4.2. Aşama II: Aspir ile Uyumlu Bakteri Taraması

Tezin bu aşamasında, *C. ensiformis* bitkisinden izole edilen, Ni dirençli ve PGPB özellikleri tespit edilmiş, bakteri türlerinden 5 tanesi seçilmiş ve aspir bitkisine

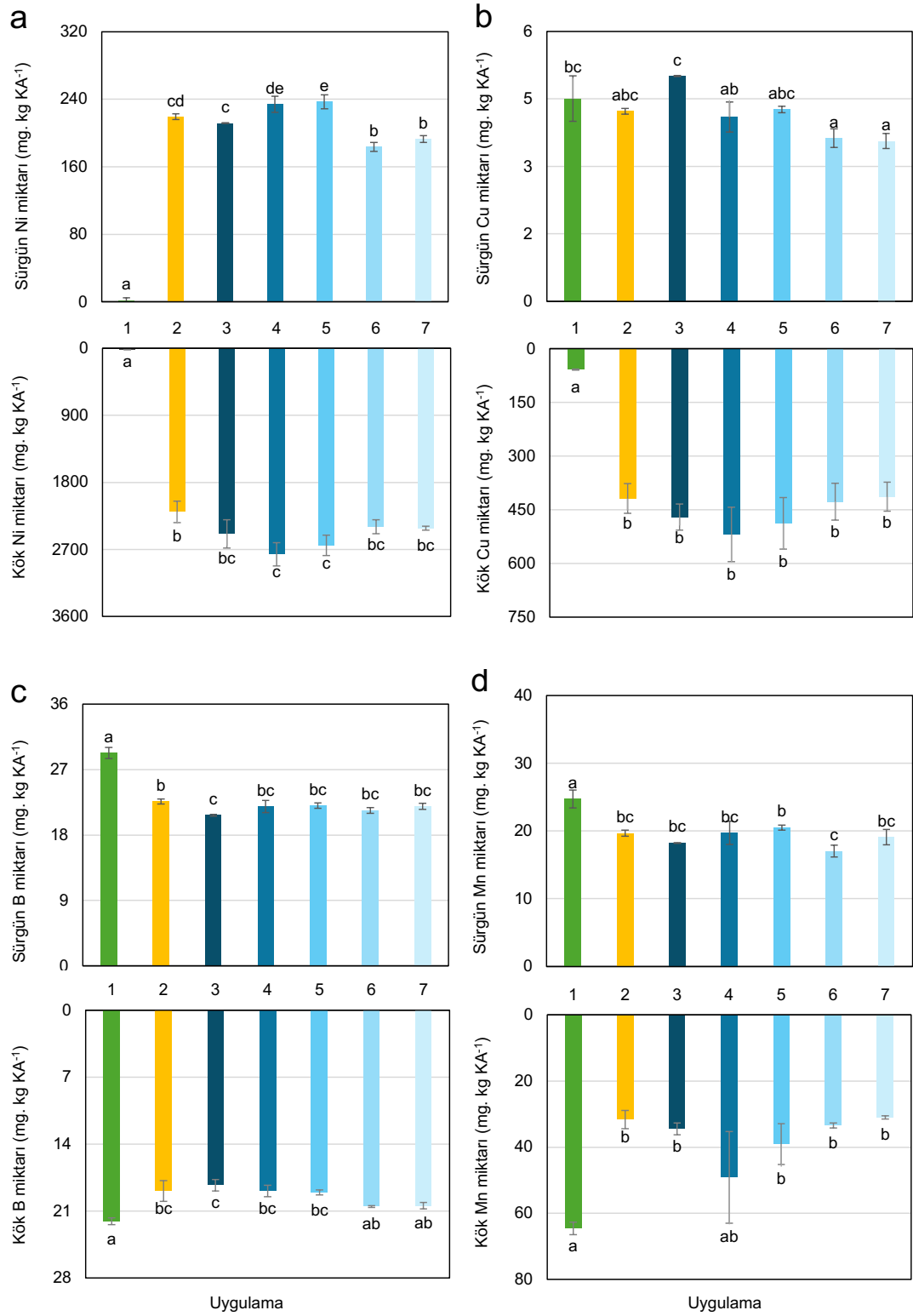
uygulanmıştır. Böylece tezin amacı doğrultusunda Aşama III için hangi bakterinin aspir bitkisi ile daha iyi uyum gösterdiği belirlenmiştir. Tezin devamında ana metin, şekil ve çizelgelerin içeriği ile başlıklarında okuyucuya kolaylık sağlamak amacıyla, çalışmada kullanılan bakterileri temsil eden kısaltmalar kullanılmıştır. Bu bağlamda, C12 (*P. frigoritolerans*), C49 (*B. sanguinis*), C52 (*S. pseudovenezuelae*), C54 (*S. canus*) ve C66 (*S. griseorubiginosus*) suşları sırasıyla Pf, Bs, Sp, Sc ve Sg şeklinde kısaltılarak ifade edilecektir.

4.2.1. PGPB'nin aspir bitkisinde mikro ve makro besin alımına etkisi

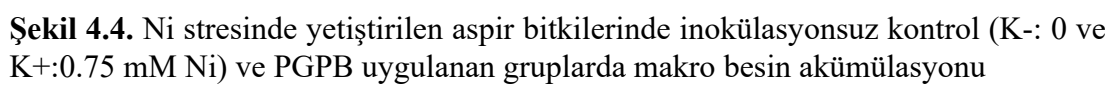
Aspir bitkilerindeki mikro ve makro elementlerin konsantrasyonu belirlenerek sırasıyla Şekil 4.3 ve 4.4'te verilmiştir. Mikro element ölçüm sonuçlarından Ni akümüasyonu incelendiğinde (Şekil 4.3a), hem sürgün hem de kökte negatif kontrole (0 mM) kıyasla tüm Ni uygulanan gruplarda önemli ölçüde Ni birikiminin arttığı görülmektedir. Pozitif kontrole (0.75 mM) kıyasla ise sürgünde en yüksek artış Sp (%8.1) ve onu takiben Bs (%6.7) inokülasyonlarında görülürken, Sc ve Sg inokülasyonlarında Ni miktarı pozitif kontrolden anlamlı ölçüde düşük (sırasıyla %16.3 ve 12.0) bulunmuştur. Kökte ise yalnızca Bs (%25.9) ve onu takiben Sp (%20.5) inokülasyonlarındaki artışlar anlamlı bulunmuştur. Bakteri uygulamalarının kendi aralarındaki farklar istatistiksel olarak önemsizdir. Özetle Sp ve Bs inokülasyonu ile Ni akümüasyonu artarken, Sg ve Sc uygulaması ile bitki bünyesine daha az miktarda Ni iyonu alınmıştır. Fidalgo vd. (2013), *S. nigrum* bitkisinde, 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ Cu stresi sonrası köklerde PC üretiminin arttığını ve bunun aşırı Cu miktarının kökte sabitlenerek sürgün bölgelere taşınmasını engellediğini ortaya koymuştur. Benzer bir mekanizma Sc ve Sg suşlarının inoküle edildiği aspir bitkilerinde gerçekleşmiş olabilir. Ayrıca bu bakterilerin inokülasyonunun aspir bitkisinde Ni iyonlarının toprak üstü organlara daha az taşınmasına neden olabilecek bir başka etken de hücre duvarı düzeyinde gerçekleşen bazı modifikasyonlarla ilişkili olabilir. Düşük metil esterleşmiş, asidik karakterdeki pektinlerin miktarında meydana gelen artışın, ağır metal iyonlarının “yumurta kutusu” (egg-box) modeli ile hücre duvarında bağlanmasını sağladığı (Parrotta vd. 2015), böylece metalin hücre duvarında hapsolmesine neden olarak, sitoplazmaya girişini sınırladığını ve toksisitesini azalttığı bilinmektedir. Buna ek olarak, endodermiste süberin birikimi gibi yapısal engellerin de metal taşınımını sınırladığı bilinmektedir. Sc ve Sg uygulamasının aspir köklerinde bu tür bariyer mekanizmalarını doğrudan veya dolaylı olarak uyarmış olması, sürgünlerdeki Ni akümüasyonunun sınırlı kalmasına katkı sağlamış olabilir. Şekil 4.3b'de verilen Cu miktarı incelendiğinde, sürgünde negatif kontrole göre yalnızca Sc ve Sg anlamlı oranda düşük (sırasıyla %19.5 ve 20.4) bulunmuştur. Kökte ise Ni uygulanan tüm gruplardaki Cu miktarı negatif kontrole kıyasla önemli miktarda fazla olsa da uygulamalar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Şekil 4.3c'de verilen B miktarı incelendiğinde, sürgünde negatif kontrole kıyasla tüm Ni uygulanan gruplarda önemli miktarda B konsantrasyonu azalsa da uygulamalar arasında fark yoktur. Kökte ise negatif kontrole kıyasla Sc ve Sg uygulamasındaki değişimler anlamlı bulunmaz iken diğer Ni uygulanan gruplarda önemli miktarda azalış saptanmıştır. Pozitif kontrole göre ise diğer uygulama gruplarındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildir. Özetle hem sürgün hem kök açısından yalnızca pozitif kontrol ve Pf uygulamasındaki aşağı yönlü değişim önemli bulunmuş, diğer gruplarda fark gözlemlenmemiştir. Şekil 4.3d'de verilen Mn miktarı incelendiğinde, sürgünde negatif kontrole göre Ni uygulanan tüm gruplarda önemli bir düşüş yaşanmıştır.

En az miktardaki düşüş Sp grubunda gerçekleşmiş olup Ni uygulanan gruplar arasındaki farklar anlamsız bulunmuştur. Kökte ise negatif kontrole göre, tüm Ni uygulanan gruplardaki (Bs grubu hariç) düşüş anlamlı miktardadır. Ancak sürgün ile benzer şekilde, Ni uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Yüksek Ni konsantrasyonlarının, fotosentezde de önemli görevleri bulunan manganın alımını engellediği bilinmektedir (Schmidt vd. 2016) ve literatürde PGPB'lerin Mn alımını artırabildiğine dair çalışmalar bulunmaktadır. Huang vd. (2020)'ye göre, *Bacillus cereus* HM5 ve *B. thuringiensis* HM7 bakterileri *Broussonetia papyrifera* bitkisinde Mn alımını artırmıştır.

Makro element analiz sonuçlarına göre (Şekil 4.4), Ni uygulaması aspir bitkisinin sürgünlerinde Mg, K, P ve Ca içeriklerinde belirgin azalışlara neden olmuştur. Ancak PGPB uygulamaları bu azalışları engellemede etkili olmamış; pozitif kontrol ile PGPB uygulamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Kök dokusunda Ni stresinin Mg, Ca ve K içeriklerinde anlamlı düşüşlere yol açtığı, P elementi üzerinde ise belirgin bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. PGPB inokülasyonları arasında Sc'nin Ca, Bs'nin ise K elementinin alımını artırdığı tespit edilmiştir. Genel olarak incelendiğinde tekil örnekler hariç PGPB uygulamalarının çoğu element alımına önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Bu durum bitki yetiştirme düzeneğinde kullanılan Hoagland çözeltisinin tam kuvvet olması ile ilişkili olabilir. Literatürde tam kuvvetle yapılan çalışmalar olmasına rağmen (Sumalan vd. 2023; Souza vd. 2016) ağır metal stresi çalışmalarında Hoagland besin çözeltisinin 1/2 kuvvet (Islam vd. 2016; Meinzer vd. 2023) hatta 1/4 kuvvet (McBride vd. 2016; Meinzer vd. 2023) olarak uygulandığı çalışmalar da yaygın şekilde bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda ise bitkiler kademeli olarak artan Hoagland çözeltilerinde yetiştirilmiştir: önce 1/2 ve tam kuvvet (Cruzado-Tafur vd. 2023) veya ardışık olarak 1/8, 1/4 ve 1/2 kuvvet Hoagland ile yetiştirilen ağır metal-PGPB çalışmaları bulunmaktadır (Liu vd. 2024). Araştırmacıların daha düşük kuvvette (örneğin 1/2 veya 1/4) Hoagland besin çözeltisi tercih etmelerinin temel nedeni, ağır metallerin genellikle bitki bünyesine bazı makro ve mikro besin elementleriyle benzer taşıma yolları üzerinden yarışmalı olarak alınması olabilir. Tam konsantrasyondaki besin elementleri, bu rekabeti ağır metaller aleyhine dengeleyerek toksisiteyi kısmen hafifletebilir ve bu da ağır metal stresinin bitki üzerindeki etkilerini azaltabilir. Bu durum, stres koşullarının şiddetini düşürerek PGPB uygulamalarının gerçek etkisini maskeleyebilir. Oysa düşük kuvvetli Hoagland çözeltisi kullanıldığında, besin elementlerinin yoğunluğu azalacağından metal iyonlarının biyoyararlanımı artar, bu da stresin bitki üzerinde daha belirgin şekilde ortaya çıkmasına ve PGPB'nin stresi hafifletici ve büyümeyi teşvik edici etkilerinin daha belirgin gözlemlenmesine olanak sağlayabilir. Nitekim, III. Aşama'da yetiştirilen aspir bitki örneklerinde bakterilerin etkisi nikel akümüasyonu açısından daha belirgin olmuş; bu durum, bitkilerin 1/2 kuvvetinde Hoagland çözeltisinde yetiştirilmiş olmalarından kaynaklanıyor olabilir. Öte yandan, Souza vd. (2016)'nın tam kuvvet Hoagland ile hazırladıkları hidroponik kültürde yetiştirilen muz bitkilerinde yaptıkları bir çalışmada, üçlü endofitik PGPB kombinasyonu inoküle edilen bitkilerde Cu, Zn ve Na miktarında bir değişim tespit edilmemesine rağmen makro besinlerin çoğu ile B, Fe ve Mn akümüasyonlarında önemli artışlar kaydedilmiştir.



Şekil 4.3. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPB uygulanan gruplarda mikro besin akümülayonu. Bu ve tezin devamındaki diğer grafiklerde çubukların üzerindeki farklı harfler, uygulamalar arasındaki istatistiksel farkın anlamlı olduğunu ($p \leq 0.05$) göstermektedir



Bu tez kapsamında aspir bitkisinin Ni metalini bünyesine almasında ve toprak üstü organlarına taşımasında uygulanan bakterilerin nasıl bir etkisinin olduğunu göstermek için hesaplanan TF, BF ve BCF değerleri Çizelge 4.3'te verilmiştir. TF değerinin 1'den düşük olması bitkinin nikeli sürgüne göre daha fazla bir oranda köklerde akümüle ettiğini göstermektedir. Hesaplanan indeks değerlerine göre tüm gruptaki TF değerinin 1'den düşük olduğu (<1) görülmektedir. Dahası pozitif ve negatif kontrol grupları bakteri uygulaması yapılan gruptan daha yüksek TF değerine sahiptir. Yani uygulanan tüm bakteriler Ni iyonlarının köklerde daha fazla oranda akümüle edilmesine yardımcı olmuştur. Buna rağmen uygulanan bakteriler arasında, sürgün dokusunda en yüksek TF değerine sahip olan ve dolayısıyla nikeli sürgüne en fazla taşıyan grubun Sp olduğu belirlenmiştir. BAF değerlerinin 1'in üzerinde (>1) olması, sırasıyla sürgün ve kök dokusunda Ni akümülyasyonunun gerçekleştiğini göstermektedir. Bu değer, tüm uygulama gruplarında 1'in üzerinde bulunmuş ve bitkilerin, bulundukları çözeltideki Ni konsantrasyonundan daha yüksek düzeyde Ni biriktirdiğini ortaya koymuştur. BAF açısından değerlendirildiğinde, tüm bakteri uygulamalarının pozitif kontrole kıyasla daha yüksek değerlere sahip olduğu görülmüştür. En yüksek BAF değeri Bs ve Sp grubunda hesaplanmıştır. Genel olarak, kök ve sürgün verileri birlikte değerlendirildiğinde, Sp ve Bs uygulamalarının Ni alımını artırma konusunda diğer uygulamalara kıyasla daha etkili olduğu; Sg ve Sc uygulamalarının ise bu açıdan en düşük etkiyi gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.3. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPB uygulanan grupta Translokasyon Faktörü (TF) ve Biyoakümülyasyon Faktörü (BAF)

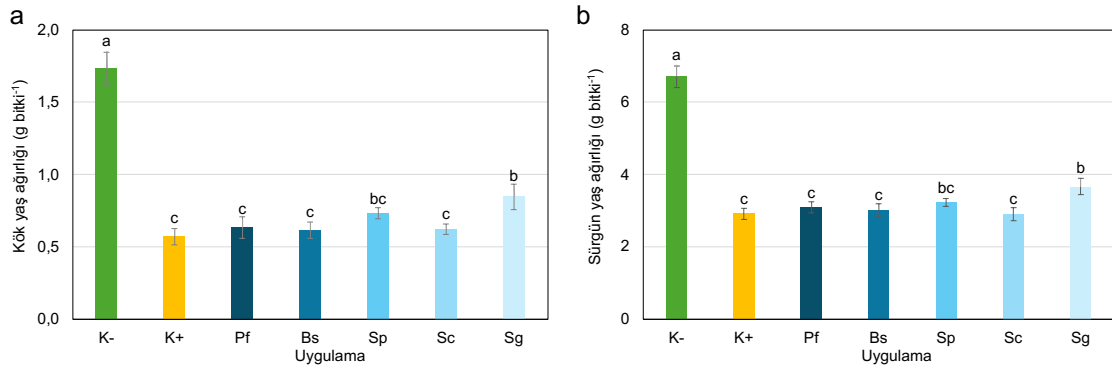
Uygulama	TF	BAF
K-	0,110	0,38
K+	0,101	54,9
Pf	0,086	61,4
Bs	0,085	68,1
Sp	0,090	65,5
Sc	0,077	58,6
Sg	0,080	59,2

Literatürde PGPB inokülasyonlarının bitkilerde metal iyonlarının TF ve BCF değerleri ile ilgili her iki yönde de değişebildiğine dair çalışmalar mevcuttur. Chi vd. (2022)'nin Cd stresi altında *Solanum nigrum* L. bitkisine *Bacillus paranthracis* NT1 and *Bacillus megaterium* NCT-2 inokülasyonları yaptıkları çalışmada NCT-2 suşu, TF ve BCF değerini anlamlı düzeyde artırırken; NT1 suşu TF ve BCF değerlerini düşürmüştür. Durand vd. (2015)'in, Ni stresi altında *Noccaea tymphaea-Bornmuellera tymphaea* bitki birlikteliğinde PGPB inokülasyonlarının (*Variovorax paradoxus*) etkisini araştırdıkları çalışmada, BCF ve TF değerlerinde belirgin artışlar tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada, Ni stresi altında *Alyssum murale-Bornmuellera tymphaea* bitki birlikteliğinde PGPB inokülasyonlarının TF değerini düşürdüğü, BCF değerinde ise anlamlı bir değişim meydana getirmediği görülmüştür. Bu bulgular, *Alyssum* içeren birlikteliğin Ni alımını artırmakta etkili olsa da nikelin sürgüne taşınımı

açısından sınırlı kaldığını; buna karşın *Noccaea* içeren birlikteliğin hem alım hem de taşınım yönünden PGPB uygulamasından daha fazla fayda sağladığını ortaya koymaktadır. Dolayısıyla farklı PGPB türleri bitkiler üzerinde farklı etkiler oluşturabileceği gibi, aynı türün etkisi de bitki türüne göre değişebilmektedir.

4.2.2. PGPB'nin aspir bitkisinin biyokütle üretimine etkisi

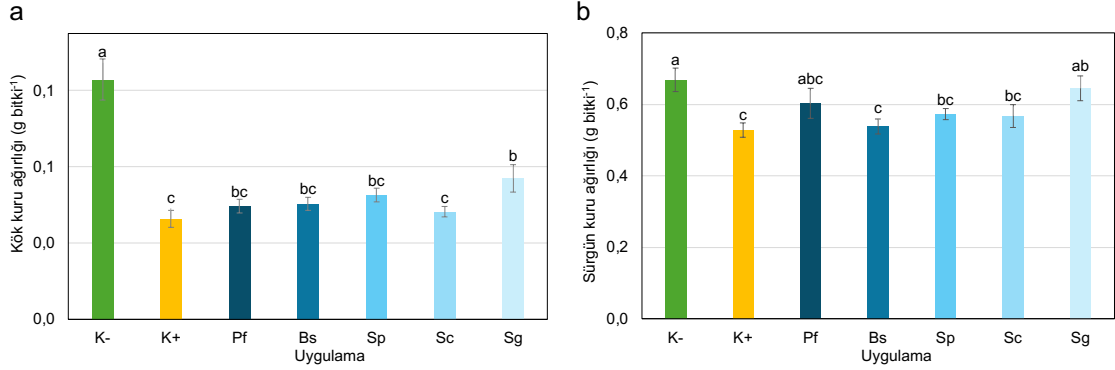
Aspir bitkilerinin kök yaş ağırlıkları incelendiği zaman (Şekil 4.5a), negatif kontrole kıyasla tüm uygulama gruplarında (K+, Pf, Bs, Sp, Sc ve Sg) önemli oranda düşüşler (sırasıyla %67.1, %63.4, %64.5, %57.6, %64.0 ve %51.1) kaydedilmiştir. Ni uygulanan gruplar incelendiğinde ise pozitif kontrole göre yalnızca Sg uygulamasındaki %48.3'lük artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Benzer bir durum sürgün yaş ağırlığı sonuçlarında da görülmektedir (Şekil 4.5b). Negatif kontrole göre tüm uygulama gruplarında (K+, Pf, Bs, Sp, Sc ve Sg) dramatik düşüşler (sırasıyla %56.5, %54.0, %55.0, %51.8, %56.7 ve %45.3) ölçülmüştür. Ni uygulanan gruplar incelendiğinde ise pozitif kontrole kıyasla yalnızca Sg uygulamasındaki artış (%25.8) istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 4.5. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPB uygulanan gruplarda kök (a) ve sürgün (b) yaş ağırlıkları

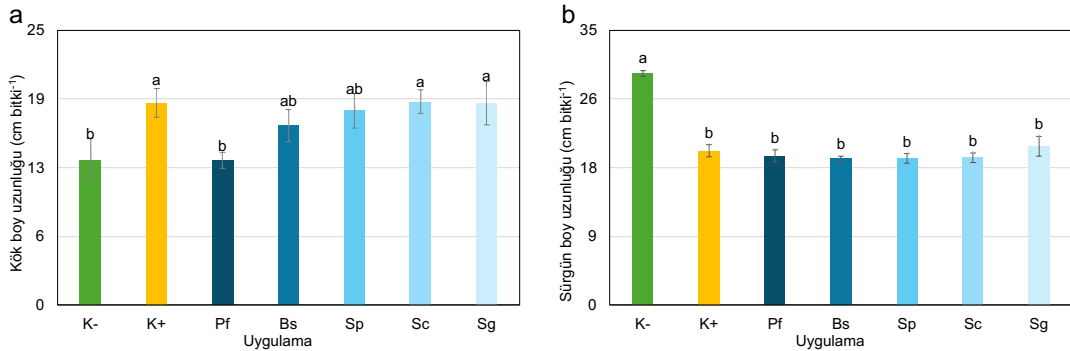
Bitki verimini gösteren önemli bir diğer parametre kuru biyokütle üretme kapasitesidir. Kök kuru biyokütle ölçüm sonuçları (Şekil 4.6a) incelendiğinde negatif kontrole göre diğer tüm gruplarda dramatik bir düşüş yaşandığı görülmektedir. En fazla düşüş pozitif kontrolde %58.3 oranında ölçülürken; en az düşüş ise %41.5 oranı ile Sg uygulamasında bulunmuştur. Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında ise Sg uygulamasının %39.2 oranında daha fazla kök kuru biyokütlesi ürettiği ölçülmüştür. Benzer dağılım sürgün sonuçlarında da görülmüştür. Sürgün kuru biyokütle ölçüm sonuçları Şekil 4.6b'de verilmiş olup ölçüm sonuçlarına göre, negatif kontrole göre tüm diğer gruplarda düşüş yaşanmış ancak yalnızca K+, Bs, Sp ve Sc uygulamalarındaki düşüşler (sırasıyla %20.8, 19.3, 14.2 ve 15.0) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Pozitif kontrole kıyasla ise Sg uygulaması %22.0 oranında daha fazla sürgün biyokütlesi üretmiştir. Sonuç olarak Sg uygulamasının hem kök hem de sürgün biyokütle üretimi açısından Ni stresi altında yetiştirilen aspir bitkilerinde önemli bir artışa sebep olduğu tespit edilmiştir. Bu artışın, bitki bünyesine daha düşük Ni akümüle etmesiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Buna ek olarak bakterilerin sentezlediği IAA gibi hücre bölünmesini ve büyümesini sağlayan hormonların ve metal şelatlayan sideroforların da etkisi olabilir. Ni konsantrasyonunu en çok arttıran Sp uygulaması ise içerdiği %20.5 (kök) ve %8.1 (sürgün) daha fazla Ni'e rağmen kuru ağırlık bakımından pozitif kontrol ile aynı seviyede

biyokütle üretimine sahip olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Priarone vd. (2023), *Alyssoides utriculata* (L.) Medik. bitkisinde yaptıkları çalışmada Ni stresi altında yetiştirilen bitkilerde bir PGPB olan *Pseudomonas fluorescens* bakteri uygulamasının biyokütle üzerinde pozitif bir etki oluşturduğunu bildirmiştir.



Şekil 4.6. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPB uygulanan gruplarda kök (a) ve sürgün (b) kuru ağırlıkları

Şekil 4.7a'da verilen aspir bitkilerin kök boy uzunluğu ölçümleri incelendiğinde, negatif kontrole kıyasla Pf, Bs ve Sp gruplarındaki artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Buna karşın negatif kontrole göre pozitif kontrolde %38.9, Sc uygulamasında %39.9 ve Sg uygulamasında %38.8'lik anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Bu artışın nedeni olarak Ni tarafından hasar gören kök dokusu, aquaporinler ve kök tüyleri sebebi ile yeterince su alamayan bitkinin, kök boyunu uzatarak daha derinlerden su almaya çalışma stratejisi geliştirmiş olabileceği şeklinde düşünülmüştür.



Şekil 4.7. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPB uygulanan gruplarda kök (a) ve sürgün (b) boy uzunlukları

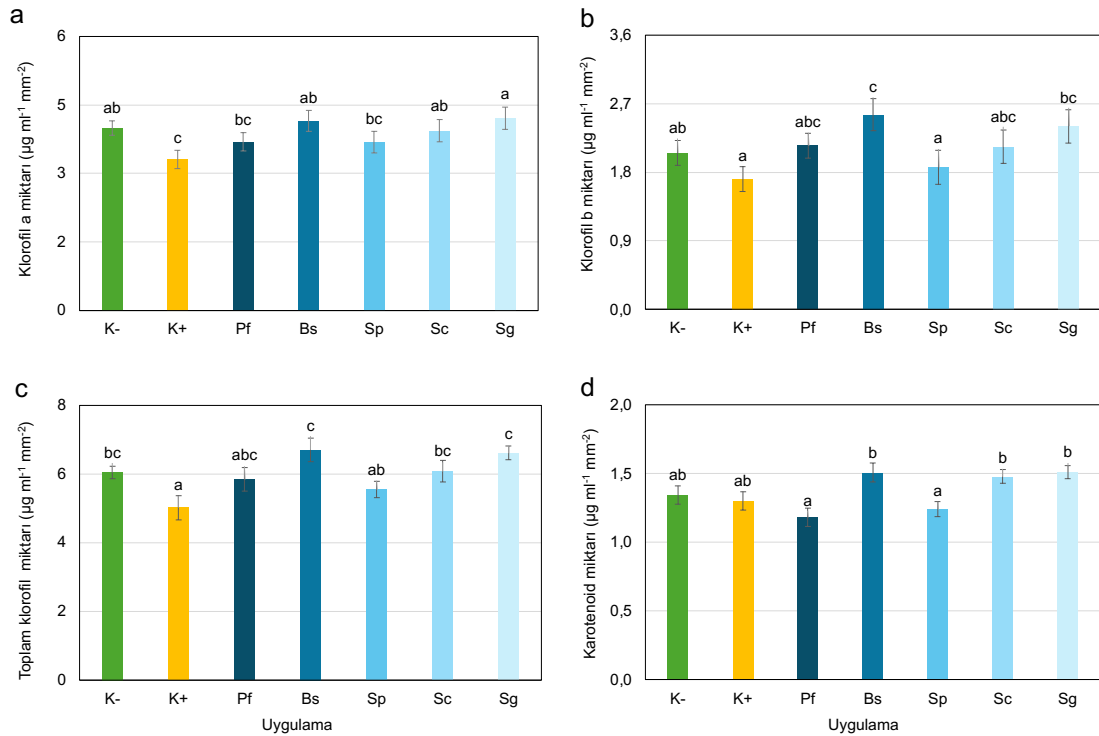
Sürgün boyları açısından değerlendirildiğinde ise (Şekil 4.7b) negatif kontrole göre tüm gruplarda (K+, Pf, Bs, Sp, Sc ve Sg) dramatik bir düşüş (sırasıyla %33.4, %35.6, %36.7, %36.7, %36.3 ve %31.3) olduğu görülmektedir. Uygulama grupları arasındaki farkların ise istatistiksel açıdan önemli olmadığı tespit edilmiştir. Ni stresinin başlamasından itibaren bir savunma stratejisi olarak büyümenin azalması ve mevcut enerjisinin bitkinin savunma elemanlarının ve yapısal moleküllerin sentezine yönlendirilmesi söz konusu olabilir. Benzer şekilde, biyokütle üzerinde belirgin etkisi

olmasına rağmen Baran (2018)'ın aspir bitkisinde yaptığı çalışmada, 0.50 ve 0.75 mM Ni stresi altında bitki boy uzunluğunda önemli bir değişim meydana gelmemiştir.

4.2.3. İnoküle edilen bakterilerin aspir bitkisinin fotosentetik pigment miktarına etkisi

Fotosentetik pigment miktarları incelendiğinde (Şekil 4.8), negatif kontrole kıyasla bakterisiz Ni uygulaması yapılan pozitif kontrolde klorofil *a* miktarında anlamlı düzeyde (%17.2) bir düşüş yaşanmıştır. Buna karşın bakteri uygulaması yapılan tüm gruplarda bu düşüşün olmadığı, klorofil *a* seviyelerinin negatif kontrolden önemli ölçüde farklı olmadığı tespit edilmiştir. Diğer bir deyişle, bakteri uygulamalarının tamamı klorofil *a* miktarını arttırmıştır. Pozitif kontrol ile kıyaslandığında bu artışlardan en yüksek olanı Sg grubunda gerçekleşmiş olup %27.5 oranındadır.

Klorofil *b* miktarı açısından negatif kontrole kıyasla yalnızca Bs uygulamasında gerçekleşen %24.7'lik artış anlamlı bulunmuştur. Ni uygulanan gruplar açısından incelendiğinde ise, pozitif kontrole göre Bs (%49.5) ve Sg (40.5) uygulamalarındaki artışlar istatistiksel açıdan önemlidir. Toplam klorofil miktarı (*a+b*) incelendiğinde ise pozitif kontrole göre Bs, Sc ve Sg uygulamasındaki artışlar önemli iken Pf ve Sp uygulamasındaki artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Karotenoid miktarı açısından kontrollere göre uygulama grupları arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.



Şekil 4.8. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPB uygulanan gruplarda fotosentetik pigment miktarları [klorofil *a* (a), klorofil *b* (b), toplam klorofil (c) ve karotenoid (d)]

Ni akümülyasyon sonuçları ile düşünöldüğünde özellikle Sp grubunun daha fazla Ni iyonunu sürgüne transloke etmesine rağmen kontrol ile aynı miktarda pigment içeriğine sahip olması önemli bir bulgudur. Yani daha yüksek Ni akümülyasyonu olmasına karşın Sp bakterisinin çeşitli mekanizmalar ile aspir bitkisinin pigment içeriğini korumasına yardımcı olduğı görölmüşür. Buna karşın en yüksek oranda pigment artışlarının tespit edildiğı Sg ve Bs uygulamalarında ise iki farklı durum vardır; Sg uygulaması sürgüne en az Ni transloke eden grup olduğı için aspir bitkisinin yapraklarında daha az Ni toksisitesi yaşanmış ve pigmentlerin korunabildiğı düşünölmektedir. Bs uygulaması ise sürgüne Ni translokasyonu en yüksek ikinci grup olmasına rağmen pigment miktarında öne çıkmaktadır. Bu durum, kontrole göre daha fazla Ni stresi altında olmasına rağmen Bs bakterisinin aspir bitkisinde pigment içeriğini koruduğına hatta sentezini arttırdığına işaret etmektedir. Benzer şekilde literatürde PGPB uygulamalarının Ni stresi altında fotosentetik pigment miktarını arttırdığına dair birçok çalışma bulunmaktadır (Kumar vd. 2023; Vishnupradeep vd. 2022; Pishchik vd. 2021).

4.2.4. İnoküle edilen bakterilerin aspir bitkisinin klorofil *a* floresansı üzerine etkisi

Klorofil *a* floresans ölçümleri sonucunda elde edilen JIP testi parametrelerinden reaksiyon merkezi ile ilgili enerji akışlarını ifade eden veriler Şekil 4.9'da verilmiştir. PSII'nin potansiyel fotokimyasal kuantum verimini ifade eden Fv/Fm oranı incelendiğinde, negatif kontrole göre tüm gruplarda (K+, Pf, Bs, Sp, Sc ve Sg) %7-9 oranında düşüş meydana gelmiş olup bu düşüşler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. En fazla verim kaybı Sp; en az verim kaybı ise Sg ve Sc uygulamasında olduğı tespit edilmiştir.

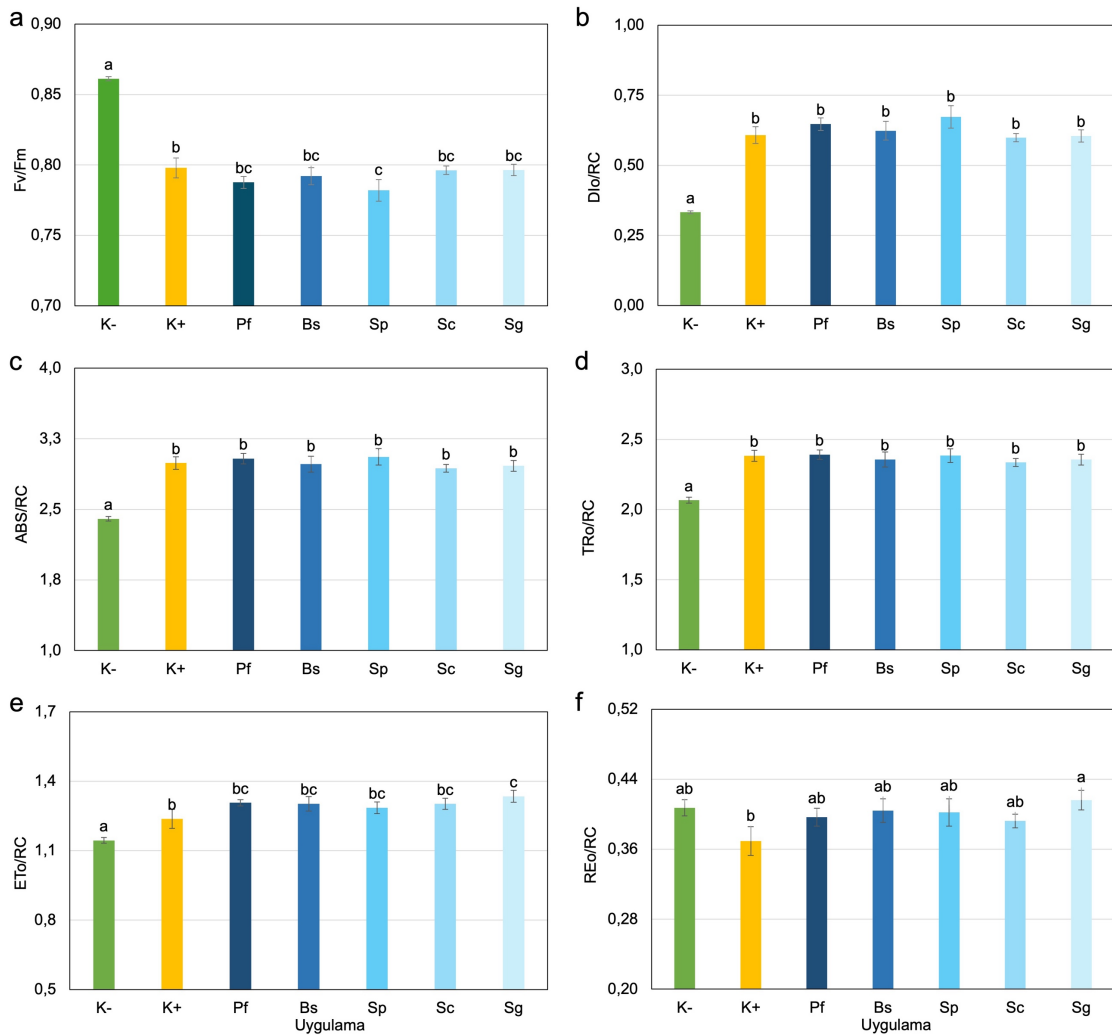
Fotokimya dışında kaybedilen enerji (Dl_o/RC) miktarı incelendiğinde ise, negatif kontrole göre tüm gruplarda dramatik bir artış tespit edilmiştir. Bu artışlar K+, Pf, Bs, Sp, Sc ve Sg gruplarında sırasıyla %83, 94, 87, 102, 80 ve 82 oranında gerçekleşmiştir. Yani gelen foton enerjisinin ısı olarak kaybının en yüksek miktarda yaşandığı uygulama Sp olarak kaydedilmiştir. Uygulamaların kendi arasındaki farklar ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Reaksiyon merkezi başına absorbe edilen enerjiyi veya ortalama anten büyüklüğünü ifade eden ABS/RC değeri incelendiğinde, negatif kontrole göre tüm gruplarda dramatik bir artış tespit edilmiştir. Bu artışlar K+, Pf, Bs, Sp, Sc ve Sg uygulamasında sırasıyla %25, 27, 24, 27, 22 ve 23 oranında gerçekleşmiştir. Dolayısıyla en fazla anten büyüklüğü Sp ve Pf; en az anten büyüklüğü ise Sg ve Sc uygulamasında olduğı yorumu yapılabilmekle beraber hem Fv/Fm hem de Dl_o/RC değerleri ile birlikte değerlendirildiğinde ABS/RC'nin anten büyüklüğünden çok inaktif reaksiyon merkezlerinde bir artışı işaret ettiğı görülebilir. Dolayısıyla, Ni stresi aktif reaksiyon merkezi miktarını negatif kontrole göre azaltmıştır.

Yakalanan enerji akışındaki (TR_o/RC) değişimler ABS/RC'de belirlenen sonuçlar ile uyumlu olarak, anten büyüklüğünün büyümesi neticesinde negatif kontrole göre uygulama gruplarında (K+, Pf, Bs, Sp, Sc ve Sg) yaklaşık %13-16 oranında artmış olup sırasıyla %15, 16, 14, 15, 13 ve 14 oranında gerçekleşmiştir. Uygulamaların kendi arasındaki farklar ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

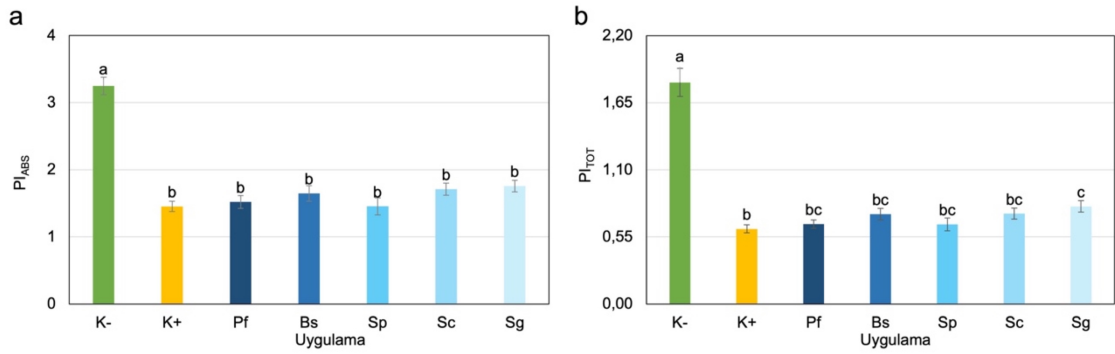
Ni uygulamasına bağlı olarak aspir bitkilerinin reaksiyon merkezi başına absorbe edilen enerjinin elektron transportuna aktarılmasını yansıtan ETo/RC'deki değişim incelendiğinde, negatif kontrole kıyasla tüm gruplardaki düşüşler (%7-14) anlamlı olmasının yanı sıra, en büyük düşüş %14 oranında pozitif kontrolde meydana gelmiştir. Ni uygulaması yapılan gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında ise pozitif kontrole göre yalnızca Sg uygulamasındaki %7.9'luk artış istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme olarak kaydedilmiştir.

Ni uygulamasına bağlı olarak aspir bitkilerinde PSI'in en son elektron alıcılarını redükleyen ve her bir aktif reaksiyon merkezine transfer edilen elektron akışını yansıtan REo/RC'deki değişim incelendiğinde, negatif kontrole göre hiçbir uygulamadaki fark istatistiksel olarak anlamlı değilken pozitif kontrole göre yalnızca Sg inokülasyonu yapılan gruptaki %12.8'lik artış anlamlı bulunmuştur.



Şekil 4.9. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPB uygulanan gruplarda fotokimyasal değişimler [kuantum verimi (a), fotokimya dışı kaybedilen enerji (b), absorbe edilen enerji (c), yakalanan enerji (d), elektron taşıma zincirine aktarılan enerji (e), PSI'e elektron iletim verimliliği (f)]

Fotosistemlerin (PSII ve PSI) tüm fotokimyasal aktiviteleri hakkında bilgi veren performans indeksleri incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.10'da sunulmuştur. Toplam performans indeksi (PI_{TOT}), PI_{ABS} değerine ilaveten PSI'in son elektron alıcısına kadar olan performansı da içermektedir. Elde edilen verilere göre, her iki parametre için de negatif kontrole göre tüm Ni uygulanan gruplarda dramatik düşüşler meydana gelmiştir. PSII tarafından foton absorpsiyonundan sistemler arası elektron alıcılarının indirgenmesine kadarki enerji korunumunun performans indeksini gösteren PI_{ABS} açısından, pozitif kontrole kıyasla bakteri uygulamalarında meydana gelen artışların anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Bununla karşın, son elektron alıcısına kadar olan performansı da içeren toplam performans indeksi (PI_{TOT}) açısından Sg inokülasyonu yapılan grupta meydana gelen %29.9'luk artış anlamlı bulunmuştur.



Şekil 4.10. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPB uygulanan gruplardaki fotosentetik performans indeksleri [PI_{ABS} (a) ve PI_{TOT} (b)]

Fotokimyasal değişimler genel olarak değerlendirildiğine, öncelikle Ni uygulaması yapılmamış negatif kontrol grubuna kıyasla tüm Ni uygulanan gruplarda bir stres meydana geldiği ve bunun fotosentetik aktiviteye yansıdığı görülmektedir. Ni uygulanan gruplarda anten büyüklüklerinin ve inaktif reaksiyon merkezi sayısının arttığı, dolayısıyla gelen fazla foton enerjisinin ısı olarak yayılması ile bertaraf edildiği, yakalanan enerji miktarının da tüm gruplarda benzer şekilde arttığı görülmüştür. Pozitif kontrol ile kıyaslanarak incelendiğinde benzer anten büyümesi ve foton yakalanmasına rağmen yakalanan enerjinin elektron transportuna aktarılmasında en başarılı grubun Sg olduğu görülmektedir. Ancak genel olarak bakteri uygulamaları birbirleri ile kıyaslandığı zaman aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ölçülen parametre bulunmamaktadır. Ni stresi altında yaşanan bu fotokimyasal değişimler akümüasyon verileri ile birlikte değerlendirildiğinde, Sg uygulanan aspir bitkisinin yapraklarında, pozitif kontrolden bile daha düşük seviyede Ni translokasyonu olduğundan, daha iyi fotosentetik performans göstermeleri beklenen bir sonuçtur.

Elde edilen verilerdeki diğer dikkat çekici durum ise pozitif kontrolden %8.1 oranında daha fazla Ni sürgüne transloke etmesine rağmen kuantum verimi hariç tüm parametrelerde kontrol ve Sg uygulaması ile aynı oranda fotosentetik performansa ve aktiviteye sahip olan Sp uygulamasıdır. Daha fazla Ni içermesine rağmen hangi mekanizma ile fotosentetik performansı iyileştirdiği önemli bir konudur. Sürgündeki Ni iyonlarının bir kısmını metalloitiyoneinler veya fitoşelatinler ile şelatlayıp inaktif durumda vakuollerde hapsedilmiş olabileceği düşünülmektedir. Böylece fotosentetik

biyomoleküller korunmuş ve en az kontrol grubu kadar aktivite gösterebilmiş olabilir. Literatürde benzer sonuçlar bildirilmiş olup, PGPB uygulamasının ağır metal ve tuz gibi abiyotik stresler altında bitkilerin fotosentetik performansını arttırdığına dair çalışmalar bulunmaktadır (Vishnupradeep vd. 2022; Rossi vd. 2021).

4.2.5. Aşama III için uygun bakterilerin seçimi

Bitkilerin metal stresine karşı verdiği iki farklı strateji bulunmaktadır. Birincisi, bu strese neden olan metali bitkiler bünyelerine almayarak potansiyel toksik etkilerinden korunmak, diğeri ise tolerans olup, toksik düzeyde alınan metalin verebileceği hasarlara karşı bitkinin savunma mekanizması elemanları ile (ligandlar, antioksidanlar gibi) kendini korumasıdır. Bu tezde, bitkinin fitoremediasyon kapasitesinin ve metal toleransının artırılması amaçlandığı için öncelikle ilgili metali bitki bünyesine alınması beklenir. Çünkü hem fitoremediasyon verimliliği hem de tolerans mekanizması, bitkinin metali akümüle etmesine bağlıdır. Bs ve Sp, Ni akümüleyonunu ve translokasyonunu sağlaması açısından en iyi performansı göstermesine rağmen pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında stres düzeylerinde fark bulunmaması, bu uygulamaların metal birikiminin yanı sıra toleransını da arttırdığını göstermektedir. Bu iki bakteri uygulaması arasından, daha yüksek biyokütle üretimini teşvik eden grubun seçilmesinin uygun olacağı düşünülmüştür. Bu sayede birim zamanda topraktan daha yüksek miktarda Ni metali çıkarılabilecek ve kirlenmiş alan temizlenebilecektir.

Bu kriterler doğrultusunda, Sp grubunun tezin devamında çalışılacak ilk tür olarak seçilmesi uygun bulunmuştur. Buna ek olarak büyüme parametrelerinde dikkat çekici iyileşmeler/teşvikler sağlayan ve pozitif kontrole göre daha fazla Ni akümüle etmesinin yanı sıra, toprak üstü organlara daha az Ni akümüle eden Sg, ikinci seçilen tür olmuştur. Bu doğrultuda, 'Ni ile kirlenmiş ve düşük verim baskısı altındaki tarımsal alanların fitoremediasyonu için PGPB uygulamaları, aspir bitkisinde Ni toleransı ve akümüleyon kapasitesini artırabilir mi?' sorusuna odaklanan bu tez, farklı stratejilere sahip iki ayrı bitki-bakteri etkileşimini karşılaştırmalı olarak değerlendirme imkânı sunmuştur.

Bilimsel literatürde en yoğun şekilde incelenen ve biyoteknolojik uygulamalarda en fazla geliştirilen PGPB, ağırlıklı olarak *Rhizobium* başta olmak üzere çeşitli Gram-negatif bakteriler olsa da antibiyotik üretimi konusundaki yaygın bilinirliklerinin ötesinde, Gram-pozitif *Streptomyces* cinsine ait türlerin, tarımsal öneme sahip bitkiler de dâhil olmak üzere, bitkilerle faydalı ilişkiler kurabildiği bilinmektedir (Sousa ve Olivares, 2016). *Streptomyces* türleri tarafından üretilen biyolojik olarak aktif bileşiklerin çeşitliliği, bitki büyümesini artırma potansiyeline sahip maddeleri de içermektedir; bu nedenle bu bakteriler, bitki büyümesini teşvik edici *Streptomyces* türleri (PGPS) olarak isimlendirilmektedir (Sousa ve Olivares, 2016).

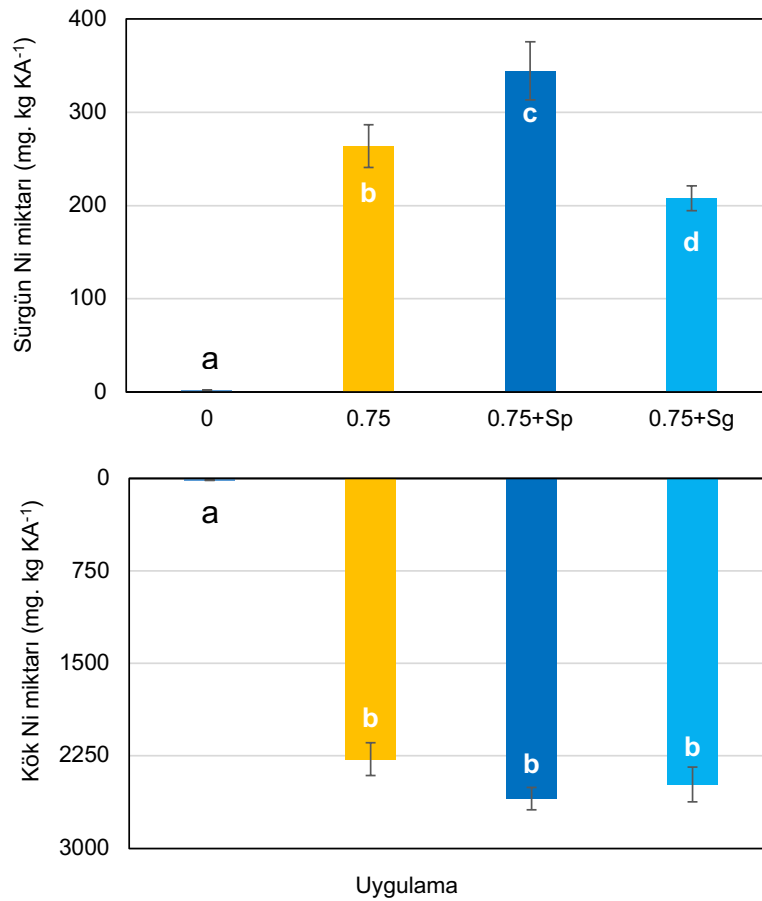
Tezin devamında Sp ve Sg'yi kapsayan PGPS terimi kullanılacaktır. Ayrıca, PGPS'nin ticari biyogübre olarak kullanımına yönelik çalışmalar da bulunmakta olup biyoinokülan formülasyonlarının tasarımına yönelik başarılı sonuçlar mevcuttur. Böylece bitki büyümesini/verimini ve fitoremediasyon kapasitesini uygulamalı olarak artırması mümkün olmaktadır (Sousa ve Olivares, 2016; Tamreihao vd. 2016). Sonuç olarak, yukarıda belirtilen gerekçeler ile Aşama III için her ikisi de *Streptomyces* türü olan Sp ve Sg seçilmiş olup 0.75 mM Ni stresi altında yetiştirilen aspir bitkilerindeki

etkileri morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal düzeyde araştırılmış ve tezin devamında sunulmuştur.

4.3. Aşama III: PGPS'nin Aspir Bitkisinde Nikel Akümülayonuna, Toleransına ve Büyüme Parametrelerine Etkisi

4.3.1. Mineral madde ölçümü

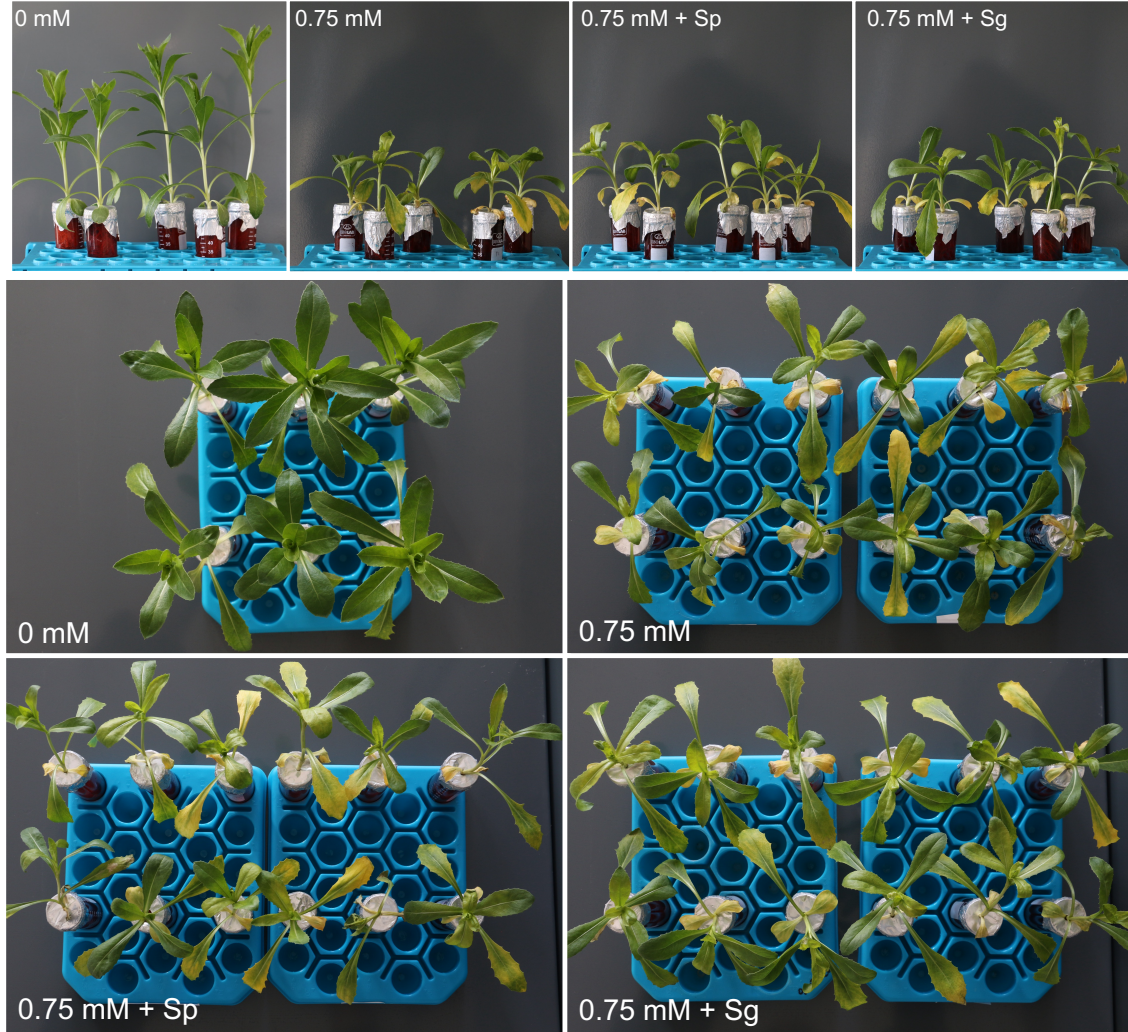
PGPS inoküle edilen aspir bitkilerinin Ni akümülayon sonuçları Şekil 4.11'de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, son aşamadaki bakteri inokülayonu ve bitki yetiştirme yöntemi bitki bakteri etkileşimini güçlendirmiş bakterilerin Ni akümülayon sonuçlarını olumlu anlamda etkilemiştir. II. Aşamada elde edilen oranlar Sp ve Sg için sırası ile +%8.1 ve -%12.0 olarak bulunmuş iken yarı katı agarlı ortam ile yetiştirilen aspir bitkilerinin sürgünlerinde pozitif kontrole kıyasla (0.75 mM) 0.75+Sp grubunda %29.9 oranında artış; 0.75+Sg grubunda ise %21.2 oranında azalış tespit edilmiştir. PGPS uygulamalarının Ni akümülayonuna artırıcı ve azaltıcı etkisi ve olası mekanizmalar hakkında 4.2.1 numaralı başlık altında tartışılmıştır.



Şekil 4.11. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülayonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPS uygulanan grupların Ni akümülayon sonuçları

4.3.2. Morfolojik ölçümler

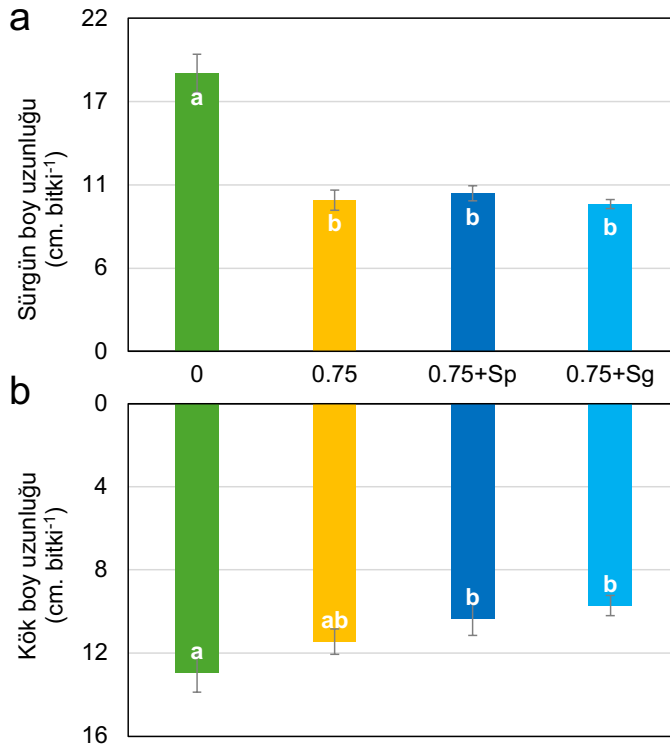
Sp ve Sg bakterileri ile inoküle edilen aspir bitkileri 0.75 mM Ni stresi altında kontrollü iklim odası koşullarında ($23^{\circ}\text{C}\pm 2$ sıcaklık, $\%50\pm 5$ nem, 16:8 saat aydınlık/karanlık fotoperiyot) yetiştirilmiş ve hasat gününe ait görseller Şekil 4.12’de verilmiştir.



Şekil 4.12. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPS uygulanan grupların hasat günü genel görünümü

Morfolojik olarak incelendiğinde negatif kontrolün (0 mM) oldukça sağlıklı durumda olduğu ve Ni uygulanan gruplara kıyasla daha uzun ve fazla yaprak sayısına sahip olduğu görülmektedir. Ni uygulanan gruplarda ise boy uzunlukları kısalmış ve yapraklarda değişen yoğunlukta klorozlar ve solmalar gözlenmiştir. Özellikle Şekil 4.12’de verilen grupların üstten görüntüsünde klorozis yoğunlukları karşılaştırılabilir düzeyde olup, en çok sararma ve solma Sp grubunda iken en az ise Sg grubundadır. İnokülasyon yapılmamış 0.75 mM grup ise (pozitif kontrol) her iki uygulamanın arasında bir görüntü vermektedir. Bu durum Sp’nin $\%29.9$ daha fazla, Sg’nin $\%21.2$ daha az Ni alımına neden olduğu bulgusu ile uyumludur.

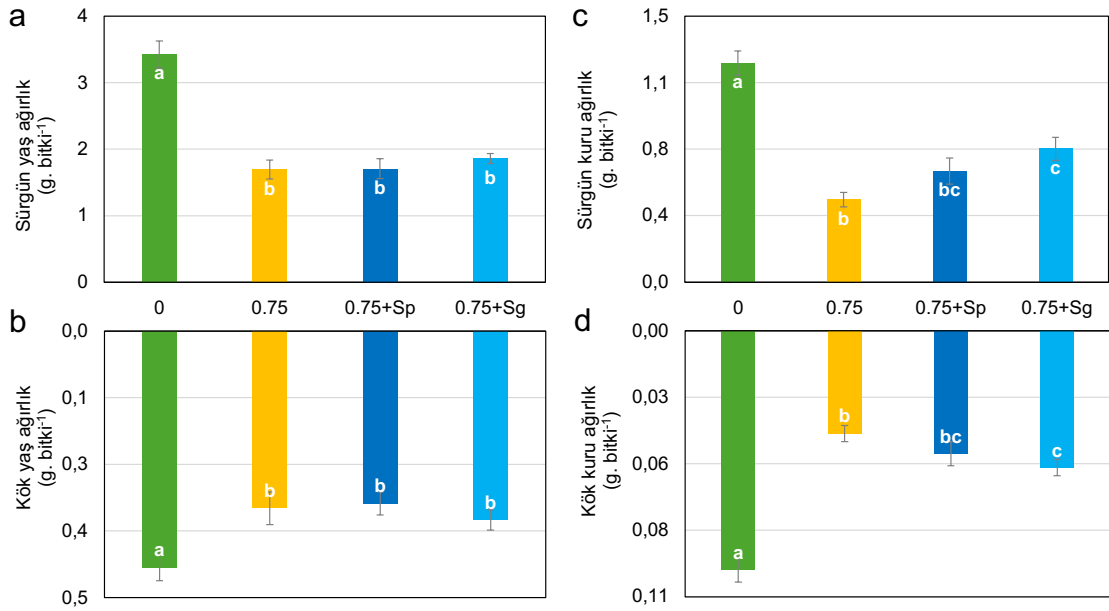
Yapılan boy uzunluğu ölçüm sonuçları Şekil 4.13'te verilmiştir. Sürgün boy uzunluğu sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.13a) negatif kontrole göre tüm Ni uygulanan gruplarda 45 ± 2 oranında düşüş tespit edilmiştir. Pozitif kontrol (0.75), Sp ve Sg arasında ise anlamlı bir fark bulunmamıştır. Kök boy uzunluklarında da (Şekil 4.13b) pozitif kontrol (0.75) ile bakteri uygulamaları (Sp ve Sg) arasında önemli bir fark tespit edilmemiştir. Dolayısıyla her iki bakteri inokülasyonunun da bitki boy uzunluğu üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı söylenebilir. Boy uzunlukları arasındaki farkın bitki yetiştirme süresi arttıkça daha iyi gözlemlenebileceği düşünülmektedir. Baran (2018), aspir bitkisinde farklı Ni konsantrasyonlarının neden olduğu toksik etkileri incelediği çalışmada, Ni stresine rağmen kök uzunluğunda anlamlı bir değişiklik gözlemlenmediğini; ancak nikelin endodermal bariyeri aşarak perisikl hücrelerinde birikmesi sonucunda yan kök oluşumunun baskılanmış olabileceğini bildirmiştir.



Şekil 4.13. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPS uygulanan grupların sürgün (a) ve kök (b) boy uzunlukları

Ni stresi altında Sp ve Sg inokülasyonu ile yetiştirilen aspir bitkilerinde yaş ve kuru biyokütle ölçüm sonuçları Şekil 4.14'de verilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde hem sürgün hem de kök yaş ağırlıklarında pozitif kontrole göre bakteri inokülasyonunda önemli bir değişim gerçekleşmemiştir. Ancak bitkinin verimini ölçmede esas olarak ele alınan kuru ağırlık verileri incelendiğinde negatif kontrole kıyasla Ni uygulanan gruplarda dramatik düşüşler meydana gelmiştir. Pozitif kontrole kıyasla ise Sp ve Sg inokülasyonu sürgünde sırasıyla %35 ve %61; kökte %20 ve %33 oranında iyileşme sağlamıştır.

Bai vd (2024) tarafından yapılan bir meta-analizde, PGPB'nin ağır metal ile kirlenmiş topraklardaki bitkiler üzerindeki etkilerini daha önce yapılmış ve yayımlanmış deneysel araştırmalardan 2037 adet nicel veri seti toplayarak incelemiştir. Çalışmada ele alınan beş farklı kültür bitkisi; pirinç (*O. sativa*), mısır (*Z. mays*), buğday (*Triticum aestivum* L.), soya fasulyesi (*Glycine max* (L.) Merr.) ve sorgum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) olup, bu bitkilerde PGPB uygulamasının sürgün, kök ve tane biyokütlesini sırasıyla %33, %35 ve %20 oranında artırdığı rapor edilmiştir. Araştırmacılar, bu etkiyi, besin alımının (özellikle N, P, K, S) artması, fotosentetik pigment içeriklerinin yükselmesi ve antioksidan enzim aktivitelerinin (SOD, CAT, POD, APX) teşvik edilmesiyle ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, oksidatif stres göstergelerinin (H_2O_2 , MDA) azalması ve bitki hormonlarındaki (ABA, IAA) düzenlenme de büyüme üzerindeki olumlu etkiyi desteklemiştir. Böylece PGPB'nin hem beslenme hem de stres toleransı yoluyla bitki gelişimini desteklediğini ileri sürülmüştür.



Şekil 4.14. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülyasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPS uygulanan grupların yaş (a, b) ve kuru (c, d) biyokütle üretimi

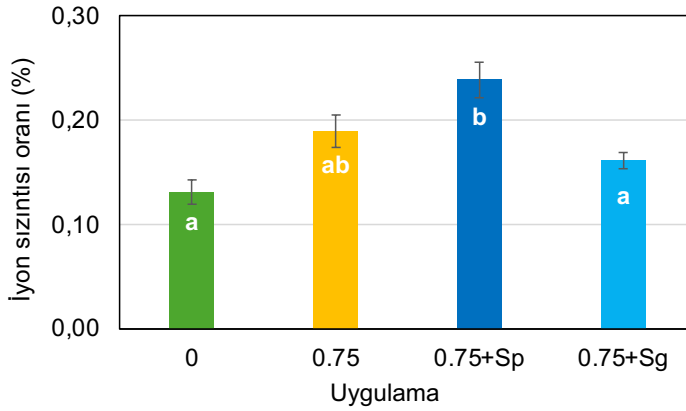
4.3.3. Fizyolojik ve biyokimyasal ölçümler

4.3.3.1. İyon sızıntısı ölçümü (ELC)

Ni stresi altında Sp ve Sg inokülyasyonu ile yetiştirilen aspir bitkilerinde iyon sızıntısı oranı sonuçları Şekil 4.15'te verilmiştir. Özellikle artan iyon sızıntısı, hücre zarlarının yapısal bütünlüğünün bozulduğunu ve iyonların hücre dışına kontrolsüz şekilde çıkabildiğini göstermektedir. nikelin, Ca ve Zn gibi zar stabilitesi için kritik öneme sahip elementlerin alımını azaltması, zar fosfolipitlerinin yapısında bozulmaya yol açarak membran geçirgenliğini artırmakta, bu da iyon sızıntısının artmasına neden olabilmektedir. Ayrıca, Ni birikiminin neden olduğu lipid peroksidasyonu ve H_2O_2 gibi radikallerin birikimi, hücre zarlarında oksidatif hasarı artırarak iyon sızıntısına katkı

sağlar. Bununla birlikte metilglioksal gibi toksik karbonil bileşiklerin birikimi de hücre zarları olumsuz etkileyerek iyon homeostazını bozabilir. Dolayısıyla, Ni stresinde gözlenen iyon sızıntısı artışı, zar bütünlüğünün bozulması, oksidatif hasar ve besin elementi dengesizliği gibi çok yönlü mekanizmalarla ilişkilidir ve bu durum, bitkinin fizyolojik dayanıklılığını önemli ölçüde zayıflatmaktadır (Pishchik vd. 2021).

Aspir bitkisi yapraklarından alınan ölçüm sonucunda negatif kontrol (0 mM Ni) ile karşılaştırıldığında, tüm Ni uygulanan gruplarda iyon sızıntısında artış gözlenmiştir; ancak yalnızca Sp uygulamasında kaydedilen %84'lük artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Şekil 4.4'te verilen bulgular, Ni stresine bağlı olarak özellikle sürgün dokularındaki Ca konsantrasyonunun tüm gruplarda yaklaşık %30 oranında azaldığını göstermektedir. Ca, membran stabilitesinin korunmasında temel rol oynayan bir katyon olup, bu elementteki azalma, hücre zarlarının yapısal bütünlüğünü zayıflatmakta ve iyon sızıntısını kolaylaştırmaktadır. Bununla birlikte, Ni stresine bağlı olarak artan ROS'ların, peroksidatif zar hasarına neden olması, iyon sızıntısındaki artışı daha da pekiştirmiş olabilir. Sp uygulamasının sürgünlerde %29.9 oranında daha yüksek düzeyde Ni akümülyasyonuna neden olması, zar bütünlüğü üzerindeki bu stresin şiddetlenmesine katkı sağlamış olabilir. Öte yandan, Sg uygulamasında iyon sızıntısının göreceli olarak daha düşük düzeyde seyretmesi, bu türün aspir bitkisinde membran bütünlüğünü korumaya yönelik detoksifikasyon sistemlerini daha etkin şekilde aktive etmiş olabileceğini düşündürmektedir. Benzer şekilde literatürde bakteri uygulamalarının bitkilerde membran bütünlüğünü korumada ve iyon sızıntısını azaltmada etkili olduklarına dair çalışmalar mevcuttur (Davoudi vd. 2023; Shah vd. 2024).

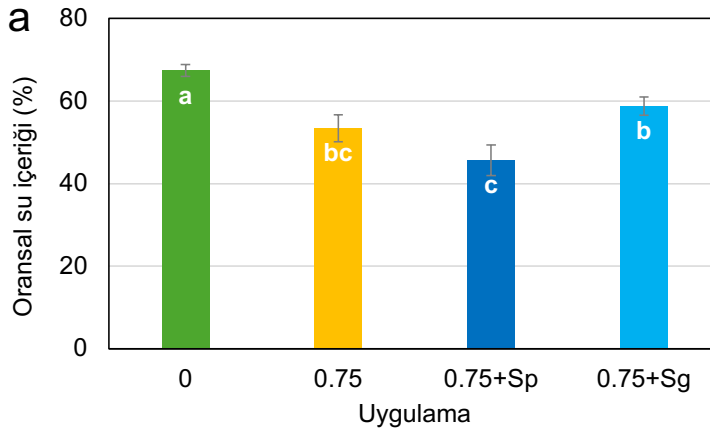


Şekil 4.15. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPS uygulanan grupların iyon sızıntısı oranı

4.3.3.2. Oransal su içeriği ölçümü (RWC)

Oransal su içeriği (RWC), bitkilerin su durumunu yansıtan temel bir fizyolojik göstergedir. Hücre turgorunun korunması, fotosentez, enzim aktiviteleri ve metabolik süreçlerin sürdürülebilmesi için yeterli su içeriğinin bulunması önemli bir koşuldur. Ni, yüksek konsantrasyonlarda bitkilerde su alımını ve su tutma kapasitesini olumsuz etkileyerek ozmotik dengeyi bozar. Bu durum, RWC düzeyinde azalmaya ve buna bağlı olarak fizyolojik işlevlerin aksamasına yol açabilir. Bu nedenle RWC, Ni stresi altında

bitkinin su kaybına karşı verdiği fizyolojik yanıtları ve tolerans düzeyini değerlendirmede önemli bir parametre olarak kullanılmaktadır. Ni stresi altında Sp ve Sg inokülasyonu ile yetiştirilen aspir bitkilerinde oransal su içeriği sonuçları Şekil 4.16'da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, negatif kontrole (0 mM) kıyasla Ni uygulanan gruplarda (0.75, Sp ve Sg) sırasıyla %21, %32 ve %13 oranında istatistiksel olarak anlamlı düşüşler olduğu tespit edilmiştir. Ni uygulanan gruplar arasında ise istatistiksel olarak fark bulunmamasına rağmen negatif kontrole kıyasla en düşük su içeriğine sahip grubun Sp, en yüksek olanın ise Sg olduğu tespit edilmiştir. Lubyanova vd. (2023)'nin yaptıkları çalışmada, endofitik PGPB olan *Bacillus subtilis* inoküle edilen buğday bitkilerinde oransal su içeriğinin arttığı tespit edilmiştir. Stres koşullarında prolin, glisin betain ve çözünebilir şekerler gibi osmolitlerin birikimi artar ve bu bileşikler hücre yapısının stabilitesini korunmasında ve ozmotik dengenin düzenlenmesinde rol oynar. Özellikle prolinin, önemli bir osmoprotektan olmasının yanı sıra ROS temizleyici ve metal şelatlayıcı olarak da işlev görerek, ağır metal stresine karşı toleransı artırdığı bilinmektedir (Anas vd. 2025). Rossi vd. (2021)'in *B. napus* ile yaptıkları bir çalışmada, PGPB ile inoküle edilen bitkilerde gözlenen daha yüksek su içeriği, prolin ve trehaloz gibi osmolitlerin üretimindeki artışla ilişkilendirilmiştir. Dahası membran hasarlarındaki azalmada da osmoprotektan içeriklerin antioksidan savunmaya ek olarak yer alan katkısına değinilmiştir. Osmotik stres yaşanan koşullarda PGPB suşlarının özellikle ekzo-polisakkarit üretimi gibi ek mekanizmalarla bu yanıtları desteklediği bilinmektedir. Sánchez vd. (2021), domates bitkilerinde PGPB uygulaması ile birlikte çözünür şekerler, amino asitler ve poliaminler gibi osmoprotektanların düzeyinde artış olduğunu ve bu artışın hem su içeriğinin korunmasına hem de ROS detoksifikasyonuna katkı sağladığını bildirmiştir. Araştırmacılar, osmoprotektan birikimi yoluyla ozmotik stresin hafifletilmesi ve ROS detoksifikasyonunun desteklenmesi sayesinde, PGPB uygulamalarının yalnızca büyüme parametrelerini değil, aynı zamanda bitkilerin stres tolerans mekanizmalarını da olumlu yönde etkilediğini vurgulamıştır. Ni stresi altında PGPB inokülasyonu ile yetiştirilen aspir bitkilerinde elde edilen sonuçlara göre, su içeriğinde en belirgin azalma Sp uygulamasında, en düşük azalma ise Sg uygulamasında gözlemlenmiştir. Bu durum, Sp'nin aspir bitkilerinin sürgün dokusunda daha yüksek, Sg'nin ise daha düşük düzeyde Ni akümülyasyonuna neden olmasından kaynaklanabileceği gibi, Sg uygulamasının, bitkide osmoprotektan birikimini artırarak su içeriğinin Ni stresinden daha az etkilenmesinde rol oynayan mekanizmalardan biri olmuş olabilir. Söz konusu mekanizmanın doğrulanabilmesi için, prolin başta olmak üzere çeşitli osmoprotektan bileşiklerin düzeylerinin belirlenmesine yönelik analizlerin yapılması gereklidir.

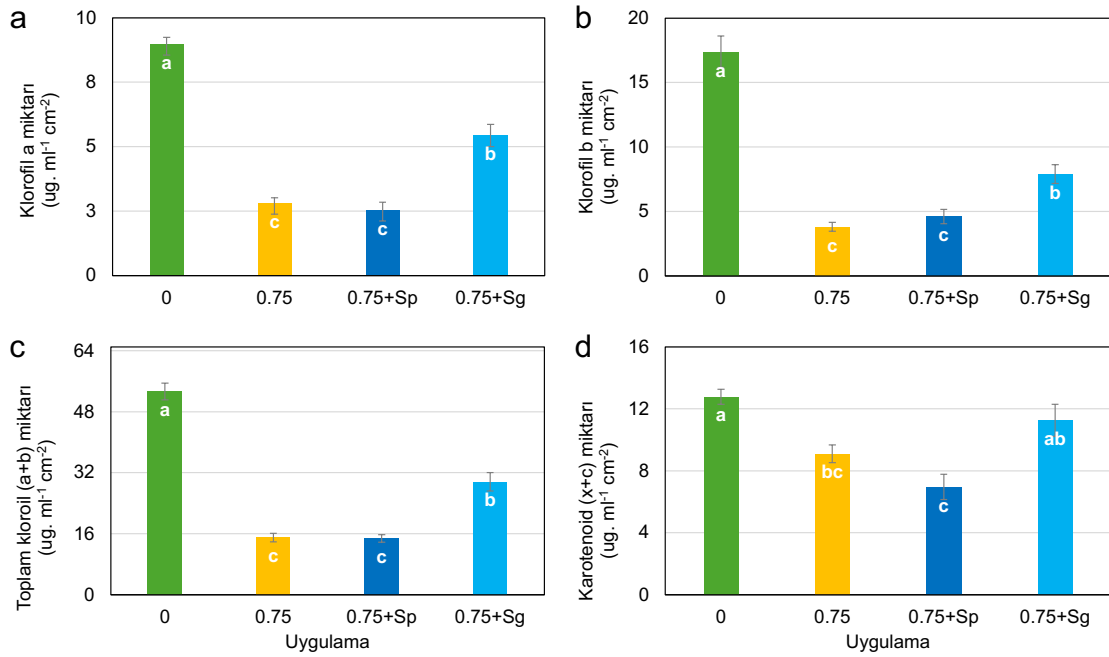


Şekil 4.16. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPS uygulanan grupların oransal su içeriği

4.3.3.3. Fotosentetik pigment miktarı ölçümü

Fotosentetik pigmentler (klorofil *a*, klorofil *b* ve karotenoidler), foton enerjisini absorbe ederek fotosentezi başlatmakta ve yüksek radyasyondan fotosentetik aygıtların korunmasında temel rol oynamaktadır. Bu pigmentlerin miktarı, yalnızca enerji dönüşümünde değil, aynı zamanda bitkinin fizyolojik durumunun ve çevresel streslere karşı tepkisinin belirlenmesinde de önemli biyokimyasal göstergelerdir. Ni stresi, pigment sentezinde görev alan enzimleri ve yapısal proteinleri olumsuz etkileyerek pigment miktarlarında azalmaya neden olabilmektedir. Bu durum, fotosentez verimliliğinde düşüşe ve dolaylı olarak bitki büyümesi ve veriminde gerilemeye yol açar. Bu tez kapsamında elde edilen bulgular, Ni stresinin aspir bitkisinde fotosentetik pigment düzeylerini dramatik şekilde azalttığını; buna karşın Sg uygulamasının, klorofil içeriklerinde anlamlı artışlar sağlayarak fotosentetik sistemi koruyucu bir etki gösterdiğini ortaya koymuştur (Şekil 4.17). Bu artışlar pozitif kontrole (0.75 mM) göre Sg’de klorofil *a* miktarında %94, klorofil *b* miktarında %108 oranında gerçekleşmiştir. Buna karşın, Sp uygulaması ile pozitif kontrol (0.75 mM) arasında fark bulunmamıştır. Sürgünlerinde daha fazla Ni akümüle etmesine rağmen benzer seviyede klorofil ve karotenoid miktarına sahip olması dikkat çekici bir sonuçtur. Sg uygulamasındaki iyileşme ise sürgünlerde daha düşük düzeyde Ni akümülyasyonuna neden olmasından kaynaklanabileceği gibi bitkide pigment sentezini artırıcı yolları uyarmış olmasından da kaynaklanıyor olabilir. Kumar vd. (2023) çalışmasında *Atriplex lentiformis* (Torr.) S.Watson bitkisi üzerinde yapılan deneyler, Ni uygulamaları sonucunda yapraklardaki toplam klorofil miktarında önemli düşüşler olduğunu; ancak bu düşüşlerin, *Pseudomonas fluorescens* ve *Bradyrhizobium japonicum* suşlarının birlikte inokülasyonu ile iyileştirildiğini göstermektedir. Uygulanan bu kombinasyonun bitkilerde klorofil düzeyinin, sadece Ni uygulanan gruba kıyasla yaklaşık %34.5 oranında artırdığı bildirilmiştir. Bu bulgular, Ni toksisitesine karşı PGPB’nin fotosentetik pigmentlerin korunmasında etkili olabildiğini göstermektedir. Vishnupradeep vd. (2022), klorofil miktarında meydana gelen artışların PGPB’nin siderofor üretimi yoluyla Fe iyonlarını şelatlayarak bitkinin kullanılabilir Fe alımını artırmasına; böylece klorofil sentezinde görevli enzimlerin aktivitesini destekleyerek pigment düzeylerinin korunmasına veya

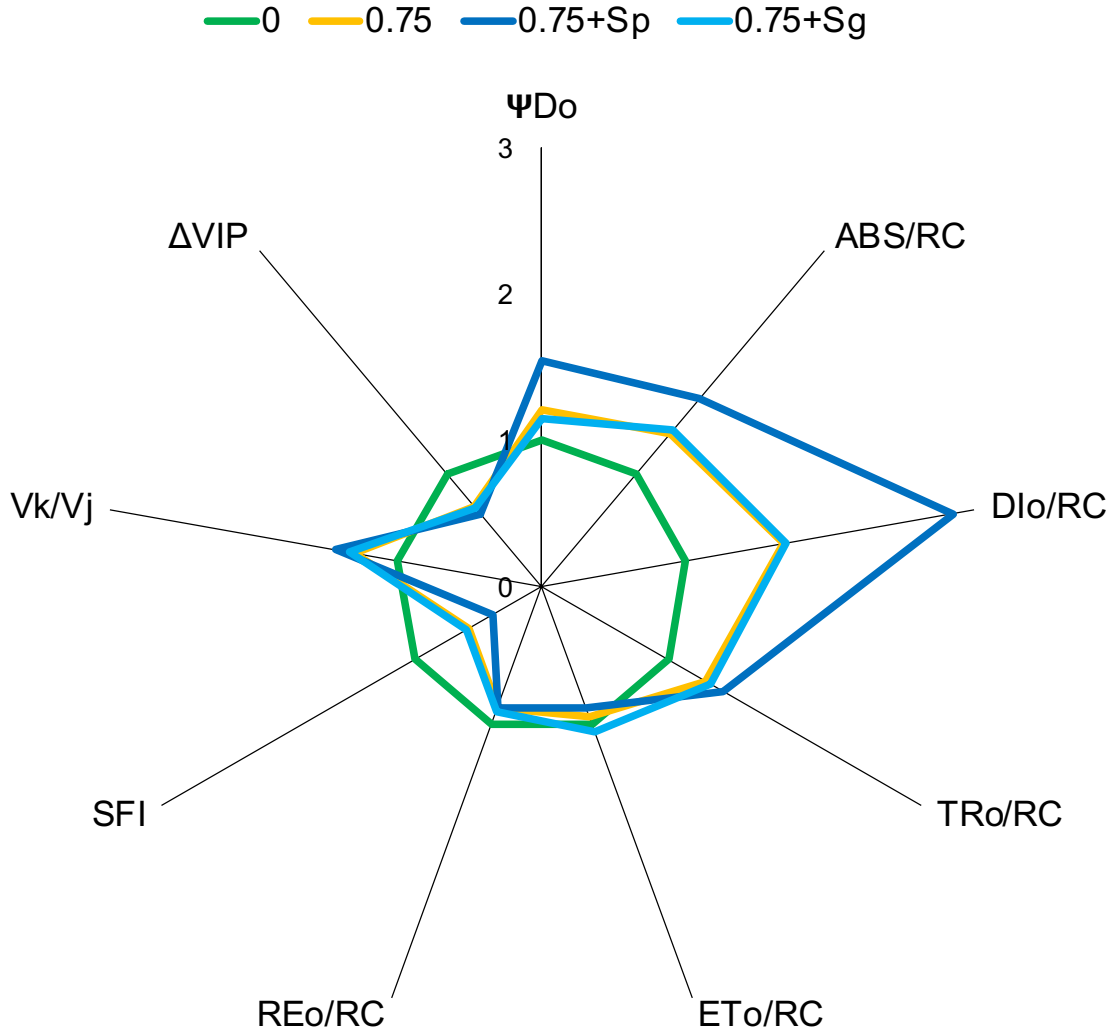
artırılmasına bağlamaktadır. Ancak tez kapsamında elde edilen verilere göre Sg uygulaması, Ni stresi altında yetiştirilen aspir bitkilerinde Fe alımı üzerine anlamlı bir değişim meydana getirmemiştir. Sg'nin sideroforun yanı sıra yüksek IAA üretimine sahip olduğu tespit edilmiştir. PGPB'nin ürettiği fitohormonların (özellikle sitokinin ve oksin) kloroplast sentezini teşvik edebildiği bilinmekte olup Tivendale vd. (2022), birçok bitki türünde oksin konsantrasyonu ve/veya oksin sinyalleşmesinin klorofil içeriğinin yanı sıra, fotosentez hızı ve Rubisco aktivitesi ile de güçlü bir korelasyonel ilişki olduğunu bildirmiştir. Bu bağlamda, Sg inokülasyonu sonrasında gözlenen belirgin klorofil artışının, muhtemel nedenlerinden birinin Sg suşunun IAA üretim kapasitesi olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.17. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPS uygulanan grupların fotosentetik pigment miktarı [klorofil *a* (a), klorofil *b* (b), toplam klorofil (c) ve karotenoid (d)]

4.3.3.4. Klorofil *a* floresansı ölçümü

Bitkilerin fotosentetik performansını değerlendirmede yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri klorofil *a* floresansı analizidir. Bu teknik, özellikle çevresel stres faktörlerinin PSII üzerindeki etkilerini ortaya koymada oldukça hassas ve güvenilir bir araç olarak kabul edilmektedir. Klorofil *a* floresansı parametreleri, bitkinin ışık enerjisini kullanma verimliliği, enerji kayıpları ve fotokimyasal etkinliği hakkında kapsamlı bilgi sunar (Swoczyna vd. 2022). Bu bağlamda, tezde gerçekleştirilen klorofil *a* floresansı ölçümleri, uygulanan Ni stresi ve PGPS inokülasyonlarının fotosentetik aktivite üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla ele alınmış ve ölçüm sonucunda elde edilen spesifik enerji akışları Şekil 4.18'de verilmiştir.



Şekil 4.18. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPS uygulanan grupların spesifik enerji akışları ve diğer bazı JIP test parametreleri

Ni stresine bağlı olarak uygulama gruplarındaki bitkilerde PSII'deki herhangi bir hasar durumu, aktif reaksiyon merkezi sayısını azaltabilir (veya anten büyüklüğünü artırabilir) ancak ışık toplama kompleksi II (LHCII) ışık toplamaya devam eder. Böylece aktif reaksiyon merkezi başına absorbe edilen ışık enerjisi artar. Bu noktada ışık enerjisi etkin şekilde PSII'ye aktarılamaz ise reaksiyon merkezi başına absorplanan enerji (ABS/RC) inaktif reaksiyon merkezlerinin sayısını artmasından dolayı artmış görünür. Buna paralel olarak da reaksiyon merkezi başına tutulan enerji akışında (TR_o/RC) artış yaşanabilir ve fotokimyasal süreçlere aktarılan ışık enerjisi miktarının arttığı görülebilir. Sistemdeki bu aşırı enerji birikiminin inhibisyona yol açmaması için fotokimyasal olmayan söndürme mekanizmaları (NPQ) çalışarak uyarılma enerjisi ısı veya floresans ile kaybedilir (DI_o/RC ve Ψ_{Do} artış). Aşırı uyarılma enerjisi bu mekanizmalarla bertaraf edilmez ise ROS oluşumu gerçekleşebilir ve sistem oksidatif hasara maruz kalabilir.

Klorofil *a* floresans ölçümlerinde, Ni uygulanan tüm gruplarda negatif kontrole kıyasla ABS/RC ve TR_o/RC değerlerinde önemli artışlar kaydedilmiştir. Bu artışlar 0.75,

0.75+Sp ve 0.75+Sg için ABS/RC'de sırası ile %36.3, %68.1 ve %39.9 iken; TR₀/RC'de %29.7, %43.4 ve %33.6 oranında gerçekleşmiştir. Ni uygulanan gruplar içinde değerlendirildiğinde ise 0.75'e kıyasla yalnızca 0.75+Sp uygulamasındaki ABS/RC ve TR₀/RC'de sırası ile %23.3 ve %10.6'lık artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

PSII'nin termal enerji kayıplarının kuantum verimliliğini gösteren Ψ_{D_0} , diğer bir deyişle PSII reaksiyon merkezlerinde açık halde bulunan klorofil moleküllerinin absorbe ettiği ışığın ne kadarının doğrudan floresans yoluyla kaybolduğunu gösteren Ψ_{D_0} , Sp inokülasyonu yapılan grupta 0.75'e göre önemli ölçüde artarken, 0.75+Sg grubunda değişmemiştir. Bu durum 0.75+Sp'de PSII tarafından absorbe edilen ışığın önemli bir kısmının fotokimyasal süreçlere yönlendirilemediğini işaret etmektedir. Dolayısıyla 0.75+Sp uygulamasında PSII'ye etkin şekilde aktarılamayan ışık enerjisi mevcuttur ve bu enerjinin bir kısmı floresans olarak kaybedilirken önemli bir kısmı da ısı olarak kaybedilmiştir (DI₀/RC). Pozitif kontrole (0.75) kıyasla 0.75+Sp inokülasyonunda DI₀/RC değeri %70.3 oranında artarken, 0.75+Sg'de bir fark tespit edilmemiş olup ısı olarak yaydığı enerji miktarı negatif kontrol ile aynı seviyededir. Dolayısıyla bu iki parametre, PSII tarafından absorbe edilen ışık enerjisinin verimliliğini korumada 0.75+Sg uygulamasının daha başarılı olduğunu göstermektedir.

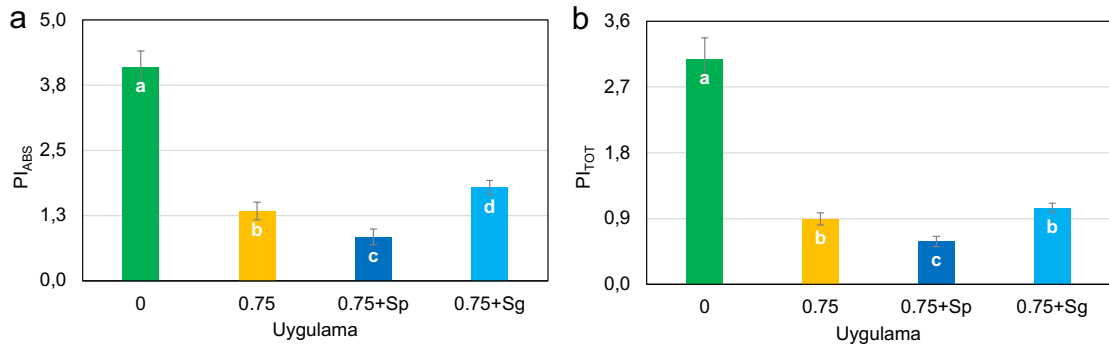
Fotokimyada kullanılabilecek olan enerjinin PSII'den sonraki süreci hakkında bilgi veren ve elektron taşıma zincirinin etkinliğini gösteren ETo/RC değerinde negatif kontrole (0 mM) göre 0.75 ve 0.75+Sp'de sırasıyla %5.18 ve %11.29'luk bir düşüş ölçülürken 0.75+Sg'de %5.85'lik bir artış ölçülmüştür. Negatif kontrol ile diğer gruplar arasındaki bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak 0.75 ile 0.75+Sp arasındaki %11.6'lık fark anlamlıdır. Bu durum, 0.75+Sg uygulamasındaki NPQ etkinliğinin de daha zayıf olması ile birlikte ele alındığında, elektronların PSII'den çıkıp plastokinon (PQ) havuzuna ve oradan PSI'e transferinde daha dengeli olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.18'de sunulan verilere göre, PSII'nin donör tarafında yer alan oksijen oluşturan kompleksin inaktivasyonu veya olası yapısal hasarını yansıtan VK/VJ oranı, tüm Ni uygulanan gruplarda anlamlı düzeyde artış göstermiştir. Bu artış negatif kontrole göre 0.75'de %29.7, 0.75+Sp'de %43.4 ve 0.75+Sg'de %33.6 olarak hesaplanmıştır. Bu bulgular, Ni stresinin PSII'nin donör kısmında oksijen oluşturan kompleksteki yapıların bütünlüğünü belirgin şekilde olumsuz etkilediğini göstermektedir. PGPS inokülasyonlarının etkisi değerlendirildiğinde ise 0.75'e göre yalnızca 0.75+Sp'deki %10.6'lık artış anlamlı bulunmuştur. Diğer bakteri uygulaması (0.75+Sg) ise mevcut hasarı iyileştirici bir etki göstermemiş 0.75 ile benzer seviyede kalmıştır. Dolayısıyla, her iki PGPS uygulaması da PSII donör kısmındaki potansiyel hasarı azaltmamış, özellikle 0.75+Sp bu hasarı daha da belirgin hale gelmiştir.

PSI'nin fonksiyonel durumu ile elektron taşıma zincirinin son basamaklarındaki redoks kapasitesini yansıtan veya PSI'in kısmi miktarı hakkında bilgi veren ΔVIP , Ni uygulanan tüm gruplarda negatif kontrol grubuna kıyasla belirgin şekilde azalmıştır. Bu azalma oranları 0.75'te %28.4, 0.75+Sp'de %35.1 ve 0.75+Sg'de %29.7 olarak kaydedilmiştir. Özellikle 0.75+Sp uygulamasında gözlenen en yüksek düşüş, bu bakteriyel suşun PSI üzerindeki koruyucu etkisinin yetersiz kaldığını, hatta stresin şiddetini artırabileceğine işaret etmektedir. Bu bulgular, nikelin PSI bileşenlerini doğrudan veya dolaylı yoldan etkileyerek elektron taşıma zincirinin son basamaklarında

tıkanmalara neden olduğunu ortaya koymaktadır. Ni uygulanan gruplar arasında yalnızca 0.75 ve 0.75+Sp arasındaki farklar önemli bulunmuştur. ΔVIP değerinin 0.75+Sg ve 0.75 grubunda benzer seviyede olması, PGPS uygulamalarının PSI üzerinde iyileştirici veya koruyucu bir etkisinin gerçekleşmediğini göstermektedir. Bitkinin fotosentetik aparatının yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü ortaya koyan bir parametre olan SFI (Structure and Function Index), PSII ve PSI arasındaki koordinasyon hakkında bilgi vermektedir. Ni uygulanan tüm gruplarda negatif kontrole göre SFI dramatik düzeyde düşmüştür. Bu düşüşler 0.75, 0.75+Sp ve 0.75+Sg için sırasıyla %42.8, %61.6 ve %40.7 oranında gerçekleşmiştir. Ni uygulanan gruplarda 0.75 ve 0.75+Sg arasındaki değişim önemli bulunmazken 0.75+Sp'deki %32.9'luk düşüş önemli bulunmuştur. Elde edilen bu bulgular, nikelin fotosentetik aygıtlar üzerinde ciddi bir yapısal ve işlevsel bozulmaya yol açtığını ve uygulanan PGPS suşlarının bu etkileri farklı derecelerde etkilediğini göstermektedir. 0.75+Sp uygulamasının PSII ve PSI arasındaki koordinasyonu sağlayan yapılar üzerinde koruyucu değil, aksi bir etki yaratmış olabileceğini düşündürmektedir. Buna karşılık, 0.75+Sg uygulamasının SFI'daki azalma 0.75 ile benzer düzeyde kalmış ve anlamlı bir fark oluşturmamıştır. Bu da 0.75+Sg uygulamasının, Ni uygulamasına rağmen fotosentetik yapı ve fonksiyonların korunmasına katkı sağlama potansiyelinin 0.75+Sp'ye kıyasla daha yüksek olabileceğini göstermektedir.

PSII'nin fotokimyasal performansını (PI_{ABS}) ve son elektron alıcısına kadarki tüm sistemin performansını ortaya koyan (PI_{TOT}) indeksler incelendiğinde (Şekil 4.19), Ni uygulanan tüm gruplarda önemli düşüşler kaydedilmiştir. Negatif kontrole kıyasla 0.75, 0.75+Sp ve 0.75+Sg için PI_{ABS} değeri sırasıyla %59.6, %76.3 ve %54.5; PI_{TOT} değeri sırasıyla %69.4, %81.4 ve %69.2 oranında azalmıştır. Bu durum nikelin aspir bitkisinde fotosentetik aygıtlar üzerinde belirgin bir toksik etkiye sahip olduğunu, bunun da hem PSI hem de PSII seviyesinde gerçekleştiğini göstermektedir. Ni uygulanan gruplar içinde ise 0.75'e kıyasla 0.75+Sg'de PI_{ABS} değeri %33 oranında daha yüksek, 0.75+Sp'de ise %37 oranında daha düşük ölçülmüştür. Bu durum, PI_{TOT} değerinde ise 0.75+Sp'de %34 daha düşük belirlenirken 0.75+Sg'de anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Dolayısıyla fotosistemlerin (PSII ve PSI) fotokimyasal verimliliği Ni stresi ile önemli ölçüde etkilenirken 0.75+Sg uygulamasının Ni toksisitesini azaltmada 0.75+Sp uygulamasına göre daha başarılı olduğu görülmektedir.



Şekil 4.19. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPS uygulanan grupların fotosentetik performans idexleri [PI_{ABS} (a) ve PI_{TOT} (b)]

Sonuç olarak Ni toksisitesinin aspir bitkisinin fotosentetik sistemi üzerinde hem yapısal hem de fonksiyonel düzeyde belirgin bozulmalara yol açtığını ortaya koymuştur. PSII'nin fotokimyasal verimliliğini yansıtan PI_{ABS} ve PI_{TOT} parametrelerinde, PSI'nin redoks kapasitesini gösteren ΔVIP değerinde ve genel fotosentetik bütünlüğü temsil eden SFI parametresinde, Ni uygulanan tüm gruplarda anlamlı düşüşler kaydedilmiştir. Bu düşüşler, özellikle Sp uygulanan grupta daha şiddetli gerçekleşmiş, Sp suşunun fotosentetik aygıtlar üzerinde koruyucu bir etki göstermediği gibi, bazı parametrelerde hasarı derinleştirdiği tespit edilmiştir. Sp uygulamasının PSI ve PSII düzeyinde enerji kullanım verimliliğini azaltarak aşırı enerji birikimine, buna bağlı olarak da termal enerji kayıplarının (DIO/RC ve ΨDo) artmasına neden olduğu gözlenmiştir. Bu etkilerin, Sp uygulanan bitkilerde hem kök hem de toprak üstü organlarda Ni birikiminin artmış olması ile alakalı olabileceği düşünülmektedir. Buna karşılık, Sg uygulaması, Ni stresine maruz kalan bitkilerde PSII ve PSI parametrelerinde daha ılımlı değişimlerle seyretmiş ve bazı fotosentetik parametrelerde pozitif kontrole (0.75 mM Ni) kıyasla iyileştirici etki göstermiştir. Sg uygulamasının özellikle fotosistemler arası enerji dengesini koruma eğiliminde olduğu, termal kayıplarda artışa neden olmadığı ve elektron taşınım zincirinde daha stabil bir işleyiş sağladığı belirlenmiştir. Ayrıca Ni uygulaması sonucunda anten kompleksinde yer alan fotosentetik pigment (klorofil *a*, klorofil *b* ve karotenoidler) içeriğinde gözlenen azalma, nikelin fotosentetik mekanizmalar üzerinde doğrudan hedeflenmiş bir toksisiteden ziyade, daha çok geniş spektrumlu ve spesifik olmayan inhibitör etkilerinin bir yansıması olarak yorumlanmıştır (Drazkiewicz ve Baszyński 2010). Bu durum, nikelin pigment sentez yollarını sekteye uğratarak ışık toplama kapasitesini zayıflattığını ve sonuç olarak fotosentetik verimliliği dolaylı yollarla da olsa ciddi şekilde düşürebildiğini göstermektedir. Sg uygulaması, Ni stresine rağmen klorofil pigment parametrelerinde anlamlı artışlar sağlamış ve kontrole kıyasla önemli ölçüde daha yüksek seviyelere ulaşmıştır (Şekil 4.17). Bu durum, Sg'nin fotosentetik pigment sentezini destekleyerek ışık hasadını artırdığını göstermesinin yanı sıra, anten kompleksi üzerindeki koruyucu etkisine işaret etmektedir. Fotosentez verileriyle birlikte değerlendirildiğinde, bu pigment artışlarının fotokimyasal verimlilik üzerindeki yansımaları da dikkat çekicidir. Sg uygulamasının yalnızca pigment düzeyinde değil, fotosentetik sistemin bütünsel işleyişi üzerinde de koruyucu bir etki gösterdiğini, fotosentez kapasitesini hem yapısal hem de işlevsel düzeyde desteklediğini ortaya koymaktadır. Bu durum, Sg uygulamasının bitki kök dokusunda Ni akümülyasyonunu artırırken, toprak üstü organlardaki birikimini azaltmasıyla açıklanabilir. Böylece Sg, ağır metalin bitki içerisinde yukarı taşınmasını sınırlayarak sistemik toksisitenin şiddetini düşürmüş ve bitkiyi olumsuz fizyolojik etkilerden koruyan bir biyolojik filtre işlevi görmüş olabilir. Genel olarak, bu çalışma Ni stresinin aspir bitkilerinde fotosentetik aparatlar üzerindeki çok yönlü etkilerini ortaya koyarken, uygulanan PGPS suşlarının bu etkiler üzerindeki farklılaştırıcı rollerini de göstermiştir. Bu kapsamda, Sg inokülasyonu fotosentetik sistemi koruyucu etkisi ve Ni dağılımını kök sistemi lehine düzenleyici rolüyle, Sp uygulamasına kıyasla daha avantajlı bir konuma gelmektedir. Ayrıca, bu çalışmada fotosentetik parametreler düzeyinde tespit edilen olumlu ya da olumsuz etkiler, muhtemelen PGPS'nin bitki fizyolojisi üzerinde oluşturduğu çok yönlü etkileşimlerin sonucu olarak da ortaya çıktığı düşünülmekte olup bu etkilerin hücrel ve moleküler temelleri ileri araştırmalarla desteklenmelidir.

Literatürde bakteri inokülasyonlarının ağır metal stresi altındaki bitkilerde fotosentetik enerji akışlarına dair etkisini araştıran çok sınırlı sayıda araştırma

bulunmaktadır. Wang vd. (2025)'in çalışmasında *Sphingomonas* sp. suşu, Cd stresine maruz kalan *B. juncea* bitkisinde fotosentetik performansını önemli ölçüde artırdığını bildirmiştir. Bu çalışma, PGPB uygulamasının yalnızca pigment düzeyinde değil, aynı zamanda PSII'nin fotokimyasal verimliliği, elektron taşıma kapasitesi ve enerji dönüşüm etkinliği üzerinde de anlamlı düzeyde iyileştirici etkiler gösterdiğini açıkça ortaya koymaktadır. Benzer şekilde Wu vd. (2020)'de, *Pseudomonas fluorescens*'in Cd stresi altında hem klorofil *a* floresansı parametrelerini (Fv/Fm, ΦPSII, qP) hem de karbon fiksasyonu ve gaz değişimini iyileştirerek fotosentez kapasitesini önemli ölçüde artırdığını bildirmiştir. Dahası bu sonuçlar, *P. fluorescens*'in yalnızca bitki büyümesini ve fotosentez parametrelerini değil, aynı zamanda Cd alımını ve translokasyonunu da teşvik etmesine rağmen gerçekleşmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise bu durumun aksi sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir. Costa-Santos vd. (2021)'in domates bitkisi üzerinde yürüttükleri çalışmada, farklı *Bacillus* ve *Brevibacillus* suşlarının fotosentetik performans üzerindeki etkileri detaylı olarak değerlendirilmiştir. Çalışma, PGPB'nin fotosentez parametreleri üzerinde suşlara özgü farklı tepkiler oluşturabildiğini göstermektedir. Özellikle *Bacillus zhangzhouensis* (5PB1) uygulaması, ΦPSII (PSII etkin kuantum verimi), stomatal iletkenlik (gs) ve net fotosentetik hız (Pn) gibi temel parametrelerde artış sağlayarak fotosentetik verimliliği desteklemiştir. Bunun aksine, *Brevibacillus laterosporus* (C9F) suşunun uygulandığı gruplarda Fv/Fm, ΦPSII ve qP gibi PSII verimliliğini yansıtan tüm klorofil *a* floresansı parametrelerinde anlamlı düşüşler gözlenmiş, bu durum bitkide fotosentetik aparatın olumsuz etkilendiğini göstermiştir. Ayrıca, 5PB1 suşunun net fotosentetik hızda (Pn) artış sağlaması, bu bakterinin stomatal açıklığı düzenleyerek CO₂ alımını kolaylaştırdığını ve karbon fiksasyon kapasitesini artırdığını göstermektedir. Bunun yanında, FV46 suşu (*Bacillus safensis*) ise özellikle klorofil *a* ve *b* pigment içeriğinde artış sağlamış ve fotosentez için gerekli ışık hasadı süreçlerine katkıda bulunmuştur. Çalışma genel olarak, PGPB uygulamalarının fotosentez üzerindeki etkilerinin yalnızca tür değil, suş bazında da büyük değişkenlik gösterebileceğini ve bu etkinin PSII'nin fotokimyasal kapasitesi, pigment sentezi ve gaz değişimi parametreleri düzeyinde farklı biçimlerde ortaya çıkabileceğini göstermektedir. Ancak çalışmada bu etkilerin altında yatan moleküler veya biyokimyasal mekanizmalar doğrudan araştırılmamış; gözlemlenen değişimlerin olası mekanizmalarına literatür destekli çıkarımlar yoluyla değinilmiştir. Özellikle fotosentezdeki iyileştirici etkilerin antioksidan sistemlerin aktive edilmesi, fenolik bileşiklerin artırılması, stomatal iletkenliğin düzenlenmesi ve PGPB kaynaklı büyümeyi teşvik eden fitohormon üretimi gibi mekanizmalarla ilişkili olabileceği öne sürülmüştür.

Vishnupradeep vd. (2022)'nin çalışmasında ise bu tez kapsamında elde edilen bulgular ile uyumlu sonuçlar bildirilmiştir. Araştırmacıların *Z. mays* bitkisi üzerinde yürüttükleri çalışmada, Cr ve kuraklık stresine maruz kalan bitkilerde PGPB uygulamasının fotosentetik performans ve ağır metal akümüasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Her iki PGPB suşu (*Providencia* sp. TCR05 ve *Proteus mirabilis* TCR20), PSII fotokimyasal verimliliğini gösteren Fv/Fm, ΦPSII, ETR ve qP gibi klorofil *a* floresansı parametrelerinde anlamlı artışlar sağlamış; aynı zamanda NPQ değerinde azalmaya neden olarak fotokimyasal olmayan enerji kayıplarını (ısı) sınırlamıştır. Ayrıca, Cr ve kuraklık stresi altında PGPB suşlarının prolin ve fenolik bileşiklerin birikimini düzenleyerek redoks dengesini sağladığı; bu yolla ROS birikimini baskıladığı ve membran bütünlüğünü koruduğu ifade edilmiştir. Özellikle düşük MDA düzeyleri artan su kullanım etkinliği, fotosentetik sistemin işlevsel kaldığını göstermiştir. Bu bulgular,

PGPB'nin sadece fotosentez parametrelerinde yüzeysel bir iyileşme sağlamadığını; aynı zamanda, bu parametreleri etkileyen biyokimyasal ve fizyolojik süreçleri de etkilediğini ortaya koymaktadır. Aynı zamanda fotosentetik parametrelerde meydana gelen iyileşmeler PGPB suşlarının metal dağılımını değiştirme kapasitesiyle de açıklanmıştır. Özellikle Cr birikiminin köklerde artırılması ve sürgünlerdeki birikimin azaltılması, toksisitenin sınırlandırıldığını ve böylece fotosentetik dokuların daha az stresle karşılaştığını göstermektedir. Nitekim çalışmada, kromun toprak üstü organlara taşınımındaki azalma ile fotosentetik parametrelerdeki iyileşmeler arasında doğrudan bir ilişki kurulmuştur. Bu durum, PGPB suşlarının sadece büyümeyi desteklemekle kalmayıp, aynı zamanda ağır metalin taşınmasını düzenleyerek fotosentez üzerinde koruyucu bir rol üstlenebileceğini göstermektedir. Bu tez kapsamında Sg inokülasyonundaki fotosentetik performans artışlarının da benzer şekilde Ni iyonlarının toprak üstü organlara daha az transloke edilmesi ile açıklanabileceği gibi, Sp inokülasyonu sonucunda toprak üstü organlarda artan Ni iyonlarına rağmen pozitif kontrol (0.75 mM) ile benzer seviyede fotosentez performansı sergilemesi önemli bir sonuç olarak yorumlanmıştır. Bitkide toplam Ni alımının devam etmesine rağmen fotosentetik parametrelerde gözlenen iyileşme, alınan Ni iyonlarının toksik etkilerinden büyük ölçüde izole edildiğini ve bu durumun bitki tarafından geliştirilen etkili bir detoksifikasyon stratejisiyle ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Bu bağlamda, Ni iyonlarının hücre çeperi, vakuol veya hücre periferinde çeşitli ligandlarla kompleks oluşturarak inaktif hâle getirilmesi, toksisitenin sınırlandırılmasında önemli bir rol oynamış olabilir. Özellikle MT, PC ya da fenolik yapıdaki bazı metabolitlerin bu iyonlarla bağlanarak onları zararsız forma dönüştürdüğü bilinmektedir. Ayrıca, bu iyonların vakuollere taşınarak sitozolden uzaklaştırılması veya hücre çeperi bileşenlerine bağlanarak biyoyararlılığının azaltılması da muhtemel mekanizmalar arasında yer almaktadır. Bu savunma yanıtının PGPB uygulamasıyla desteklenmesi, bitkinin iyon toksisitesine karşı daha dengeli bir redoks durumu oluşturmasını ve böylece fotosentetik aparatların fonksiyonel kalmasını sağlamış olabilir. Söz konusu mekanizmaların daha detaylı aydınlatılabilmesi için, MT, PC ve benzeri bağlayıcı moleküllerin metabolomik ve/veya proteomik analizlerle tespiti mümkün olabilecektir.

4.3.3.5. Antosiyanin ve Flavonoid miktarı ölçümü

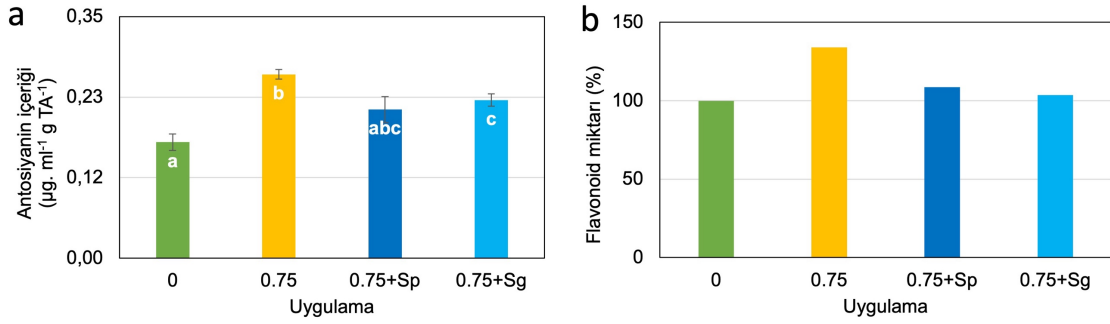
Ağır metal stresi, bitkilerde sekonder metabolik yolları uyarır ve çeşitli çalışmalar, sekonder metabolizma yoluyla üretilen antosiyaninlerin ağır metallerin neden olduğu stres veya toksisiteyi hafifletebildiğini göstermiştir (Li ve Ahammed 2023). Antosiyaninler metal stresinde önemli savunma elemanlarıdır. Antosiyaninler, hidrojen veya elektron vericisi olarak güçlü reaktiviteye sahip çok sayıda fenol hidroksil grubu içermektedir. Antosiyaninler, ROS zincir reaksiyonlarının başlamasını engelleyebilir, yağların zincirleme oksidasyon reaksiyonlarını durdurabilir ve lipid peroksidasyonunu baskılayabilirler. Antosiyaninler, polifenol yapısına sahip oldukları için ve bu yapı, özellikle B halkasında yer alan ortho-hidroksil grubu sayesinde metal iyonlarıyla kolayca şelat oluşturabildiği için metalleri şelatlayıp, metallerin biyomoleküller ile etkileşimini sınırlarlar ve potansiyel toksisitesini engellerler. Ni stresinde yetiştirilen ve PGPB inoküle edilen aspir bitkilerinin yapraklarındaki antosiyanin ve flavonoid miktarı Şekil 4.20'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, Ni stresi sonucunda aspir bitkilerinde antosiyanin miktarının negatif kontrole kıyasla 1.59 kat arttığı tespit edilmiştir. PGPS uygulamalarında ise bu artış Sp ve Sg için sırası ile 1.28

ve 1.36 olarak belirlenmiştir. Bakteri uygulanan gruplar arasında istatistiksel analizler sonucunda yalnızca Sg uygulamasındaki 1.36'lık artış anlamlı bulunmuştur. Antosiyanin miktarındaki bu artışların, aspir bitkisinin yaprak dokularında oluşan ROS'lara karşı daha etkin bir savunma geliştirmesine ve Ni iyonlarının vakuollerde etkisizleştirilmesine katkı sağlamış olabileceği düşünülmektedir. Ni uygulanan gruplar içinde ise, pozitif kontrole kıyasla Sp inokülasyonundaki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken Sg inokülasyonundaki %14.0'lük düşüş anlamlı bulunmuştur. Benzer şekilde, Şekil 4.21b'de gösterilen flavonoid miktarında da en yüksek içerik pozitif kontrolde iken (negatif kontrolün 1.3 katı) PGPS inokülasyonu yapılan grupların flavonoid miktarı daha düşük olup birbirleriyle benzer seviyededir. Sonuç olarak, inoküle edilen PGPS suşlarının (özellikle daha fazla Ni akümülyasyonuna neden olan Sp'nin) aspir bitkisinde antosiyanin ve flavonoid içeriğinin pozitif kontrole (0.75 mM) kıyasla daha düşük düzeyde olması, Ni iyonlarının detoksifikasyonunda farklı savunma mekanizmalarının devreye girmiş olabileceğini düşündürmektedir. Metallotiyoneinler, fitoşelatinler, organik asitler ve diğer sekonder metabolitler, hücre duvarı bileşenleri ve diğer savunma mekanizmaları Ni iyonlarının vakuollerde, hücrenin periferik bölgelerinde veya hücre duvarlarında etkin bir şekilde hapsedilmesinde ve detoksifikasyonunda etkili olmuş olabilir. Böylece, serbest Ni iyonlarının hücre içi konsantrasyonunun düşmüş olabileceği ve bunun sonucunda bitkilerin savunma amaçlı fenolik metabolit üretimini azaltma eğilimi gösterdiği düşünülmektedir. Diğer bir ifadeyle, PGPS uygulaması, bitkideki stres düzeyini azaltarak, enerji ve metabolik kaynakların savunma tepkileri yerine büyüme ve gelişme süreçlerine yönlendirilmesini sağlamış olabilir. Şekil 4.14'te verilen kuru biyokütle ölçüm sonuçları da bu görüş ile uyumludur. Elikara vd. (2024) çilek bitkisi ile yaptıkları çalışmada, PGPB uygulamalarının genel olarak fenolik ve flavonoid bileşikler üzerinde olumlu etkiler gösterdiğini; ancak antosiyanin içeriği üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada, *Bacillus subtilis* OSU-142 uygulamalarının antosiyanin konsantrasyonunu azalttığını; fenolik ve flavonoid miktarını artırdığını bildirmiştir. Agnihotri vd. (2022)'nin metal stresi altında yetiştirilen ve PGP uygulaması yapılan *Azolla microphylla* Kaulf. ile yaptıkları çalışmada da antosiyanin miktarı bakteri uygulaması yapılan grupta önemli ölçüde düşük çıkmıştır. Someya vd. (2007)'nin Ni stresi altında yetiştirilen *Arabidopsis* sp. bitkilerine *Pseudomonas putida* ARB86 uyguladığı çalışmasında da PGPB uygulanan grubun antosiyanin miktarında kontrole kıyasla önemli oranda azalma olduğunu bildirmiştir. Buna karşın litaretürde metal stresi altındaki bitkilerde mikrobiyal uygulamaların antosiyaninin ve flavonoid miktarını artırdığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Abeed vd. (2022), *Azotobacter chroococcum* ve *Bacillus subtilis* suşlarının Cd stresi altındaki ayçiçeği bitkisinde flavonoid içeriğinde %446.2, antosiyanin içeriğinde ise %95.6 oranında artış sağlamıştır. Araştırmacılar mikrobiyal inokülasyonların Cd stresine karşı bitkide fenolik bileşik sentezini uyararak savunma mekanizmalarını güçlendirebildiğini bildirmiştir.

Tez kapsamında, PGPS uygulaması sonrasında antosiyanin miktarının kontrol gruplarına göre daha düşük bulunması, ilk bakışta savunma tepkisinin zayıfladığı şeklinde yorumlanabileceği gibi Ni ile antosiyanin molekülleri arasında kompleks oluşumu olasılığı da göz önünde bulundurulmalıdır. Antosiyaninler, geçiş metalleriyle kompleks oluşturarak hem kimyasal özelliklerinde hem de spektral davranışlarında belirgin değişiklikler göstermektedir. Literatürde, Fe^{+3} , Al^{+3} ve Ga^{+3} gibi metal iyonlarıyla yapılan çalışmalarda, antosiyanin-metal komplekslerinin UV-Vis spektrumlarında özellikle batokromik kayma (Bathochromic shift-kırmızıya kayma) ve hiperkromik

(absorbans artışı) kaymalar sergilediği bildirilmiştir (Sigurdson vd. 2016). Bu kaymalar, kompleks oluşumu sonucunda konjugasyon sisteminin (çift ve tek bağların ardışık dizilimiyle oluşan delokalize elektron sistemi) genişlemesiyle ortaya çıkmakta ve renk tonunun daha uzun dalga boylarına kaymasına neden olmaktadır. Bu durum spektrofotometrik ölçümlerde önemli kaymalara neden olabilir. Çalışmada kullanılan 530 nm ölçüm dalga boyu, kompleksleşmiş formların maksimum absorbansını tam olarak yansıtmayabileceğinden, gerçek antosiyanin miktarı olduğundan daha düşük okunmuş olabilir. PGPS uygulamaları ile bitkilerde Ni alımının veya taşınımının artması, antosiyaninlerle kompleksleşen serbest Ni iyonlarının miktarını artırmış olabilir. Bu bağlamda, ölçüm yöntemi kaynaklı spektral sapmaların, elde edilen antosiyanin verilerini kısmen maskelemiş olabileceği ve bu nedenle fenolik yanıtın daha kapsamlı olarak değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir. Antosiyanin ve flavonoidlerin detaylı analizi için UV-Vis spektrofotometrede daha geniş bir dalga boyu aralığında (500-600 nm gibi) spektral taramalar yapılarak, olası dalga boyu kaymaları belirlenebilir ve Ni-fenolik komplekslerinin absorpsiyonları daha doğru şekilde değerlendirilebilir. Ayrıca, HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografi) gibi bileşik düzeyinde ayırım yapabilen tekniklerle, bireysel fenolik bileşiklerin kantitatif analizi sağlanabilir. Bu yaklaşım hem serbest hem de kompleksleşmiş fenolik yapıların ayırımını mümkün kılar.

PGPS uygulamaları ile düşen antosiyanin ve flavonoid seviyeleri ile ilgili bir diğer olasılık ise, Tahkokorpi vd. (2010)'un gerçekleştirdiği çalışmada ortaya konulmuştur. Araştırmacılar, *Vaccinium myrtillus* bitkisinde kök düzeyinde biriken nikelin toprak üstü organlarda su stresi oluşturacağı ve bu stresin antosiyanin sentezini artırarak ozmotik düzenlemede rol oynayacağı hipotezini öne sürmüşlerdir. Bu amaçla, farklı dozlarda Ni uygulanan bitkilerde kök ve sürgün düzeyinde çeşitli fizyolojik parametreler değerlendirilmiştir. Araştırma bulgularına göre, nikelin toprak altı dokularda biriktiği, ancak sürgüne anlamlı düzeyde taşınmadığı ve doku su içeriğinde dikkate değer bir değişiklik oluşmadığı belirlenmiştir. Buna karşın, gövde ve yapraklardaki antosiyanin miktarı, rizomdaki Ni birikimi ile ters orantılı olarak azalmıştır. Araştırmacılar bu durumu, Ni stresinin su dengesini bozmadığı koşullarda bile antosiyanin biyosentezini baskılayabileceği ve dolayısıyla bu bileşiklerin doğrudan ozmotik düzenlemede görev almadığı şeklinde yorumlamıştır. Antosiyaninlerdeki bu azalmanın, flavonoid biyosentez yolunun anahtar enzimi olan fenilalanin amonyak liyaz (PAL) aktivitesinin Ni tarafından inhibe edilmesinden kaynaklanabileceği öne sürülmüştür. Bu sonuçlar, nikelin antosiyanin sentez yoluna doğrudan toksik etkilerle müdahale edebileceğini ve fenolik yanıtları baskılayabileceğini göstermektedir. Bu tez kapsamında aspir bitkilerine uygulanan PGPS inokülasyonlarının toprak altı organlarda pozitif kontrolden (0.75 mM) daha yüksek Ni akümüle ettiği düşünülürse, benzer bir yol ile antosiyanin üretiminin baskılanması da söz konusu olmuş olabilir.



Şekil 4.20. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPS uygulanan grupların antosiyanin (a) ve flavonoid (b) içeriği

4.3.3.6. Hidrojen peroksit (H₂O₂) ve Antioksidan enzim aktiviteleri ölçümü

Yüksek seviyelerde nikel maruz kalmak, bitki hücrelerinde ROS birikimini önemli ölçüde artırmaktadır. Özellikle •OH, H₂O₂ ve •O₂⁻ gibi yüksek derecede reaktif moleküller bu süreçte yoğun biçimde üretilir (Rizwan vd. 2018). Bu türler, oksidatif stresin başlıca etkenleri olup, hücre zarını oluşturan lipid bileşenleri ve zar proteinleri ile reaksiyona girerek ciddi yapısal bozulmalara yol açar. Bu oksidatif saldırılar sonucunda membranlarda meydana gelen hasarların yanı sıra diğer biyomoleküller üzerinde de belirgin hasarlara neden olarak hücre bütünlüğünü ve fonksiyonlarını zayıflatır. Sonuçta, nikelin neden olduğu ROS birikimi, bitki hücrelerinin hayati fonksiyonlarını doğrudan tehdit eden bir stres yanıtı mekanizmasını tetikler. Bitkilerin ise oksidatif saldırılara karşı en önemli savunma mekanizmalarından biri antioksidanlardır. Bu tez kapsamında PGPS inokülasyonu ile Ni stresi altında yetiştirilen aspir bitkilerinin yapraklarındaki H₂O₂ ve enzimatik antioksidan (SOD, POD, GR ve APX) miktarları hesaplanarak Çizelge 4.4'te sunulmuştur. Bitkilerde stres koşullarında miktarı artan •O₂⁻ radikallerini, H₂O₂ ve O₂ gibi daha az zararlı forma dönüştüren SOD enzimi, enzimatik antioksidan savunma sisteminin ilk basamağını oluşturmaktadır. Elde edilen ölçüm sonuçlarına göre, negatif kontrole (0 mM) kıyasla tüm grupların toplam SOD aktivitesinde dramatik artışlar tespit edilmiştir. Bu artışlar pozitif kontrol (0.75 mM), Sp ve Sg için sırasıyla %146.0, %142.2 ve %122.5 oranında olduğu ölçülmüştür. Chen vd. (2024)'ün Ni stresi altında yetiştirdikleri *Leersia hexandra* Swartz bitkilerinde yaptıkları transkriptomik çalışmada SOD gen ifadesinde (SODCP ve SODI) artış tespit etmişlerdir. Literatürde yapılan pek çok araştırma ile Ni toksisitesinin bitkilerde SOD aktivitesini arttırdığı ortaya koyulmuştur (Ali vd. 2003; Gajewska ve Skłodowska 2007; Siddiqui vd. 2011; Theriault vd. 2016; Baran ve Ekmekçi 2022). SOD enziminin katalizlediği tepkimenin ürünü olarak güçlü bir oksidan olan H₂O₂ açığa çıkmaktadır. Bu çalışmada yapılan analizlerde, artan SOD aktivitesi ile uyumlu olarak, ürünü olan H₂O₂ miktarında da negatif kontrole kıyasla pozitif kontrol (0.75 mM), Sp ve Sg uygulamasında %186.1, %169.1 ve %176.6 oranında artış kaydedilmiştir. Ni uygulanan gruplar arasında ise SOD aktivitesinde istatistiksel açıdan önemli bir fark saptanmamıştır. Pozitif kontrol ile bakteri uygulamaları arasında H₂O₂ miktarı bakımından da benzer sonuçlar kaydedilmiş olup istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır. Bitkilerde SOD'a ek olarak NADPH oksidaz (NOX), amino oksidaz (AO), oksalat oksidaz (OxO), peroksidaz (PRX) aktivitesinin yanı sıra, peroksizomlardaki yağ asidi β-oksidasyonu ve gliksizom glikolat oksidasyonu sonucunda da H₂O₂ üretimi meydana gelmektedir (Smirnov vd. 2019). H₂O₂ önemli bir sinyal molekülü olup stres ve patojen savunmasında rol almasına karşın aşırı miktarda

birikmesi sonucunda kloroplast ve peroksizom otofajisini ve programlanmış hücre ölümünü tetikleyebilir (Smirnoff vd. 2019). Bu nedenle, stres koşullarında H_2O_2 molekülünün hücrede aşırı birikmesine karşı bitkiler CAT, POD, GPX, GR, GST, APX, MDHAR ve DHAR gibi çeşitli antioksidan enzimlerden yararlanır. Bu enzimler, bir yandan Haber–Weiss reaksiyonu gibi ROS oluşumunu artıran zincir tepkimeleri sınırlarken, diğer yandan Foyer–Halliwell–Asada yolağında NADPH'nin indirgeme gücünü kullanarak H_2O_2 molekülünü zararsız bileşenlere dönüştürür. Böylece oksidatif stresin şiddeti azaltılarak hücresel bütünlük korunmuş olur. Bu tezde, Ni stresi altında yetiştirilen ve PGPS inoküle edilen aspir bitkilerinin yapraklarından alınan ölçümlerde H_2O_2 molekülünü ekstraselüler alanda detoksifiye eden POD aktivitesi (guaikol peroksidaz) belirlenmiştir. Negatif kontrole (0 mM) kıyasla toplam POD aktivitesi tüm gruplarda dramatik şekilde artmıştır. Bu artışlar pozitif kontrol (0.75 mM), Sp ve Sg için sırasıyla %58.1, %101.6 ve %59.6 oranında olduğu kaydedilmiştir. Bu enzimatik artışların, SOD aktivitesindeki yükselişe paralel bir şekilde gerçekleşmesi, O_2^- ve H_2O_2 gibi ara ürünlerin birikimini sınırlandırarak Haber–Weiss reaksiyonu aracılığıyla oluşabilecek son derece toksik $\cdot OH$ üretimini engellemeye yönelik bir savunma yanıtı olduğunu düşündürmektedir. Ni uygulanan gruplar arasındaki karşılaştırmada, Sg inokülasyonunun pozitif kontrole (0.75 mM) kıyasla toplam POD aktivitesinde anlamlı bir değişim yaratmadığı, buna karşılık Sp inokülasyonunun %27.5 oranında artışa yol açtığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Bu durum, her iki PGPS suşunun bitkide oksidatif stres tepkilerini farklı şekillerde düzenlediğini göstermektedir. Sp suşunun POD aktivitesini belirgin şekilde artırması, bu bakterinin aspir bitkisinde peroksidaz aracılı savunma sistemlerini daha etkili biçimde aktive ettiğine işaret etmektedir. Buna karşılık, Sg suşunun benzer bir etki göstermemesi, bu suşun farklı bir tolerans stratejileri üzerinden (örneğin Ni hapsedilmesi veya translokasyonun azaltılması gibi) etki gösterdiğine işaret edebilir. Bu farklılıklar, PGPS suşlarının biyotik tepkileri yönlendirme kapasitelerinin suş düzeyinde değişkenlik gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Pishchik vd. (2021), *Bacillus megaterium* ve *Paenibacillus nicotianae* ile inoküle ettikleri ve Ni stresi altında yetiştirdikleri buğday bitkilerinde, POD ve CAT enzim aktivitelerinin yalnızca Ni uygulanan (inokülasyonsuz) stres gruplarında anlamlı şekilde arttığını, buna karşın bakteri inokülasyonu yapılan gruplarda bu enzim aktivitelerinde düşüş gözlemlendiğini bildirmiştir. Bu durum, tez kapsamında elde edilen sonuçlarla uyumludur ve benzer eğilimleri desteklemektedir.

GSH (redükte glutatyon) enzimatik olmayan bir antioksidan olarak hücre içi düşük moleküler ağırlıklı bir tiyol molekülüdür. Bu molekül, Ni stresi koşulları altında proteinlerin sülfhidril gruplarını koruyarak oksidatif denatürasyonlarını önler. GPX ve GST, H_2O_2 molekülünü suya dönüştürebilir ve bu süreçte GSH'yi, okside glutatyon (GSSG) formuna yükseltgeyebilir. GR enzimi ise GSSG'yi tekrar GSH'ye indirger ve böylece hücrede GSH'nin dengeli düzeyde tutulmasını sağlar. Bir flavo-protein oksidoredüktaz olan ve askorbat-glutatyon yolağının (Foyer-Asada-Halliwell yolağı) önemli bir bileşeni olan GR enzim aktivitesi sonuçlarına göre, negatif kontrole (0 mM) kıyasla toplam GR aktivitesi tüm gruplarda artmıştır. Bu artışlar pozitif kontrol (0.75 mM) ve Sp'de %216.4; Sg'de ise %139.2 oranında gerçekleşmiştir. Ni uygulanan gruplardaki değişim incelendiğinde ise, pozitif kontrole (0.75 mM) göre yalnızca Sg inokülasyonu yapılan gruptaki %24.4'lük düşüş anlamlı bulunmuştur. GR aktivitesinin sitozol, çekirdek, peroksizomlar ve mitokondrilerde bulunmasına rağmen büyük çoğunluğunun (%80) fotosentetik dokularda, kloroplastlarda bulunduğu bilinmektedir.

Fotosentetik aygıtların korunmasında önemli rol oynayan GR, PSII aktivitesinin korunmasında, özellikle PSII'nin alıcı tarafındaki elektron transferi için ve fotohasarlı PSII'nin onarımı için gerekli olduğu bildirilmiştir (Rajput vd. 2021). PSII'nin durumu hakkında bilgi veren klorofil *a* floresans parametreleri incelendiğinde Sg inokülasyonunun pozitif kontrole kıyasla daha iyi durumda olduğu görülmektedir. GR aktivitesinin düşük olmasına rağmen PSII'nin korunmuş ve fonksiyonel olması Ni stresinin Sg inokülasyonu yapılan aspir bitkisi yapraklarında daha hafif seyrettiğini göstermektedir. Bu durum Sg inokülasyonu yapılan gruplarda Ni akümüasyonunun toprak üstü organlara düşük translokasyonu ile açıklanabilir. Ayrıca PGPB uygulamalarının bitkilerde şelatlama stratejilerini aktive ettiğini ve PC, MT, organik asitler vb ajanlar aracılığı ile mevcut metallere bağlanarak kompleks oluşturduğunu ve böylece vakuollerde veya hücrenin periferik bölgelerinde etkisizleştirilerek fizyolojik olarak inaktif formda hapsedilebildiğini bildirmiştir. Sonuçta hem düşük konsantrasyonda Ni iyonu olması hem de var olan iyonların çeşitli kompleksler ile inaktif hale getirilmesi sayesinde daha düşük toksisite, oksidatif hasar sonucunda düşük antioksidan yanıtı oluşmuş olabilir.

Sınıf I hem-peroksidazlar arasında yer alan ve askorbat (AsA) bağımlı peroksidaz olarak bilinen APX, Foyer-Halliwell-Asada yolağının temel enzimlerinden biridir. Bitki hücrelerinde askorbatı elektron vericisi olarak kullanarak H_2O_2 'yi suya dönüştürürken, aynı zamanda askorbatı dehidroaskorbik aside (DHA) oksitler. Bu süreçte oluşan DHA, DHAR (dehidroaskorbat redüktaz) enzimi tarafından tekrar askorbata indirgenerek askorbat döngüsünün sürekliliği sağlanır (Chen vd. 2024b). Ni stresi altında PGPS inokülasyonları ile yetiştirilen aspir bitkisi yapraklarında elde edilen sonuçlara göre, negatif kontrole (0 mM) kıyasla toplam APX aktivitesi tüm gruplarda ciddi şekilde artmıştır. Bu artışlar pozitif kontrol (0.75 mM), 0.75+Sp ve 0.75+Sg uygulamaları için sırasıyla %365.3, %346.4 ve %237.8 oranında gerçekleşmiştir. Bu durum, bitkide meydana gelen ROS birikimine karşı verilen antioksidan savunma yanıtını göstermektedir. En yüksek APX aktivitesinin pozitif kontrol grubunda gözlenmesi, bakteri uygulamalarının oksidatif stresi kısmen hafiflettiğine işaret etmektedir. Nitekim Sp ve Sg gruplarında APX aktivitesi pozitif kontrole göre daha düşük seviyelerde kalmıştır. Bu durum, PGPS suşlarının Ni kaynaklı oksidatif yükü azaltarak antioksidan savunma sistemlerinin daha dengeli çalışmasına katkı sağladığını düşündürmektedir. Bununla birlikte, Sg suşunun uygulandığı grupta APX düzeyinin diğerlerine kıyasla daha düşük olması, bu suşun toprak üstü organlara daha az Ni transloke etmesiyle ilişkili olabilir. Bu durum, bitkinin yaprak dokularında Ni birikiminin sınırlanması sayesinde oksidatif stresin daha az tetiklendiğini ve dolayısıyla antioksidan sistemlerin aşırı uyarılmasına gerek kalmadığını düşündürmektedir. Chen vd. (2024)'ün Ni stresi altında yetiştirdikleri *L. hexandra* bitkilerinde yaptıkları transkriptomik çalışmada APX gen ifadesinde (*APX7*) artış tespit etmişlerdir. Benzer şekilde çeşitli bitkilerde yapılan çalışmalar Ni toksisitesinin APX enzim aktivitesini artırdığını göstermektedir (Kumar ve Sharma 2012; Ghasemi vd. 2014). Literatürde bu tez kapsamında elde edilen veriler ile uyum gösteren ve metal toksisitesi uygulamasında bakteri uygulamalarının APX miktarını düşürdüğünü gösteren çalışmalar olmakla birlikte (Gonzalez-Reguero vd. 2024), aksini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır. Kumar vd. (2023) tarafından *A. lentiformis* bitkisi üzerinde yürütülen çalışmada, Ni stresi altında APX aktivitesinin anlamlı düzeyde artmasının yanı sıra, *P. fluorescens* ve *B. japonicum* suşlarıyla yapılan PGPB uygulamaları sonucunda bu artışın daha da belirginleştiği rapor edilmiştir. PGPB

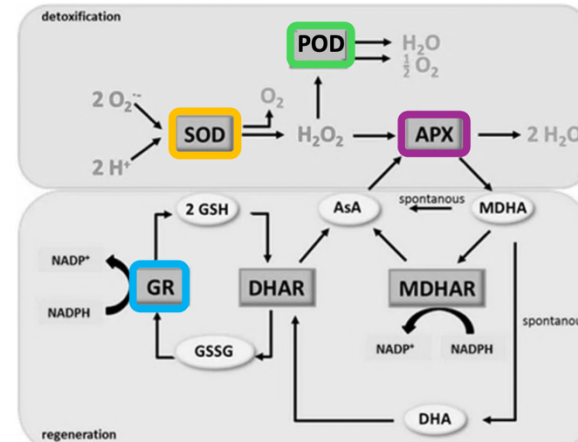
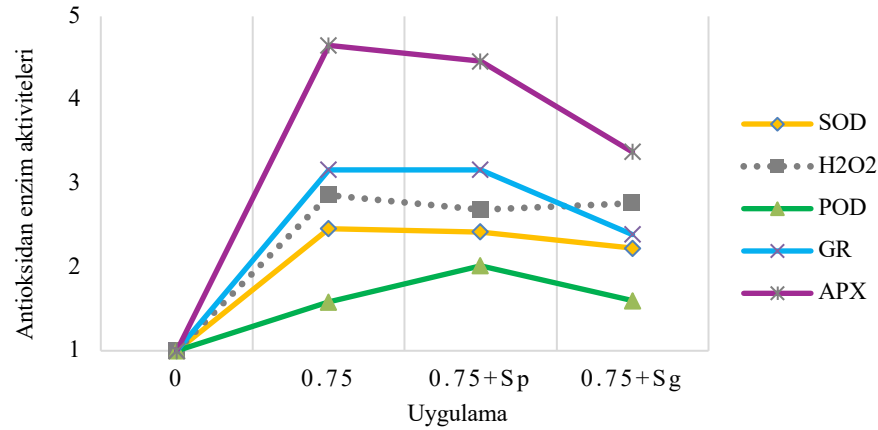
inoküle edilen gruplarda APX aktivitesinin yalnızca Ni uygulanan kontrol grubuna kıyasla yaklaşık %118.5 oranında arttığı bildirilmiştir.

Sonuç olarak bu tez kapsamında Ni toksisitesinin aspir bitkisinde neden olduğu oksidatif stres yanıtı detaylı olarak incelenmiş; bu sürece PGPS inokülasyonlarının etkileri biyokimyasal düzeyde değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, Ni uygulamasının bitki dokularında ROS birikimine yol açtığını ve bunun sonucu olarak lipid peroksidasyonu, membran hasarı ve hücresel bütünlükte bozulmalarla karakterize bir oksidatif stres ortamı oluşturduğunu ortaya koymuştur. Aspir bitkileri, bu strese karşı başta SOD, POD, GR ve APX olmak üzere çeşitli enzimatik antioksidan sistemlerini devreye sokarak yanıt vermiştir. Ölçüm sonuçlarına göre, tüm Ni uygulanan gruplarda bu enzimlerin aktivitesi negatif kontrole göre anlamlı şekilde artarken; PGPS uygulamaları ile enzim aktivitelerinde farklı düzeylerde yanıtlar ölçülmüştür. Sp suşunun özellikle POD aktivitesini anlamlı düzeyde artırması, bu suşun H₂O₂ detoksifikasyonunu hedef alan peroksidaz temelli savunma yollarını aktive ettiğini göstermektedir. Öte yandan, Sg suşunun POD aktivitesini anlamlı şekilde etkilememesi ancak buna rağmen PSII sisteminin korunmuş olması, farklı bir tolerans stratejisi ile (örneğin Ni translokasyonunun azaltılması ya da Ni iyonlarının şelatlayıcı moleküllerle bağlanarak fizyolojik olarak inaktif hale getirilmesi gibi) etki gösterdiğini düşündürmektedir. APX ve GR gibi enzimlerin aktivitesindeki farklılıklar da bu durumu destekler niteliktedir. Ayrıca Sg inokülasyonunun aspir sürgünlerinde daha düşük Ni akümülyasyonuna neden olduğu düşünüldüğünde yine de benzer seviyede antioksidan yanıt elde edilmiş olması bu suşun ISR özelliği göstermiş olmasından ve öncül bir koruma sağlayabildiğinden ileri geliyor olabilir. Sp suşunun GR aktivitesinde pozitif kontrole göre daha yüksek bir artış sağlaması, glutatyon döngüsünün etkinleştirildiğini; Sg suşunun ise bu aktivitede düşüş göstermesine rağmen fizyolojik parametrelerin bozulmamış olması, bu suşun daha sistemik veya pasif savunma mekanizmalarını (Ni sekestrasyonu, vakuoler depolama, translokasyonun sınırlandırılması vb.) devreye soktuğuna işaret etmektedir. Bu farklılıklar, Ni toleransında PGPB'nin suş düzeyinde özelleşmiş etki mekanizmalarına sahip olabileceğini ve fitoremediasyon uygulamalarında suş seçiminin büyük önem taşıdığını göstermesi açısından literatüre önemli katkı sağlamaktadır.

Çizelge 4.4. Ni stresinde yetiştirilen aspir bitkilerinde inokülasyonsuz kontrol (K-: 0 ve K+:0.75 mM Ni) ve PGPS uygulanan grupların H_2O_2 miktarı ve antioksidan enzim aktiviteleri. Çizelgede verilen değerler ortalama ve standart hatalarını ($\pm$ STH) göstermekte olup farklı harfler, uygulamalar arasındaki farkın anlamlı olduğunu ($p \leq 0.05$) göstermektedir

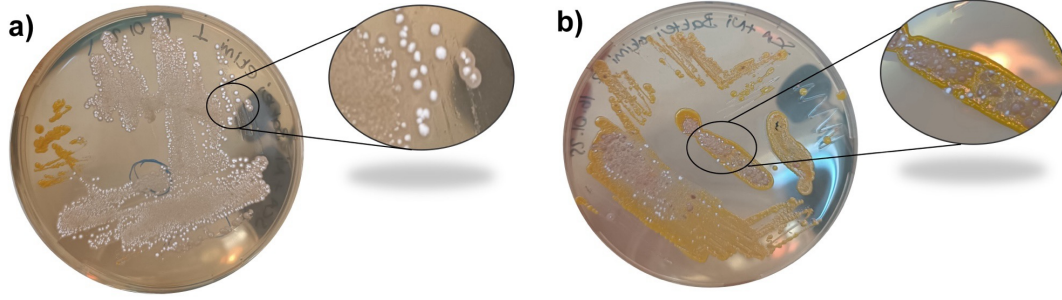
H ₂ O ₂ miktarı ve enzimatik antioksidan aktivitesi		Uygulama			
		0	0.75	0.75+Sp	0.75+Sg
Kantitatif ölçüm sonuçları	Hidrojen peroksit (H₂O₂) (nmol. g TA ⁻¹)	15,49±2,1 ^a	44,32±3,0 ^b	41,69±1,1 ^b	42,86±3,6 ^b
	Süperoksit dismutaz (SOD) (ünite. mg protein ⁻¹)	0,149±0,01 ^a	0,367±0,05 ^b	0,361±0,04 ^b	0,332±0,01 ^b
	Peroksidaz (POD) (nmol H ₂ O ₂ . dak ⁻¹ mg protein)	199,89±8,5 ^a	316,05±22,8 ^b	402,97±29,7 ^c	319,09±38,7 ^b
	Glutasyon redüktaz (GR) (nmol NADPH. dak ⁻¹ µg protein ⁻¹)	1,74±0,4 ^a	5,51±0,1 ^b	5,51±0,6 ^b	4,17±0,1 ^a
	Askorbat peroksidaz (APX) (nmol askorbat . dak ⁻¹ mg protein ⁻¹)	77,78±48,1 ^a	361,90±39,6 ^b	347,22±38,9 ^b	262,70±14,7 ^{ab}

Oransal ölçüm sonuçları

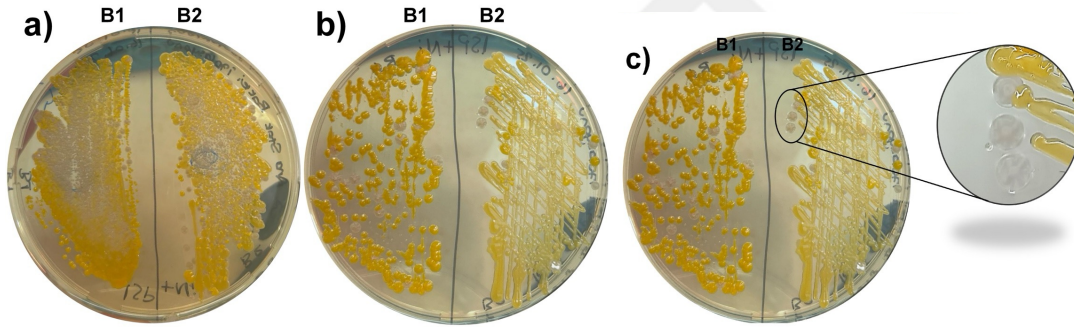


4.4. Bakteri kolonizasyonunun kanıtlanması

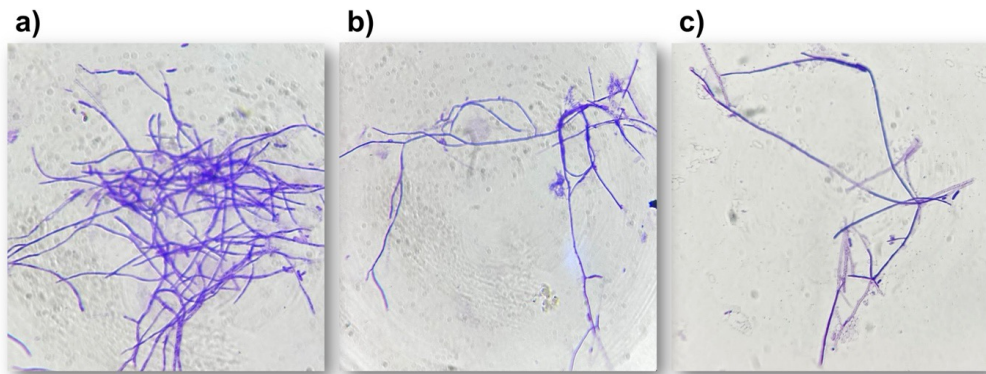
Yapılan analizler sonucunda *Streptomyces* için seçici besiyerlerinde *Streptomyces* sp. kolonilerinin büyüdüğü gösterilmiştir (Şekil 4.21 ve Şekil 4.22). Ayrıca büyüyen kolonilerin ışık mikroskobu analizlerinde hücre morfolojilerinin *Streptomyces* cinsi bakteriler ile uyumlu olduğu görülmüştür (Şekil 4.23). Bakteri uygulaması yapılmayan kontrol gruplarında *Streptomyces* cinsine benzeyen bakteri kolonileri izole edilmemiştir.



Şekil 4.21. Sp (a) ve Sg (b) inoküle edilen bitkilerden geri izole edilen bakterilerin SCA besiyerindeki morfolojileri



Şekil 4.22. Aspir bitkisinden geri izole edilen bakterilerin ISP agarda büyümleri [ana stok (a) ve 10^{-3} seyreltmeden (b) gerçekleştirilen ekimler] ve koloni morfolojileri (c) (B1: Sp; B2: Sg)



Şekil 4.23. Aspir bitkisinden geri izole edilen Sp (a, b) ve Sg (c) kolonilerinin mikroskop görüntüleri

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, Ni hiperakümülatörü *C. ensiformis* bitkisinin mikrobiyotasında yer alan endofitik bakterilerin kompozisyonu belirlenmiş olup, *Streptomyces*, *Peribacillus*, *Paenibacillus*, *Gottfriedia* ve *Priestia* cinslerine ait suşlar izole edilmiştir. Mikrobiyal dağılımın önemli bir kısmını *Streptomyces* cinsine ait türler oluşturmuştur. İzole edilen bakterilerin PGPB testleri (IAA üretimi, ACC deaminaz, siderofor üretimi, P çözümlülüğü) gerçekleştirilmiş ve yüksek potansiyele sahip olan 5 tür (Pf, Sc, Bs, Sp ve Sg) seçilerek aspir bitkisine inoküle edilmiş ve bitkiler 0.75 mM Ni stresi altında yetiştirilmiştir. 21 gün sonunda hasat edilen bitkilerden biyokütle, pigment ve element akümülasyonu ölçümleri alınmıştır. Sonuçlara göre, inokülasyonsuz pozitif kontrole kıyasla Sp hem kökte hem sürgünde, Bs kökte Ni akümülasyonunu artırırken; Sg ve Sc sürgünde Ni akümülasyonunu düşürmüştür. Diğer taraftan Sg ve Bs fotosentetik pigment miktarını artırmıştır. Hem yaş hem kuru biyokütle üretiminde ise yalnızca Sg başarılı sonuçlar vermiştir. Sürgünde Ni akümülasyonunu artıran tek suş olan Sp ise bu artışa rağmen pigment veya biyokütle kaybına neden olmamıştır.

Fitoremediasyonun iki temel alt tekniği olan fitostabilizasyon (topraktaki kirleticilerin bitki kök bölgesinde sabitlenmesi) ve fitoekstraksiyon (kirleticilerin bitki tarafından alınarak özellikle toprak üstü organlarda biriktirilmesi) yaklaşımları farklı mikrobiyal stratejiler ile desteklenebilmektedir. Bu tezde, Ni stresi altında aspir bitkisi ile kurulan simbiyotik ilişkiler temel alınarak, Ni translokasyon yetenekleri doğrultusunda fitostabilizasyon çalışmalarına yönelik Sg, fitoekstraksiyona yönelik ise Sp suşları seçilmiştir. Ardından Aspir-PGPS birlikteliklerinin Ni stresine karşı oluşturduğu yanıtların fizyolojik ve biyokimyasal düzeyde nasıl şekillendiğini ortaya koymak amacıyla büyüme parametreleri, fotokimyasal aktivite, su içeriği, membran bütünlüğü, pigment içerikleri, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri düzeyleri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre;

- Pozitif kontrol (0.75 mM Ni) ile bakteri uygulaması olan gruplar (0.75 mM + Sg/Sp), diğer bir deyişle sadece Ni uygulanmış bitkiler ile Ni ve bakteri suşlarının birlikte uygulandığı gruplar kıyaslandığında: Sürgün Ni akümülasyonunda %30, kök Ni akümülasyonunda %26, sürgün biyokütle üretiminde %61, kök biyokütle üretiminde %33, klorofil a miktarında %94, klorofil b miktarında %108, POD aktivitesinde %28, fotosentetik performans indeksinde %33'e ulaşan oranlarda iyileşme kaydedilmiştir. Böylece sınanan hipotezlerden Hipotez 1'in tüm alt hipotezleri (A, B ve C) ve Hipotez 2'nin üç alt hipotezi (A, B ve E) kabul edilerek hem Hipotez 1 hem de Hipotez 2 doğrulanmıştır.
- Nikelin büyük ölçüde köklerde birikmesi, aspir bitkisinin fitoremediasyon potansiyelinin fitoekstraksiyondan çok fitostabilizasyon yönüyle ele alınmasını daha uygun hale getirmektedir. Bu durum, özellikle nikelin toprak üstü ve yenilebilir bitki kısımlarına sınırlı taşınması sayesinde gıda güvenliği açısından da avantaj sağlamaktadır. Böylece, ağır metal içeriğinin ürün kalitesi ve insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri minimize edilebilir.
- Ni toksisitesi aspir bitkilerinin fotosentetik pigment miktarlarında azalmaya, fotokimyasal aktivitede kayıplara, iyon sızıntısında ve oksidan miktarında artışlara, su içeriğindeki azalmalara neden olmuştur. Bu olumsuz etkiler, bitkinin

besin üretimi, enerji metabolizması ve hücresel bütünlüğünü bozarak büyüme ve gelişme süreçlerini önemli ölçüde aksatmıştır. Sonuç olarak hem yaş hem de kuru biyokütle üretiminde anlamlı ve ciddi düzeyde düşüşler gözlemlenmiştir. İlerideki çalışmalarda diğer oksidan miktarlarının (süperoksit, hidroksil gibi) belirlenmesi, hücre duvarları, ksilem boruları ve kloroplastların görüntülenmesi, bitkide meydana gelen Ni toksisitesini daha detaylı bir şekilde haritalanmasına yardımcı olabilecektir.

- Ni iyonlarının zararlı etkilerine karşı bitkinin savunma mekanizmaları aktifleşmiştir. Enzimatik antioksidanlardan SOD, POD, GR ve APX aktiviteleri ile ve enzimatik olmayan antioksidanlardan antosiyanin ve flavonoid miktarları artmıştır. Böylece Ni stresinin neden olduğu oksidatif hasara karşı savunma yanıtı oluşturulmuştur. Ayrıca artan antosiyanin ve flavonoid miktarı serbest Ni iyonları ile kompleks oluşturarak, nikelin detoksifiye edilmesine yardımcı olmuş olabilir. Yapılacak ileri analizler ile, bitki hücre duvarlarının Ni detoksifikasyonuna katkısı, muhtemelen sentezi artan PC, MT ve bazı organik asitler gibi şelatlayıcı ajanların miktarı veya transkripsiyon seviyeleri, ağır metal toleransında rol alan diğer sekonder metabolitlerin durumu ile GSH, GST ve AsA gibi diğer antioksidan miktarları tespit edilerek bitkinin Ni stresine karşı oluşturmuş olduğu tolerans mekanizmasının detaylandırılması mümkündür.
- Sp inokülasyonunun, sürgünlere yüksek Ni translokasyonuna rağmen klorofil miktarı, bitki boyu ve kuru biyokütle üzerinde olumsuz bir etkisinin olmaması, çeşitli tolerans mekanizmalarını (özellikle antioksidan sistemler; POD ve APX) daha etkin biçimde çalışmasını desteklemesinden kaynaklanmış olabilir. Fotosentetik enerji akışlarında bazı parametrelerde belirgin düzeyde hasar tespit edilmesine rağmen biyokütle üretiminde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemesi, veriler arasında bir çelişki olarak değerlendirilmemelidir. Çünkü klorofil *a* floresansı ölçümleri, fotosentetik sistemde meydana gelen fizyolojik bozulmaları erken dönemde, henüz morfolojik ve biyokütle düzeyindeki etkiler tam olarak ortaya çıkmadan önce tespit edebilen hassas bir göstergedir. Dolayısıyla floresans analizlerinde saptanan bozulmalar, ilerleyen dönemde büyüme ve biyokütle parametrelerine yansması muhtemel olan bir stresin erken belirtileridir. Bu durum, klorofil *a* floresansının erken uyarı sistemi olarak değerlendirilmesini ve elde edilen bulguların zamansal bir perspektifle ele alınmasını gerektirir.
- Sg inokülasyonu ise, aspir bitkisi sürgünlerinde daha düşük düzeyde Ni translokasyonuna neden olmuştur. Bu yönüyle yaprak dokularında oluşan toksisite baskısı sınırlamış ve Sp ile karşılaştırıldığında membran bütünlüğü, su içeriği, klorofil miktarı ile fotosentetik yapıların hem yapısal hem de fonksiyonel bütünlüğünü daha iyi korumuştur. Bunun sonucunda bitki gelişiminin daha iyi ilerlediği ve kuru biyokütle üretiminin arttığı tespit edilmiştir. Dahası Sg inokülasyonu yapılan aspir bitkilerinde, sürgün dokularında daha düşük düzeyde Ni birikmesine rağmen, kontrol grubuyla benzer seviyede antioksidan savunma tepkilerinin gözlenmesi dikkat çekici bir bulgudur. Bu durum, Sg suşunun oksidatif stresi hafifletmesinin yanı sıra, bitkide sistemik direnç mekanizmalarını (ISR) aktive ederek, antioksidan savunma sistemlerinin proaktif biçimde uyarılmış olabileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla Sg, sürgünlerde hem Ni

yükünü sınırlayan hem de ISR yoluyla bitkinin fizyolojik dayanıklılığını artıran çift yönlü bir koruma stratejisi sağlamıştır. Bu veriler, PGPS uygulamalarının yalnızca büyüme teşviği değil, aynı zamanda Ni stresine karşı bitkisel savunma ve detoksifikasyon sistemlerini çok yönlü olarak etkileyebileceğini göstermektedir. Yapılacak metabolomik ve proteomik analizler ile Ni toleransında rol oynayan içeriklerin haritalaması detaylı şekilde ortaya koyulabilir.

- Bu tez çalışması, Sp ve Sg suşlarının, aspir bitkisinin Ni stresine karşı dayanıklılığını farklı ancak birbirini tamamlayıcı mekanizmalarla artırdığını ortaya koymuştur. Bulgular, PGPS suşlarının seçiminde yalnızca Ni alım düzeylerinin değil, aynı zamanda bitkinin stres toleransı, fotosentetik performansı, antioksidan savunma yanıtları ve büyüme parametrelerinin bütüncül olarak değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir. Bu kapsamda, PGPS uygulamaları hem fitoremediasyon stratejilerinin optimizasyonu hem de tarımsal verimliliğin artırılması açısından önemli bir biyoteknolojik araç olarak değerlendirilmektedir. Gıda güvenliği açısından, aspir ürünü sofralık yağ, baharat veya tıbbi amaçlarla kullanılacaksa, sürgün dokularında daha düşük düzeyde Ni birikimi sağlayan Sg suşunun kullanılması önerilmektedir. Öte yandan, ürünün biyodizel, biyoetanol gibi gıda dışı endüstriyel uygulamalarda değerlendirilmesi hedefleniyorsa, toprakta biriken nikeli daha etkin şekilde absorblayan ve sürgünlere taşıyan Sp suşu, fitoekstraksiyon temelli yaklaşımlar için daha uygun bir seçenek sunmaktadır. Ayrıca, her iki suşun birlikte uygulanacağı kombine inokülasyon stratejileri hem ağır metal alımını hem de fizyolojik toleransı optimize edebilecek potansiyel bir yaklaşım olarak değerlendirilebilir. Önemli bir bulgu olarak, Ni kirliliği bulunan alanlarda aspir bitkisinin daha kolay adapte olmasını ve daha yüksek biyokütle verimiyle gelişmesini sağlayan suşun Sg olduğu belirlenmiştir. Sg, yalnızca Ni translokasyonunu sınırlamakla kalmamış; aynı zamanda fotosentez, su dengesi, membran bütünlüğü ve antioksidan savunma gibi temel fizyolojik süreçleri koruyarak bitkinin Ni stresine karşı daha dirençli bir yapıda gelişmesini desteklemiştir. Bu yönüyle Sg, gıda güvenliği kaygısının ön planda olduğu kontamine tarım alanlarında aspir yetiştiriciliği için avantajlı ve güvenli bir biyolojik çözüm sunmaktadır.
- Bu çalışma, kontrollü laboratuvar koşullarında yürütülmüş olup, elde edilen verilerin saha koşullarında doğrulanması büyük önem taşımaktadır. Çünkü doğal ortamlarda, PGPS suşlarının yerel mikrobiyota ile etkileşimi, toprak yapısı, iklim koşulları ve bitkiyle kurduğu simbiyotik ilişkinin sürekliliği gibi değişkenler, bu suşların performansını doğrudan etkileyebilir. Bu nedenle, ilerleyen çalışmalarda farklı ekolojik koşullarda gerçekleştirilecek tarla denemeleri, PGPS suşlarının saha ölçeğinde uygulanabilirliğini değerlendirmek açısından kritik öneme sahiptir. Böylece hem çevresel hem de tarımsal sürdürülebilirlik hedeflerine katkı sunabilecek, bilimsel temelli ve pratik olarak uygulanabilir fitoremediasyon ve biyogübre stratejileri geliştirilebilir.

6. KAYNAKLAR

- Abeed, A.H.A., Mahdy, R.E., Alshehri, D., Hammami, I., Eissa, M.A., Abdel Latef, A.A.H., and Mahmoud, G.A. 2022. Induction of resilience strategies against biochemical deteriorations prompted by severe cadmium stress in sunflower plant when Trichoderma and bacterial inoculation were used as biofertilizers. *Frontiers in Plant Science*, 13: 1004173.
- Adalı, M. 2016. Konya koşullarında bazı aspir (*Carthamus tinctorius* L.) çeşit ve hatlarında verim, verim unsurları ve kalite özelliklerinin belirlenmesi. *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, Konya.
- Adıgüzel, N. and Reeves, R.D. 2012. Important serpentine areas of Turkey and distribution patterns of serpentine endemics and nickel accumulators. *Bocconeia*, 24: 7–17.
- Afonseca, A., Mota, I., Vasques, G., Soares, L., Flores, M., Azenha, M., and Teixeira, J. 2024. Nickel-induced differential expression of metallothioneins and phytochelatin synthase 1 in *Arabidopsis thaliana*: Organ-specific responses. *Agronomy*, 14: 3026.
- Afzal, I., Shinwari, Z.K., Sikandar, S. and Shahzad, S. 2019. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research*, 221: 36–49.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., and Tattini, M. 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*, 196: 67–76.
- Agnihotri, P., Maitra, M., and Mitra, A.K. 2022. Effect of an As(V)-resistant plant growth promoting bacterial consortium on growth, antioxidant content and arsenic accumulation in *Azolla microphylla* under As(V) stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 69: 15.
- Akbari, G. A., Arab, S. M., Alikhani, H. A., Allakdadi, I. ve Arzanesh, M. H. 2007. Isolation and selection of indigenous Azospirillum spp. and the IAA of superior strains effects on wheat roots. *World Journal of Agricultural Sciences*, 3: 523–529.
- Akinbile, B.J. and Mbohwa, C. 2025. Incorporating hyperaccumulating plants in phytomining, remediation and resource recovery: Recent trends in the African region – A review. *RSC Sustainability*, 3: 1652–1671.
- Akköprü, A. 2012. Hıyar bakteriyel köşeli yaprak leke hastalığının (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) bazı kök bakterileriyle biyolojik savaşımlı üzerinde araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye.
- Aksoy, A. 2021. Accumulation of cadmium, copper and zinc in selected natural *Viola* taxa in Turkish Mediterranean serpentine soils. *Anatolian Journal of Botany*, 5(2): 138–143.
- Al Chami, Z., Amer, N., Al Bitar, L. and Cavoski, I. 2015. Potential use of *Sorghum bicolor* and *Carthamus tinctorius* in phytoremediation of nickel, lead and zinc. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12: 3957–3970.

- Alaboudi, A. K., Ahmed, B. and Brodie, G. 2018. Phytoremediation of Pb and Cd contaminated soils by using sunflower (*Helianthus annuus*) plant. *Annals of Agricultural Sciences*, 63: 123–127.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. and Karanov, E. 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell and Environment*, 24(12): 1337–1344.
- Ali, M. B., Vajpayee, P., Tripathi, R. D., Rai, U. N., Singh, S. N. and Singh, S. P. 2003. Phytoremediation of lead, nickel, and copper by *Salix acmophylla* Boiss.: Role of antioxidant enzymes and antioxidant substances. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70: 462–469.
- Altaf, M.A., Shahid, R., Ren, M.-X., Altaf, M.M., Jahan, M.S., and Khan, L.U. 2021. Melatonin mitigates nickel toxicity by improving nutrient uptake fluxes, root architecture system, photosynthesis, and antioxidant potential in tomato seedling. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 21: 1842–1855.
- Alves, A.R.A., Yin, Q., Oliveira, R.S., Silva, E.F. and Novo, L.A.B. 2022. Plant growth-promoting bacteria in phytoremediation of metal-polluted soils: Current knowledge and future directions. *Science of the Total Environment*, 838: 156435.
- Ameen, N., Amjad, M., Murtaza, B., Abbas, G., Shahid, M., Imran, M., Asif, M. A. and Niazi, N. K. 2019. Biogeochemical behavior of nickel under different abiotic stresses: Toxicity and detoxification mechanisms in plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 26: 10496–10514.
- Amjad, M., Raza, H., Murtaza, B., Abbas, G., Imran, M., Shahid, M., Naeem, M. A., Zakir, A. and Iqbal, M. M. 2020. Nickel toxicity induced changes in nutrient dynamics and antioxidant profiling in two maize (*Zea mays* L.) hybrids. *Plants*, 9(1): 5.
- Anas, M., Falak, A., Hassan, S., Khattak, W.A., Saleem, M.H., Khan, K.A., Khalid, A., and Fahad, S. 2025. Microbial interactions and bacterial responses to metal stress in plants: Mechanisms, adaptations, and applications for sustainable agriculture. *Journal of Crop Health*, 77: 36.
- Angelova, V. R., Akova, V. I., Krustev, S. V. and Ivanov, K. I. 2015. Potential of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) for phytoremediation of soils contaminated with heavy metals. *Contaminated Soils, Sediments, Water and Energy*, 1.
- Aqeel, M., Khalid, N., Tufail, A., Ahmad, R. Z., Akhter, M. S., Luqman, M., Javed, M. T., Irshad, M. K., Alamri, S., Hashem, M. and Noman, A. 2021. Elucidating the distinct interactive impact of cadmium and nickel on growth, photosynthesis, metal-homeostasis, and yield responses of mung bean (*Vigna radiata* L.) varieties. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(21): 27376–27390.
- Asada, K., Kiso, K. ve Yoshikawa, K. 1974. Univalent reduction of molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination. *Journal of Biological Chemistry*, 249(7): 2175–2181.
- Athar, R. ve Ahmad, M. 2002. Heavy metal toxicity in legume-microsymbiont system. *Journal of Plant Nutrition*, 25: 369–386.

- Azmat, R. and Riaz, S. 2012. Inhibition of polymerization of glucose in carbohydrates under Cu stress in *Vigna radiata*. *Pakistan Journal of Botany*, 44: 95–98.
- Bai, X., Bol, R., Chen, H., Cui, Q., Qiu, T., Zhao, S., and Fang, L. 2024. A meta-analysis on crop growth and heavy metals accumulation with PGPB inoculation in contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*, 471: 134370.
- Bai, Y., Guo, J., Reiter, R.J., Wei, Y., and Shi, H. 2020. Melatonin synthesis enzymes interact with ascorbate peroxidase to protect against oxidative stress in cassava. *Journal of Experimental Botany*, 71: 5645–5655.
- Bani, A., Echevarria, G., Sulçe, S., and Morel, J.L. 2014. Improving the agronomy of *Alyssum murale* for extensive phytomining: A five-year field study. *International Journal of Phytoremediation*, 17: 117–127.
- Baran, U. 2018. Aspir bitkisinin yerel (*Carthamus tinctorius* L.) ve atasal (*Carthamus oxyacantha* M. Bieb) genotiplerinin nikel toleranslarının belirlenmesi ve fitoremediasyonda kullanılma potansiyellerinin değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Baran, U. ve Ekmekçi, Y. 2022. Physiological, photochemical, and antioxidant responses of wild and cultivated *Carthamus* species exposed to nickel toxicity and evaluation of their usage potential in phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 29: 4446–4460.
- Barros, J., Escamilla-Trevino, L., Song, L., Rao, X., Serrani-Yarce, J.C., Palacios, M.D., Engle, N., Choudhury, F.K., Tschaplinski, T.J., Venables, B.J., Mittler, R., and Dixon, R.A. 2019. 4-Coumarate 3-hydroxylase in the lignin biosynthesis pathway is a cytosolic ascorbate peroxidase. *Nature Communications*, 10: 1994.
- Barzanti, R., Ozino, F., Bazzicalupo, M., Gabrielli, R., Galardi, F., Gonnelli, C. and Mengoni, A. 2007. Isolation and characterization of endophytic bacteria from the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. *Microbial Ecology*, 53: 306–316.
- Batool, S. 2018. Impact of bioaccumulation of nickel on growth, seed yield and mineral uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.) varieties. *Pakistan Journal of Botany*, 50: 2147–2150.
- Bergmeyer, H.U. and Bernt, E. 1974. Glutamate-oxaloacetate transaminase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, 2, 727–733.
- Berni, R., Luyckx, M., Xu, X., Legay, S., Sergeant, K., Hausman, J.-F., Lutts, S., Cai, G., and Guerriero, G. 2019. *Environmental and Experimental Botany*, 161: 98–106.
- Beyer, W.F. ve Fridovich, I. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, 161: 559–566.
- Boisvert, S., Joly, D., Leclerc, S., Govindachary, S., Harnois, J. ve Carpentier, R. 2007. Inhibition of the oxygen-evolving complex of photosystem-II and depletion of extrinsic polypeptides by nickel. *Biometals*, 20: 879–889.

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254.
- Burd, G.I., Dixon, D.G. and Glick, B.R. 1998. A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10): 3663–3668.
- Carlos, M.H.J., Stefani, P.V.Y., Janette, A.M., Melani, M.S.S. and Gabriela, P.O. 2016. Assessing the effects of heavy metals in ACC deaminase and IAA production on plant growth-promoting bacteria. *Microbiological Research*, 188: 53–61.
- Ceppi, M.G., Oukarroum, A., Çiçek, N., Strasser, R.J. and Schansker, G. 2012. 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: 277–288.
- Chen, C., Huang, D. and Liu, J. 2009. Functions and toxicity of nickel in plants: Recent advances and future prospects. *Clean – Soil, Air, Water*, 37: 304–313.
- Chen, F., Ye, J., Chio, C., Liu, W., Shi, J. and Qin, W. 2020. A simplified quick microbial genomic DNA extraction via freeze–thawing cycles. *Molecular Biology Reports*, 47(1): 703–709.
- Chen, M., Jiang, P., Zhang, X., Sunahara, G.I., Liu, J. and Yu, G. 2024b. Physiological and biochemical responses of *Leersia hexandra* Swartz to nickel stress: Insights into antioxidant defense mechanisms and metal detoxification strategies. *Journal of Hazardous Materials*, 466: 133578.
- Chen, M., Xing, Y., Chen, C. and Wang, Z. 2024a. Enhancing sugarcane's drought resilience: the influence of Streptomycetales and Rhizobiales. *Frontiers in Plant Science*, 15: 1471044.
- Chi, Y., You, Y., Wang, J., Chen, X., Chu, S., Wang, R. ve Zhou, P. 2022. Two plant growth-promoting bacterial *Bacillus* strains possess different mechanisms in affecting cadmium uptake and detoxification of *Solanum nigrum* L. *Chemosphere*, 305: 135488.
- Ciaramella, B. R., Corinzia, S. A., Cosentino, S. L. and Testa, G. 2022. Phytoremediation of heavy metal contaminated soils using safflower. *Agronomy*, 12(10): 2302
- Cohen, A., Hacham, Y., Welfe, Y., Khatib, S., Avice, J.-C., and Amir, R. 2020. Evidence of a significant role of glutathione reductase in the sulfur assimilation pathway. *The Plant Journal*, 102: 246–261.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, J. and Barka, E.A. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects”, *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9): 4951–4959.
- Costa-Santos, M., Mariz-Ponte, N., Dias, M.C., Moura, L., Marques, G., and Santos, C. 2021. Effect of *Bacillus* spp. and *Brevibacillus* sp. on the photosynthesis and redox status of *Solanum lycopersicum*. *Horticulturae*, 7: 24.
- Cruzado-Tafur, E., Orzoł, A., Gołębowski, A., Pomastowski, P., Cichorek, M., Olszewski, J., Walczak-Skierska, J., Buszewski, B., Szultka-Młyńska, M., and

- Głowacka, K. 2023. Metal tolerance and Cd phytoextraction ability in *Pisum sativum* grown in spiked nutrient solution. *Journal of Plant Research*, 136: 931–945.
- Çelik, J., Aksoy, A., and Leblebici, Z. 2018. Metal hyperaccumulating Brassicaceae from the ultramafic area of Yahyalı in Kayseri province, Turkey. *Ecological Research*, 33: 705–713.
- Çelikten, M. ve Bozkurt, İ. A. 2018. “Buğday kök bölgesinden izole edilen bakterilerin buğday gelişimine olan etkilerinin belirlenmesi”, *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 23(1), 33–48.
- Çulha-Erdal, Ş., Eyidoğan, F. ve Ekmekci, Y. 2021. Comparative physiological and proteomic analyses of cultivated and wild safflower response to drought stress and rewatering. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27: 281–295.
- Davoudi, M., Esmailpour, B., Gohari, G., Soltani Toolarood, A.A., Sheikhalipour, M., Fatemi, H. ve Farooq, M. 2023. Morphophysiological responses of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) to the nickel stress and inoculation with *Pseudomonas* strains”, *Acta Physiologiae Plantarum*, 45(1): 9.
- Dehury, B., Sarma, K., Sarmah, R., Sahu, J., Sahoo, S., Sahu, M., Sen, P., Modi, M.K., Sharma, G.D., and Choudhury, M.D. 2013. In silico analyses of superoxide dismutases (SODs) of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 22: 150–156.
- Deng, T., van der Ent, A., Tang, Y., Sterckeman, T., Echevarria, G., Morel, J.L. and Qiu, R.L. 2018. Nickel hyperaccumulation mechanisms: A review on the current state of knowledge. *Plant and Soil*, 423: 1–11.
- Dilshara, P., Abeysinghe, B., Premasiri, R., Dushyantha, N., Ratnayake, N., Senarath, S., Ratnayake, A.S., and Batapola, N. 2024. The role of nickel (Ni) as a critical metal in clean energy transition: Applications, global distribution and occurrences, production-demand and phytomining. *Journal of Asian Earth Sciences*, 259: 105912.
- Domka, A., Rozpadek, P., Ważny, R., Jędrzejczyk, R.J., Hubalewska-Mazgaj, M., Gonnelli, C., Benny, J., Martinelli, F., Puschenreiter, M., and Turnau, K. 2020. Transcriptome response of metal-tolerant and a non-metal-tolerant ecotypes of *Nocca goesingensis* to nickel excess. *Plants*, 9: 951.
- Drażkiewicz, M. and Baszyński, T. 2010. Interference of nickel with the photosynthetic apparatus of *Zea mays*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(5): 982–986.
- Durand, A., Piutti, S., Rue, M., Morel, J.L., Echevarria, G., and Benizri, E. 2016. Improving nickel phytoextraction by co-cropping hyperaccumulator plants inoculated by plant growth promoting rhizobacteria. *Plant and Soil*, 399: 179–192.
- Dushyantha, N., Weerawarnakula, S., Premasiri, R., Abeysinghe, B., Ratnayake, N., Batapola, N., and Ranasinghe, M. 2021. Potential ecological risk assessment of heavy metals (Cr, Ni, and Co) in serpentine soil at Ginigalpelessa in Sri Lanka. *Arabian Journal of Geosciences*, 14: 1255.
- Dworkin, M. and Foster, J. W. 1958. Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *Journal of Bacteriology*, 75(5): 592–603.

- Edel, K.H. and Kudla, J. 2016. Integration of calcium and ABA signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 33: 83–91.
- Elikara, A.U., Popescu, G.C., Demirel, S., Sümbül, A., Yaman, M., Demirel, F., Say, A., and Güneş, A. 2024. Effect of Rhizobacteria Application on Nutrient Content, Bioactive Compounds, Antioxidant Activity, Color Properties and Fruit Characteristics of Strawberry Cultivars. *Processes*, 12: 2242.
- Ellaiah, P., Kalyan, D., Rao, V.S. and Rao, B.V. 1996. Isolation and characterisation of bioactive actinomycetes from marine sediments. *Hindustan Antibiotics Bulletin*, 38(1–4): 48–52.
- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F., and Xie, Y. 2015. Heavy Metal Stress and Some Mechanisms of Plant Defense Response. *The Scientific World Journal*, 215: 756120.
- Etesami, H., and Glick, B.R. 2024. Bacterial indole-3-acetic acid: A key regulator for plant growth, plant-microbe interactions, and agricultural adaptive resilience. *Microbiological Research*, 281: 127602.
- Fanai, A., Bohia, B., Lalremruati, F., Lalhriatpuii, N., Lalrokimi, Lalmuanpuii, R., Singh, P.K., and Zothanpuia. 2024. Plant growth promoting bacteria (PGPB)-induced plant adaptations to stresses: an updated review. *PeerJ*, 12: 17882.
- Farrant, J. M. 2000. A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species. *Plant Ecology*, 151: 29–39.
- Fashola, M.O., Ngole-Jeme, V.M. and Babalola, O.O. 2016. Heavy metal pollution from gold mines: Environmental effects and bacterial strategies for resistance. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13: 1047.
- Fidalgo, F., Azenha, M., Silva, A.F., de Sousa, A., Santiago, A., Ferraz, P., and Teixeira, J. 2013. Copper-induced stress in *Solanum nigrum* L. and antioxidant defense system responses. *Food and Energy Security*, 2(1): 70–80.
- Fink, R.C., and Scandalios, J.G. 2002. Molecular Evolution and Structure–Function Relationships of the Superoxide Dismutase Gene Families in Angiosperms and Their Relationship to Other Eukaryotic and Prokaryotic Superoxide Dismutases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 399(1): 19–36.
- Gajewska, E. and Skłodowska, M. 2007. Effect of nickel on ROS content and antioxidative enzyme activities in wheat leaves. *BioMetals*, 20: 27–36.
- Gajewska, E., Wielanek, M., Bergier, K., and Skłodowska, M. 2009. Nickel-induced depression of nitrogen assimilation in wheat roots. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31: 1291–1300.
- García-Hernández, M., Murphy, A., and Taiz, L. 1998. Metallothioneins 1 and 2 have distinct but overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 116(3): 1101–1112.
- Ghaderian, S. M., Ghasemi, R. ve Hajhashemi, F. 2015. Interaction of nickel and manganese in uptake, translocation, and accumulation by the nickel-hyperaccumulator plant, *Alyssum bracteatum* (Brassicaceae). *Australian Journal of Botany*, 63: 47–55.

- Gill, M. 2014. Heavy metal stress in plants: A review. *International Journal of Advanced Research*, 2: 1043–1055.
- Gill, S.S., Anjum, N.A., Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, D.K., Ahmad, I., Pereira, E., and Tuteja, N. 2013. Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry*, 70: 204–212.
- Glick, B.R. 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, 2012: 963401.
- Glick, B.R. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169: 30–39.
- Goltsev, V. N., Kalaji, H. M., Paunov, M., Bába, W., Horaczek, T., Mojski, J., Kociel, H. ve Allakhverdiev, S. I. 2016. Variable chlorophyll fluorescence and its use for assessing physiological condition of plant photosynthetic apparatus. *Russian Journal of Plant Physiology*, 63: 869–893.
- González-Reguero, D., Robas-Mora, M., Alonso, M.R., Fernández-Pastrana, V.M., Probanza Lobo, A., and Jiménez Gómez, P.A. 2024. Induction of phytoextraction, phytoprotection and growth promotion activities in *Lupinus albus* under mercury abiotic stress conditions by *Peribacillus frigoritolerans* subsp. *mercuritolerans* subsp. nov. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 285: 117139
- Govarthanan, M., Mythili, R., Selvankumar, T., Kamala-Kannan, S., Rajasekar, A. and Chang, Y.C. 2016. Bioremediation of heavy metals using an endophytic bacterium *Paenibacillus* sp. RM isolated from the roots of *Tridax procumbens*. *Biotech*, 6(2): 1–7.
- Grennan, A.K. 2011. Metallothioneins, a Diverse Protein Family. *Plant Physiology*, 155(4): 1750–1751.
- Guerinot, M. L. 2000. The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465: 190–198.
- Guo, J., Xu, L., Su, Y., Wang, H., Gao, S., Xu, J., and Que, Y. 2013. ScMT2-1-3, a metallothionein gene of sugarcane, plays an important role in the regulation of heavy metal tolerance/accumulation. *BioMed Research International*, 213: 904769.
- Guo, K., Li, Z., Tian, H., Du, X., Liu, Z., Huang, H., Wang, P., Ye, Z., Zhang, X., and Tu, L. 2020. Cytosolic ascorbate peroxidases plays a critical role in photosynthesis by modulating reactive oxygen species level in stomatal guard cell. *Frontiers in Plant Science*, 11: 446.
- Haber, F. ve Weiss, J. 1934. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A – Mathematical and Physical Sciences*, 147(861): 332–351.
- Hashemi, S.S., Mirmohamadsadeghi, S. ve Karimi, K. 2020. Biorefinery development based on whole safflower plant. *Renewable Energy*, 152, 399–408.
- Hassan, M.U., Chattha, M.U., Khan, I., Chattha, M.B., Aamer, M., Nawaz, M., Ali, A., Khan, M.A.U., and Khan, T.A. 2019. Nickel toxicity in plants: reasons, toxic effects, tolerance mechanisms, and remediation possibilities—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 26: 12673–12688.

- Hazotte, C., Laubie, B., Pacault, S., Dufaud, O., and Simonnot, M. 2020. Evaluation of the performance of nickel hyperaccumulator plants as combustion fuel. *Biomass and Bioenergy*, 140: 105671.
- He, S., He, Z., Yang, X. ve Baligar, V.C. 2012. "Mechanisms of nickel uptake and hyperaccumulation by plants and implications for soil remediation", *Advances in Agronomy*, 117: 118–122.
- Heiss, S., Wachter, A., Bogs, J., Cobbett, C., and Rausch, T. 2003. Phytochelatin synthase (PCS) protein is induced in *Brassica juncea* leaves after prolonged Cd exposure. *Journal of Experimental Botany*, 54(389): 1833–1839.
- Huang, H., Zhao, Y., Fan, L., Jin, Q., Yang, G., and Xu, Z. 2020. Improvement of manganese phytoremediation by *Broussonetia papyrifera* with two plant growth promoting (PGP) *Bacillus* species. *Chemosphere*, 260: 127614.
- Hussain, S., Khaliq, A., Noor, M. A., Tanveer, M., Hussain, H. A., Hussain, S., Shah, T. ve Mehmood, T. 2020. Metal toxicity and nitrogen metabolism in plants: An overview. *Carbon and Nitrogen Cycling in Soil*, 221–248.
- Inouhe, M. 2005. Heavy metal tolerance in bryophytes: An overview. *Phytochemistry*, 66(13): 1387–1394.
- Islam, F., Yasmeen, T., Arif, M.S., Riaz, M., Shahzad, S.M., Imran, Q., and Ali, I. 2016. Combined ability of chromium (Cr) tolerant plant growth promoting bacteria (PGPB) and salicylic acid (SA) in attenuation of chromium stress in maize plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 108: 456–467.
- Jahan, M. S., Guo, S., Baloch, A. R., Sun, J., Shu, S., Wang, Y., Ahammed, G. J., Kabir, K. and Roy, R. 2020. Melatonin alleviates nickel phytotoxicity by improving photosynthesis, secondary metabolism and oxidative stress tolerance in tomato seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 197: 110593.
- Jalmi, S.K., Bhagat, P.K., Verma, D., Noryang, S., Tayyeba, S., Singh, K., Sharma, D., and Sinha, A.K. 2018. Traversing the links between heavy metal stress and plant signaling. *Frontiers in Plant Science*, 9: 12.
- Jan, R., Khan, M. A., Asaf, S., Lubna, Lee, I.-J. and Kim, K. M. 2019. Metal resistant endophytic bacteria reduces cadmium, nickel toxicity, and enhances expression of metal stress related genes with improved growth of *Oryza sativa* via regulating its antioxidant machinery and endogenous hormones. *Plants*, 8(10): 363.
- Jaskulak, M., Rorat, A., Grobelak, A., Chaabene, Z., Kacprzak, M., and Vandenbulcke, F. 2019. Bioaccumulation, antioxidative response, and metallothionein expression in *Lupinus luteus* L. exposed to heavy metals and silver nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research*, 26: 16040–16052.
- Kan, D., Tian, M., Ruan, Y., and Han, H. 2024. Phosphorus-solubilizing bacteria enhance cadmium immobilization and gene expression in wheat roots to reduce cadmium uptake. *Plants*, 13: 1989.
- Karimi, N. ve Ghasempour, H. R. 2019. Salicylic acid and jasmonic acid restrain nickel toxicity by ameliorating antioxidant defense system in shoots of metallicolous and non-metallicolous *Alyssum inflatum* populations. *Plant Physiology and Biochemistry*, 135: 450–459.

- Khalid, N., Hussain, M., Hameed, M. and Ahmad, R. 2017. Physiological, biochemical and defense system responses of *Parthenium hysterophorus* to vehicular exhaust pollution. *Pakistan Journal of Botany*, 49: 67–75.
- Kim, Y. O. ve Kang, H. 2018. Comparative expression analysis of genes encoding metallothioneins in response to heavy metals and abiotic stresses in rice (*Oryza sativa*) and *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 82: 1656–1665.
- Kohanova, J., Martinka, M., Vaculik, M., White, P. J., Hauser, M. T. and Lux, A. 2018. Root hair abundance impacts cadmium accumulation in *Arabidopsis thaliana* shoots. *Annals of Botany*, 122: 903–914.
- Kumar, H., Ishtiyag, S., Favas, P.J.C., Varun, M., and Paul, M.S. 2023. Effect of metal-resistant PGPB on the metal uptake, antioxidative defense, physiology, and growth of *Atriplex lentiformis* in soil contaminated with cadmium and nickel. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42: 3868–3887.
- Kumar, U., Kumar, I., Singh, P.K., Dwivedi, A., Singh, P., Mishra, S., Seth, C.S., and Sharma, R.K. 2025. Nickel contamination in terrestrial ecosystems: Insights into impacts, phytotoxicity mechanisms, and remediation technologies. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 263: 2.
- Kumar, V. and Dwivedi, S.K. 2021. A review on accessible techniques for removal of hexavalent chromium and divalent nickel from industrial wastewater: Recent research and future outlook. *Journal of Cleaner Production*, 295: 126229.
- Küpper, H. and Andresen, E. 2016. Mechanisms of metal toxicity in plants. *Metallomics*, 8: 269–285.
- Landi, M., Margaritopoulou, T., Papadakis, I.E., and Araniti, F. 2019. Boron toxicity in higher plants: an update. *Planta*, 250: 1011–1032.
- Leskova, A., Zvarík, M., Araya, T. ve Giehl, R.F.H. 2020. Nickel toxicity targets cell wall-related processes and PIN2-mediated auxin transport to inhibit root elongation and gravitropic responses in *Arabidopsis*, *Plant Cell Physiology*, 61: 519–535.
- Li, J., Hu, H.W., Ma, Y.B., Wang, J.T., Liu, Y.R. and He, J.Z. 2015. Long-term nickel exposure altered the bacterial community composition but not diversity in two contrasting agricultural soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 22: 10496–10505.
- Li, Z., and Ahammed, G.J. 2023. Plant stress response and adaptation via anthocyanins: A review. *Plant Stress*, 10: 100230.
- Li, Z., Huang, L., Chen, X., Liu, Q., Liu, Y., Liu, C., and Feng, Y. 2025. Contribution of plant growth-promoting endophytic bacteria from hyperaccumulator to non-host plant zinc nutrition and health. *International Journal of Phytoremediation*, 27(1): 23–35.
- Liang, C.G., Chen, L.P., Wang, Y., Liu, J., Xu, G.L. ve Tian, L. 2011. High temperature at grain-filling stage affects nitrogen metabolism enzyme activities in grains and grain nutritional quality in rice. *Rice Science*, 18: 210–216.
- Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148: 350–382.

- Liu, S., Pan, Y., Jin, X., Zhao, S., Xu, X., Chen, Y., Shen, Z., and Chen, C. 2024. A novel biochar-PGPB strategy for simultaneous soil remediation and safe vegetable production. *Environmental Pollution*, 356: 124254.
- Liu, W.X. 2008. Accumulation and translocation of toxic heavy metals in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) growing in agricultural soil of Zhengzhou, China. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82: 343–347.
- Liu, Z., He, X., Chen, W., Yuan, F., Yan, K., Tao, D. 2009. Accumulation and tolerance characteristics of cadmium in a potential hyperaccumulator-*Lonicera japonica* Thunb. *Journal of Hazardous Materials*, 169: 170-175.
- Long, H.H., Schmidt, D.D. and Baldwin, I.T. 2008. Native bacterial endophytes promote host growth in a species specific manner; phytohormone manipulations do not result in common growth responses. *PLoS One*, 3: 2702.
- Lubyanova, A.R., Allagulova, C.R. ve Lastochkina, O.V. 2023. The effects of seed pretreatment with endophytic bacteria *Bacillus subtilis* on the water balance of spring and winter wheat seedlings under short-time water deficit. *Plants*, 12(14): 2684.
- Ma, Y., Prasad, M.N.V., Rajkumar, M. and Freitas, H. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances*, 29: 248–258.
- Mao, X., Ahmad, B., Hussain, S., Azeem, F., Waseem, M., Hamoud, Y. A., and Yong, J. W. H. 2025. Microbial assisted alleviation of nickel toxicity in plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 289: 117669.
- Madaan, N., Mudgal, V., Mishra, S., Srivastava, A.K. and Singh, R.B. 2011. Studies on biochemical role of accumulation of heavy metals in safflower. *The Open Nutraceuticals Journal*, 4: 199–204.
- Mancinelli, A. L., Yang, C. P. H., Lindquist, P., Anderson, O. and Rabino, I. 1975. Photocontrol of anthocyanin synthesis: The action of streptomycin on the synthesis of chlorophyll and anthocyanin. *Plant Physiology*, 55: 251–257.
- Manoj, S.R., Karthik, C., Kadirvelu, K., Arulselvi, P.I., Shanmugasundaram, T., Bruno, B. and Rajkumar, M. 2020. Understanding the molecular mechanisms for the enhanced phytoremediation of heavy metals through plant growth promoting rhizobacteria: A review. *Journal of Environmental Management*, 254: 109779.
- McBride, M.B., Martinez, C.E., and Kim, B. 2016. Zn, Cd, S and trace metal bioaccumulation in willow (*Salix* spp.) cultivars grown hydroponically. *International Journal of Phytoremediation*, 18(12): 1178–1186.
- Meinzer, M., Ahmad, N., and Nielsen, B.L. 2023. Halophilic plant-associated bacteria with plant-growth-promoting potential. *Microorganisms*, 11: 2910.
- Meraklı, M. and Memon, A. 2020. Role of plant growth promoting bacteria (PGPR) in plant growth and development: Soil–plant relationship. *Turkish Journal of Agriculture – Food Science and Technology*, 8(12): 2590–2602.
- Mesa-Marín, J., Pérez-Romero, J.A., Redondo-Gómez, S., Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I.D. and Mateos-Naranjo, E. 2020. Impact of plant growth promoting bacteria on *Salicornia ramosissima* ecophysiology and heavy metal

- phytoremediation capacity in estuarine soils. *Frontiers in Microbiology*, 11: 553018.
- Mirecki, R.M. and Teramura, A.H. 1984. Effects of ultraviolet-B irradiance on soybean: The dependence of plant sensitivity on the photosynthetic photon flux density during and after leaf expansion. *Plant Physiology*, 74: 475–480.
- Muñoz-Torres, P., Huanca-Mamani, W., Cárdenas-Ninasivincha, S., Aguilar, Y., Quezada, A., and Bugueño, F. 2025. Plant growth-promoting and herbicidal bacteria as potential bio-based solutions for agriculture in desertic regions. *Plants*, 14: 9.
- Mustafa, A., Zulfiqar, U., Mumtaz, M.Z., Radziemska, M., Haider, F.U., Holatko, J., Hammershmiedt, T., Naveed, M., Ali, H., Kintl, A., Saeed, Q., Kucerik, J. and Brtnicky, M. 2023. Nickel (Ni) phytotoxicity and detoxification mechanisms: A review. *Chemosphere*, 328: 138574.
- Nahar, K., Rahman, M., Hasanuzzaman, M., Alam, M. M., Rahman, A., Suzuki, T. and Fujita, M. 2016. Physiological and biochemical mechanisms of spermine-induced cadmium stress tolerance in mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings. *Environmental Science and Pollution Research*, 23: 21206–21218.
- Nautiyal, C.S., Srivastava, S., Chauhan, P.S., Seem, K., Mishra, A., and Sopory, S.K. 2013. Plant growth-promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN13 modulates gene expression profile of leaf and rhizosphere community in rice during salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 66: 1–9.
- Navarro, G.V.D., Quirong, D.D., Maghanoy, G.A., and Cortes, A.D. 2023. Characterization and identification of rhizobacteria associated with Liberica and Robusta coffee rhizosphere. *Technology in Horticulture*, 3: 24.
- Naveed, M., Bukhari, S.S., Mustafa, A., Ditta, A., Alamri, S., El-Esawi, M.A., Rafique, M., Ashraf, S. ve Siddiqui, M.H. 2020. Mitigation of nickel toxicity and growth promotion in sesame through the application of a bacterial endophyte and zeolite in nickel contaminated soil. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(23): 8859.
- Nazir, F., Hussain, A. ve Fariduddin, Q. 2019. Interactive role of epibrassinolide and hydrogen peroxide in regulating stomatal physiology, root morphology, photosynthetic and growth traits in *Solanum lycopersicum* L. under nickel stress. *Environmental and Experimental Botany*, 162: 479–495.
- Nikodinovic, J., Barrow, K. D. and Chuck, J. A. 2003. High yield preparation of genomic DNA from *Streptomyces*. *Biotechniques*, 35(5): 932–936.
- Nishida, S., Tsuzuki, C., Kato, A., Aisu, A., Yoshida, J. ve Mizuno, T. 2011. AtIRT1, the primary iron uptake transporter in the root, mediates excess nickel accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, 52: 1433–1442.
- Noctor, G., De Paepe, R., and Foyer, C.H. 2007. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends in Plant Science*, 12(3): 125–134.
- Oukarroum, A., Madidi, S., Schansker, G. ve Strasser, R. J. 2007. 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, 438–446.
- Özcan, H., Sungur, A., Everest, T., Temel, E., Bozcu, M., Soylak, M. 2022. Serpantin Üzerinde Oluşmuş Topraklarda Kobalt, Krom ve Nikelin Jeokimyasal Fraksiyonlarının Belirlenmesi (Çanakkale- Ezine, Türkiye), *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 9(3): 509–517.
- Pagani, M.A., Tomas, M., Carrillo, J., Bofill, R., Capdevila, M., Atrian, S., and Andreo, C.S. 2012. The response of the different soybean metallothionein isoforms to cadmium intoxication. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 117: 306–315.
- Palansooriya, K.N., Shaheen, S.M., Chen, S.S., Tsang, D.C.W., Hashimoto, Y., Hou, D., Bolan, N.S., Rinklebe, J. and Ok, Y.S. 2020. Soil amendments for immobilization of potentially toxic elements in contaminated soils: A critical review. *Environment International*, 134: 105046.
- Panda, A., Fatnani, D. and Parida, A.K. 2025. Uptake, impact, adaptive mechanisms, and phytoremediation of heavy metals by plants: Role of transporters in heavy metal sequestration. *Plant Physiology and Biochemistry*, 221: 109578.
- Pandey, N. and Sharma, C. P. 2002. Effect of heavy metals Co^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} on growth and metabolism of cabbage. *Plant Science*, 163: 753–758.
- Pandey, V.P., and Dwivedi, U.N. 2011. Purification and characterization of peroxidase from *Leucaena leucocephala*, a tree legume. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68: 168–173.
- Parrotta, L., Guerriero, G., Sergeant, K., Cai, G., and Hausman, J.F. 2015. Target or barrier? The cell wall of early- and later-diverging plants vs cadmium toxicity: differences in the response mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 6: 133.
- Peela, S.U.J.A.T.H.A. and Porana, S.W.E.T.H.A.L.A.T.H.A. 2017. “Isolation and screening of novel *Streptomyces* from sediments of Bay of Bengal near Srikakulam coast”, *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 9(1): 40–44.
- Perez, A., Rossano, S., Trcera, N., Verney-Carron, A., Rommevaux, C., Fourdrin, C. ve Agnello, A.C. 2019. Direct and indirect impact of the bacterial strain *Pseudomonas aeruginosa* on the dissolution of synthetic Fe (III)- and Fe (II)-bearing basaltic glasses. *Chemical Geology*, 523: 9–18.
- Perez, E., Sulbaran, M., Ball, M.M. and Yarzabal, L.A. 2007. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(11): 2905–2914.
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., and Van Wees, S.C.M. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, 5(5): 308–316.
- Pinter, I.F., Salomon, M.V., Berli, F., Bottini, R. and Piccoli, P. 2017. Characterization of the As(III) tolerance conferred by plant growth promoting rhizobacteria to in vitro-grown grapevine. *Applied Soil Ecology*, 109: 60–68.
- Pishchik, V., Mirskaya, G., Chizhevskaya, E., Chebotar, V., and Chakrabarty, D. 2021. Nickel stress-tolerance in plant-bacterial associations. *PeerJ*, 9: e12230.

- Plekhanova, I.O., Zarubina, A.P. ve Plekhanov, S.E. 2017. Ecotoxicological assessment of nickel pollution of soil and water environments adjacent to soddy-podzolic soil. *Moscow University Soil Science Bulletin*, 72 (2): 71–77.
- Poria, V., Dębiec-Andrzejewska, K., Fiodor, A., Lyzohub, M., Ajijah, N., Singh, S. ve Pranaw, K. 2022. Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) integrated phytotechnology: A sustainable approach for remediation of marginal lands. *Frontiers in Plant Science*, 13: 999866.
- Pourghasemian, N., Landberg, T., Ehsanzadeh, P. and Greger, M. 2019. Different response to Cd stress in domesticated and wild safflower (*Carthamus* spp.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 171: 321–328.
- Priarone, S., Romeo, S., Di Piazza, S., Rosatto, S., Zotti, M., Mariotti, M. and Roccotiello, E. 2023. Effects of bacterial and fungal inocula on biomass, ecophysiology, and uptake of metals of *Alyssoides utriculata* (L.) Medik. *Plants*, 12(3): 554.
- Qin, G., Niu, Z., Yu, J., Li, Z., Ma, J., and Xiang, P. 2021. Soil heavy metal pollution and food safety in China: Effects, sources and removing technology. *Chemosphere*, 267: 129–205.
- Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M.N.V. and Freitas, H. 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology*, 28(3): 142–149.
- Rajput, V.D., Harish, Singh, R.K., Verma, K.K., Sharma, L., Quiroz-Figueroa, F.R., Meena, M., Gour, V.S., Minkina, T., Sushkova, S., and Mandzhieva, S. 2021. Recent developments in enzymatic antioxidant defence mechanism in plants with special reference to abiotic stress. *Biology*, 10: 267.
- Rao, K.V.M. and Sresty, T.V.S. 2000. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Science*, 157: 113–128.
- Rao, M.V., Hale, B.A. ve Ormrod, D.P. 1995. Amelioration of ozone-induced oxidative damage in wheat plants grown under high carbon dioxide (role of antioxidant enzymes). *Plant Physiology*, 109: 421–432.
- Rathaur, P., Ramteke, P.W. and Waseem, R.A.J.A. 2012. Isolation and characterization of nickel and cadmium tolerant plant growth promoting rhizobacteria from rhizosphere of *Withania somnifera*. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 6: 18.
- Redmann, R.E., Haraldson, J. and Gusta, L.V. 1986. Leakage of UV-absorbing substances as a measure of salt injury in leaf tissue of woody species. *Physiologia Plantarum*, 67: 87–91.
- Reeves, R.D. and Adıgüzel, N. 2004. Rare plants and nickel accumulators from Turkish serpentine soils, with special reference to *Centaurea* species. *Turkish Journal of Botany*, 28: 147–153.
- Reeves, R.D., van Der Ent, A., Echevarria, G., Isnard, S., and Baker, A. J. 2021. Global distribution and ecology of hyperaccumulator plants. *Agromining: farming for metals: extracting unconventional resources using plants*. 133-154.

- Ren, X.M., Guo, S.J., Tian, W., Chen, Y., Han, H., Chen, E., Li, B.L., Li, Y.Y. and Chen, Z.J. 2019. Effects of plant growth-promoting bacteria (PGPB) inoculation on the growth, antioxidant activity, Cu uptake, and bacterial community structure of rape (*Brassica napus* L.) grown in Cu-contaminated agricultural soil. *Frontiers in Microbiology*, 10: 1455.
- Ribeiro, A.T., de Oliveira, V.P., Junior, U.D.O.B., da Silva, B.R.S., Batista, B.L. and da Silva Lobato, A.K. 2020. 24-Epibrassinolide mitigates nickel toxicity in young *Eucalyptus urophylla* ST Blake plants: Nutritional, physiological, biochemical, anatomical and morphological responses. *Annals of Forest Science*, 77: 1–19.
- Rizwan, M., Mostofa, M. G., Ahmad, M. Z., Imtiaz, M., Mehmood, S., Adeel, M., Dai, Z., Li, Z., Aziz, O., Zhang, Y. and Tu, S. 2018. Nitric oxide induces rice tolerance to excessive nickel by regulating nickel uptake, reactive oxygen species detoxification and defense-related gene expression. *Chemosphere*, 191: 23–35.
- Rizwan, M., Usman, K., and Alsafran, M. 2024. Ecological impacts and potential hazards of nickel on soil microbes, plants, and human health. *Chemosphere*, 357: 142028.
- Rodríguez, H., and Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17: 319–339.
- Rossi, M., Borromeo, I., Capo, C., Glick, B.R., Del Gallo, M., Pietrini, F., and Forni, C. 2021. PGPB improve photosynthetic activity and tolerance to oxidative stress in *Brassica napus* grown on salinized soils. *Applied Sciences*, 11: 11442.
- Roy, B., Maitra, D., Sarkar, S., Podder, R., Das, T., Ghosh, J., and Mitra, A.K. 2023. Biofilm and metallothioneins: A dual approach to bioremediate the heavy metal menace. *Environmental Quality Management*, 33(4): 659–676.
- Saadani, O., Fatnassi, I.C., Chiboub, M., Abdelkrim, S., Barhoumi, F., Jebara, M. and Jebara, S.H. 2016. In situ phytostabilisation capacity of three legumes and their associated plant growth promoting bacteria (PGPBs) in mine tailings of northern Tunisia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 130: 263–269.
- Sachan, P. ve Lal, N. 2017. An overview of nickel (Ni^{2+}) essentiality, toxicity and tolerance strategies in plants. *Asian Journal of Biology*, 2: 1–15.
- Saharan, B. S. and Nehra, V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: A critical review. *Life Sciences and Medicine Research*, 21(1): 30.
- Saleem, M. H., Ali, S., Rehman, M., Hasanuzzaman, M., Rizwan, M., Irshad, S., Shafiq, F., Iqbal, M., Alharbi, B. M., Alnusaie, T. S. ve Qari, S. H. 2020. Jute: A potential candidate for phytoremediation of metals—A review. *Plants*, 9(2): 258.
- Sánchez, P., Castro-Cegri, A., Sierra, S., Garrido, D., Llamas, I., Sampedro, I., and Palma, F. 2023. The synergy of halotolerant PGPB and mauraan mitigates salt stress in tomato (*Solanum lycopersicum*) via osmoprotectants accumulation. *Physiologia Plantarum*, 175: e14111.
- Schmidt, S.B., Jensen, P.E. and Husted, S. 2016. Manganese deficiency in plants: The impact on photosystem-II. *Trends in Plant Science*, 21: 622–632.
- Schwyn, B. and Neilands, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores *Analytical Biochemistry*, 160(1): 47–56.

- Seregin, I.V. and Kozhevnikova, A.D. 2006. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(2): 257–277.
- Sessitsch, A., Coenye, T., Sturz, A., Vandamme, P., Barka, E.A., Salles, J., Van Elsas, J., Faure, D., Reiter, B. and Glick, B. 2005. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant beneficial properties. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55: 1187–1192.
- Shaffique, S., Hussain, S., Kang, S.-M., Imran, M., Kwon, E.-H., Khan, M.A., and Lee, I.-J. 2023. Recent progress on the microbial mitigation of heavy metal stress in soybean: overview and implications. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1188856.
- Shafiq, A., Munawar, M.E., Nadeem, M., Khan, A., Abbasi, G.H., Haq, M.A., Ayub, M.A., Iftikhar, I. ve Awais, M. 2024. Health risk assessment of bread wheat grown under cadmium and nickel stress and impact of silicic acid application on its growth, physiology, and metal uptake. *Environmental Science and Pollution Research*, 31: 55535–55548.
- Shah, A. A., Zafar, S., Usman, S., Javad, S., Aslam, M., Noreen, Z. and Ahmad, A. 2024. Zinc oxide nanoparticles and *Klebsiella* sp. SBP-8 alleviates chromium toxicity in *Brassica juncea* by regulation of antioxidant capacity, osmolyte production, nutritional content and reduction in chromium adsorption. *Plant Physiology and Biochemistry*, 210: 108624.
- Shahzad, B., Tanveer, M., Rehman, A., Cheema, S.A., Fahad, S., Rehman, S. and Sharma, A. 2018. Nickel; whether toxic or essential for plants and environment – a review. *Plant Physiology and Biochemistry*, 132: 641–651.
- Siddiqui, M. H., Al-Whaibi, M. H. and Basalah, M. O. 2011. Interactive effect of calcium and gibberellin on nickel tolerance in relation to antioxidant systems in *Triticum aestivum* L. *Protoplasma*, 248: 503–511.
- Sigurdson, G.T., Robbins, R.J., Collins, T.M., and Giusti, M.M. 2016. Evaluating the role of metal ions in the bathochromic and hyperchromic responses of cyanidin derivatives in acidic and alkaline pH. *Food Chemistry*, 208: 26–34.
- Singh, I., and Shah, K. 2014. Exogenous application of methyl jasmonate lowers the effect of cadmium-induced oxidative injury in rice seedlings. *Phytochemistry*, 108: 57–66.
- Sirhindi, G., Mir, M. A., Abd-Allah, E. F., Ahmad, P. and Gucel, S. 2016. Jasmonic acid modulates the physio-biochemical attributes, antioxidant enzyme activity, and gene expression in *Glycine max* under nickel toxicity. *Frontiers in Plant Science*, 7: 591.
- Smirnoff, N. 1993. Tansley Review No. 52. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 127: 27–58.
- Smirnoff, N., and Arnaud, D. 2019. Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist*, 221: 1197–1214.
- Sobczyk, M.K., Smith, J.A.C., Pollard, A.J., and Filatov, D.A. 2017. Evolution of nickel hyperaccumulation and serpentine adaptation in the *Alyssum serpyllifolium* species complex. *Heredity*, 118: 31–41.
- Soleymanifar, S., Ehsanpour, A. A., Ghasemi, R., and Schat, H. 2024. The effect of L-histidine on nickel translocation and the activities of antioxidant enzymes in

- hyperaccumulator (*Odontarrhena inflata*) and non-accumulator (*Aurinia saxatilis*) plants. *Plant and Soil*, 495(1): 411–428.
- Someya, N., Sato, Y., Yamaguchi, I., Hamamoto, H., Ichiman, Y., Akutsu, K., Sawada, H., and Tsuchiya, K. 2007. Alleviation of nickel toxicity in plants by a rhizobacterium strain is not dependent on its siderophore production. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 38(9–10): 1155–1162.
- Sousa, J.A.J., and Olivares, F.L. 2016. Plant growth promotion by streptomycetes: ecophysiology, mechanisms and applications. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3: 24.
- Souza, G.L.O.D., Nietsche, S., Xavier, A.A., Costa, M.R., Pereira, M.C.T., and Santos, M.A. 2016. Triple combinations with PGPB stimulate plant growth in micropropagated banana plantlets. *Applied Soil Ecology*, 103: 31–35.
- Srivastava, S., Chaudhry, V., Mishra, A., Chauhan, P.S., Rehman, A., Yadav, A., Tuteja, N., and Nautiyal, C.S. 2012. Gene expression profiling through microarray analysis in *Arabidopsis thaliana* colonized by *Pseudomonas putida* MTCC5279, a plant growth promoting rhizobacterium. *Plant Signaling & Behavior*, 7(2): 235–245.
- Steinhorst, L., and Kudla, J. 2014. Signaling in cells and organisms-calcium holds the line. *Current Opinion in Plant Biology*, 22: 14–21.
- Stephenie, S., Chang, Y.P., Gnanasekaran, A., Mohd Esa, N., and Gnanaraj, C. 2020. An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement. *Journal of Functional Foods*, 68: 103917.
- Stirbet, A., Lazár, D., Kromdijk, J. and Govindjee. 2018. Chlorophyll a fluorescence induction: Can just a one-second measurement be used to quantify abiotic stress responses?. *Photosynthetica*, 56: 86–104.
- Strasser, R. J., Srivastava, A. and Govindjee. 1995. Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochemistry and Photobiology*, 61: 32–42.
- Strasser, R. J., Srivastava, A. and Tsimilli-Michael, M. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*, 445–483, Taylor and Francis, London.
- Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M., Srivastava, A. 2004. Analysis of the Chlorophyll a Fluorescence Transient, *Chlorophyll a Fluorescence*, Govindjee, P.C.G. (eds), Springer, Netherlands, 321–362.
- Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M., Qiang, S. and Goltsev, V. 2010. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *BBA - Bioenergetics*, 1797: 1313–1326.
- Sumalan, R.L., Nescu, V., Berbecea, A., Sumalan, R.M., Crisan, M., Negrea, P., and Ciulca, S. 2023. The impact of heavy metal accumulation on some physiological parameters in *Silphium perfoliatum* L. plants grown in hydroponic systems. *Plants*, 12: 1718.

- Świąteczak, J., Kalwasińska, A., and Brzezińska, M.S. 2024. Plant growth–promoting rhizobacteria: *Peribacillus frigoritolerans* 2RO30 and *Pseudomonas sivasensis* 2RO45 for their effect on canola growth under controlled as well as natural conditions. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1233237.
- Swoczyna, T., Kalaji, H.M., Bussotti, F., Mojski, J., and Pollastrini, M. 2022. Environmental stress—what can we learn from chlorophyll a fluorescence analysis in woody plants? A review. *Frontiers in Plant Science*, 13: 1048582.
- Syn, C. K. C. ve Swarup, S. 2000. A scalable protocol for the isolation of large-sized genomic DNA within an hour from several bacteria. *Analytical Biochemistry*, 278(1), 86–90.
- Tahkokorpi, M., Kortenien, A., Taulavuori, E., Roitto, M., Laine, K., Huttunen, S., and Taulavuori, K. 2010. Trace amounts of nickel in belowground rhizomes of *Vaccinium myrtillus* L. decrease anthocyanin concentrations in aerial shoots without water stress. *Environmental and Experimental Botany*, 69: 338–342.
- Tak, H.I. 2015. Modulation of growth, antioxidant system in seedling of mustard under different levels of nickel in adaptive response to metal resistant bacteria. *Frontiers in Biology*, 10(3): 272–278.
- Tamreihao, K., Ningthoujam, D.S., Nimaichand, S., Singh, L.S., Reena, P., Singh, S.H., and Nongthomba, U. 2016. Biocontrol and plant growth promoting activities of a *Streptomyces corchorusii* strain UCR3-16 and preparation of powder formulation for application as biofertilizer agents for rice plant. *Microbiological Research*, 192: 260–270.
- Therriault, G., Michael, P. and Nkongolo, K. 2016. Comprehensive transcriptome analysis of response to nickel stress in white birch (*Betula papyrifera*). *Plos One*, 11: 1–21.
- Tivendale, N.D., and Millar, A.H. 2022. How is auxin linked with cellular energy pathways to promote growth? *New Phytologist*, 233: 2397–2404.
- Tiwari, S., Lata, C., Chauhan, P.S., and Nautiyal, C.S. 2016. *Pseudomonas putida* attunes morphophysiological, biochemical and molecular responses in *Cicer arietinum* L. during drought stress and recovery. *Plant Physiology and Biochemistry*, 99: 108–117.
- Trivedi, D.K., Gill, S.S., Yadav, S., and Tuteja, N. 2013. Genome-wide analysis of glutathione reductase (GR) genes from rice and Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior*, 8(2): e23021.
- Tsimilli-Michael, M., Strasser, R. J. 2008. 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.
- Vamerali, T., Bandiera, M. ve Mosca, G. 2010. Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 8: 1–17.
- Vischetti, C., Marini, E., Casucci, C., and De Bernardi, A. 2022. Nickel in the environment: Bioremediation techniques for soils with low or moderate contamination in European Union. *Environments*, 9: 133.

- Vishnupradeep, R., Bruno, L.B., Taj, Z., Karthik, C., Challabathula, D., Tripti, A., Kumar, A., Freitas, H., and Rajkumar, M. 2022. Plant growth promoting bacteria improve growth and phytostabilization potential of *Zea mays* under chromium and drought stress by altering photosynthetic and antioxidant responses. *Environmental Technology & Innovation*, 25: 102154.
- Vithanage, M., Kumarathilaka, P., Oze, C., Karunatilake, S., Seneviratne, M., Hseu, Z.Y., Gunarathne, V., Dassanayake, M., Ok, Y.S., and Rinklebe, J. 2019. Occurrence and cycling of trace elements in ultramafic soils and their impacts on human health: A critical review. *Environment International*, 131: 104974.
- Wang, Q., Xu, S., Wu, Z., Huang, L., Yang, X., and Feng, Y. 2025. The endophytic bacterium *Sphingomonas* sp. facilitated photosynthetic response to cadmium stress in *Brassica juncea* L. *Preprint*, 1.
- Wang, S. Y., Jiao, H. J. ve Faust, M. 1991. Changes in ascorbate, glutathione, and related enzyme activities during thidiazuron-induced bud break of apple. *Physiologia Plantarum*, 82: 231–236.
- Wang, X., Xia, K., Yang, X. ve Tang, C. 2019. Growth strategy of microbes on mixed carbon sources. *Nature Communications*, 10: 1279.
- Wiszniewska, A., Muszyńska, E., Hanus-Fajerska, E., Dziurka, K. ve Dziurka, M. 2018. “Evaluation of the protective role of exogenous growth regulators against Ni toxicity in woody shrub *Daphne jasminea*”, *Planta*, 248, 1365–1381.
- Wu, F., Shi, Q., Wang, X.J., Sun, Z.-T., Wang, W., Li, X., Guo, L.Y., and Bai, J.G. 2019. *Streptomyces canus* GLY-P2 degrades ferulic and *p*-hydroxybenzoic acids in soil and affects cucumber antioxidant enzyme activity and rhizosphere bacterial community. *Plant and Soil*, 436: 71–89.
- Wu, Y., Ma, L., Liu, Q., Sikder, M.M., Vestergård, M., Zhou, K., Wang, Q., Yang, X., and Feng, Y. 2020. *Pseudomonas fluorescens* promote photosynthesis, carbon fixation and cadmium phytoremediation of hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *Science of the Total Environment*, 726: 138554.
- Wudick, M. M., Li, X., Valentini, V., Geldner, N., Chory, J., Lin, J., Maurel, C. ve Luu, D. T. 2015. Subcellular redistribution of root aquaporins induced by hydrogen peroxide. *Molecular Plant*, 8(7): 1103–1114.
- Yang, J., and Pan, X. 2013. Root exudates from sunflower (*Helianthus annuus* L.) show a strong adsorption ability toward Cd(II). *Journal of Plant Interactions*, 8(3): 263–270.
- Yang, Z., Yang, F., Liu, J.L., Wu, H.T., Yang, H., Shi, Y., Liu, J., Zhang, Y.F., Luo, Y.R. ve Chen, K.M. 2022. Heavy metal transporters: Functional mechanisms, regulation, and application in phytoremediation. *Science of the Total Environment*, 809: 151099.
- Zagorchev, L., Seal, C.E., Kranner, I., and Odjakova, M. 2013. A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 7405–7432.

- Zaid, A., Mohammad, F., Wani, S. H. ve Siddique, K. M. 2019. Salicylic acid enhances nickel stress tolerance by up-regulating antioxidant defense and glyoxalase systems in mustard plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 180: 575–587.
- Zakaria, Z., Zulkafflee, N.S., Redzuan, N.A.M., Selamat, J., Ismail, M.R., Praveena, S.M., Tóth, G., and Abdull Razis, A.F. 2021. Understanding potential heavy metal contamination, absorption, translocation and accumulation in rice and human health risks. *Plants*, 10: 1070.
- Zang, Q., Feng, Y.X., Tian, P., Lin, Y.J., and Yu, X.Z. 2022. Proline-mediated regulation on jasmonate signals repressed anthocyanin accumulation through the MYB-bHLH-WDR complex in rice under chromium exposure. *Frontiers in Plant Science*, 13: 953398.
- Zeng, G., Wan, J., Huang, D., Hu, L., Huang, C., Cheng, M., Xue, W., Gong, X., Wang, R. ve Jiang, D. 2017. Precipitation, adsorption and rhizosphere effect: The mechanisms for phosphate-induced Pb immobilization in soils – A review. *Journal of Hazardous Materials*, 339: 354–367.
- Zhang, X., Laubie, B., Houzelot, V., Plasari, E., Echevarria, G. and Simonnot, M.-O. 2016. Increasing purity of ammonium nickel sulfate hexahydrate and production sustainability in a nickel phytomining process. *Chemical Engineering Research and Design*, 106: 26–32.
- Zhou, Y., Hu, L., Wu, H., Jiang, L., and Liu, S. 2017. Genome-wide identification and transcriptional expression analysis of cucumber superoxide dismutase (SOD) family in response to various abiotic stresses. *International Journal of Genomics*, 2017: 7243973.
- Zuluaga, D.L., Gonzali, S., Loreti, E., Pucciariello, C., Degl’Innocenti, E., Guidi, L., Alpi, A., and Perata, P. 2008. *Arabidopsis thaliana* MYB75/PAP1 transcription factor induces anthocyanin production in transgenic tomato plants. *Functional Plant Biology*, 35: 606–618.

7. EKLER

Çizelge 7.1. JIP-testte kullanılan bazı terimlerin, tanımlamaların ve formüllerin özeti (Strasser vd. 2000; 2004; Tsimilli-Michael vd. 2008; Stirbet vd. 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_I/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	
ABS/RC	Her bir reaksiyon merkezi başına enerji akışları
	$Mo \cdot (1/V_J) \cdot (1/\phi_{Po})$, $t = 0$ '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
DIo/RC	$(ABS/RC) - (TRo/RC)$, Fotokimya dışında kaybedilen enerji
Fenomenolojik akışlar	
ABS/CSO $\approx F_o$	Ölçüm yapılan yaprak alanı bazında enerji akışları
	$t = 0$ '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
DIo/CSO	$(ABS/CSO) - (TRo/CSO)$, Bir PSII'de fotokimya dışında kaybedilen enerji
RC/CSO	$\phi_{Po} \cdot (V_J/Mo) \cdot Fo$, $t = t_{F_M}$ '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

ÖZGEÇMİŞ

Uğurcan BARAN

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora	Akdeniz Üniversitesi
2019-2025	Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Antalya
Yüksek Lisans	Hacettepe Üniversitesi
2016-2018	Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Programı, Botanik Anabilim Dalı, Ankara
Lisans	Hacettepe Üniversitesi
2011-2015	Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi
2018-devam ediyor	Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Botanik Anabilim Dalı, Antalya

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. **Baran, U.** and Ekmekçi, Y. 2022. Physiological, photochemical, and antioxidant responses of wild and cultivated *Carthamus* species exposed to nickel toxicity and evaluation of their usage potential in phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(3): 4446–4460.

Diğer Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Gülcemal, C., **Baran, U.**, Vardar, M.C., and Aksoy, A. 2022. *Lomelosia caucasica* (M.Bieb.) Greuter & Burdet ve *Lomelosia sulphurea* (Boiss. & A.Huet)

Greuter & Burdet (*Caprifoliaceae*) türlerinin karşılaştırmalı anatomisi. *Bağbahçe Bilim Dergisi*, 9(3): 46–56.

2. Aykut, A., **Baran, U.**, Çelik, J., and Aksoy, A. 2022. Türkiye’de yayılış gösteren *Lomelosia argentea* ve *Lomelosia polykratis* (*Caprifoliaceae*) türlerinin anatomik karşılaştırılması. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 11(2): 31–39.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. Eroğlu, B., **Baran, U.**, Aksoy, A., Ekmekçi, Y. and Tefon-Öztürk, B.E. 2025. *Centaurea ensiformis*’ten izole edilen endofitik bakterilerin bitki gelişimini teşvik etme (PGP) özellikleri. *II. International Aegean Scientific Studies Congress*, 15–16 Mart 2025, İzmir, Türkiye.
2. **Baran, U.** and Ekmekçi, Y. 2019. Aspir genotiplerinin nikel fitoremediasyonunda kullanılma potansiyelleri; nikel akümüasyonu, translokasyonu ve antioksidant enzim yanıtları. *9th International Symposium on Ecology and Environmental Problems*, 1–3 Kasım, Antalya, Türkiye, ss. 41–42.
3. **Baran, U.** and Ekmekçi, Y. 2018. Yerel (*Carthamus tinctorius* L.) ve yabancı (*Carthamus oxyacantha* M.Bieb.) aspir genotiplerinin artan nikel düzeylerindeki büyüme ve fotokimyasal yanıtları. *UBFS-2018 III. Uluslararası Katılımlı Bitki Fizyolojisi Sempozyumu*, 26–29 Eylül, Çanakkale, Türkiye, ss. 21.