

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KURŞUN VE BAKIR UYGULAMASININ *Cucurbita moschata* Duch.'NİN BAZI
EKOFİZYOLOJİK PARAMETRELERİ VE ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ
ÜZERİNE ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KÜBRA SEVGİ

TEZ DANIŐMANI
DOÇ. DR. SEMA LEBLEBİCİ

BİLECİK, 2023

10564615

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KURŞUN VE BAKIR UYGULAMASININ *Cucurbita moschata* Duch.'NİN BAZI
EKOFİZYOLOJİK PARAMETRELERİ VE ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ
ÜZERİNE ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KÜBRA SEVGİ

TEZ DANIŐMANI
DOÇ. DR. SEMA LEBLEBİCİ

BİLECİK, 2023

10564615

BEYAN

“Kurşun ve Bakır Uygulamasının *Cucurbita moschata* Duch.’nın Bazı Ekofizyolojik Parametreleri ve Antioksidan Savunma Sistemi Üzerine Etkileri” adlı yüksek lisans tezimin proje hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel araştırma ve etik kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını, aksinin tespit edileceği muhtemel durumlarda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Bu çalışmanın, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), TÜBİTAK veya benzeri kuruluşlarca desteklenmesi durumunda; projenin ve destekleyen kurumun adı proje numarası ile birlikte, ETİK KURUL onayı alınması durumunda ise ETİK KURUL tarih karar ve sayı bilgilerinin beyan edilmesi gerekmektedir.			
DESTEK ALINMIŞTIR		DESTEK ALINMAMIŞTIR	X
Destek alındı ise;			
Destekleyen kurum;			
Desteğin Türü		Proje Numarası	
1- BAP (Bilimsel Araştırma Projesi)			
2- TÜBİTAK			
Diğer;.....			
ETİK KURUL onayı var ise;			
ETİK KURUL karar tarih/sayı:	/.....	

Kübra SEVGİ

.../.../2023

İmza

ÖN SÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü bilgi ve tecrübesinden faydalandığım, ilgi ve desteğini daima hissettiren, çalışmalarım da beni teşvik ederek yol gösteren değerli danışman hocam Doç. Dr. Sema LEBLEBİCİ'ye,

Laboratuvar çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimlerini paylaşan Fadime DONBALOĞLU BOZCA'ya, Öğr. Gör. Gülçin ÇETİN KILIÇASLAN'a ve Arş. Gör. Fırat Yavuz ÖZTÜRK'e,

Hayatımın her anında maddi ve manevi hiçbir desteklerini benden esirgemeyen, destek ve sevgilerini her daim hissettiğim, benim bugünlere gelmem için büyük emek harcayan sevgili annem Zeynep ve babam Hasan SEVGİ'ye,

Hayatımın geri kalanında olduğu gibi tez çalışmam boyunca da her daim yanımda olarak beni destekleyen, laboratuvar ve sınıf arkadaşım, aynı zamanda en yakın arkadaşım olan sevgili ablam Büşra SEVGİ'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

KURŞUN VE BAKIR UYGULAMASININ *Cucurbita moschata* Duch.'NİN BAZI EKOFİZYOLOJİK PARAMETRELERİ VE ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Jeolojik etmenler, antropojenik faaliyetler, madencilik ve tarımsal uygulamalar tüm dünyada önemli bir ekolojik bir sorun haline gelen ağır metal kirliliğine sebep olmaktadır. Sesil doğaları gereği bu abiyotik stresten en fazla bitkiler etkilenmektedir. Ağır metal stresine maruz kalan bitkilerin ürünlerinde kalite kaybı ve verimliliklerinde azalma görülmektedir. Bu nedenle bitkiler, ağır metallere kontamine olmuş topraklarda yaşayabilmek için ekolojik, fizyolojik ve moleküler düzeyde çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu çalışmada, iki farklı konsantrasyonda kurşun (25 mM ve 50 mM) ve bakır (50 mM ve 100 mM) uygulamalarının bal kabağı bitkisi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Kurşun ve bakıra maruz bırakılan bal kabağı örneklerinde kök ve gövde uzunluğu, kök ve gövde yaş-kuru ağırlığı, kök ve gövde biyokütlesi, kurşun ve bakır tolerans indeksi, klorofil *a*, *b* ve toplam klorofil miktarı, lipid peroksidasyonu, toplam protein miktarı, SOD, CAT, APX enzim aktiviteleri ve bu enzimlerin gen ekspresyon seviyelerindeki değişimler belirlenmiştir. Sonuç olarak, kurşun ve bakır stresinin bal kabağında gövdeye ait ekolojik parametreleri olumlu, köke ait ekolojik parametreleri ise negatif şekilde etkilediği belirlenmiştir. Her iki metal uygulamasının da klorofil *a*, *b* ve toplam klorofil miktarlarını artırdığı ancak sadece yüksek konsantrasyonlarda metal uygulamalarının (50 mM Pb ve 100 mM Cu) MDA içeriğini artırdığı tespit edilmiştir. Kurşun ve bakır uygulanan tüm deney gruplarında SOD ve CAT enzimlerinin aktivitelerinin ve gen ifadelerinin artış gösterdiği, APX aktivitesinin ve gen ifadesinin ise 50 mM Pb ve 100 mM Cu konsantrasyonlarında arttığı tespit edilmiştir. Elde edilen ekolojik, fizyolojik ve moleküler parametreler incelendiğinde bal kabağı bitkisinin yüksek bir antioksidan savunma gücüne sahip olduğu, uygulanan kurşun ve bakır konsantrasyonlarına ise oldukça yüksek bir tolerans gösterdiği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Ağır Metal Stresi, *Cucurbita moschata* Duch., Ekolojik Parametreler, Antioksidan Enzim, Gen Ekspresyonu

ABSTRACT

EFFECTS OF LEAD AND COPPER APPLICATION ON SOME ECOPHYSIOLOGICAL PARAMETERS AND ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEM OF *Cucurbita moschata* Duch.

Geological factors, anthropogenic activities, mining and agricultural practices cause heavy metal pollution, which has become an important ecological problem all over the world. Due to their sessile nature, plants are the most affected by this abiotic stress. Plants exposed to heavy metal stress suffer from loss of quality in products and decrease in productivity. For this reason, plants have developed various mechanisms at the ecological, physiological and molecular level to survive in soils contaminated with heavy metals. In this study, the effects of two different concentrations of lead (25 mM and 50 mM) and copper (50 mM and 100 mM) on pumpkin plants were investigated. Root and stem length, root and stem fresh-dry weight, root and stem biomass, lead and copper tolerance index, chlorophyll *a*, *b* and total chlorophyll amount, lipid peroxidation, total protein amount, SOD, CAT, APX enzyme activities and changes in gene expression levels of these enzymes were determined in pumpkin samples exposed to lead and copper. As a result, it was found out that lead and copper stress had a positive effect on the ecological parameters of the stem in pumpkin, and negatively affected the ecological parameters of the root. It was observed that both metal applications increased chlorophyll *a*, *b* and total chlorophyll amounts, but only high concentrations of metal applications (50 mM Pb and 100 mM Cu) increased the MDA content. It was determined that the activities and gene expressions of SOD and CAT enzymes increased in all experimental groups treated with lead and copper, while APX activity and gene expression increased at 50 mM Pb and 100 mM Cu concentrations. According to the obtained ecological, physiological and molecular parameters, it has been revealed that the pumpkin plant has a high antioxidant defense capacity and shows a very high tolerance to the applied lead and copper concentrations.

Keywords: Heavy Metal Stress, *Cucurbita moschata* Duch., Ecological Parameters, Antioxidant Enzyme, Gene Expression

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖN SÖZ.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
GRAFİKLER LİSTESİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Bal Kabağı Bitkisinin Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları	1
1.2. Bitkilerde Abiyotik Stres.....	2
1.2.1. Bitkilerde Ağır Metal Stresi	5
1.2.1.1. Kurşun Stresi	11
1.2.1.2. Bakır Stresi	12
1.3. Antioksidan Savunma Sistemi	13
1.3.1. Lipid Peroksidasyonu	13
1.3.2. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri (ROS).....	15
1.3.3. Bazı Enzimatik Antioksidan Savunma Sistemi Bileşenleri	18
1.3.3.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	18
1.3.3.2. Katalaz (CAT)	19
1.3.3.3. Askorbat Peroksidaz (APX)	20
1.4. Hiperakümülatör Bitkiler ve Fitoremediasyon	21
1.5. Literatür Özeti	24
2. MATERYAL METOD	29
2.1. Bitki Örneklerinin Yetiştirilmesi, Kurşun ve Bakır Stresi Uygulamaları	29
2.2. Bitkilerin Ekolojik Ölçümlerinin Belirlenmesi	29
2.3. Klorofil İçeriğinin Belirlenmesi.....	30
2.4. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi İçin Yapraklardan Protein Ekstraksiyonu	30
2.5. Lipid Peroksidasyonunun Belirlenmesi.....	30
2.6. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	31

2.6.1. Toplam Protein İçeriğinin Belirlenmesi.....	31
2.6.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Belirlenmesi.....	31
2.6.3. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Belirlenmesi.....	32
2.6.4. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesinin Belirlenmesi.....	32
2.7. Antioksidan Enzimlere Ait Gen İfadelerinin Belirlenmesi.....	33
2.7.1. Total RNA İzolasyonu	33
2.7.2. Total RNA Miktarının Belirlenmesi.....	34
2.7.3. cDNA Sentezi.....	34
2.7.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İçin Primer Seçimi	34
2.7.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR.....	35
2.8. İstatiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi.....	36
3. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER	37
3.1. Sonuçlar.....	37
3.1.1. Bitkilerin Ekolojik Ölçümlerinin Belirlenmesi	37
3.1.2. Klorofil Miktarlarının Belirlenmesi	44
3.1.3. Lipid Peroksidasyonunun Belirlenmesi	46
3.1.4. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	47
3.1.4.1. Toplam Protein İçeriğinin Belirlenmesi	47
3.1.4.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Belirlenmesi	48
3.1.4.3. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Belirlenmesi	49
3.1.4.4. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesinin Belirlenmesi.....	50
3.1.5. Antioksidan Enzimlere Ait Gen İfadelerinin Belirlenmesi	51
3.1.5.1. Total RNA Miktarının Belirlenmesi.....	51
3.1.5.2. Bal Kabağı Yapraklarında <i>SOD</i> mRNA Seviyesindeki Değişimin Belirlenmesi.....	52
3.1.5.3. Bal Kabağı Yapraklarında <i>CAT</i> mRNA Seviyesindeki Değişimin Belirlenmesi.....	53
3.1.5.4. Bal Kabağı Yapraklarında <i>APX</i> mRNA Seviyesindeki Değişimin Belirlenmesi.....	54
3.2. Tartışma	55
3.2.1. Bal Kabağı Bitkisinde Kurşun ve Bakır Uygulamasının Ekolojik Etkileri.....	56

3.2.2. Bal Kabağı Bitkisinde Kurşun ve Bakır Uygulamasının Klorofil Miktarları Üzerine Etkileri	62
3.2.3. Bal Kabağı Bitkisinde Kurşun ve Bakır Uygulamasının Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkileri	63
3.2.4. Bal Kabağı Bitkisinde Kurşun ve Bakır Uygulamasının Toplam Protein İçeriği Üzerine Etkileri	65
3.2.5. Bal Kabağı Bitkisinde Kurşun ve Bakır Uygulamasının Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri.....	66
3.2.6. Bal Kabağı Bitkisinde Kurşun ve Bakır Uygulamasının <i>SOD</i> , <i>CAT</i> ve <i>APX</i> Gen İfadeleri Üzerine Etkileri	69
3.3. Öneriler.....	71
KAYNAKÇA	74
EKLER.....	93

TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1.1. Biyotik ve abiyotik stres faktörleri.....	3
Tablo 2.1. qPZR için kullanılan primerler ve dizileri.....	35
Tablo 2.2. Kantitatif gerçek zamanlı PZR bileşenleri ve eklenen miktarlar	35
Tablo 2.3. Kantitatif gerçek zamanlı PZR sıcaklık döngüsü	36

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1.1. Bal kabağı yaprağı, çiçeğı ve meyvesi.....	1
Şekil 1.2. Abiyotik strese maruz kalan bitkilerde stres cevabı	4
Şekil 1.3. Bitkilerde abiyotik stres cevabı.....	5
Şekil 1.4. Bitkilerde ağır metal toksisitesinin etkileri.....	7
Şekil 1.5. Ağır metal stresi altında bitkilerde kalsiyum bağımlı sinyal yolağıının etkinleşmesi	9
Şekil 1.6. Bitkilerde ağır metal stresi altında MAPK kaskadının aktifleşmesi.....	10
Şekil 1.7. Lipid peroksidasyonunun genel aşamaları.....	14
Şekil 1.8. Atmosferik oksijenden farklı ROS'ların oluşumu	16
Şekil 1.9. Bitkilerde oksidatif stresin etkileri.....	17
Şekil 1.10. Bitkilerdeki antioksidan çeşitleri ve antioksidanların ROS detoksifikasyon mekanizmaları	18
Şekil 1.11. Fitoremediasyon teknikleri	22
Şekil 2.1. Ağır metal uygulanmadan önce (solda) ve 7. uygulamanın ardından (sağda) saksıların genel görünümü	29
Şekil 3.1. Kurşun ve bakır stresine maruz bırakılan örneklerin 7. uygulama ardından saksı görüntüleri	37
Şekil 3.2. Bal kabağı yapraklarına ait RNA'ların agaroz jel görüntüsü.....	52

GRAFİKLER LİSTESİ

Sayfa No

Grafik 3.1. Kurşun uygulanan bal kabağı bitkisine ait gövde ve kök uzunlukları.....	38
Grafik 3.2. Bakır uygulanan bal kabağı bitkisine ait gövde ve kök uzunlukları.....	39
Grafik 3.3. Kurşun uygulanan bal kabağı bitkisine ait kök yaş ve kuru ağırlıkları	40
Grafik 3.4. Bakır uygulanan bal kabağı bitkisine ait kök yaş ve kuru ağırlıkları	40
Grafik 3.5. Kurşun uygulanan bal kabağı bitkisine ait gövde yaş ve kuru ağırlıkları.....	41
Grafik 3.6. Bakır uygulanan bal kabağı bitkisine ait gövde yaş ve kuru ağırlıkları.....	42
Grafik 3.7. Bal kabağı bitkisinde kurşun uygulamasının gövde ve kök biyokütlesi üzerine etkisi	43
Grafik 3.8. Bal kabağı bitkisinde bakır uygulamasının gövde ve kök biyokütlesi üzerine etkisi	43
Grafik 3.9. a) Kurşun uygulanan b) bakır uygulanan bal kabağı bitkisinde tolerans indeksleri	44
Grafik 3.10. Kurşun uygulanan bal kabağı bitkisinde klorofil miktarları.....	45
Grafik 3.11. Bakır uygulanan bal kabağı bitkisinde klorofil miktarları.....	46
Grafik 3.12. a) Kurşun uygulanan b) bakır uygulanan bal kabağı bitkisinde MDA içeriği ...	47
Grafik 3.13. a) Kurşun uygulanan b) bakır uygulanan bal kabağı bitkisinde toplam protein miktarı	48
Grafik 3.14. a) Kurşun uygulanan b) bakır uygulanan bal kabağı bitkisinin yaprak örneğindeki SOD aktivitesi	49
Grafik 3.15. a) Kurşun uygulanan b) bakır uygulanan bal kabağı bitkisinin yaprak örneğindeki CAT aktivitesi	50
Grafik 3.16. a) Kurşun uygulanan b) bakır uygulanan bal kabağı bitkisinin yaprak örneğindeki APX aktivitesi	51
Grafik 3.17. a) Kurşun uygulanan b) bakır uygulanan bal kabağı bitkisinin yaprak örneğindeki <i>SOD-Mn</i> mRNA seviyesi	53
Grafik 3.18. a) Kurşun uygulanan b) bakır uygulanan bal kabağı bitkisinin yaprak örneğindeki <i>CAT</i> mRNA seviyesi	54
Grafik 3.19. a) Kurşun uygulanan b) bakır uygulanan bal kabağı bitkisinin yaprak örneğindeki <i>APX</i> mRNA seviyesi	55

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

%: Yüzde

α : Alfa

β : Beta

γ : Gamma

δ : Delta

ϵ : Ekstinksiyon katsayısı

μ l : Mikrolitre

μ g : Mikrogram

μ M : Mikromolar

°C : Santigrat Derece

Al : Alüminyum

APX : Askorbat Peroksidaz

As: Arsenik

AsA : Askorbat

AsA-GSH : Askorbat-Glutatyon

BSA : Sığır Serum Albümini

Ca⁺² : Kalsiyum

CaM : Kalmodulin

CAT : Katalaz

CBL : Kalsinörin B Benzeri Protein

Cd : Kadmiyum

cDNA : Komplementer DNA

CDPK : Kalsiyum Bağımlı Protein Kinaz

cm: Santimetre

Co : Kobalt

Cr : Krom

Cu / CuSO₄.5H₂O : Bakır / Bakır(II) Sülfat Pentahidrat

Cu/Zn-SOD : Bakır/Çinko Süperoksit Dismutaz

DEPC : Dietil Pirokarbonat

DHAR : Dehidroaskorbat Redüktaz

dk : Dakika
DNA : Deoksiribonükleik asit
EDTA : Etilendiamin Tetra Asetik Asit
Fe-SOD : Demir Süperoksit Dismutaz
g : Gram
GR : Glutasyon Redüktaz
GSH : Glutasyon
H₂O₂: Hidrojen Peroksit
ha : Hektar Alan
Hg : Civa
K : Potasyum
KCN : Potasyum Siyanür
kg : Kilogram
K₂HPO₄ : Dipotasyum Hidrojen Fosfat
KH₂PO₄ : Potasyum Dihidrojen Fosfat
L : Litre
LOO[•] : Lipid Peroksil Radikali
LOOH : Lipid Hidroperoksit
MAPK : Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz
MAPKK : MAPK Kinaz
MAPKKK: MAPK Kinaz Kinaz
MDA : Malondialdehit
MDHAR : Monodehidroaskorbat Redüktaz
mg : Miligram
ml : Mililitre
mM: Milimolar
Mn : Mangan
Mn-SOD : Mangan Süperoksit Dismutaz
Mo : Molibden
mRNA : Mesajcı RNA
MT : Metalloprotein
NaClO : Sodyum Hipoklorit

Na₂HPO₄ : Disodyum Hidrojen Fosfat
NBT : Nitro Blue Tetrazolyum
Ni : Nikel
nm : Nanometre
nmol : Nanomol
NO[•] : Nitrik Oksit
NO₂[•] : Nitrik Dioksit
O₂ : Moleküler Oksijen
¹O₂ : Singlet Oksijen
O₂^{-•} : Süperoksit Radikali
OH[•] : Hidroksil Radikali
P : Fosfor
Pb / Pb(NO₃)₂ : Kurşun / Kurşun(II) Nitrat
PC : Fitoşelatin
PUFA : Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
PVP : Polivinilpirolidon
PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA : Ribonükleik Asit
ROS: Reaktif Oksijen Türleri
rpm : Dakikadaki Devir Sayısı
-SH : Sülfidril
SOD : Süperoksit Dismutaz
TBA : Tiyobarbitürik Asit
TBARS : Tiyobarbitürik Asit Reaktif Madde
TCA : Trikloroasetik Asit
TF : Transkripsiyon Faktörü
Zn : Çinko

1. GİRİŞ

1.1. Bal Kabağı Bitkisinin Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları

Bal kabağı (*Cucurbita moschata* Duch.), Cucurbitaceae (Kabakgiller) familyasının *Cucurbita* cinsine ait tek yıllık otsu bir bitkidir (Ezin vd., 2022: 3661). Bal kabağının (*Cucurbita moschata* Duch.) anavatanının Kuzey Amerika olduğu düşünülmektedir ve ilk kez Meksika ile Güney Amerika'nın kuzeyinde kültüre alındığı iddia edilmektedir (Ulrich vd., 2022: 9).

Kökleri 1-1,5 metre derine kadar inebilen bal kabağı kazık kök yapısına sahiptir. Ana kökünün etrafında ikincil yan kökler oluşmakta ve zamanla bu yan kökler büyüyerek saçaklanmış bir görünüm oluşturmaktadır. Erkek ve dişi çiçek olmak üzere iki çeşit çiçeğe sahip olan bal kabağının çiçekleri aynı bitki üzerinde fakat farklı yerlerde bulunmaktadır. İlk olarak çiçek tozunu taşıyan erkek çiçek açmakta ve sonra meyve oluşturan dişi çiçek açıp beraber büyümektedirler. Tohumları beyaz veya kurşuni, yaprakları yeşil, çiçeği sarı renk olan bal kabağının geniş ve genellikle dikenli olan yapraklarında beyaz lekeler görülebilmektedir. Meyvesinin ise kabuğu kalın olup rengi turuncudur (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Bal kabağı yaprağı, çiçeği ve meyvesi

Kaynak: (NC State Extension Plant Toolbox, 2020)

Ilık ve sıcak iklim bitkisi olan bal kabağı bol güneş ışığı alan, toprak pH'ı 6-7 civarında olan ve orta derecede nemli topraklarda yetiştirilmektedir. Fazla ağır ve kumlu topraklar haricinde her türlü toprak üzerinde yetişebilmektedir. 10-12 °C toprak sıcaklığı tohumların optimum çimlenme göstermesi için gereklidir. 4-8 gün arasında çimlenen tohumlar, 5-10 yıla kadar normal koşullarda çimlenme özelliğini koruyabilmektedir (MEGEP, 2009: 5-10; NC State Extension Plant Toolbox, 2020: 1).

Dünya genelinde hem sebze hem de ilaç olarak kullanılan bal kabağı, yüksek miktarda vitamin A (4 ± 20 mg/g) ve askorbik asit (22,9 mg/100 g) içermektedir. Düşük kalorili bir sebze olan bal kabağının etli kısmı ve çekirdeği ayrı bir önem arz etmektedir. Bal kabağının etli kısmı polisakkarit, pektin, karotenoid ve γ -aminobütirik asidin iyi bir kaynağı olup kanser, katarakt, diyabet, kardiyovasküler hastalıkların riskini azaltmaktadır. Bal kabağı çekirdeği ise protein, çoklu doymamış yağ asidi, karotenoid, tokoferol, fitosterol ve K, P, Fe ve Zn elementleri açısından zengindir ve mesane taşı hastalığı, hipertansiyon, hiperkolesterolemi, diyabet ve kanser ile mücadeleye katkı sağlamaktadır (Qin vd., 2012: 1049; Ezin vd., 2022: 3662).

2021 yılı dünya kabak üretiminde ilk sırada yer alan Çin'i sırası ile Ukrayna, Rusya, ABD ve İspanya takip etmektedir. Türkiye ise kabak üretiminde dünyada 6. sırada yer almaktadır (FAO, 2021). 2021 yılı Türkiye'de kışlık kabak (bal kabağı ve kestane kabağı) üretiminin en fazla yapıldığı yıldır. 2022 TÜİK verilerine göre Türkiye'de kışlık kabak üretimi en fazla Doğu Marmara bölgesinde yapılırken bu sırayı Ege ve Batı Anadolu bölgeleri izlemektedir (TÜİK, 2022).

1.2. Bitkilerde Abiyotik Stres

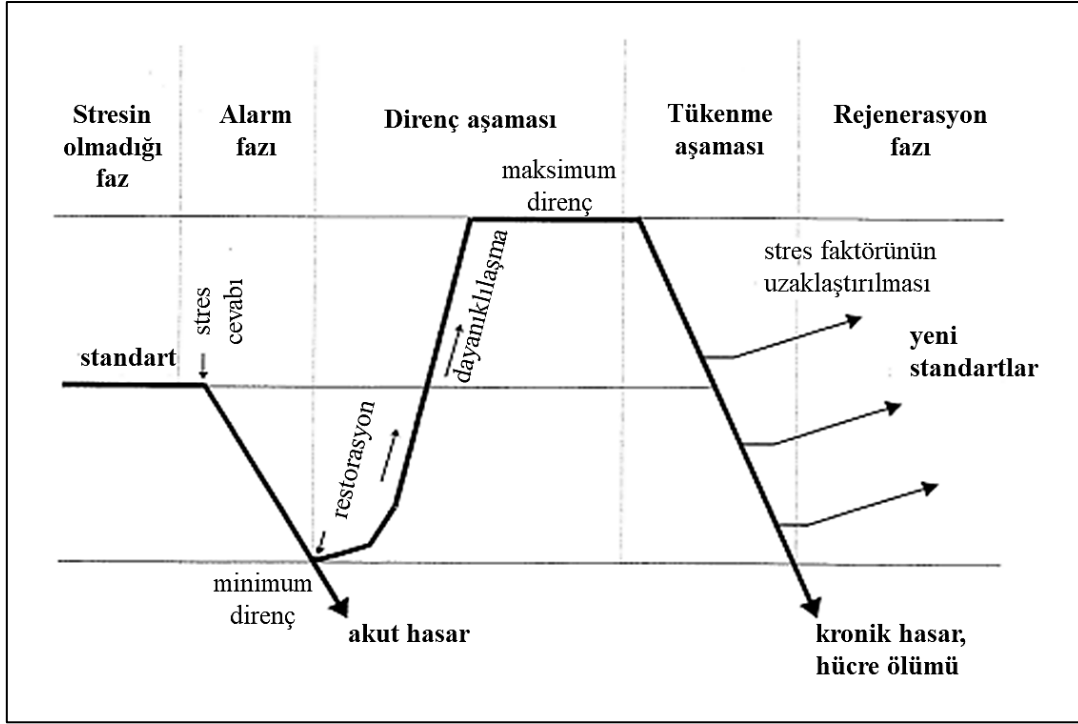
Bitkiler, yaşamları boyunca birçok çevresel etmene maruz kalmaktadır. Bu etmenlerde meydana gelen değişiklikler bitkilerin büyümesini ve gelişimini negatif yönde etkileyip verim kaybına neden olarak bitkilerde strese neden olmaktadır. Bitkilerde stres, biyotik ve abiyotik stres olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır (Tablo 1.1). Virüsler, bakteriler, mantarlar, nematodlar, böcekler ve yabancı otlar gibi canlı organizmaların bitkilerde neden olduğu stresler biyotik stres olarak adlandırılırken kuraklık, tuzluluk, ağır metaller, aşırı sıcak ve soğuklar, aşırı sulama ve radyasyon gibi canlı olmayan fiziksel veya kimyasal faktörlerin bitkilerde oluşturduğu stresler ise abiyotik stres olarak tanımlanmaktadır (Gull vd., 2019: 2).

Tablo 1.1. Biyotik ve abiyotik stres faktörleri

Biyotik Stres Faktörleri	Abiyotik Stres Faktörleri
Virüsler	Kuraklık
Bakteriler	Tuzluluk
Mantarlar	Ağır metaller
Nematodlar	Aşırı sıcak ve soğuklar
Böcekler	Radyasyon
Yabani otlar	Su baskını
Herbivorlar	Mekanik yaralanmalar

Kaynak: (Gull vd., 2019: 1-2)

Bitkiler, stres faktörleri ile mücadele edebilmek için fizyolojilerini, metabolik mekanizmalarını, gen ekspresyonlarını ve gelişimsel aktivitelerini değiştirmektedir (Redondo-Gómez, 2013: 1). Stres faktörlerini algılamak, bunlardan kaçınmak ve hatta bu sınırlayıcı çevresel koşullara karşı tolerans oluşturmak için çeşitli mekanizmalar geliştiren bitkilerin streslere cevabı, stresin şiddetine ve süresine göre değişmektedir. Stres tarafından uyarılan bitkilerde; alarm, direnç, tükenme ve rejenerasyon aşaması olmak üzere dört aşamalı cevap oluşmaktadır (Şekil 1.2). Stresin başlangıcı olan alarm aşamasında fotosentez, iyon alınımları gibi fizyolojik fonksiyonların birkaçı azalmaktadır. Metabolik aktivitelerdeki bu değişiklik bitkinin optimum yaşam standartından sapmasına neden olmaktadır. Stresin devam etmesi durumunda görülen direnç aşamasında, bitkiler stresle başa çıkabilmek için adaptasyon ve tamir süreçlerini aktive etmektedir. Düşük stres tolerans mekanizmasına sahip olan veya herhangi bir stres tolerans mekanizmasına sahip olmayan bitkiler ise hasar görmekte ve senesense girmektedir. Uzun dönemli stresin etkili olduğu tükenme aşamasında, bitkiler canlılığını yitirmeye başlamakta ve sonunda hücre ölümü gerçekleşmektedir. Rejenerasyon yani onarım aşaması ise bitkide senesens süreci baskın hale geçmeden önce stres faktörünün ortadan kaldırılmasıyla bitkinin yeniden canlanması ve fizyolojik fonksiyonların kısmen veya tamamen yenilenmesini ifade etmektedir (Lichtenthaler, 1998: 191-192; Paes de Melo vd., 2022: 1).

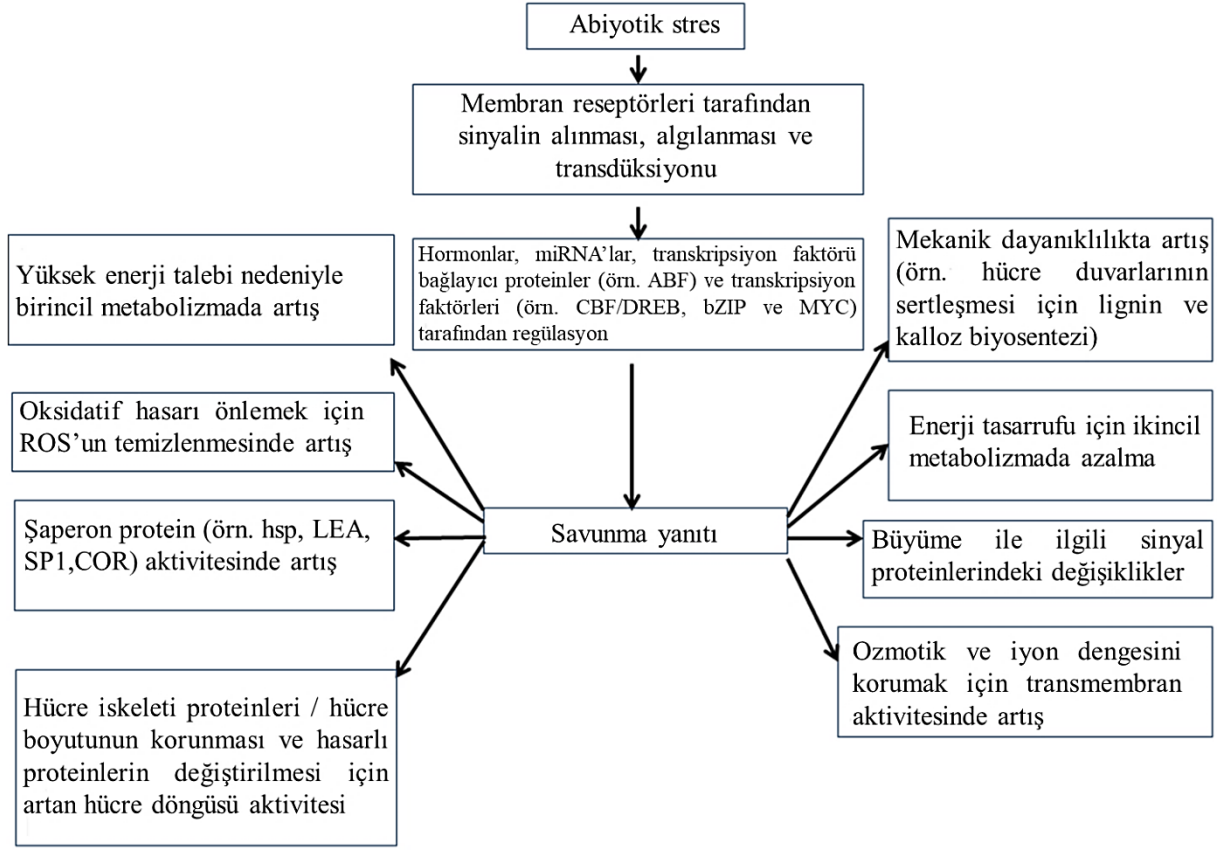


Şekil 1.2. Abiyotik strese maruz kalan bitkilerde stres cevabı

Kaynak: (Lichtenthaler, 1998: 191)

Abiyotik strese maruz kalan bitkilerin çimlenmeleri kısıtlanıp, gelişimleri ve verimlilikleri azalmaktadır. Bitkilerde bir takım fizyolojik farklılaşmalara sebep olan abiyotik stres, bitkilerin fotosentez, su alımı ve nitrojen asimilasyonunu kısıtlayıp transpirasyon oranında ve respirasyonda değişikliklere neden olmaktadır. Bitkilerde gelişimsel ve fizyolojik değişikliklere yol açan abiyotik stres, bunun yanında moleküler açıdan farklılıklar oluşmasına da sebep olmaktadır. Abiyotik stres, makromoleküllerin yıkımına, membran sisteminde düzensizliğe, gen ekspresyonunda değişikliklere, önemli enzimlerin aktivitesinin ve protein sentezinin azalmasına sebep olmaktadır (Vijayalakshmi, 2018: 379).

Bitkilerde birincil stres olan abiyotik stres faktörleri, hücre hasarına sebep olmanın yanı sıra ozmotik ve oksidatif stres gibi ikincil streslerin ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Abiyotik stresin neden olduğu redoks dengesizliği ya da sitozolde kalsiyum iyonunun birikmesi gibi stres sinyalleri, membran reseptörleri tarafından algılanmakta ve sinyal akışı aşağı iletilmektedir. Kinaz kaskadları ve diğer fosforilasyon/defosforilasyon kaskadlarını aktive eden sinyal, transkripsiyonu tetikleyerek stres yanıt mekanizmalarının aktive edilmesine ve homeostazın yeniden kurulmasına olanak sağlamaktadır (Şekil 1.3). Eğer bu yanıt mekanizmaları bitkinin homeostazını onarmaya yetecek kadar etkili değilse hücrelerde erken yaşlanma tetiklenmektedir (Onaga ve Wydra, 2016: 169; Paes de Melo vd., 2022: 6).



Şekil 1.3. Bitkilerde abiyotik stres cevabı

Kaynak: (Onaga ve Wydra, 2016: 169)

1.2.1. Bitkilerde Ağır Metal Stresi

Orijinleri yer kabuğu olan ağır metallerin doğal kaynağı, jeolojik ana materyal, kaya çıkıntıları ve volkanik patlamalardır. Bu doğal süreçler, çevredeki ağır metal kirliliğinin kaynağı olabileceği gibi madencilik ve tarımsal faaliyetler gibi antropojenik faaliyetler de bu kirliliğin başlıca kaynağı olabilmektedir (Nagajyoti vd., 2010: 201). Günümüzde, hızla sanayileşen ve gelişen dünyanın yanında getirdiği olumsuz etkilerden biri de çevre kirliliğidir. Sanayileşmenin neticesinde oluşan endüstriyel atıkların aşırı emisyonu ve kimyasal gübre ile pestisitlerin yanlış kullanımı birçok ağır metalin doğaya karışmasına sebep olmaktadır. Bu durum ise ekolojik dengeyi bozmakta ve besin zinciri yoluyla da tüm canlıların sağlığını tehdit etmektedir (Jia-Wen vd., 2013: 815). Sesil organizmalar olan bitkiler bu durumdan etkilenen organizmaların başında gelir ve ağır metallere maruziyet sonucu bitkilerde ağır metal stresi oluşmaktadır. Ağır metal maruziyeti altındaki bitkilerin fizyolojik faaliyetleri bu abiyotik stres faktöründen negatif bir şekilde etkilenir ve hatta daha ileriki aşamalarda bu durum bitkinin ölümüyle dahi sonuçlanabilmektedir. Bu yüzden bitkilerdeki ağır metal

birikimi, bitkinin verimliliğini ve kalitesini azalttığından tarım sektörü ve bu sektörle ilişkili sektörlerde önemli bir sorun haline gelmektedir (Yerli vd., 2020: 106).

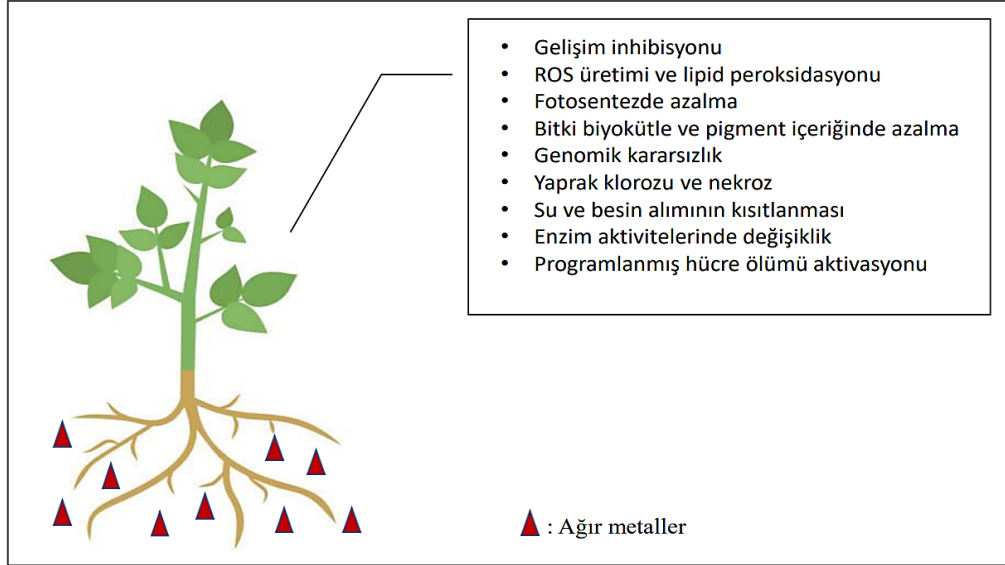
Yoğunlukları 5 g/cm^3 'ten daha yüksek olan metaller, ağır metal olarak adlandırılmaktadır (DalCorso, 2012: 2). Ağır metaller, redoks aktif metaller ve redoks inaktif metaller olarak gruplandırılabilir. Çinko, civa, alüminyum, nikel, kurşun ve kadmiyum gibi redoks aktif olmayan ağır metaller, hücrel antioksidan havuzunun aktivitesini azaltarak ve metabolik dengesizliğe yol açarak ROS (reaktif oksijen türleri) yükünü artırmaktadır ve dolaylı yoldan oksidatif strese neden olmaktadır. Bakır, demir, krom ve kobalt gibi redoks aktif metaller ise Haber-Weiss ve Fenton benzeri reaksiyonlarda yer alarak doğrudan ROS'ların oluşumuna sebep olmaktadır (Hossain vd., 2012: 2; Kosakivska vd., 2021: 259).

Ağır metalleri redoks aktifliğine göre ayırmak mümkün olsa da bitkiler için gereklilik durumlarına göre sınıflandırma yapılmaktadır. Ağır metallerin bir kısmı, düşük konsantrasyonlarda herhangi bir toksik etki göstermez. Bunlar bitkilerin gelişimi için ihtiyaç duyduğu mikro besin elementleridir. Bakır (Cu), çinko (Zn), kobalt (Co), mangan (Mn), molibden (Mo) ve nikel (Ni) düşük miktarlarda mutlak gerekli olup bitkide belirli bir eşik değerini geçtiğinde ve biriktiğinde bitki için zararlı olmaya başlamaktadırlar. Bu gruptaki ağır metaller, enzim reaksiyonlarının kofaktörü veya aktivatörü görevini görmektedir.

Ağır metallerin geriye kalan diğer kısmını oluşturan kurşun (Pb), alüminyum (Al), arsenik (As), civa (Hg), kadmiyum (Cd) ve krom (Cr) gibi ağır metaller ise düşük konsantrasyonlarda bile bitki için toksik etki göstermektedir ve bitkilerde bilinen herhangi bir olumlu biyolojik role sahip değildir (Savvas vd., 2010: 157). Bu ağır metaller biyoakümülatif özellik gösterir ve çevreden kolaylıkla temizlenemezler. Her ne kadar bitki gelişiminde mutlak gerekli olup olmamalarına göre ağır metallerin ayrımı yapılsa da bu gereklilik ayrımı farketmeksizin bütün ağır metallerin bitkilerdeki aşırı birikimi bitkilerin vejetatif ve generatif organlarının gelişimi üzerinde olumsuz sonuçlar doğurmaktadır (Sharma ve Agrawal, 2005: 301; Asri ve Sönmez., 2006: 36).

Bitkide farklı etki bölgelerine sahip olan ağır metaller, birbirinden farklı toksik etkilere sebep olabilmektedir. Ama genel anlamda ağır metallerin neden olduğu bazı yaygın semptomlar mevcuttur (Şekil 1.4). Bu toksik etkilerden en yaygın ağır metallerin bitki gelişimini inhibe etmesidir. Senesens stimülasyonuna da neden olan ağır metaller, enzimlerin aktivitelerini değiştirmekte ve kökler üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı su ve besin alımını kısıtlamaktadır. Ağır metaller, fotosentez inhibisyonuna, pigment içeriğinde ve bitki biyokütlesinde azalmaya yol açmaktadır. Görülen diğer toksik etkileri; protein oksidasyonu,

nükleik asit hasarı, ROS (reaktif oksijen türleri) birikimi ve lipid peroksidasyonudur. Bunun yanında ağır metaller, kloroz ve nekroza, hatta programlanmış hücre ölümüne bile sebep olmaktadır (Maksymiec, 2007: 178; Shah vd., 2010: 80-85; Ashfaque vd., 2016: 2; Riyazuddin vd., 2022: 6).



Şekil 1.4. Bitkilerde ağır metal toksisitesinin etkileri

Kaynak: (Liu vd., 2015: 196; Ashfaque vd., 2016: 4)

Ağır metallerin bitkilerde oluşturduğu toksisite esasen dört ana mekanizma yoluyla gerçekleşmektedir.

i) Ağır metaller, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları yoluyla ya doğrudan ya da hücre içindeki toksisiteyi nedeni ile dolaylı olarak ROS üretimini tetiklemektedir. Bu durum oksidatif stresin indüklenmesine ve hücre membranının bütünlüğünün değişmesine yol açmaktadır.

ii) Metabolizmadaki biyokimyasal fonksiyonel gruplarla benzer yapıya sahip olan ağır metaller, çoğu hücresel fonksiyonda analog oldukları bu gruplarla rekabet etmektedir.

iii) Ağır metaller, enzimlerin aktif bölgelerindeki iyonik kofaktörlerin yerine geçerek aktivite kaybına sebep olabilmektedir.

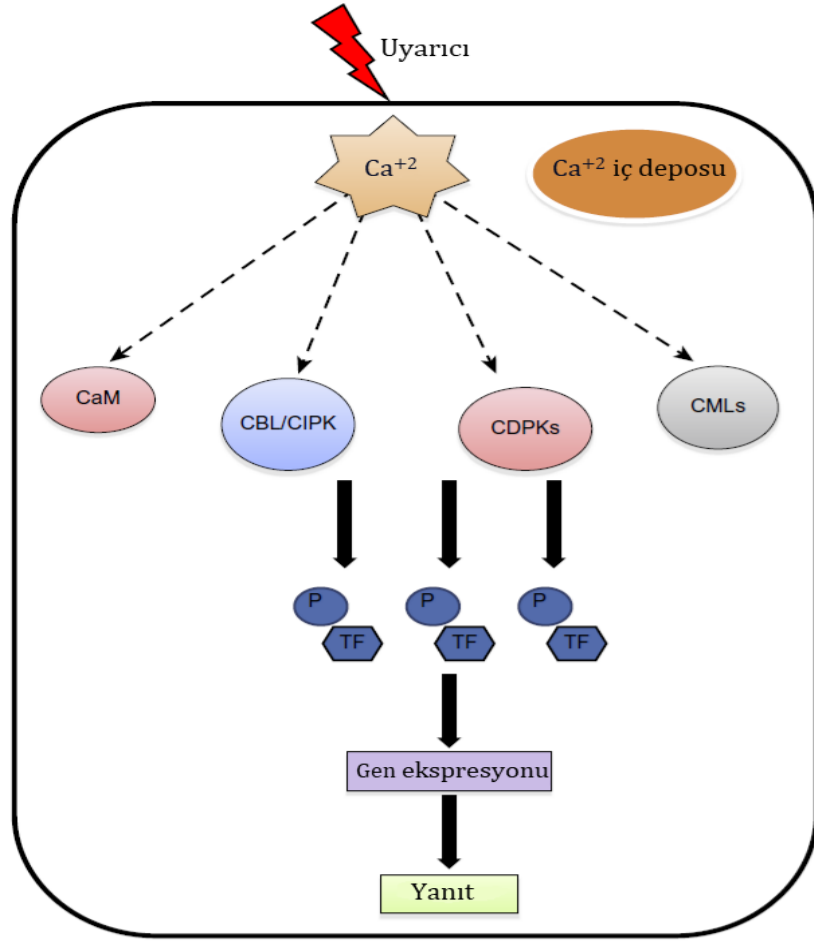
iiii) Ağır metaller, sülfidril (-SH) gruplarına karşı yüksek afinitiyeye sahiptir. Bu yüzden ağır metaller, bu grubu içeren yapısal proteinlere ve enzimlere bağlanarak doğru katlanmayı engelleyebilmekte ve katalitik aktiviteye müdahale edebilmektedir (DalCorso, 2012: 3-4).

Ağır metal toksisitesine maruz kalan bitkiler, iki yolla bu strese karşı direnç geliştirmektedir. Bitkiler, çevreden bünyelerine ağır metal alınmasını kısıtladıkları kaçınma yoluyla ya da yüksek ağır metal konsantrasyonlarında hayatta kaldıkları tolerans mekanizması yoluyla direnç sağlamaktadır. Kaçınma mekanizması; ağır metal alınımının azaltılması, dışarı akışının artırılması ya da hücrelere giren metal konsantrasyonunun azaltılması ile gerçekleşmektedir. Tolerans mekanizmasında ise amino asitlerin, glutatyonun, ağır metallere bağlanan ligandların sentezlenmesiyle hücre içi şelasyon yapılmakta ve antioksidan savunma sistemiyle ROS'un detoksifikasyonu sağlanmaktadır (Kosakivska vd., 2021: 260).

Metal iyonlarının sekestrasyonu, ağır metal toksisitesinin iyileştirilmesi için organizmalar tarafından gerçekleştirilen bir stratejidir. Metal taşıyıcıları, ağır metal iyonlarını sitozolden vakuole sekestrasyon yapılması için taşımakta ve bitkilerde homeostazın korunmasına katkıda bulunmaktadır. CDF, NRAMP, ağır metal ATPaz, ABC, CAX, COPT, ZIP taşıyıcıları gibi metal taşıyıcılar, metal iyonlarının homeostazında ve alınmasında rol oynayarak hücredeki ağır metal konsantrasyonunun fizyolojik seviyelerde tutulmasını ve hücresel detoksifikasyonu sağlamaktadır (Komal vd., 2015: 184; Hasan vd., 2017: 2).

Ağır metaller, metabolik yollarla etkileşerek sinyal üretmektedir ve bitkilerde karışık bir sinyal yolağını (ROS sinyali, hormon sinyali, kalsiyum bağımlı sinyal ve MAPK kaskadı) aktive etmektedir. Ağır metal sinyalini algılayan bitkiler ise, hücrelerin moleküler ve biyokimyasal mekanizmalarında modülasyon gibi bir yanıt oluşturmaktadır (Kumar ve Trivedi, 2016: 586; Jalmi vd., 2018: 2).

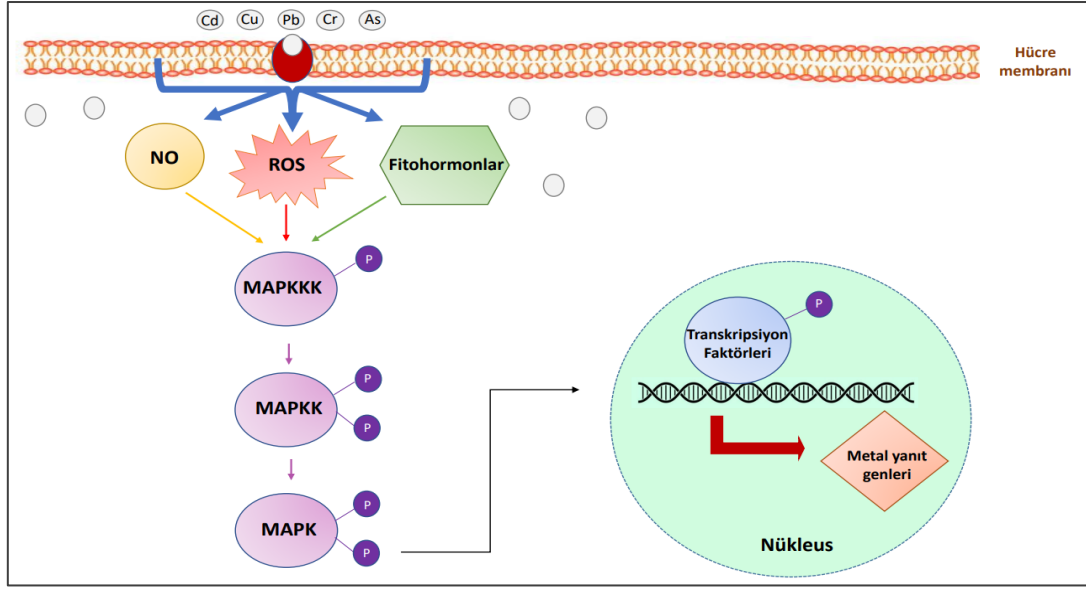
Kalsiyum bağımlı sinyal iletiminde kalsiyum iyonu (Ca^{+2}), ikincil mesajcı görevi görmektedir. Ağır metal stresi altında, hücre dışından hücre içine kalsiyum iyonu akışı olması veya hücrenin hücre içi depolarından kalsiyum iyonu salınması sonucunda serbest sitozolik kalsiyum iyonu konsantrasyonu değişmektedir. CDPK'ler (Ca^{+2} bağımlı protein kinazlar), CBL'ler (kalsinörin B benzeri proteinler), CaM'lar (kalmodulinler), CaM benzeri proteinler gibi kalsiyum sensörleri bu konsantrasyon değişimini algılayıp akış aşağı farklı sinyal yollarını tetikleyerek stres yanıtı oluşmasını sağlamaktadır (Şekil 1.5) (Kumar ve Trivedi, 2016: 587; Jalmi vd., 2018: 6).



Şekil 1.5. Ağır metal stresi altında bitkilerde kalsiyum bağımlı sinyal yolağının etkinleşmesi

Kaynak: (Kumar ve Trivedi, 2016: 588)

Yüksek oranda korunmuş olan MAPK'lar (mitojenle aktive edilen protein kinazlar), bitkilerde ağır metal stresi altında aktif hale gelerek bir stres yanıtı oluşturulmasını sağlamaktadır. NO (nitrik oksit), fitohormonlar ve ROS gibi moleküllerin algılanmasıyla aktifleşen MAPK kaskadı, MAPKKK (MAPK kinaz kinaz), MAPKK (MAPK kinaz) ve MAPK olmak üzere üç bileşik bulundurmaktadır. Fosforillenmeyle etkinleşen kaskad, WRKY, MYB gibi transkripsiyon faktörlerini aktif hale getirerek stres yanıtının oluşturulmasını sağlamaktadır (Şekil 1.6) (Jalmi vd., 2018: 4; Sevgi ve Leblebici, 2022: 531).



Şekil 1.6. Bitkilerde ağır metal stresi altında MAPK kaskadının aktifleşmesi

Kaynak: (Sevgi ve Lelebici, 2022: 531)

Ağır metallerin yüksek afiniteli ligandlara bağlanarak sitozolde şelatlanması, ağır metal stresi altındaki bitkilerde ağır metal toleransı ve detoksifikasyonu için oldukça önemlidir. Metal bağlayıcı ligandlar olan fitoşelatin (PC) ve metallothioneinler (MT), bitki hücrelerinde ağır metallerin vakuollere taşınmasını sağlamaktadır (Hossain vd., 2012: 6; Shahid vd., 2015: 14). Metalleri sekestre edebilen bu metal bağlayıcı ligandlar, metal-tiyolat kümeleri oluşturma yeteneğine sahip sisteince zengin polipeptitlerdir. Birçok ağır metal tarafından biyosentezi indüklenen fitoşelatinler, fitoşelatin sentaz enzimi tarafından metal iyonlarının varlığında doğrudan glutatyondan enzimatik olarak sentezlenir (Redondo-Gómez, 2013: 10). Fitoşelatinler, ksenobiyotik metallerin detoksifikasyonunda ve esansiyel metallerin homeostazında görev almaktadır (Kosakivska vd., 2021: 268). Fitoşelatinler, sitozolde toksik metal iyonlarıyla kompleks oluşturup bu metal iyonlarını vakuole taşıyarak bitkileri ağır metallerin zararlı etkilerinden korumaktadır (Yadav, 2010: 168). Bitki metallothioneinleri, sistein bakımından zengin alanların yapısına bağlı olarak dört grupta sınıflandırılır ve bunların her biri bitkide belirli bir dokuda lokalizedir. mRNA translasyonunun ürünleri olan metallothioneinlerin fizyolojik fonksiyonu henüz kesin olarak aydınlatılmamış olsa da esansiyel geçiş ağır metallerinin homeostazının sürdürülmesinde, toksik ağır metallerin sekestrasyonunda ve hücre içi oksidatif hasara karşı korumada rol oynadığı düşünülmektedir. Metallothioneinlerin biyosentezi hormonlar, sitotoksik ajanlar ve ağır metaller dahil olmak üzere çeşitli faktörler tarafından indüklenir (Hossain vd., 2012: 7; Kosakivska vd., 2021: 268).

1.2.1.1. Kurşun Stresi

Antropojenik faaliyetler sonucunda oluşan en önemli metal kirleticilerin kurşun, bakır, çinko ve nikel olduğu belirtilmektedir (Ishtiyak vd., 2018: 78). Toksisitesinden dolayı arsenikten sonra en tehlikeli ikinci madde olarak rapor edilen kurşun (Pb), yaşayan organizmalarda bilinen biyolojik bir fonksiyona sahip değildir (Pourrut vd., 2011: 114). Madencilik faaliyetleri, otomobil egzozu, fabrika bacaları, gübreler, böcek ilaçları, pigmentlerdeki katkı maddeleri, benzin ve kurşun içeren boyalar gibi antropojenik faktörler çevredeki kurşun kirliliğinin başlıca kaynağıdır. Özellikle endüstriyel alanların yakınındaki ekili topraklarda kurşun içeriğinin önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir (Sharma ve Dubey, 2005: 36).

Doğada inorganik ve organik olmak üzere iki formda bulunan kurşun, inorganik formda atmosferde partiküller halindeyken organik formda uçucudur. Uçucu bir yapıya sahip olan organik formdaki kurşun, canlıların besin kaynaklarına karışarak inorganığe göre canlılar için daha büyük bir tehdit oluşturmaktadır (Okcu vd., 2012: 19).

Güçlü bir çevre kirleticisi olan kurşun, bitkilerde esansiyel bir element olmasa da bitkiler tarafından kolaylıkla alınmakta, bitkilerin farklı organ ve dokularında birikmektedir (Hadi ve Aziz, 2015: 92). Kurşun, bitki gelişimi ve metabolizmasında gerekli olmadığı gibi düşük konsantrasyonlarda bile canlıların sağlığına zarar verebilen bir ağır metaldir. Bitkiler için toksik kabul edilebilecek olan kurşun miktarının 20 mg/kg olduğu ifade edilmektedir (Pivić vd., 2013: 1468).

Süperoksit radikalleri ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türlerinin artışına sebep olarak hücre zarına zarar veren kurşun stresi, ROS üretimini artırarak bitkide oksidatif strese neden olmaktadır. Aynı zamanda kurşun elementi köklerde daha fazla biriktiği için kök gelişimini engelleyerek besin alınımını olumsuz etkilemektedir. Kurşun elementi, hücre duvarı stabilitesini negatif yönde etkilemekte, stoma açılıp kapanmasının azalmasına ve yaprak alanının daralmasına sebep olmaktadır. Böylece bitkinin aldığı su miktarını etkilemektedir. Dolayısıyla aşırı kurşun maruziyeti, su ve mineral besin dengesini bozmaktadır. (Asri ve Sönmez., 2006: 40; Chen vd., 2015: 313; Gjorgieva Ackova, 2018: 16). Kurşun toksisitesi, bitki gelişimini, fotosentezi ve enzim aktivitesini inhibe etmektedir. Gelişim geriliği ve klorozise neden olan kurşun, yüksek konsantrasyonlarda hücre ölümüne bile yol açmaktadır (Hadi ve Aziz, 2015: 93).

1.2.1.2. Bakır Stresi

Düşük konsantrasyonlarda bitkilerin normal gelişimi için gerekli bir mikro besin elementi olan bakır, yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu bitkiler için toksik etki göstermeye başlamaktadır. Topraktaki toplam bakırın normal konsantrasyon aralığı 2-250 mg/kg arasındadır. Özellikle endüstrileşme ve madencilik faaliyetlerinin artması sonucu ekosistemdeki bakırın miktarı giderek artmaktadır. Çoğu bitki türünde bitkinin büyümesi için gerekli olan bakır seviyesi kuru kütle bazında 5-20 mg/kg arasında değer alır. Bakır bu konsantrasyonun üzerinde ise bitkilerde bakır toksisitesi ortaya çıkmakta ve toksisite semptomları görülmeye başlamaktadır (Farid vd., 2021: 262).

Redoks aktif geçiş metali olan bakır (Cu), fizyolojik koşullar altında yükseltgenmiş (Cu^{+2}) ve indirgenmiş (Cu^{+}) durumda bulunmaktadır. Farklı oksidasyon durumları arasında geçiş yapabildiği için fotosentez, solunum, hücre duvarı metabolizması, hormon sinyali gibi bitkinin birçok önemli biyolojik sürecinde rol oynamaktadır. Cu/Zn süperoksit dismutaz (SOD), amino oksidaz, sitokrom c oksidaz gibi çoğu enzimde kofaktör görevi gören bakır, CO_2 asimilasyonu ve ATP üretiminde de rol almaktadır (Yruela, 2005: 145; Kumar vd., 2021: 1).

Aşırı miktarda bakıra maruz kalan bitkilerde görülen toksik etkiler, bitki gelişimindeki gecikme, yaprak klorozu ve nekrozdur. Yüksek seviyelerdeki bakır, daha çok kök sisteminde birikme eğilimi gösterdiği için sürgün büyümesinden önce kök büyümesini engellemektedir. Bakır toksisitesi, bitki morfolojisini etkileyip kök gelişimini inhibe etmekte, biyokütleyi azaltmakta ve daha kısa boylu fenotip oluşmasına sebep olmaktadır. Serbest Cu, hidroksil radikallerinin üretilmesine sebep olan Fenton reaksiyonunu katalizlemektedir. Reaksiyon sonucunda hidroksil radikallerinin üretimi de DNA, protein ve lipidlere zarar vermektedir. Fotosentez inhibisyonuna ve pigment içeriğinde azalmaya neden olan bakır stresi, ROS ve MDA (malondialdehit) seviyesinde artışa ve mineral dengesizliğine de yol açmaktadır. Bakır toksisitesinin görülen diğer toksik etkisi ise neredeyse demir eksikliğine sebep olacak kadar demir alımını azaltmasıdır (Burkhead vd., 2009: 802; Lange vd., 2017: 538; Mir vd., 2021: 743).

1.3. Antioksidan Savunma Sistemi

Bitkiler optimum yaşam koşullarında, ROS'ları bazal seviyelerde üretmektedir. Bu seviyede bulunan ROS'lar farklı antioksidan mekanizmalar tarafından temizlendikleri için bitkide hasara neden olmazlar ve hücrel dengeyi bozmazlar. Ağır metal, kuraklık, tuzluluk gibi abiyotik stresler ROS üretimi ve ROS temizlenmesi arasındaki dengeyi bozmakta ve ROS üretiminde artışa neden olmaktadır. Belirli bir ROS seviyesi aşıldığında ise bitkiler oksidatif strese girmektedir (Das ve Roychoudhury, 2014: 1; Ishtiyah vd., 2018: 84).

Stres koşulları altındaki bitkiler, redoks homeostazını sağlamak ve hayatta kalabilmek için etkili bir antioksidan savunma sistemi geliştirmişlerdir. Antioksidanlar, enzimatik olan ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Antioksidatif savunma sisteminin enzimatik bileşenlerini süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), guaiakol peroksidaz (GPX) ve askorbat-glutatyon (AsA-GSH) döngüsü enzimleri olan askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) ile dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) oluşturmaktadır. Bu antioksidan enzimler, Foyer-Halliwell-Asada döngüsü olarak da bilinen AsA-GSH döngüsüne katılmaktadır veya Haber-Weiss reaksiyonunu engellemede rol oynamaktadır (Rajput vd., 2021: 3). Enzimatik antioksidanlar, üretilen ROS'ları yıkarak ve çeşitli aşamalarla sistemden uzaklaştırarak ROS seviyelerini düşürmektedir. (Sachdev vd., 2021: 19).

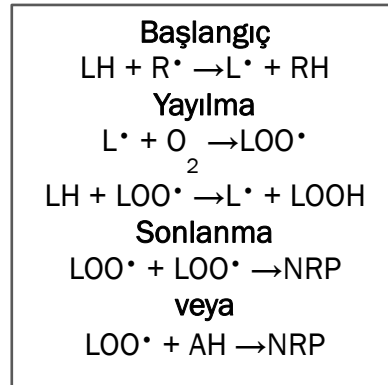
Antioksidatif savunma sisteminin enzimatik olmayan bileşenleri askorbat (AsA), glutatyon (GSH), karotenoidler, tokoferoller ve fenolik bileşikler içerir. ROS ile etkileşime giren redoks tamponları olarak işlev gören enzimatik olmayan antioksidanlar, iklimasyon yanıtının uygun bir şekilde indüklenmesini modüle eden metabolik bir arayüz görevi görmektedir. Düşük moleküler ağırlıklı bu antioksidanlar, serbest radikal zincir reaksiyonunu kesintiye uğratarak ROS detoksifikasyonu yapmakta ve stres koşulları altında üretilen kontrolsüz ROS kaskadı ile mücadele etmektedir (Waśkiewicz vd., 2014: 202; Sachdev vd., 2021: 20).

1.3.1. Lipid Peroksidasyonu

Hücre zarlarının temel bileşenleri olan lipidler, hücrelerin yapısını korumakta ve fonksiyonlarını kontrol etmektedir. ROS saldırısının birincil hedefi olan lipidlerin peroksidasyonu ise ROS'un hücre zarındaki lipidlerden elektronları çıkardığı süreci ifade etmektedir. Lipid peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) oksidatif yıkımıdır. Lipid peroksidasyonu, oksidatif strese maruz kalan aerobik organizmalarda hücre

hasarına sebep olmaktadır (Catalá, 2006: 1483; Yin vd., 2011: 5944). Biyomembranın ana bileşenleri olan PUFA'lar, oksidatif strese yanıt olarak kolayca peroksidasyona uğramaktadır. Kapsamlı PUFA peroksidasyonu, membran akışkanlığını azaltmakta, sızıntıyı artırmakta ve membran proteinlerinde ikincil hasara neden olmaktadır (Ahmad vd., 2009: 11).

Serbest radikaller, enzimatik olmayan lipid peroksidasyonuna yol açar. Lipid peroksidasyonu, başlangıç, yayılma ve sonlanma aşamaları olmak üzere üç aşamadan oluşmaktadır (Şekil 1.7). Başlangıç aşamasında yeterli reaktiviteye sahip bir radikal (R^{\bullet}), lipid molekülü (LH) ile etkileşerek lipid radikallerini (L^{\bullet}) oluşturmaktadır. Yayılma aşamasında karbon merkezli lipid radikal ile moleküler oksijen (O_2) reaksiyona girerek lipid peroksil radikalini (LOO^{\bullet}) oluşturmaktadır. Lipid peroksil radikali, membrandaki diğer PUFA'ları etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşmasına yol açmaktadır. Lipid peroksil radikalleri, bu sırada açığa çıkan hidrojen atomunu alarak lipid hidroperoksitlerine ($LOOH$) dönüşmektedir. Kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerleyen bu süreç bitki hücresi için oldukça zararlıdır. Sonlanma aşamasında ise lipid peroksil radikalleri birbirleriyle tepkimeye girerek radikal olmayan ürünlerin (NRP) oluşmasına yol açmakta ve iki radikal aynı anda yok edilmektedir. Alternatif bir yol olarak bu radikaller, antioksidan maddeler (AH) ile tepkimeye girerek de zincir reaksiyonunu bitirebilmektedir (Yarsan, 1998: 91; Catalá, 2006: 1486; Jambunathan, 2010: 292; Yin vd., 2011: 5945-5949).



Şekil 1.7. Lipid peroksidasyonunun genel aşamaları

Kaynak: (Yarsan, 1998: 91; Catalá, 2006: 1485)

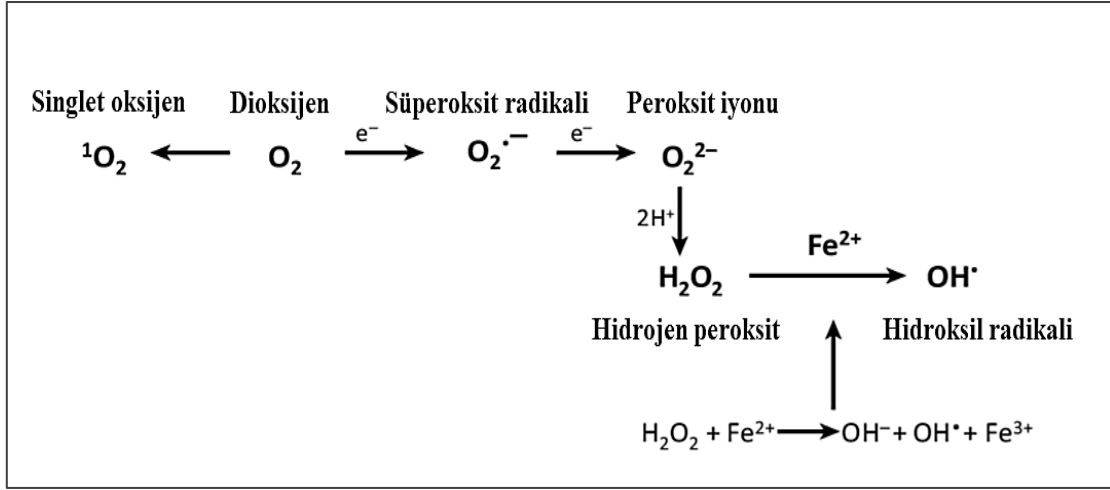
Lipid peroksidasyonunun ana birincil ürünleri, lipid hidroperoksitlerdir. Lipid hidroperoksitler yıkıldığında ise bazıları son derece reaktif olan aldehitler oluşmaktadır. En yaygın reaktif aldehitlerden biri olan malondialdehit (MDA), araşidonik asit ve daha büyük PUFA'ların enzimatik olan veya enzimatik olmayan süreçlerle ayrışması neticesinde oluşan

son üründür. İki'den fazla metilen kesintili çift bağ içeren PUFA'ların oksidatif bozunmasıyla MDA oluşmaktadır (Yamauchi vd., 2008: 786; Ayala vd., 2014: 5). Lipid peroksidasyonunun belirlenmesinde kolorimetrik bir yöntem olan tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) tayini kullanılmaktadır. Lipid peroksidasyonu sürecinde PUFA'ların ayrışmasıyla oluşan MDA, tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girmekte ve tiyobarbitürik asit reaktif maddelerini oluşturmaktadır. Bu kontrollü reaksiyon, kolorimetrik olarak ölçülmektedir. Bitkilerdeki abiyotik, biyotik ve oksidatif stres çalışmalarında MDA içeriği, uzun zamandır lipid peroksidasyonunun belirteci olarak kullanılmaktadır (Jambunathan, 2010: 292; Morales ve Munné-Bosch, 2019: 1246-1247).

1.3.2. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Son yörüngesinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron bulunduran serbest radikaller, bu eşlenmemiş elektronlar yüzünden kararsız yapıda bulunmaktadır. Diğer maddeler ile tepkimeye girerek kararlı hale geçebilen serbest radikaller, oksijen ya da nitrojen kaynaklı olabilmektedir. Nitrojen kaynaklı olan serbest radikaller, reaktif nitrojen türleri (RNS) olarak adlandırılır. Reaktif nitrojen türleri arasında nitrik oksit (NO^*) ile nitrik dioksit (NO_2^*) bulunmaktadır. Oksijen kaynaklı serbest radikaller ise reaktif oksijen türleri olarak adlandırılır. Reaktif oksijen türleri arasında başlıca süperoksit (O_2^-), hidroksil radikali (OH^*), alkoksil radikali (RO^*), peroksil radikali (ROO^*), hidroperoksil (HO_2^*), lipid peroksil (LOO^*) gibi radikaller ile hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) gibi radikal olmayan oksidanlar yer almaktadır (Bhattacharjee, 2012: 1; Karabulut ve Gülay, 2016: 51-52).

Reaktif oksijen türlerinin kaynağı olan atmosferik oksijen (O_2), enerji transferi yoluyla farklı ROS'ların oluşmasına yol açmaktadır (Şekil 1.8). Atmosferik oksijen, bir elektron transferi sonucu indirgendiğinde süperoksit radikali, fazladan enerji alıp kendi dönüş yönünün tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirdiğinde ise singlet oksijen oluşmaktadır. Süperoksit anyonunun dismutasyona uğramasıyla hidrojen peroksit oluşurken, hidrojen peroksit de Fe^{+2} ile etkileşerek Fenton reaksiyonu yoluyla hidroksil radikalini oluşturmaktadır. Hidrojen peroksit geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu yoluyla ve süperoksit anyonunun varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucunda bilinen en reaktif ve toksik ROS olan hidroksil radikalini meydana getirmektedir (Büyük vd., 2012: 100; Das ve Roychoudhury, 2014: 3; Mittler, 2017: 12).



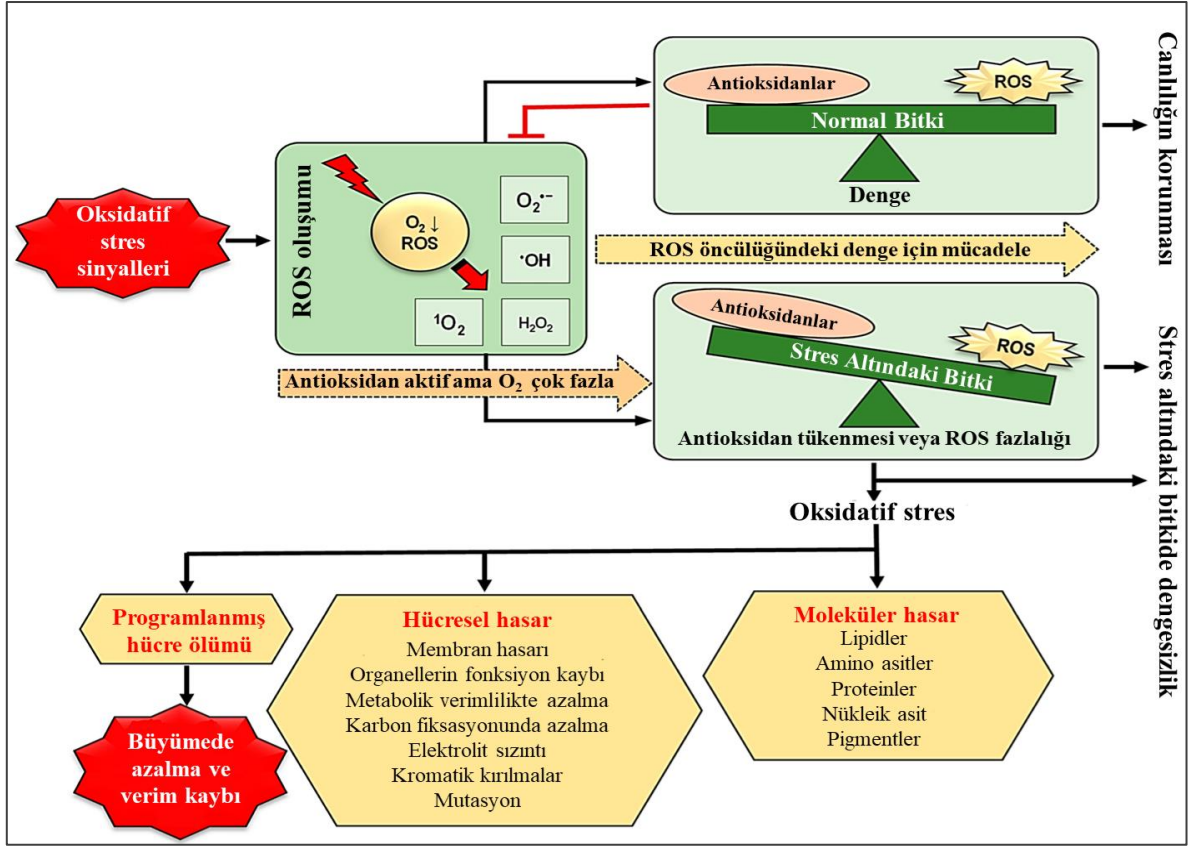
Şekil 1.8. Atmosferik oksijenden farklı ROS'ların oluşumu

Kaynak: (Mittler, 2017: 12)

ROS'lar hem normal hem de stres koşulları altında bitkinin değişik organellerinde üretilmektedir. Bitkilerde ROS üretiminin ana kaynağı ışık olduğunda kloroplastlar ve peroksizomlar iken ışığın olmadığı karanlık zamanlarda ise mitokondridir (Das ve Roychoudhury, 2014: 3).

Çeşitli abiyotik ve biyotik stres faktörlerine maruz kalan bitkilerde oluşan en yaygın tepkilerden biri reaktif oksijen türlerinin üretimindeki artıştır (Bhattacharjee, 2012: 1). Bitkilerde aerobik metabolizmanın yan ürünü olarak sürekli üretilen ROS'lar, hücrelerin kendisini uzaklaştıramayacağı seviyeye ulaşır biriktiğinde oksidatif strese neden olmaktadır (Pandhair ve Sekhon, 2006: 71; Dumanović vd., 2021: 2).

Yüksek seviyelerdeki ROS'lar, lipidler, proteinler ve DNA gibi biyomoleküllerde oksidatif hasar oluşturmaktadır. ROS'lar, lipidlerin peroksidasyonuna, proteinlerin oksidasyonuna, enzimlerin inaktivasyonuna, DNA ile protein arasında çapraz bağ oluşumuna, DNA'da tek zincir kırıklarına sebep olmakta ve nihayetinde hücre ölümüne yol açmaktadır (Şekil 1.9) (Sharma vd., 2012: 7).

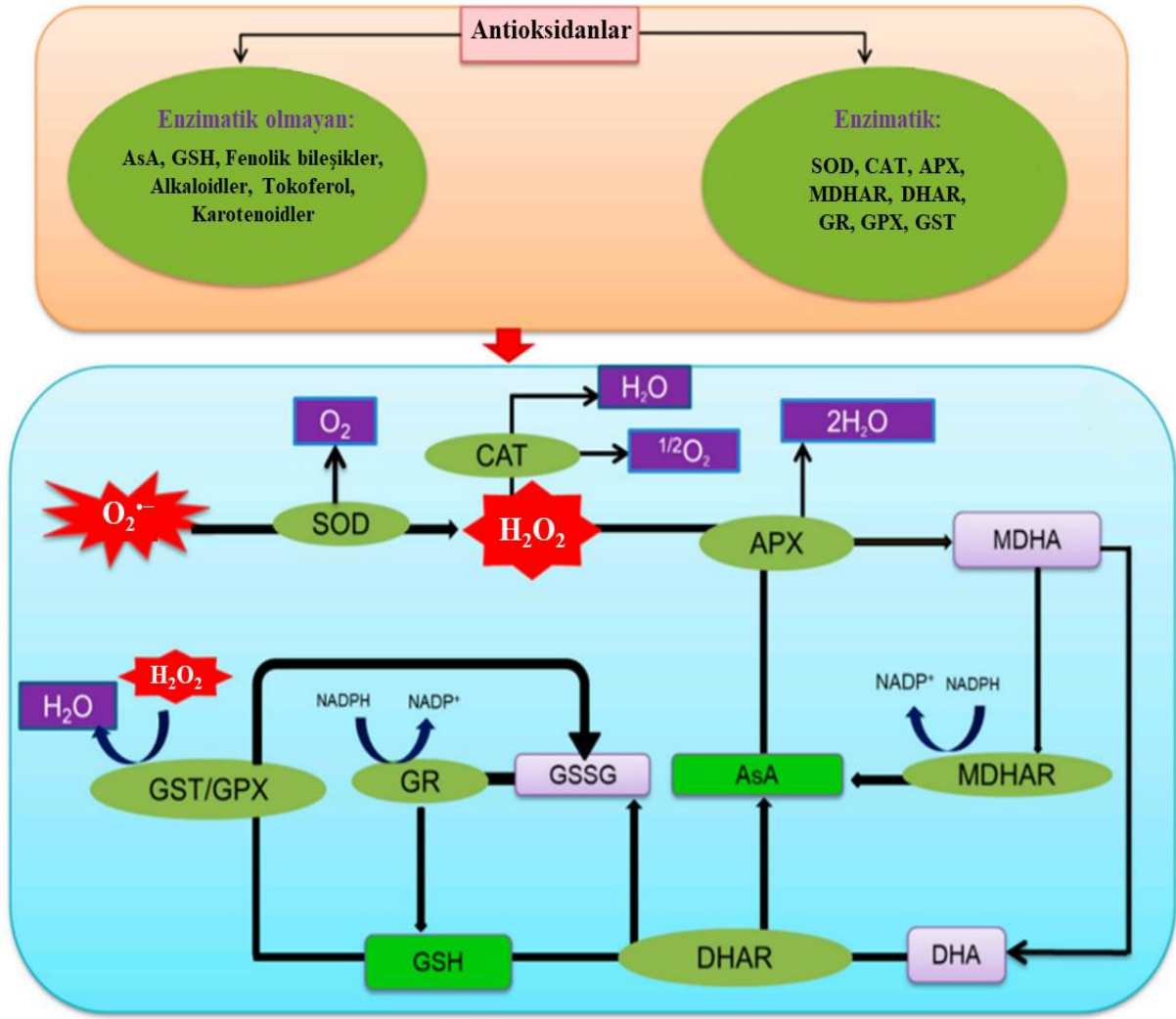


Şekil 1.9. Bitkilerde oksidatif stresin etkileri

Kaynak: (Hasanuzzaman vd., 2020b: 7)

ROS'un değişik konsantrasyonlarda farklı etkilere sahip olmasından dolayı bitkilerin ROS tepkileri de doza bağlı olarak değişmektedir. Düşük ya da orta konsantrasyonlarda ROS'lar, hücre içi sinyal kaskadlarında ikincil mesajcı görevi görmektedir. Böylece bitki hücrelerinde programlanmış hücre ölümü, stoma kapanması, biyotik ve abiyotik strese karşı tolerans kazanılması gibi çeşitli bitki tepkilerinin oluşmasına aracılık etmektedir. Fakat yüksek konsantrasyonlarda ROS'lar, hüresel hasara ve hatta hücre ölümüne yol açmaktadır (Bhattacharjee, 2012: 4; Sharma vd., 2012: 5). ROS'un sinyal mesajcısı görevinin mi yoksa zararlı etkisinin mi gerçekleşeceği ROS üretimi ve ROS'u temizleyen enzimlerin aktivasyonu arasındaki denge tarafından belirlenmektedir (Qamer vd., 2021: 3).

Antioksidanlar, doğrudan ya da dolaylı olarak ROS'un temizlenmesini ve ROS üretiminin kontrol altında tutulmasını sağlamaktadır. ROS'un aşırı üretimini engelleyen antioksidan savunma sistemi, enzimatik antioksidanlar ile düşük moleküler ağırlıklı enzimatik olmayan antioksidanlardan oluşmaktadır (Şekil 1.10) (Hasanuzzaman vd., 2020b: 15; Mohammadi vd., 2021: 9).



Şekil 1.10. Bitkilerdeki antioksidan çeşitleri ve antioksidanların ROS detoksifikasyon mekanizmaları

Kaynak: (Hasanuzzaman vd., 2020a: 17)

1.3.3. Bazı Enzimatik Antioksidan Savunma Sistemi Bileşenleri

1.3.3.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) reaktif oksijen türlerine karşı ilk savunma hattını oluşturan antioksidatif enzimdir. Oksidatif strese duyarlı tüm aerobik organizmalarda ve hücre altı bileşenlerde bulunan SOD, süperoksit radikalının hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eder (Karuppanapandian vd., 2011: 717; Mehla vd., 2017: 8). SOD, süperoksit radikalini detoksifiye ederek metal katalizli Haber-Weiss reaksiyonu yoluyla hidroksil radikali üretilmesi riskini de azaltmaktadır (Berwal ve Ram, 2018: 3).

Metalloenzim ailesi olan SOD'ların, bakır ve çinko SOD (Cu/Zn-SOD), mangan SOD (Mn-SOD) ve demir SOD (Fe-SOD) olmak üzere aktif bölgelerindeki metal kofaktörüne göre bitkilerde üç izozimi mevcuttur (del Río vd., 2018: 3). Bu SOD izoformları, hücrenin farklı bölümlerinde bulunmaktadır. Fe-SOD kloroplastta, Mn-SOD mitokondri ve peroksizomda Cu/Zn-SOD ise kloroplast, sitozol, peroksizom ve muhtemelen hücre dışı boşlukta lokalizedir (Alscher vd., 2002: 1332). Yapısal olarak Fe-SOD ve Mn-SOD enzimleri birbirine benzerken Cu/Zn-SOD farklıdır. Üç SOD izoformunun hidrojen peroksit ve potasyum siyanüre (KCN) karşı değişen hassasiyetlerine göre deneysel olarak da ayrımı yapılabilmektedir. Cu/Zn-SOD hem hidrojen peroksit hem de potasyum siyanüre duyarlı iken, Fe-SOD sadece hidrojen peroksit duyarlıdır. Mn-SOD ise her iki inhibitöre karşı da dirençlidir (Bowler vd., 1992: 85).

Yapılan çalışmalarda, çeşitli abiyotik streslere maruz kalan bitkilerde SOD aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (Pandhair ve Sekhon, 2006: 73; Yin vd., 2008: 49; Armendariz vd., 2016: 124). Artan SOD aktivitesi genellikle bitkilerin abiyotik streslere karşı artan toleranslarıyla ilişkilendirilmektedir (Dar vd., 2017: 37). Bitkilerin hayatta kalmasında kritik bir rol oynayan SOD'ların yukarı regülasyonu, abiyotik streslerin neden olduğu oksidatif stres ile mücadele edilebilmektedir (Ahmad vd., 2010: 163).

1.3.3.2. Katalaz (CAT)

Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) keşfedilip karakterize edilen ilk antioksidatif enzimdir (Mhamdi vd., 2010: 4199). Katalaz, bitkilerin ve diğer aerobik organizmaların peroksizomlarında bulunmaktadır. Fakat sitoplazma, mitokondri ve kloroplastlarda da tespit edilmiştir. Tetramerik yapıda olup hem içeren katalaz, siyanür gibi hem protein inhibitörleri tarafından inhibe edilebilmektedir (Anjum vd., 2016: 19003-19004; Leung, 2018: 27; Pan vd., 2022: 2).

Katalaz, hidrojen peroksidin su ve oksijene dönüşümünü katalize etmektedir. CAT'ların hücrel indirgeme eşdeğeri gerektirmemesi onları bitkilerdeki diğer hidrojen peroksidi indirgeyen enzimlerden farklılaştırmaktadır. Katalaz, hidrojen peroksitine karşı yüksek spesifiteye sahip olsa da organik peroksitlere karşı zayıf aktiviteye sahiptir (Sharma vd., 2012: 11).

Hidrojen peroksidin konsantrasyonuna bağlı olarak katalaz, peroksidatik ya da katalitik davranmaktadır. Hidrojen peroksidin düşük konsantrasyonunda ($< 10^{-6}$ M) katalaz

peroksidatik davranır ve etanol, formaldehit gibi çeşitli hidrojen vericileri oksitler. Peroksidatik reaksiyon ile katalaz, hidrojen peroksit ve toksinlerden yararlı ürünler ve su üretmektedir. Hidrojen peroksidin yüksek konsantrasyonlarında ise katalaz katalitik davranarak toksik hidrojen peroksidi yüksek hızda ayrıştırır. Bu katalitik reaksiyonda hidrojen peroksit, hidrojen molekülünün hem alıcısı hem de vericisi olarak davranarak su ve moleküler oksijen oluşturulmaktadır (Sharma ve Ahmad, 2014: 139; Mehla vd., 2017: 9).

Bitki CAT'ları ekspresyon özelliklerine göre Sınıf I, Sınıf II ve Sınıf III olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır. Sınıf I CAT'lar fotosentetik dokularda, Sınıf II CAT'lar vasküler dokularda ve Sınıf III CAT'lar reproduktif dokularda eksprese edilmektedir (Pan vd., 2022: 2). Metal stresi altında bitkilerdeki CAT aktivitesi farklı sonuçlar verebilmektedir. Metallerin CAT da dahil antioksidan enzimlerin aktiviteleri üzerindeki etkisi bitki türü, doku tipi, bitki yaşı, metal tipi, konsantrasyonu ve maruz kalma süresi gibi faktörlere göre değişebilmektedir (Anjum vd., 2016: 19007). Fakat abiyotik streslere maruz kalan bitkilerde antioksidan savunmanın aktivasyonunun bir parçası olarak CAT aktivitesinde de sıklıkla eşzamanlı bir artış olduğu belirtilmektedir (Leung, 2018: 27).

1.3.3.3. Askorbat Peroksidaz (APX)

Askorbat peroksidaz (APX, EC 1.11.1.11), AsA-GSH döngüsünün merkezi bir bileşeni olup hücre içi ROS seviyelerinin kontrolünde esansiyel bir rol oynamaktadır (Sharma vd., 2012: 12). Sınıf I hem-peroksidaz ailesine mensup olan APX, yüksek bitkiler de dahil çoğu ökaryotta bulunmaktadır (Anjum vd., 2016: 19012). APX, elektron verici olarak askorbatı kullanarak hidrojen peroksidi suya indirgemekte ve aynı zamanda askorbatın tek değerlikli oksidantı olan monodehidroaskorbat (MDHA) üretmektedir (Shigeoka vd., 2002: 1305). APX'i diğer peroksitlerden ayıran özelliği indirgeme gücünün kaynağı olarak askorbata bağlı olmasıdır. APX, askorbatın yokluğunda kararsız hale gelmektedir. Bunun yanında APX'ler hem-bağımlı oksido-redüktazlar olduklarından katalitik aktiviteleri için demir oldukça önemlidir. Demir eksikliği de APX aktivitesini azaltmaktadır (Pandey vd., 2017: 3).

Bitki APX'leri sitozol, mitokondri, peroksizom ve kloroplast dahil olmak üzere çeşitli hücresel bölmelerde bulunmaktadır (Anjum vd., 2016: 19013). Bitkilerde amino asit sekansı temelinde APX, hücre altı lokalizasyonuna göre beş izozim olarak sınıflandırılmaktadır. Bunlar sitozolik (cAPX), mitokondriyal (mitAPX), kloroplastik (chlAPX: stromal-APX ve tilakoidal-APX), peroksizomal/glioksizomal (mAPX) izoformlardır. Bu izozimler, spesifik

korunmuş domainler ve sinyal peptitleri dahil olmak üzere farklı yapısal ve kinetik özelliklere sahiptir (Pandey vd., 2017: 3).

Çevresel streslere maruz kalan bitkilerde diğer antioksidan enzimlerle birlikte genel olarak APX aktivitesi artmaktadır (Caverzan vd., 2012: 1011). Yapılan bir çalışmada nikel ve çinko stresi altında hardal otunda kontrole kıyasla APX aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Khan ve Khan, 2014: 1011). Diğer bir çalışmada ise bezelyede kadmiyum stresinin kontrole kıyasla APX aktivitesini %180, nikel stresinin %50 artırdığı gözlenmiştir (El-Amier vd., 2019: 7).

1.4. Hiperakümülatör Bitkiler ve Fitoremediasyon

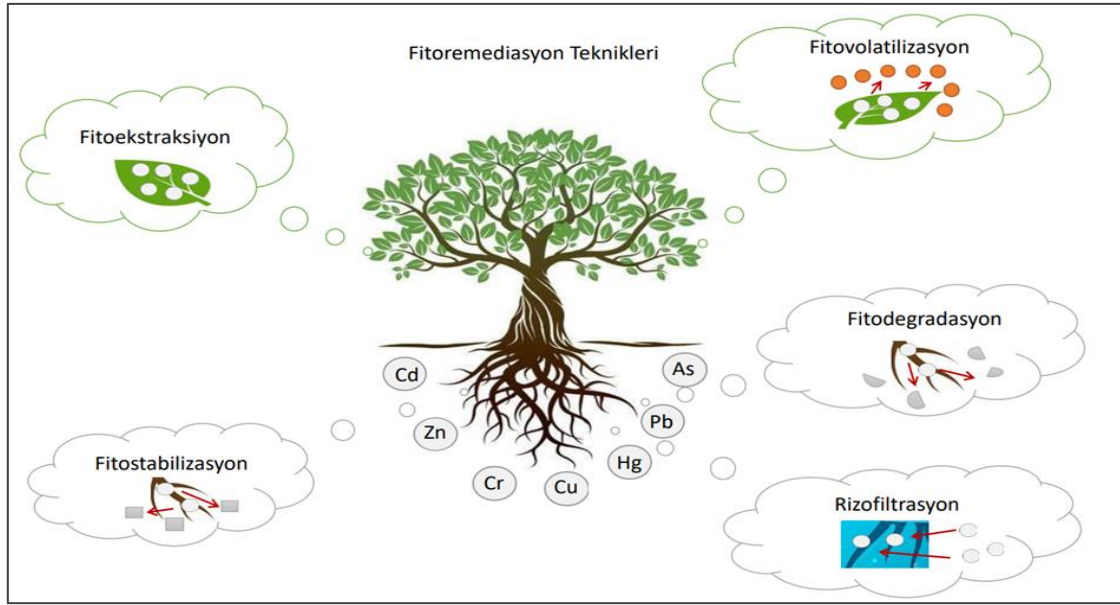
Ağır metallerin toksik seviyesini belirli bir eşik değerinde tolere edebilen bitkiler hiperakümülatörler olarak isimlendirilir. Baker ve Walker (1990), ağır metallerle kontamine olmuş topraklarda yetişen bitkileri stratejilerine göre metal dışlayıcıları, indikatörleri ve akümülatörleri/hiperakümülatörleri olmak üzere üç gruba ayırmıştır. Metal dışlayıcıları, ağır metallerin translokasyonunu sınırlamakta ve toprak üstü kısımlarında düşük seviyede kirletici bulundurmaktadır. Metal indikatörleri, metal alınımını ve sürgünlere taşınımını düzenlemekte veya pasif alım yapmaktadır. Metal indikatörleri topraktaki metal konsantrasyonu kadar metali toprak üstü kısımlarına alabilmektedir. Metal akümülatör/hiperakümülatörleri ise topraktaki ağır metal konsantrasyonundan daha fazlasını toprak üstü kısımlarında biriktirebilmektedir (Baker ve Walker, 1990: 157).

Hiperakümülatör bitkilerin tolere edebildiği ağır metal konsantrasyonu, her ağır metal için değişebilmekle birlikte sürgün kuru kütlelerinin %1 seviyesi Zn ve Mn için, %0,1 seviyesi As, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb, Se için ve %0,01 seviyesi Cd için eşik değeri kabul edilmektedir. Yaklaşık 450 bitki türü hiperakümülatör olarak sınıflandırılmıştır ve bunların %75 civarı nikel toleranslıdır (Visioli ve Marmiroli, 2013: 134; Singh vd., 2016: 4).

Hiperakümülatörler, topraktan absorbe ettikleri ağır metalleri köklerinde tutmayıp sürgünlerine taşır. Hiperakümülatör olmayan türlere göre toprak üstü organlarında 100-1000 kat daha fazla metal biriktirebilen hiperakümülatörler, ağır metallerin yüksek konsantrasyonlarına rağmen herhangi bir toksik etki göstermez (Singh vd., 2016: 4). Hiperakümülatör olmayan bitkilere kıyasla hiperakümülatör bitkilerin topraktan yüksek oranda ağır metalleri almaları, aldıkları bu metalleri kökten sürgünlerine doğru hızlı ve efektif bir şekilde taşıyabilmeleri ve bu ağır metallerin büyük miktarlarını yapraklarında detoksifiye

ve sekestre edebilmeleri ayırt edici özelliklerindedir (Rascio ve Navari-Izzo, 2011: 171). Hiperakümülatörler, bir fitoremediasyon çeşidi olan fitoekstraksiyon için mükemmel adaylardır (Rascio ve Navari-Izzo, 2011: 175).

Fitoremediasyon teknolojisi, ağır metallerle kontamine olmuş alanların temizlenmesinde bitkilerin kullanımına dayanan çevre dostu bir teknolojidir ve fitoekstraksiyon, fitostabilizasyon, rizofiltrasyon, fitovolatilizasyon, fitodegradasyon olmak üzere farklı tipleri mevcuttur (Şekil 1.11) (Terzi ve Yıldız, 2011: 1).



Şekil 1.11. Fitoremediasyon teknikleri

Kaynak: (Favas vd., 2014: 486; Awa ve Hadibarata, 2020: 7)

- **Fitoekstraksiyon:** Fitoakümülyasyon, fitoabsorbsiyon veya fitosekestrasyon olarak da bilinen fitoekstraksiyon tekniği, hiperakümülyasyon mekanizması yoluyla gerçekleşmektedir. Bu teknik, topraktaki kirleticilerin bitki kökleri tarafından alınmasını ve toprak üstü biyokütleye geçerek burada birikmesini ifade etmektedir. Daha sonrasında bu teknikte kullanılan bitkiler hasat edilerek yok edilmektedir. Yüksek seviyelerde metal kirliliği olan alanlarda bitki büyümesi sürdürülemeyeceği için fitoekstraksiyon, metal kirliliğinin düşük veya orta düzeyde olduğu alanlarda kullanılabilen bir tekniktir (Ghosh ve Singh, 2005: 217; Terzi ve Yıldız, 2011: 3; Ali vd., 2013: 872).

- Fitostabilizasyon: Kompleksleşme, çökelme, kökler tarafından sorpsiyon, metal değerlik indirgemesi gibi yollarla gerçekleşen fitostabilizasyon, fitoimmobilizasyon olarak da bilinmektedir. Fitostabilizasyon tekniğinde, bitki kökleri, kontamine olmuş topraklardaki kirleticilerin hareketliliğini ve biyoyararlanımını azaltmaktadır. Böylece, kirleticilerin yeraltı sularına taşınması veya besin zincirine karışması engellenmiş olmaktadır. Fakat bu teknik, ağır metallerin hareketini kısıtlamasına rağmen toprakta ağır metaller hâlâ daha bulunduğu için geçici bir çözümdür ve düzenli olarak takip gerektirmektedir (Ghosh ve Singh, 2005: 216; Ali vd., 2013: 872).
- Rizofiltrasyon: Kirletici kontaminasyonunun düşük olduğu sulu kaynaklarda, bitki köklerinin kirleticileri absorbe etmesi, konsantre etmesi ve çöktürmesidir. Hiperakümülatörler dışında diğer bitki türlerinin de kullanılabildiği bu teknikte karasal bitkiler uzun kök sistemlerinden dolayı tercih edilmektedir (Ghosh ve Singh, 2005: 216; Awa ve Hadibarata, 2020: 7).
- Fitovolatilizasyon: Kirleticilerin bitki kökleri tarafından alınıp, daha az toksik ve uçucu formlara dönüştürülerek bitkinin havasal kısımlarından atmosfere salınmasını ifade eden tekniktir. Fitovolatilizasyon, özellikle civa ve selenyum gibi uçuculuğu yüksek ağır metallerin uzaklaştırılmasında kullanılsa da kirleticileri tamamen uzaklaştırmayıp topraktan atmosfere aktarması kullanımını sınırlayan bir faktör olmaktadır (Ali vd., 2013: 872; Awa ve Hadibarata, 2020: 7).
- Fitodegradasyon: Organik kirleticilerin bitkiler tarafından daha basit moleküllere parçalanmasıdır. Rizosferik mikroorganizmalara bağımlı olmayan bu parçalanma işlemi, dehalojenaz, oksijenaz gibi enzimler kullanılarak gerçekleşmektedir. Fitodegradasyon tekniği, ağır metaller biyolojik olarak parçalanmadığı için yalnızca organik kirleticileri uzaklaştırmakla sınırlı kalmaktadır. Rizosferik mikrobiyal aktiviteye bağımlı olmayan fitodegradasyon tekniğinin aksine rizodegradasyon bu aktiviteye bağımlı gerçekleşmektedir. Fitodegradasyondan daha yavaş süreçte gerçekleşen rizodegradasyon, rizosferdeki mikroorganizmalar tarafından organik kirleticilerin parçalanmasını ifade etmektedir (Ghosh ve Singh, 2005: 217; Ali vd., 2013: 872).

1.5. Literatür Özeti

Salatalık bitkisine kurşun stresinin uygulandığı bir çalışmada; kurşun toksisitesinin biyokütleyi azalttığı ve sürgünlerdeki kalsiyum, demir, potasyum iyonlarını azaltarak besin dengesizliğine yol açtığı tespit edilmiştir. Kurşuna maruz kalan salatalık bitkisinde; MDA, hidrojen peroksit, askorbik asit ve flavonoid konsantrasyonlarında; CAT, APX ve POD enzimlerinin aktivitelerinde artış olduğu belirlenmiştir (Khaliq vd., 2021: 6). Salatalık bitkisine bakır nanopartiküllerinin uygulandığı bir çalışmada ise; salatalık bitkisinin total biyokütlesinin, klorofil *a* ve *b* içeriğinin azaldığı, elektrolit sızıntı, hidrojen peroksit ve MDA içeriğinin ise arttığı gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, bakır stresine maruziyet sonucunda salatalık bitkisinin kök ve sürgünlerindeki *Cu-Zn SOD* gen ekspresyonunun yukarı regüle olduğu ifade edilmiştir (Mosa vd., 2018: 1).

Proso darı bitkisinde (*Panicum miliaceum* L.) bakır toksisitesinin klorofil içeriğini azalttığı, fotosentetik aktiviteyi yavaşlattığı ve büyümeyi engellediği ifade edilmiştir. Bakıra maruz bırakılmış örneklerde MDA ve H₂O₂ içeriğinin, SOD, CAT ve POD enzimlerinin aktivitelerinin kontrole kıyasla arttığı gösterilmiştir (Saman ve Sepehri, 2021: 3065).

Zhang ve arkadaşlarının (2022), domatesle yaptıkları bir çalışmada, bakır toksisitesinin H₂O₂ konsantrasyonunu, MDA ve prolin içeriğini artırdığı belirlenmiştir. Bakır uygulamasının domates yapraklarında, kontrole kıyasla POD aktivitesini %134, APX aktivitesini %27,69 artırdığı fakat CAT aktivitesini %60,28 ve SOD aktivitesini %11,71 azalttığı rapor edilmiştir (Zhang vd., 2022: 10).

Çemen otunda (*Trigonella foenum-graecum*) farklı konsantrasyonlardaki bakırın (0,005; 0,1; 1; 10 ve 20 mM) etkilerinin incelendiği bir çalışmada, 0,005 ve 0,1 mM CuSO₄ uygulanan örneklerde morfolojik herhangi bir toksik semptomun olmadığı fakat daha yüksek konsantrasyonlarda bakır uygulanan örneklerin kloroz ve senesens belirtileri gösterdiği tespit edilmiştir. Yüksek konsantrasyonlardaki bakırın, lipid peroksidasyon ve hidrojen peroksit oranını artırdığı, yaprak klorofil ve karotenoid içeriğinde ise azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Total fenol ve flavonoid seviyelerinin düşük bakır konsantrasyonlarında arttığı 10 mM bakır konsantrasyonunda kontrol seviyelerine geldiği ya da daha azaldığı, yüksek bakır konsantrasyonunda APX aktivitesinin ise iki kattan daha fazla artış gösterdiği belirtilmiştir (Elleuch vd., 2013: 46).

Wang ve arkadaşları (2011), farklı konsantrasyonlardaki bakır uygulamasını (0, 10, 30, 50, 100 μM) yonca bitkisinde incelemişler ve bakır stresinin H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ ve OH^{\cdot} seviyelerinde artışa sebep olduğunu gözlemlemişlerdir. Bakır stresinin düşük konsantrasyonlarında bitki örneklerinin köklerinde CAT, APX ve GR aktivitelerinin arttığını, 10 μM Cu konsantrasyonunda CAT, 30 μM Cu konsantrasyonunda APX ve GR aktivitelerinin maksimum seviyeye ulaştığını ve konsantrasyon yükseldikçe bu enzimlerin aktivitelerinin düştüğünü belirlemişlerdir. Bakır konsantrasyonu yükseldikçe POD aktivitesinin arttığını, SOD aktivitesinin ise azaldığını tespit etmişlerdir (Wang vd., 2011a: 418). Pirinçte bakır stresinin incelendiği bir çalışmada da artan bakır konsantrasyonu ile birlikte H_2O_2 seviyesinin, lipid peroksidasyonunun, SOD, GPX, APX, GR aktivitelerinin, askorbat, glutatyon ve prolin içeriğinin arttığı, ancak CAT aktivitesinin kontrole göre önemli bir değişiklik göstermediği ifade edilmiştir (Thounaojam vd., 2012: 33).

Çeşitli arpa genotiplerinde kurşun stresinin tohum çimlenme yüzdesi, kök ve sürgün uzunluğunu engelleyici etki gösterdiği; kontrole göre prolin içeriğini ve lipid peroksidasyonunu artırdığı bulunmuştur (Al-Ghzawi vd., 2019: 58). Reddy ve arkadaşlarının (2005) at yemi olarak kullanılan at gramı (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) ve nohut (*Cicer arietinum* L.) ile yaptıkları çalışmada kurşun toksisitesinin kontrole kıyasla MDA içeriğini, SOD, CAT, POD, GR ve GST aktivitelerini artırdığı bildirilmiştir (Reddy vd., 2005: 97). Kurşun toksisitesi ile ilgili yapılan bir diğer çalışmada mısır fideleri kurşuna maruz bırakılmış ve artan kurşun konsantrasyonu ile birlikte MDA seviyesinin yükseldiği, fotosentetik pigmentlerin seviyesinin azaldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte artan kurşun seviyesi ve maruz kalma süresinin uzamasıyla paralel olarak CAT ve SOD aktivitesinde ve askorbik asit içeriğinde artış olduğu ifade edilmiştir (Gupta vd., 2009: 479).

Mostofa ve Fujita (2013), pirinç ile yaptıkları bir çalışmada 75 ve 150 μM bakırın kloroza, nekroza, yaprak kıvrılmasına; MDA ve H_2O_2 içeriğinde artışa ve klorofil içeriğinde azalmaya neden olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca askorbat içeriğinin kök ve yapraklarda azaldığını, glutatyon içeriğinin ise köklerde azalıp yapraklarda arttığını bildirmişlerdir. Köklerde her iki bakır konsantrasyonunda da SOD, APX, GPX, GR aktivitelerinin arttığını, DHAR aktivitesinin azaldığını, CAT aktivitesinin 75 μM bakır konsantrasyonunda değişmediğini, 150 μM 'da azaldığını, MDHAR aktivitesinin ise 75 μM 'da arttığını, 150 μM 'da değişmediğini belirtmişlerdir (Mostofa ve Fujita, 2013: 959).

Turunç (*Citrus aurantium L.*) bitkisine kurşun ve bakır uygulamasının yapıldığı bir çalışmada, bitkinin gelişiminde gerileme, pigmentlerin konsantrasyonlarında ve fotosentetik aktivitede azalma gözlenmiştir. Hem kurşun hem de bakır uygulamasında kontrole ve düşük konsantrasyondaki metal maruziyetine göre, yüksek miktarda ağır metale maruz kalan örneklerde, antioksidanlarda kayda değer bir artış belirlenmiş; MDA ve hidrojen peroksit konsantrasyonlarında artış olduğu ifade edilmiştir (Giannakoula vd., 2021: 1).

Kurşun toksisitesinin tartarya karabuğdayında (*Fagopyrum tataricum Gaertn.*); SOD, CAT, APX, POD, GST ve GR ile prolin, şeker ve GSH ozmolitlerini zaman ve konsantrasyona bağlı olarak artırdığı rapor edilmiştir (Pirzadah vd., 2020: 1). Kurşun toksisitesinin pamukta klorofil *a*, klorofil *b*, toplam klorofil, karotenoidler gibi fotosentetik pigmentleri azalttığı, membran hasarını ve elektrolit sızıntıyı ise artırdığı gözlenmiştir. Bununla birlikte kontrole kıyasla kurşun stresinin pamukta SOD, CAT, APX ve GPX aktivitelerini artırdığı ifade edilmiştir (Bharwana vd., 2013: 5).

Malar ve arkadaşları (2016) su sümbülünde (*Eichhornia crassipes*) kurşun toksisitesi üzerine yaptıkları çalışmada; 1000 mg/L Pb maruziyetinde kontrol grubuna kıyasla biyokütlenin %33,28 azaldığını ve bitki büyümesinin %50 inhibe edildiğini gözlemişlerdir. Gövdeye göre kökte daha fazla kurşun birikiminin olduğunu ve artan kurşun konsantrasyonuna bağlı olarak klorofil içeriğinin azaldığını bildirmişlerdir. 400 mg/L Pb konsantrasyonuna kadar MDA miktarının arttığını ancak yüksek konsantrasyonlarda azalmanın olduğunu tespit etmişlerdir. Artan Pb konsantrasyonuyla birlikte APX ve POX aktivitelerinin arttığını, CAT ve SOD aktivitelerinin 800 mg/L Pb konsantrasyonuna kadar arttığını fakat daha yüksek konsantrasyonlarda azaldığını göstermişlerdir. Yüksek kurşun konsantrasyonlarında, CAT ve SOD aktivitesinin azalmasının nedeninin ROS üretiminin aşırı artmış olmasından kaynaklı olabileceğini ifade etmişlerdir. Antioksidatif enzimlerin aktivitelerindeki artış ile su sümbülünün kurşun maruziyetini tolere edebilecek etkin bir mekanizmaya sahip olduğunu belirtmişlerdir (Malar vd., 2016: 1).

Lombardi ve Sebastiani (2005) yapmış oldukları çalışmada, kiraz eriğinin (*Prunus cerasifera*) 50 µM konsantrasyona kadar bakırı tolere edebildiğini ancak 100 µM bakır konsantrasyonunda bitki örneklerinin hem yaş hem kuru ağırlık için relatif büyüme oranının düştüğünü ve nekroza kadar ilerleyen şiddetli kararma meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Aynı zamanda bakır toksisitesinin total katalaz ve süperoksit dismutaz aktivitesini artırdığını

ve *Sod* ile *Cat* geninin ekspresyonunu eş zamanlı olarak indüklediğini bildirmişlerdir (Lombardi ve Sebastiani, 2005: 797).

Lamhamdi ve arkadaşlarının (2011) buğday fidelerinde kurşun toksisitesi üzerine yaptıkları bir çalışmada, kurşun stresinin doza bağlı olarak çimlenme yüzdesini azalttığı, köklerde lipid peroksidasyonunu, çözümlü protein konsantrasyonunu ve prolin içeriğini artırdığı gözlenmiştir. Buna ek olarak SOD, POD, CAT, APX, GST gibi antioksidan enzim aktivitelerinin genellikle doza bağlı bir şekilde kurşun varlığında önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir (Lamhamdi vd., 2011: 118).

Alaraidh ve arkadaşları (2018), çemen otunda kurşun, kadmiyum ve krom toksisitesinin etkileri üzerine yaptıkları bir çalışmada, kurşun stresinin çimlenme yüzdesini, kök ve sürgün uzunluğunu ve kök taze ağırlığını azalttığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte kurşun stresinin kontrol grubuna kıyasla CAT, APX ve POD enzimlerini kodlayan genlerin mRNA ekspresyon seviyelerinde önemli ölçüde artışa sebep olduğunu ifade etmişlerdir. Kadmiyum ve kroma göre kurşun toksisitesinin, antioksidan enzimleri kodlayan genlerin ekspresyon seviyelerinde daha fazla değişime yol açtığı, CAT kodlayan genin ekspresyon seviyesinde 1.33 kat, APX kodlayan genin ekspresyon seviyesinde 1.63 kat ve POD kodlayan genin ekspresyon seviyesinde 1.48 kat değişikliğe neden olduğunu rapor etmişlerdir (Alaraidh vd., 2018: 93).

Elsholtzia argyi bitkisinin biri Pb/Cu maden alanından alınan ve diğeri kontamine olmamış tarımsal alandan toplanan iki ekotip örneğinde kurşunun etkilerinin incelendiği bir çalışma yapılmıştır. Maden bölgesindeki ekotipin yüksek kurşun seviyelerine daha toleranslı olduğu belirlenmiştir. Uygulanan bütün kurşun seviyelerinde, maden bölgeden alınan ekotipin daha iyi geliştiği ve toksisite semptomu göstermediği ama kontamine olmamış alandan alınan ekotipin büyümesinin engellendiği ve 1 haftalık uygulamadan sonra yapraklarında solma belirtileri olduğu gözlenmiştir. Kurşunun, her iki ekotipin kök morfolojik organizasyonu ve kök aktivitesi üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğu ancak maden bölgesindeki ekotipte bu olumsuzlukların keskin olmadığı ve bu ekotipin kök aktivitesini geri kazandığı ifade edilmiştir (Islam vd., 2007: 806).

Literatürde ağır metallerin etkilerinin farklı bitki türlerinde incelendiği çalışmalar mevcut olmasına rağmen bal kabağında (*Cucurbita moschata*) ağır metal stresinin araştırıldığı çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Örneğin, yakın zamanda arsenik toksisitesinin bu bitkide çalışıldığı bilinmektedir. Bu araştırmada, arsenik uygulanan örneklerin kontrol grubuna

kıyasla büyüme parametrelerinin, net fotosentetik hızın, klorofil *a*, klorofil *b* ve toplam klorofil miktarının azaldığı belirlenmiştir. Arsenik stresine maruz kalan bal kabağı fidelerinde, fenolik ve flavonoid bileşiklerin sentezinin azaldığı; SOD, CAT ve APX'in aktivitelerinin ise arttığı tespit edilmiştir (Mushtaq vd., 2020: 1413). Bal kabağında bu ve benzeri ağır metal çalışmaları oldukça az sayıda olduğundan literatürde önemli bir boşluk bulunmaktadır. Bal kabağında özellikle kurşun ve bakır stresinin hem ekofizyolojik hem de moleküler seviyede araştırıldığı herhangi bir çalışmaya ise rastlanmamıştır. Bu yüzden çalışmamızda farklı konsantrasyonlarda kurşun (25 ve 50 mM) ve bakır (50 ve 100 mM) uygulanan bal kabağında antioksidan enzimlerin aktiviteleri spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmiştir. Aynı zamanda bu antioksidan enzimlerin gen ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimler kantitatif gerçek zamanlı PZR ile tespit edilmiştir.

2. MATERYAL METOD

2.1. Bitki Örneklerinin Yetiştirilmesi, Kurşun ve Bakır Stresi Uygulamaları

Bu çalışmada bal kabağı (*Cucurbita moschata* Duch.) deney materyali olarak kullanılmıştır. Bal kabağı tohumları sterilizasyon için %10'luk NaClO (Tekkim) içerisinde 10 dakika bekletilip ardından 3 kez distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra her saksıya 12 adet tohum olacak şekilde ekim yapılmıştır. 5 grup (kontrol, 25 mM kurşun, 50 mM kurşun, 50 mM bakır ve 100 mM bakır) ve 3 tekrarlı olacak şekilde tohumlar 15 gün süresince iklim kabininde (DigiTech) distile su ile sulanmıştır. 15. günün sonunda kontrol grubu distile su ile sulanmaya devam edilmiş, diğer gruplar ise 25 mM Pb(NO₃)₂ (Carlo Erba) ve 50 mM Pb(NO₃)₂, 50 mM CuSO₄.5H₂O (A.D.R.) ve 100 mM CuSO₄.5H₂O olacak şekilde sulanmıştır (Şekil 2.1). 7 kez ağır metal uygulaması yapılmış ve bitki örnekleri 4 haftanın sonunda toplanmıştır.



Şekil 2.1. Ağır metal uygulanmadan önce (solda) ve 7. uygulamanın ardından (sağda) saksıların genel görünümü

2.2. Bitkilerin Ekolojik Ölçümlerinin Belirlenmesi

Saksılarından çıkarılan bitki örnekleri topraklarından temizlenmiştir. Fidelerin kök-gövde uzunlukları (cm) cetvel ile ve kök-gövde yaş ve kuru ağırlıkları (g) hassas terazi ile belirlenmiştir. Yaş ağırlıkları alınan örnekler, 70 °C'ye ayarlı etüvde 72 saat bekletilip kurutulduktan sonra hassas terazi (RADWAG) ile örneklerin kök-gövde kuru ağırlık ölçümleri alınmıştır. Örneklerin kök ve gövde biyokütleleri ile tolerans indeksleri hesaplanmıştır.

2.3. Klorofil İçeriğinin Belirlenmesi

Örneklerin klorofil *a*, *b* ve toplam klorofil içeriği belirlenmiştir. Her bir deney grubuna ait taze yapraklardan alınan 0,05 g örnekler %80'lik 15 ml aseton (Merck) ile homojenize edilmiş ve spektrofotometrede (AgileSpec) 645 nm ve 663 nm dalga boylarında absorbans değerleri okunmuştur. İki farklı dalga boyundaki absorbans değerleri aşağıda verilen denklemlerde yerine koyularak klorofil *a*, *b* ve toplam klorofil içerikleri mg/ml olarak belirlenmiştir (Arnon, 1949: 3).

Klorofil a: $[12.7 (D_{663}) - 2.69 (D_{645})] (V/1000W)$

Klorofil b: $[22.9 (D_{645}) - 4.68 (D_{663})] (V/1000W)$

Total Klorofil: $[20.2 (D_{645}) + 8.02 (D_{663})] (V/1000W)$

D: Klorofil ekstratının belirtilen dalga boyundaki absorbans değeri

V: % 80'lik aseton hacmi

W: Ekstre edilen dokunun gr olarak yaş ağırlığı

2.4. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi İçin Yapraklardan Protein Ekstraksiyonu

Antioksidan enzimlerin aktivitelerinin belirlenmesi için yapraklardan protein ekstraksiyonu yapılmıştır. 0,1 g yaprak örnekleri, sıvı azot ile ezilmiş ve 2 ml ekstraksiyon tamponu [50 mM K₂HPO₄ (Carlo Erba), 50 mM KH₂PO₄ (Carlo Erba), %1 PVP (Biomatik), 1mM EDTA (VWR Chemicals)] ile homojenize edilmiştir. Bu karışım vorteksle (WiseMix® VM-10) 15 saniye boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra örnekler 20000 g'de 20 dk +4 °C'de santrifüj (HERMLE) edilmiş ve süpernatant kısmı yeni eppendorf tüpe alınıp enzim aktivitesi tayininde kullanılmak üzere -80 °C'ye (Thermo Scientific) kaldırılmıştır.

APX aktivitesinin tayininde kullanılacak ekstraksiyon tamponuna ayrıca 5mM askorbik asit (Tekkim) de eklenmiştir (Harinasut vd., 2003: 110).

2.5. Lipid Peroksidasyonunun Belirlenmesi

Bitki örneklerinde lipid peroksidasyonu indikatörü olarak MDA (malondialdehit) içeriği belirlenmiştir. 0,25 g yaprak örnekleri tartılmış ve 5 ml %0,1'lik TCA (trikloroasetik asit) (Bio Basic) ile homojenize edilmiştir. Sonra homojenat, 15000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve santrifüj edilen örneklerin berrak kısımlarından 500 µl alınıp üzerine 2 ml %20'lik TCA içerisinde çözülmüş %0,5'lik TBA (tiyobarbitürik asit) (Carlo Erba) eklenmiştir.

Örnekler, 95 °C'de 30 dk inkübe edilip sonra buz banyosunda soğutulmuştur. Daha sonra 10000 rpm'de 10 dk santrifüj yapılmış ve berrak kısımdan alınıp 532 nm ve 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbans değerleri okutulmuştur. Bu absorbans değerleri aşağıdaki formülde yerine yazılarak malondialdehit (MDA) değerleri bulunmuştur (Heath ve Packer, 1968: 190; Sairam ve Saxena, 2000: 56).

$$\text{MDA (nmol ml}^{-1}\text{)} = [(A_{532}-A_{600})/155\ 000] 10^6$$

2.6. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

2.6.1. Toplam Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Enzim aktivitelerinin hesaplanmasında protein miktarlarını da bilmek gerektiğinden elde edilen yaprak ekstraktlarının protein içerikleri belirlenmiştir. Protein miktarları, Bradford metodu ve sığır serum albümini (BSA) standardı kullanılarak belirlenmiştir (Bradford, 1976: 249). Protein içeriği belirlenirken 780 µl dH₂O üzerine 20 µl enzim çözeltisi konulmuş ve bu karışımın üzerine 200 µl 5X Bradford (Serva) çözeltisi eklenerek vortekste karıştırılmıştır. Daha sonra oda sıcaklığında ve karanlıkta 5 dakika bekletilen karışımın absorbans değeri spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda üç tekrarlı olacak şekilde okutulmuştur. Standart grafiğinin oluşturulması için 1 mg/ml BSA (Sigma) stoğu kullanılmıştır. BSA stoğundan 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µg protein alınarak absorbans değerleri ölçülmüştür. Standartlara ait absorbans değerleri kullanılarak bir grafik oluşturulmuştur. Grafikten elde edilen formül ($y = 0,0073x - 0,0053$) kullanılarak protein konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin konsantrasyonları belirlenmiştir.

2.6.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Belirlenmesi

SOD aktivitesi, mg protein başına birim olarak ifade edilmektedir. SOD enzim aktivitesinin bir birimi (U), NBT (Nitro Blue Tetrazolyum) redüksiyonunu %50 oranında inhibe etmek için gereken SOD enzim miktarı olarak tanımlanır (Kumar vd., 2012: 7). SOD aktivitesinin belirlenmesi için 20 µl enzim özütü ve 1 ml SOD tamponu [0,05 mM Na₂HPO₄ (Carlo Erba), 0,033 mM NBT (TCI), 0,0033 mM Riboflavin (Alfa Aesar), 10 mM L-metiyonin (AMRESCO), 0,66 mM EDTA (VWR)] 10 dk süre ile 300 µmol m⁻²s⁻¹ ışık yoğunluğunda beyaz floresan ışığına maruz bırakılarak absorbans değerleri köre karşı spektrofotometrede (AgileSpec) 560 nm dalga boyunda okunmuş ve % inhibisyon değerlerinin hesaplanması için kaydedilmiştir. % inhibisyon değerlerinin hesaplaması aşağıda verilen formüle göre yapılmıştır.

% inhibisyon= (Kontrolün Abs.-Örneğin Abs.) X 100/ Kontrolün Abs.

Örnek: Enzim özütü içeren SOD reaksiyon tamponu

Kontrol: Enzim özütü içermeyen SOD reaksiyon tamponu

2.6.3. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalaz aktivitesi, hidrojen peroksidin katalaz enziminin etkisi ile su ve oksijene parçalanmasından kaynaklanan 240 nm dalga boyunda absorbanstaki azalmaların oda sıcaklığında spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle belirlenmektedir. CAT aktivitesinin belirlenmesi için 20 µl enzim özütü ve 1 ml CAT reaksiyon tamponu [50 mM K₂HPO₄, 50 mM KH₂PO₄ ve 30 mM H₂O₂ (Carlo Erba)] birlikte tüpe aktarılmış ve pipetaj yapılarak karıştırılmıştır. Enzim özütü içermeyen CAT reaksiyon tamponu kör olarak kullanılmıştır. Köre karşı örneklerin 240 nm dalga boyunda 3 dk boyunca 15 sn aralıklarla kinetik ölçümü alınarak absorbans değerlerindeki değişimler kaydedilmiştir. Bir birim (U) katalaz aktivitesi, deney koşulları altında dakikada 0,001'lik bir absorbans değişikliğine neden olan enzim miktarı olarak tanımlanır (Alici ve Arabaci, 2016: 3).

Toplam katalaz aktivitesi, aşağıdaki eşitliğe göre U/µg protein olarak belirlenmiştir.

CAT Aktivitesi (U/µg): $[(\Delta \text{Abs} \times V_{\text{toplam}}) / \epsilon \times t \times V_{\text{enzim}} \times l] / \text{TP}$

ϵ = Ekstinksiyon katsayısı (40 mmol/L.cm)

V_{toplam} : Toplam hacim (1,020 ml)

V_{enzim} : Reaksiyona konulan enzim hacmi (0,02 ml)

t: Reaksiyonun gerçekleştiği süre (3 dk)

l: Küvete ait ışık yolu (1 cm)

TP: Total protein miktarı (mg/ml)

2.6.4. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesinin Belirlenmesi

APX aktivitesinin belirlenmesi için 20 µl enzim özütü ve 1 ml APX reaksiyon tamponu (50 mM K₂HPO₄, 50 mM KH₂PO₄, 250 µM askorbik asit ve 5 mM H₂O₂) birlikte tüpe aktarılmış ve pipetaj yapılarak karıştırılmıştır. Kör olarak enzim özütü içermeyen APX reaksiyon tamponu kullanılmıştır. Köre karşı örneklerin 290 nm dalga boyunda 3 dk boyunca 15 sn aralıklarla kinetik ölçümü alınarak absorbans değerlerindeki değişimler kaydedilmiştir (Panchuk vd., 2002: 849).

Toplam APX aktivitesi, aşağıdaki eşitliğe göre U/ μ g protein olarak belirlenmiştir.

APX Aktivitesi (U/ μ g): $[(\Delta\text{Abs} \times V_{\text{toplaml}}) / \epsilon \times t \times V_{\text{enzim}} \times l] / \text{TP}$

ϵ : Ekstinksiyon katsayısı (2,8 mmol/L.cm)

V_{toplaml} : Toplam hacim (1,020 ml)

V_{enzim} : Reaksiyona konulan enzim hacmi (0,02 ml)

t: Reaksiyonun gerçekleştiği süre (3 dk)

l: Küvete ait ışık yolu (1 cm)

TP: Total protein miktarı (mg/ml)

2.7. Antioksidan Enzimlere Ait Gen İfadelerinin Belirlenmesi

2.7.1. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu için HibriGen Total RNA İzolasyon Kiti kullanılmıştır. -80 °C’de muhafaza edilen bitki örnekleri -80 °C’den çıkarılıp steril havanda sıvı azotla toz haline getirilene kadar ezilmiştir. Kitin protokolu takip edilerek 100 mg bitki örneklerinin üzerine 1ml HT tamponu eklenmiş ve karışım homojen hale gelene kadar vortekste 10 saniye boyunca karıştırılmıştır. Buzda 5 dakika inkübasyon yapıp 4 °C’de 12000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni bir RNaz bulundurmayan mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Ardından 200 μ l kloroform eklenip 15 saniye vorteks ile homojen hale gelene kadar karıştırılmış ve buz üzerinde 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra örnekler 4 °C’de 12000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra iki faza ayrılan karışımın RNA içeren renksiz en üst fazı pipet yardımıyla alttaki diğer fazlar karışmayacak şekilde dikkatlice yeni bir RNaz bulundurmayan boş tüpe aktarılmıştır. Alınan renksiz fazın hacmine göre ½ oranında önceden soğutulmuş etanol (%100) eklenmiş ve karışım vorteksle iyice karıştırılıp filtrelili tüpe aktarılmıştır. Sonra, 4 °C’de 12000 rpm’de 30 sn santrifüj edilmiş ve filtrenin altındaki tüpte toplanan sıvı atılmıştır. Filtreye 500 μ l RY1 eklenmiş ve 4 °C’de 12000 rpm’de 30 sn boyunca santrifüj edilip yine altta kalan sıvı atılmıştır. Ardından filtreye 500 μ l RY2 eklenip 1 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapılmış, 4 °C’de 12000 rpm’de 30 sn boyunca santrifüj edilip altta kalan sıvı atılmıştır. Filtreye 500 μ l RY2 eklenip 1 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapılarak ve 4 °C’de 12000 rpm’de 30 sn boyunca santrifüj edilip altta kalan sıvı atılarak önceki adım bir daha tekrarlanmıştır. Filtrelili tüp 12000 rpm’de 2 dk kuruması için santrifüj edilmiş ve filtrelili tüpün içindeki kolon 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilmiştir. Son olarak doğrudan membran üzerine 50 μ l DEPC ile muamele

edilmiş su eklenip 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. RNA'nın bu su içerisinde toplanması için 12000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiş ve tüp içerisinde bulunan saf RNA uzun süreli kullanım için -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.7.2. Total RNA Miktarının Belirlenmesi

İzole edilen RNA örneklerinden 5 µl alınarak %1'lik 100 ml agaroz jelde 100V'da 40 dk yürütülmüştür. Jelde çift ve parlak bant halinde görünen örnekler cDNA sentezi için seçilmiştir. Jelde çok silik ve sürüntü halinde bant görünen örnekler için RNA izolasyonu tekrarlanmıştır.

2.7.3. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA örnekleri A.B.T. cDNA sentez kiti [A.B.T.TM cDNA Synthesis Kit with RNase Inh. (High Capacity)] kullanılarak cDNA'ya çevrilmiştir. Her bir örnek için steril bir 0,2 ml'lik santrifüj PCR tüpe sırasıyla 3,5 µl RNaz-serbest su, 2 µl 10X Reaksiyon Tamponu, 1 µl dNTP mix, 2 µl Random Hexamer (50 µM), 0,5 µl RNaz İnhibitör, 1 µl Reverse Transkriptaz ve 10 µl RNA örneği eklenmiş ve son hacmi 20 µl olan karışım mikrosantrifüj (STARLAB) spinlenmiştir. Ardından örnekler, 10 dk 25 °C'de, 120 dk 37 °C'de, 5 dk 85 °C'de Thermal Cycler'da (Applied Biosystems) inkübe edilmiş ve inkübasyon bittikten sonra kantitatif gerçek zamanlı PZR'de kullanılmak için -20 °C'de saklanmıştır.

2.7.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İçin Primer Seçimi

Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR) deneylerinde gerekli olan genlere ait primer dizileri için, Ara ve arkadaşlarının (2013) yapmış olduğu çalışmadan yararlanılmıştır (Ara vd., 2013: 24023) ve primer dizileri aşağıdaki tabloda listelenmiştir (Tablo 2.1). Liyofilize gelen primerler 15 sn 10000 rpm'de santrifüj edilip her primere üzerinde belirtilen miktar ölçüsünde nükleaz-serbest dH₂O eklenmiştir. Ardından pipetaj yapılarak karıştırılmış ve 100 µM'lık stok solüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu stok solüsyonlardan ise 10 µM'lık çalışma solüsyonları hazırlanmıştır. Hem stok hem de çalışma solüsyonları daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 2.1. qPZR için kullanılan primerler ve dizileri

Primer	Dizisi (5'-3')	Tm (°C)
SOD-Mn (F)	5'-TCTGGATGGGTGTGGCTTGCTCT-3'	64
SOD-Mn (R)	5'-GCATGCTCCCAAACATCGATC-3'	60
CAT (F)	5'-TACTCAGAGGCACCGTCTTG-3'	59
CAT (R)	5'-CTCCTCATCTCGGTGCATAA-3'	57
APX (F)	5'-TGAGCTCGCCCATGGCGCCAA-3'	66
APX (R)	5'-ATCTCAACAGCAACAACACCAG-3'	58
Aktin (F)	5'-CCGCTCTTGCTCCGAGCAG-3'	63
Aktin (R)	5'-ATCCACATCTGTTGGAAGGTAC-3'	58

2.7.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR

Elde edilen cDNA örnekleri, kantitatif gerçek zamanlı PZR için kalıp olarak kullanılmıştır. qPZR deneyleri yapılmadan önce cDNA örneklerinin Nanodrop Spektrofotometre (AgileSpec) ile 260 nm ve 280 nm dalga boyunda saflık ve miktar tayinleri yapılmış ve örnekler, qPZR deneyleri için gerekli miktarda seyreltilmiştir. Seyreltme işlemleri tamamlandıktan sonra kantitatif gerçek zamanlı PZR, A.B.T.TM 2X qPCR SYBR-Green MasterMix (without ROX) kiti kullanılarak yapılmıştır (Tablo 2.2). Deney için gerekli malzemeler kitin kullanım kılavuzunda belirtildiği şekilde PZR strip tüplere ilave edilerek qPZR, PZR cihazında (Agilent Technologies) gerçekleştirilmiştir (Tablo 2.3). Kantitatif gerçek zamanlı PZR reaksiyonu her bir cDNA örneği için hem SOD-Mn, CAT, APX enzim genleri hem de normalizatör gen olan Aktin genine ait olan primerler kullanılarak 3'er tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2.2. Kantitatif gerçek zamanlı PZR bileşenleri ve eklenen miktarlar

Bileşenler	Miktar
cDNA kalıp	1 µl
Primer Forward (F)	0,5 µl
Primer Reverse (R)	0,5 µl
DEPC'li su	3 µl
A.B.T. TM 2X qPCR SYBR-Green MasterMix (without ROX)	5 µl
Total Hacim	10 µl

Tablo 2.3. Kantitatif gerçek zamanlı PZR sıcaklık döngüsü

95 °C	5 dk	
95 °C	30 sn	40 döngü
55 °C	60 sn	
95 °C	30 sn	
65 °C	30 sn	
95 °C	30 sn	

2.8. İstatiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

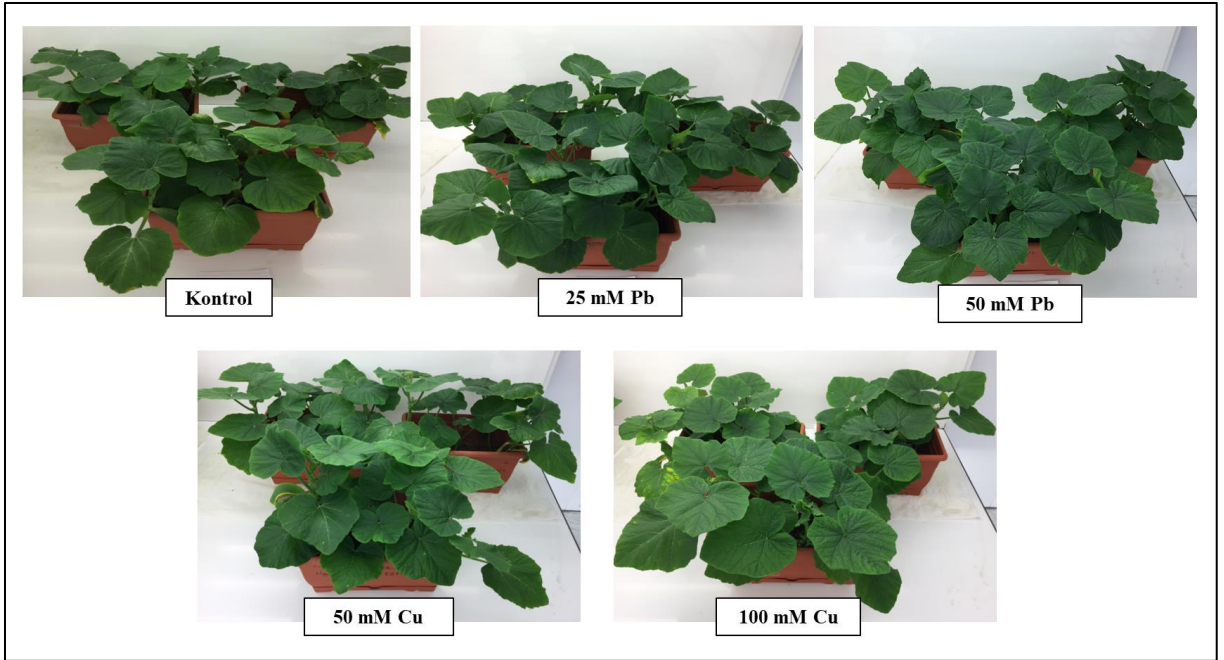
Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlarda kurşun ve bakıra maruz bırakılan deney gruplarıyla yapılan her çalışma 3 bağımsız tekrar olmak üzere gerçekleştirilmiştir. İstatiksel analizler için GraphPad programında (GraphPad Prism 9) varyans analizi (ANOVA) kullanılıp p değeri hesaplanmıştır. Önemli değerler “*” işareti ile, standart sapmalar “±” işareti ile gösterilmiştir.

3. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

3.1. Sonuçlar

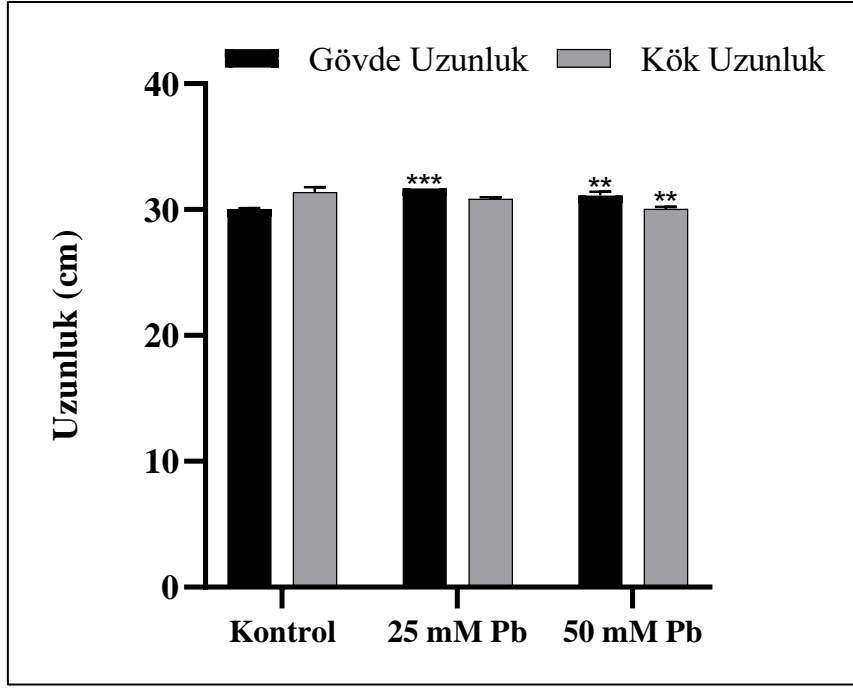
3.1.1. Bitkilerin Ekolojik Ölçümlerinin Belirlenmesi

İki farklı kurşun (25 mM ve 50 mM) ve bakır (50 mM ve 100 mM) konsantrasyonunda yetiştirilen bitkilerden 7 ağır metal uygulaması sonunda kök ve yaprak örnekleri toplanmış ve bazı ekolojik ölçümler alınmıştır. Kurşun ve bakır uygulanan örneklerin her iki metal konsantrasyonunda morfolojik olarak toksisite semptomu göstermediği, örneklerin kontrolde olduğu gibi yeşil kaldığı ve kloroz oluşmadığı saptanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Kurşun ve bakır stresine maruz bırakılan örneklerin 7. uygulama sonrasındaki saksı görüntüleri

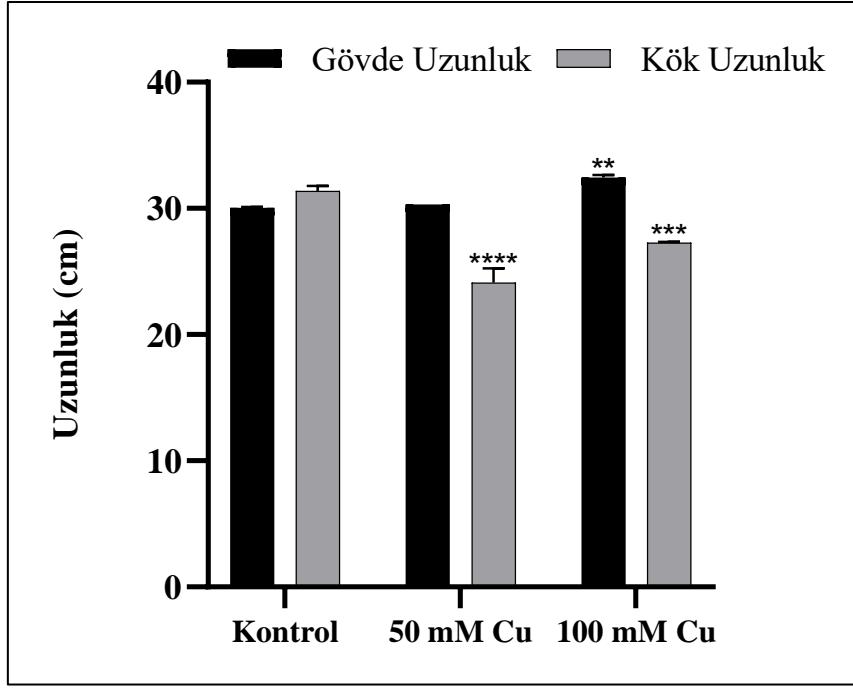
İki farklı konsantrasyonda kurşuna maruz bırakılan örneklerin kontrole (30,04 cm) göre gövde uzunluğunda önemli bir artış gözlenirken, 25 mM kurşun uygulanan bitkilerin gövde uzunluğunun (31,67 cm) 50 mM kurşun stresi uygulanan örneklerin gövde uzunluğuna (31,13 cm) göre daha fazla olduğu görülmüştür. Artan kurşun konsantrasyonuyla birlikte bitkilerin kök uzunluğunda (sırasıyla 30,85 cm; 30,04 cm) ise kontrole (31,4 cm) kıyasla bir azalma olduğu tespit edilmiştir (Grafik 3.1).



Grafik 3.1. Kurşun uygulanan bal kabağı bitkisine ait gövde ve kök uzunlukları
 (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001)

50 ve 100 mM olmak üzere iki farklı konsantrasyonda bakır uygulanan örnekler kontrolle karşılaştırıldığında artan bakır konsantrasyonuna paralel olarak gövde uzunluğunun (sırasıyla 30,33 cm; 32,46 cm) arttığı belirlenmiştir. 50 mM ve 100 mM bakır uygulanan örneklerin kontrole göre kök uzunluklarında önemli derecede azalma gözlenmiş, 50 mM bakır uygulamasının bitkilerin kök uzunluğunu (24,13 cm) 100 mM bakır uygulamasına göre (27,29 cm) daha fazla azalttığı saptanmıştır (Grafik 3.2).

Tüm bitki örnekleri karşılaştırıldığında, en uzun gövde uzunluğuna (32,46 cm) 100 mM bakır stresi altındaki bitki grubunda rastlanırken, en kısa gövde uzunluğuna (30,04 cm) kontrol grubunda rastlanmıştır. En uzun kök uzunluğuna (31,4 cm) kontrol grubunda rastlanırken, en kısa kök uzunluğuna (24,13 cm) 50 mM bakır stresi uygulanan bitki grubunda rastlanmıştır (Grafik 3.1 ve 3.2).

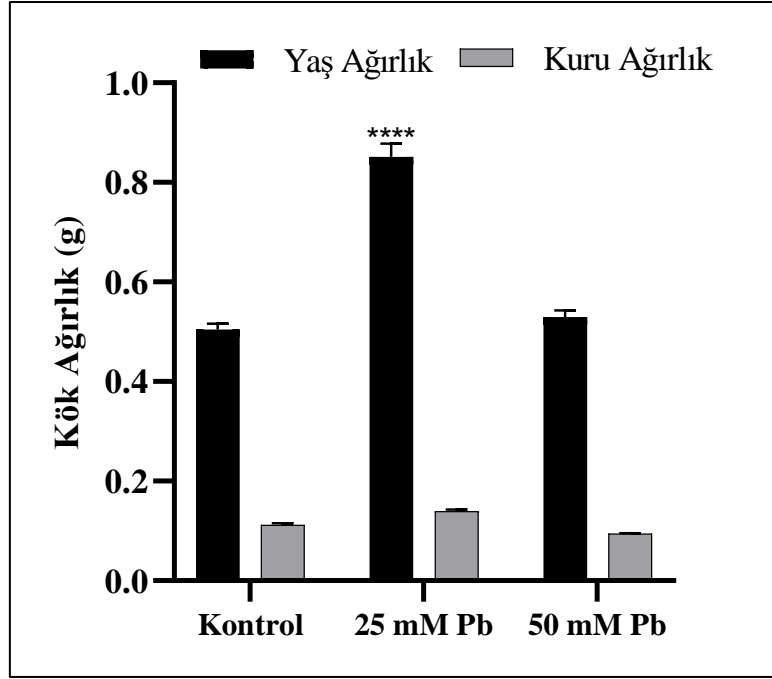


Grafik 3.2. Bakır uygulanan bal kabağı bitkisine ait gövde ve kök uzunlukları
 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

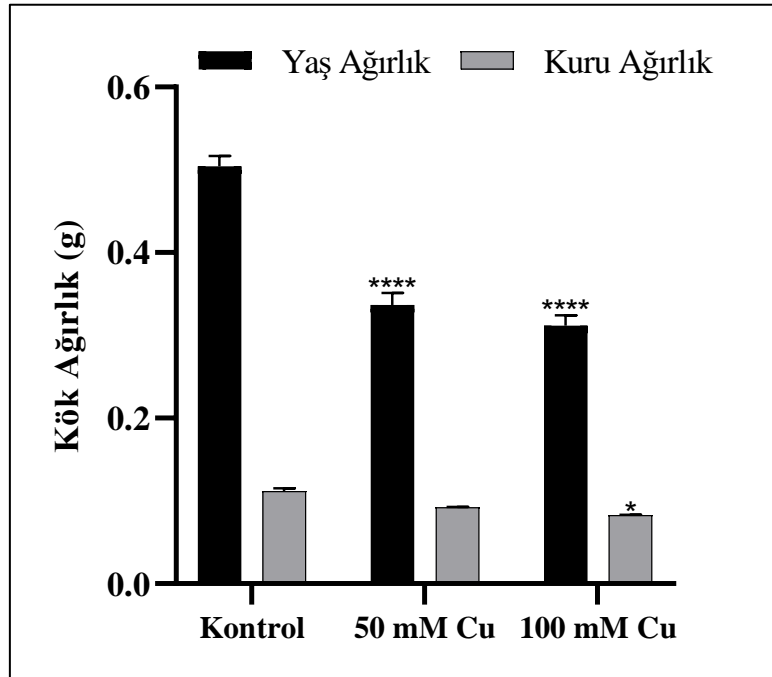
Bitkilerin kök yaş ve kuru ağırlıkları incelendiğinde, kontrole (sırasıyla 0,504 g; 0,112 g) göre 25 mM kurşun uygulanan örneklerin kök yaş ağırlığının (0,851 g) oldukça önemli derecede artış gösterdiği; kök kuru ağırlığının da (0,139 g) göz ardı edilebilecek bir şekilde arttığı belirlenmiştir. 50 mM kurşun uygulanan örneklerin ise kontrole kıyasla kök yaş (0,53 g) ve kuru (0,095 g) ağırlıklarında önemli bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir (Grafik 3.3).

İki farklı konsantrasyonda bakır uygulanan örneklerde ise kontrole kıyasla kök yaş ve kuru ağırlığında genel olarak azalma gözlenmiştir. Artan bakır konsantrasyonuyla birlikte kök yaş ağırlığında (sırasıyla 0,337 g; 0,312 g) önemli bir azalma gözlenirken, kök kuru ağırlığında 50 mM bakır konsantrasyonunda (0,092 g) önemli bir değişiklik tespit edilmeyip 100 mM bakır konsantrasyonunda (0,083 g) kontrole (0,112 g) göre önemli derecede bir azalma olduğu belirlenmiştir (Grafik 3.4).

Tüm bitki grupları karşılaştırıldığında, en yüksek kök yaş (0,851 g) ve kuru ağırlığına (0,139 g) 25 mM kurşun stresi uygulanan bitki grubunda rastlanırken, en düşük kök yaş (0,312 g) ve kuru ağırlığına (0,083 g) 100 mM bakır stresi uygulanan bitki grubunda rastlanmıştır (Grafik 3.3 ve 3.4).

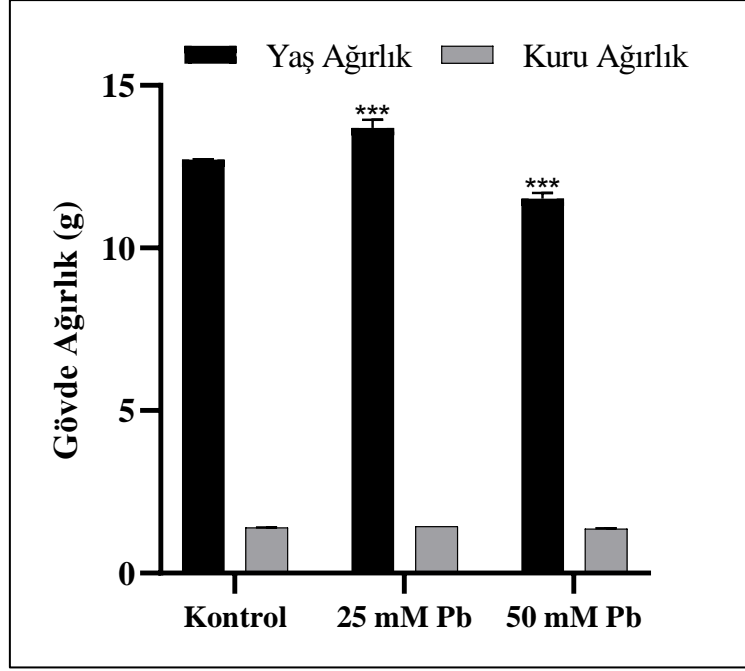


Grafik 3.3. Kurşun uygulanan bal kabağı bitkisine ait kök yaş ve kuru ağırlıkları
 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)



Grafik 3.4. Bakır uygulanan bal kabağı bitkisine ait kök yaş ve kuru ağırlıkları
 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

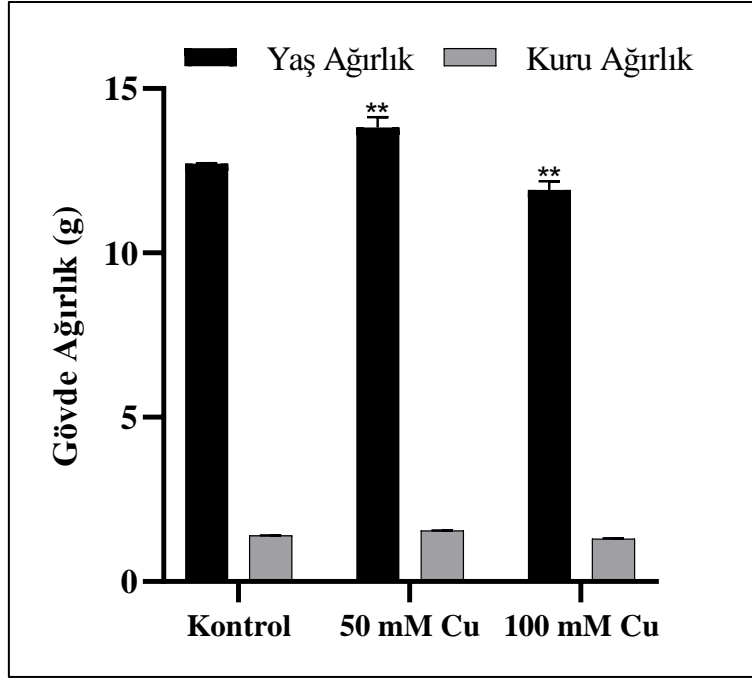
Örneklerin gövde yaş ve kuru ağırlıkları incelendiğinde kontrole (sırasıyla 12,72 g; 1,401 g) kıyasla bitkilerin gövde yaş ağırlığının 25 mM kurşun uygulamasında (13,69 g) önemli derecede artarken, 50 mM kurşun uygulamasında önemli derecede azaldığı (11,51 g) görülmüş, her iki kurşun konsantrasyonunda gövde kuru ağırlığında (sırasıyla 1,444 g; 1,367 g) ise önemli bir değişikliğin olmadığı belirlenmiştir (Grafik 3.5).



Grafik 3.5. Kurşun uygulanan bal kabağı bitkisine ait gövde yaş ve kuru ağırlıkları
(*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001)

Kontrole göre 50 mM ve 100 mM bakır uygulanan örneklerin gövde kuru ağırlıklarında (sırasıyla 1,555 g; 1,310 g) önemli bir değişiklik bulunmazken, 50 mM bakır konsantrasyonunda gövde yaş ağırlığının (13,82 g) kontrole kıyasla önemli derecede arttığı, 100 mM bakır konsantrasyonunda ise gövde yaş ağırlığının (11,92 g) önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir (Grafik 3.6).

Tüm bitki grupları karşılaştırıldığında, en yüksek gövde yaş (13,82 g) ve kuru ağırlığına (1,555 g) 50 mM bakır stresi uygulanan bitki grubunda rastlanırken, en düşük gövde yaş ağırlığına (11,51 g) 50 mM kurşun stresi uygulanan grupta, en düşük gövde kuru ağırlığına (1,310 g) ise 100 mM bakır stresi uygulanan bitki grubunda rastlanmıştır (Grafik 3.5 ve 3.6).

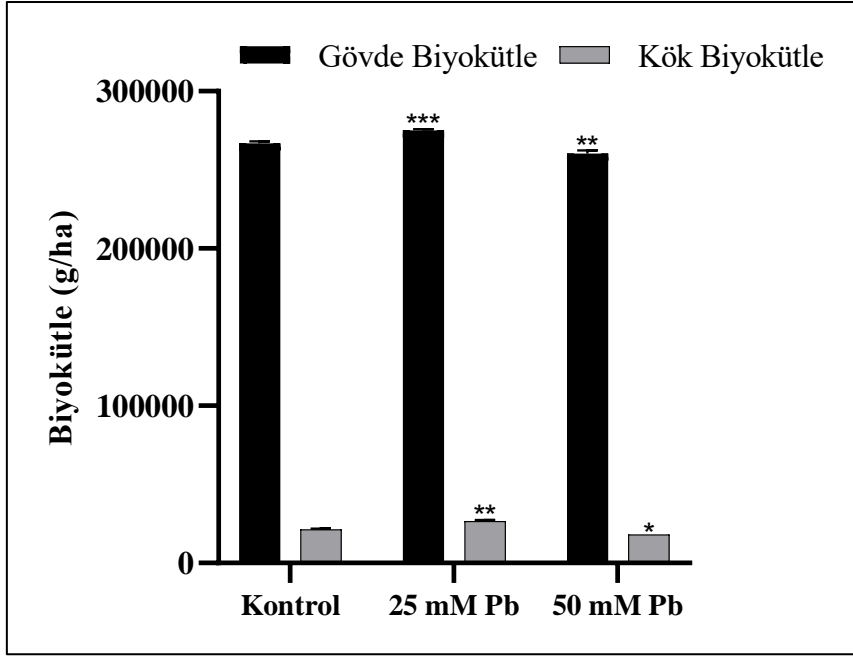


Grafik 3.6. Bakır uygulanan bal kabağı bitkisine ait gövde yaş ve kuru ağırlıkları
 (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001)

Bitki örneklerinin kök ve gövde biyokütelleri karşılaştırıldığında, 25 mM kurşun uygulanan bitkilerde kök (26519 g/ha) ve gövde (275122 g/ha) biyokütlesinin kontrole (sırasıyla 21298 g/ha; 266874 g/ha) göre önemli bir artış gösterdiği ancak 50 mM kurşun uygulanan bitkilerde hem kök (18089 g/ha) hem de gövde (260306 g/ha) biyokütlesinde önemli bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir (Grafik 3.7).

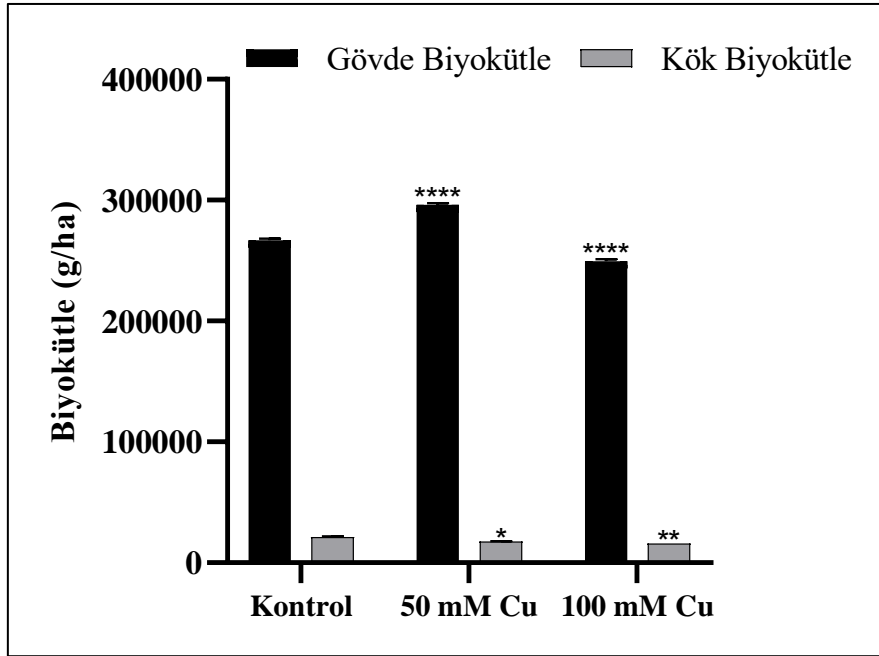
50 mM ve 100 mM bakır konsantrasyonunda yetiştirilen örneklerin kök biyokütlesinin (sırasıyla 17585 g/ha; 15806 g/ha) kontrol grubuna kıyasla önemli derecede azaldığı, 50 mM bakır konsantrasyonundaki örneklerde kontrole göre gövde biyokütlesinin (296100 g/ha) önemli derecede arttığı, 100 mM bakır konsantrasyonundaki örneklerde gövde biyokütlesinin (249441 g/ha) ise önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir (Grafik 3.8).

Tüm bitki grupları karşılaştırıldığında, en yüksek kök biyokütlesine (26519 g/ha) 25 mM kurşun stresi uygulanan bitki grubunda rastlanırken, en yüksek gövde biyokütlesine (296100 g/ha) 50 mM bakır stresi uygulanan bitki grubunda rastlanmıştır. En düşük kök (15806 g/ha) ve gövde (249441 g/ha) biyokütlesi ise 100 mM bakır stresi uygulanan bitki grubunda gözlenmiştir (Grafik 3.7 ve 3.8).



Grafik 3.7. Bal kabağı bitkisinde kurşun uygulamasının gövde ve kök biyokütlesi üzerine etkisi

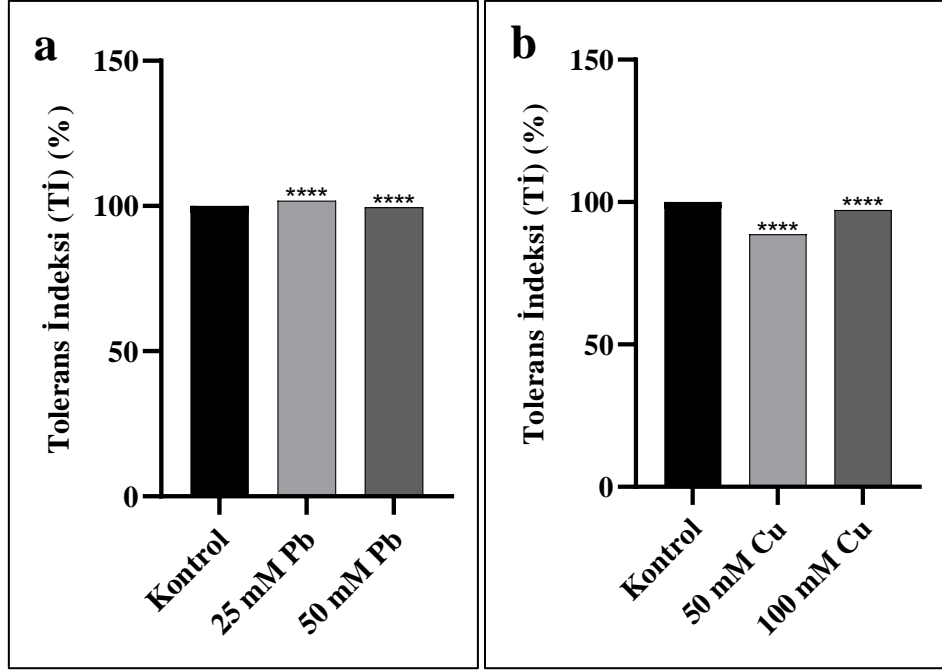
(*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001)



Grafik 3.8. Bal kabağı bitkisinde bakır uygulamasının gövde ve kök biyokütlesi üzerine etkisi

(*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001)

Bitki örneklerinin kurşun tolerans indeksleri (Pb-Tİ) incelendiğinde, 25 mM kurşun uygulanan örneklerin tolerans indeksinin (%101,8) kontrolden (%100) önemli derecede yüksek olduğu, 50 mM kurşun uygulanan bitkilerin tolerans indeksinin (%99,56) ise kontrol grubuna göre önemli derecede düşük olduğu belirlenmiştir (Grafik 3.9a).

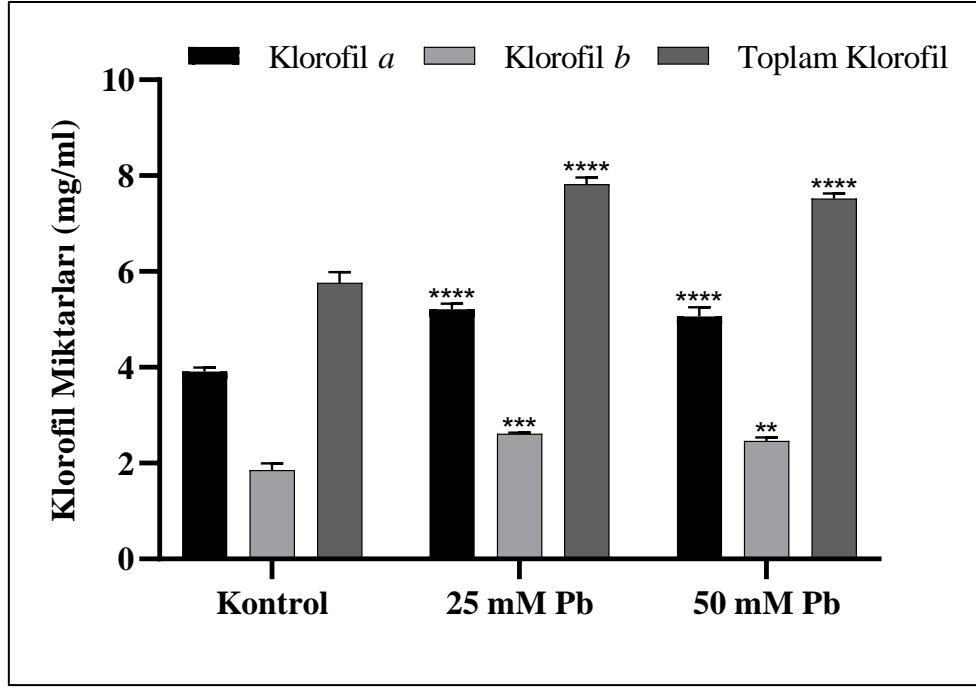


Grafik 3.9. a) Kurşun uygulanan **b)** bakır uygulanan bal kabağı bitkisinde tolerans indeksleri (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$)

İki farklı konsantrasyonda bakır uygulanan bitki örneklerinin bakır tolerans indekslerinin (Cu-Tİ) kontrole göre önemli derecede azaldığı görülmüştür. 50 mM bakır uygulanan bitkilerin tolerans indeksinin (%88,64) 100 mM bakır stresi altındaki bitkilerin tolerans indeksinden (%97,25) daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Grafik 3.9b).

3.1.2. Klorofil Miktarlarının Belirlenmesi

Bitki örneklerinin klorofil *a*, klorofil *b* ve toplam klorofil miktarları incelendiğinde, her iki kurşun konsantrasyonunda da kontrole göre klorofil *a* miktarının önemli derecede arttığı; bu artışın 25 mM kurşun uygulamasında (5,212 mg/ml) 50 mM kurşun uygulamasına (5,066 mg/ml) göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde her iki kurşun konsantrasyonunda kontrole göre klorofil *b* ve toplam klorofil miktarının arttığı ve bu artışın 25 mM kurşun uygulanan örneklerde (sırasıyla 2,613 mg/ml; 7,823 mg/ml) 50 mM kurşun uygulanan örneklere göre (sırasıyla 2,460 mg/ml; 7,524 mg/ml) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Grafik 3.10).

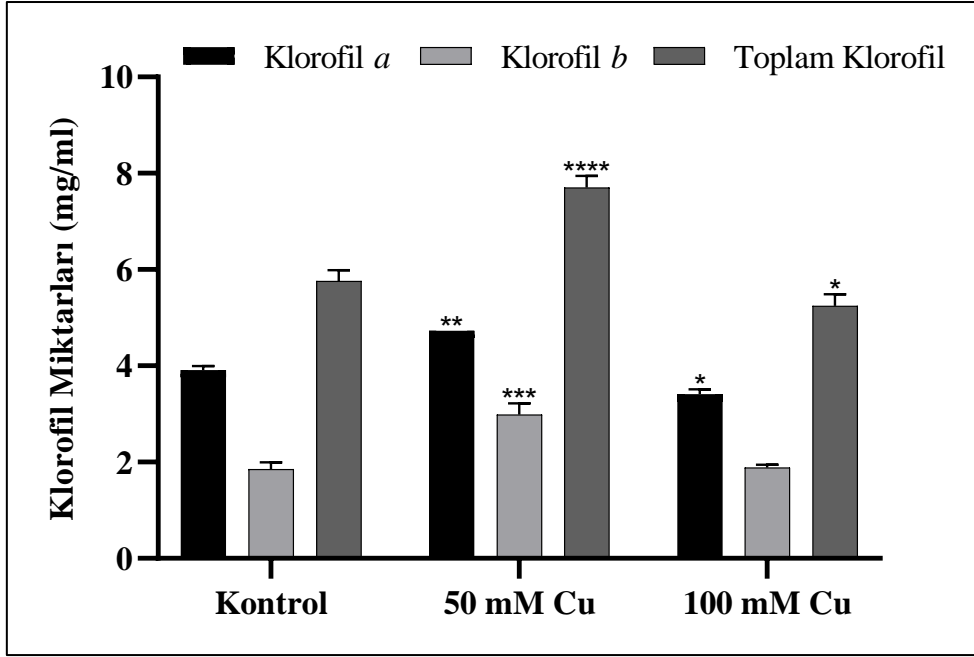


Grafik 3.10. Kurşun uygulanan bal kabağı bitkisinde klorofil miktarları

(*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001)

50 mM bakır konsantrasyonundaki örneklerde klorofil *a* (4,727 mg/ml), klorofil *b* (2,984 mg/ml) ve toplam klorofil (7,708 mg/ml) miktarlarının kontrole (sırasıyla 3,913 mg/ml; 1,854 mg/ml; 5,766 mg/ml) kıyasla arttığı belirlenmiştir. Ayrıca 100 mM bakır uygulanan örneklerin klorofil *b* miktarında (1,887 mg/ml) kontrole göre önemli bir değişiklik gözlenmezken, klorofil *a* (3,409 mg/ml) ve toplam klorofil (5,249 mg/ml) miktarının önemli derecede azaldığı gözlenmiştir (Grafik 3.11).

Tüm bitki örnekleri karşılaştırıldığında, en yüksek klorofil *a* (5,212 mg/ml) ve toplam klorofil miktarına (7,823 mg/ml) 25 mM kurşun uygulanan bitki grubunda rastlanırken, en yüksek klorofil *b* miktarına (2,984 mg/ml) 50 mM bakır uygulanan deney grubunda rastlanmıştır. En düşük klorofil *a* (3,409 mg/ml) ve toplam klorofil miktarı ise (5,249 mg/ml) 100 mM bakır uygulanan örneklerde gözlenirken, en düşük klorofil *b* miktarı (1,854 mg/ml) kontrol grubunda tespit edilmiştir (Grafik 3.10 ve 3.11).



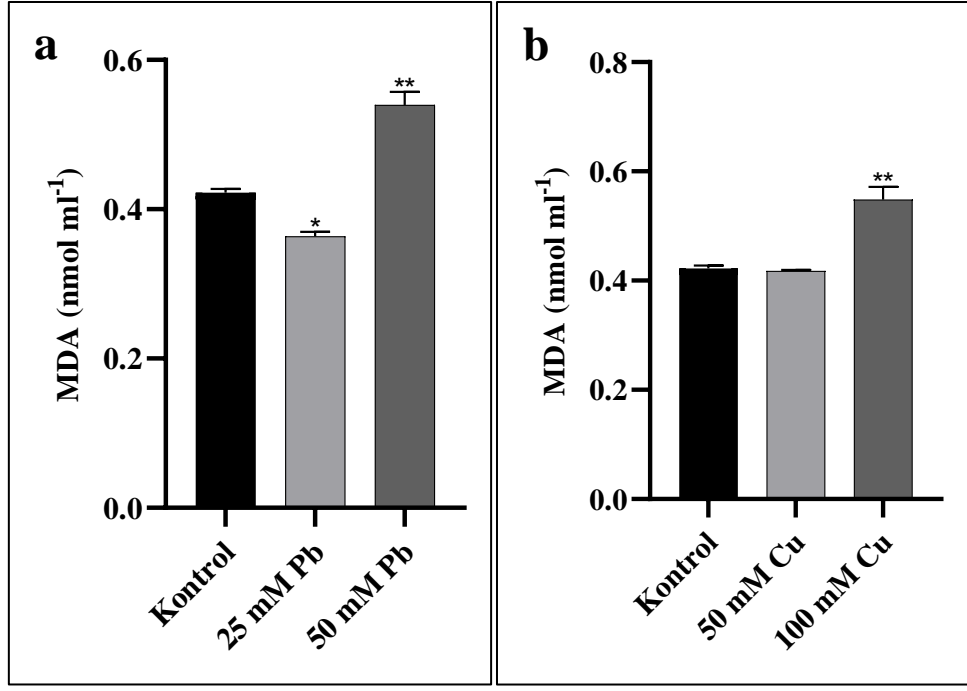
Grafik 3.11. Bakır uygulanan bal kabağı bitkisinde klorofil miktarları
(*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001)

3.1.3. Lipid Peroksidasyonunun Belirlenmesi

25 mM kurşun konsantrasyonuna maruz bırakılan bitkilerin MDA içeriğinde ($0,36 \text{ nmol ml}^{-1}$) kontrole ($0,42 \text{ nmol ml}^{-1}$) kıyasla önemli ölçüde bir azalma olduğu, 50 mM kurşun konsantrasyonundaki örneklerde ($0,54 \text{ nmol ml}^{-1}$) ise kontrole göre önemli derecede artış olduğu saptanmıştır (Grafik 3.12a).

50 mM bakır uygulanan örneklerin MDA içeriğinde ($0,418 \text{ nmol ml}^{-1}$) kontrole ($0,42 \text{ nmol ml}^{-1}$) kıyasla önemli bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir. 100 mM bakır konsantrasyonuna maruz bırakılan örneklerin MDA içeriğinde ($0,549 \text{ nmol ml}^{-1}$) ise kontrole göre önemli ölçüde bir artış olduğu tespit edilmiştir (Grafik 3.12b).

Tüm bitki grupları karşılaştırıldığında, en yüksek MDA içeriğine ($0,549 \text{ nmol ml}^{-1}$) 100 mM bakır stresi altındaki bitki grubunda rastlanırken, en düşük MDA içeriğine ($0,36 \text{ nmol ml}^{-1}$) 25 mM kurşun stresi altındaki bitki grubunda rastlanmıştır (Grafik 3.12a ve 3.12b).



Grafik 3.12. a) Kurşun uygulanan **b)** bakır uygulanan bal kabağı bitkisinde MDA içeriği
 (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001)

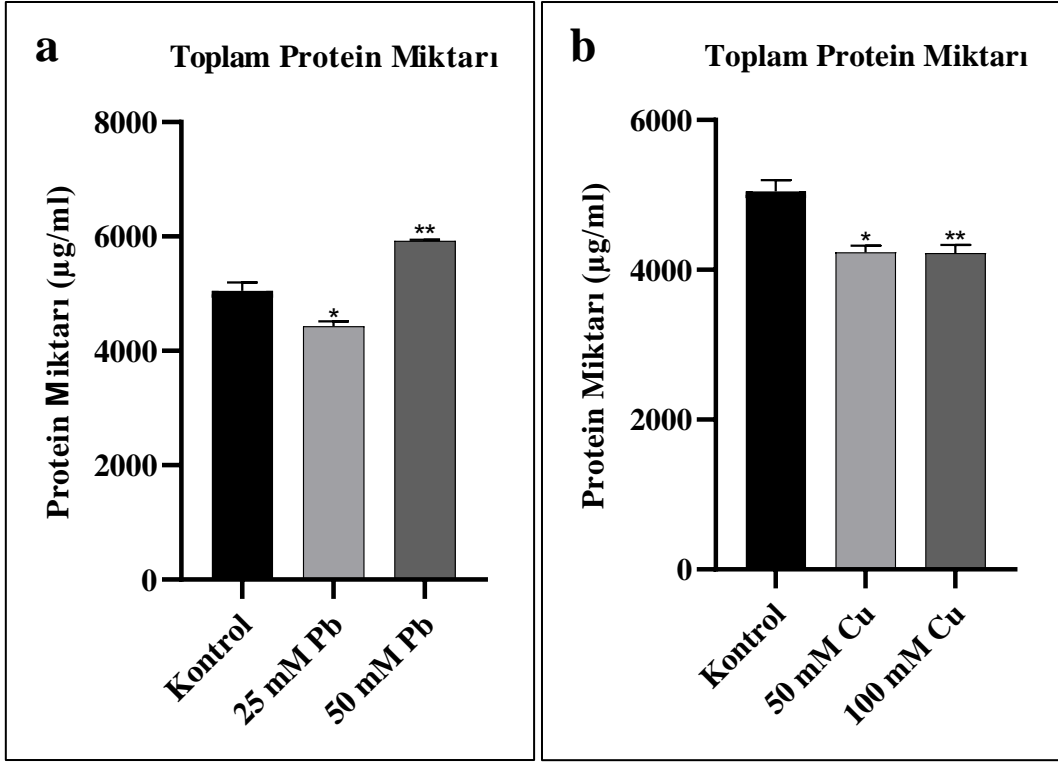
3.1.4. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.1.4.1. Toplam Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Bitki örneklerinin toplam protein miktarları karşılaştırıldığında, 25 mM kurşun konsantrasyonuna maruz bırakılan bitkilerin (4427 µg/ml) kontrole (5049 µg/ml) göre toplam protein miktarında önemli bir azalmanın olduğu ancak 50 mM kurşun uygulanan bitkilerin toplam protein miktarında (5922 µg/ml) ise kontrole kıyasla önemli bir artışın gerçekleştiği belirlenmiştir (Grafik 3.13a).

Her iki bakır uygulamasında da bitki örneklerinin toplam protein miktarının kontrol grubuna göre önemli derecede azaldığı; bu azalmanın 100 mM bakır konsantrasyonundaki bitkilerde (4224 µg/ml) 50 mM bakır uygulanan örneklere (4232 µg/ml) göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Grafik 3.13b).

Tüm bitki grupları karşılaştırıldığında, en yüksek toplam protein miktarının (5922 µg/ml) 50 mM kurşun uygulanan bitki grubunda, en düşük toplam protein miktarının (4224 µg/ml) ise 100 mM bakır uygulanan bitki grubunda olduğu belirlenmiştir (Grafik 3.13a ve 3.13b).



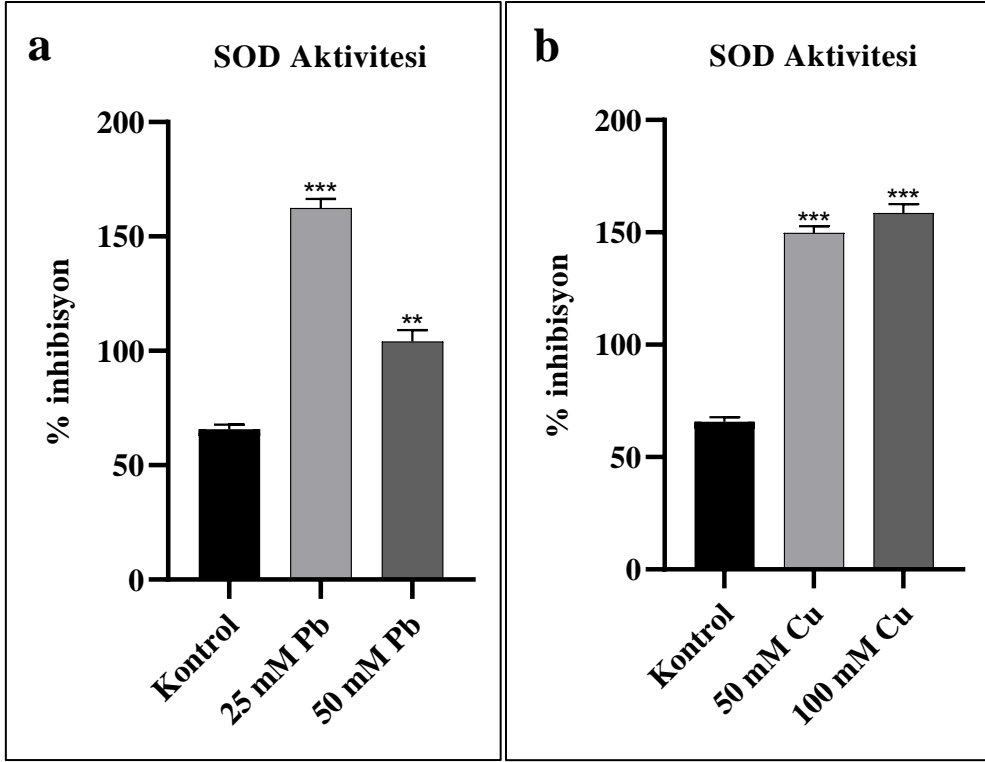
Grafik 3.13. a) Kurşun uygulanan **b)** bakır uygulanan bal kabağı bitkisinde toplam protein miktarı (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

3.1.4.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Belirlenmesi

Her iki kurşun konsantrasyonunda yetiştirilen örneklerin SOD aktivitesinin kontrol grubu ile (%65,8) karşılaştırıldığında önemli derecede artış gösterdiği belirlenmiştir. 25 mM kurşun uygulanan örneklerin SOD aktivitesinin (%162,4) 50 mM kurşun uygulanan örneklere (%104,1) göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Grafik 3.14a).

Bakır uygulanan örnekler karşılaştırıldığında, konsantrasyon artışına paralel olarak 50 mM (%149,8) ve 100 mM (%158,6) bakır uygulanan deney gruplarında SOD aktivitesinin kontrol grubuna göre önemli bir artış gösterdiği tespit edilmiştir (Grafik 3.14b).

Tüm deney grupları karşılaştırıldığında, en yüksek SOD aktivitesine (%162,4) 25 mM kurşun uygulanan bitki örneklerinde rastlanırken, en düşük SOD aktivitesine (%65,8) kontrol grubunda rastlanmıştır (Grafik 3.14a ve 3.14b).



Grafik 3.14. a) Kurşun uygulanan **b)** bakır uygulanan bal kabağı bitkisinin yaprak örneğindeki SOD aktivitesi

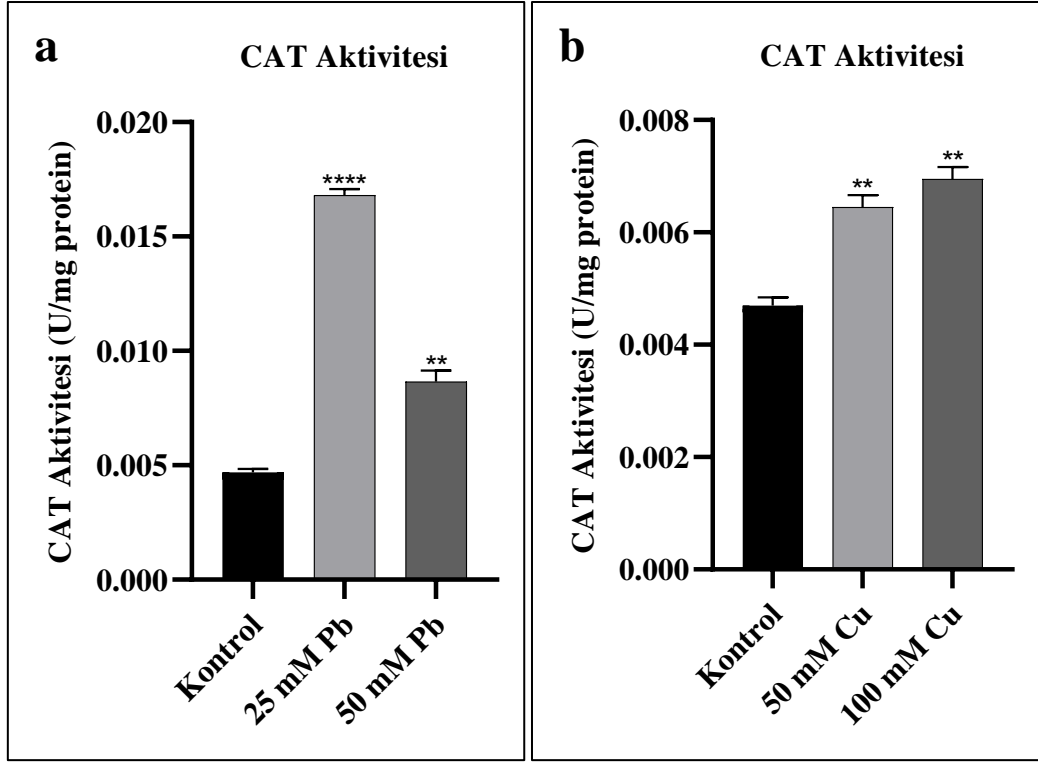
(*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001)

3.1.4.3. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Belirlenmesi

Bitki örneklerinin CAT aktiviteleri karşılaştırıldığında, her iki kurşun konsantrasyonunda kontrole (0,0047 U/mg) kıyasla CAT aktivitesinin önemli derecede arttığı ve 25 mM kurşun uygulanan bitkilerdeki CAT aktivitesinde (0,0168 U/mg) 50 mM kurşun uygulanan bitkilerdeki CAT aktivitesine (0,00865 U/mg) göre daha fazla artışın olduğu belirlenmiştir (Grafik 3.15a).

CAT aktivitesinin her iki bakır konsantrasyonunda kontrol grubuna kıyasla önemli derecede arttığı gözlenmiş; 50 mM (0,00645 U/mg) ve 100 mM bakır konsantrasyonunda (0,00695 U/mg) düzenli bir artışın olduğu tespit edilmiştir (Grafik 3.15b).

Tüm deney grupları karşılaştırıldığında, en yüksek CAT aktivitesine (0,0168 U/mg) 25 mM kurşun stresi altındaki bitki grubunda rastlanırken, en düşük CAT aktivitesine (0,0047 U/mg) kontrol grubunda rastlanmıştır (Grafik 3.15a ve 3.15b).



Grafik 3.15. a) Kurşun uygulanan **b)** bakır uygulanan bal kabağı bitkisinin yaprak örneğindeki CAT aktivitesi

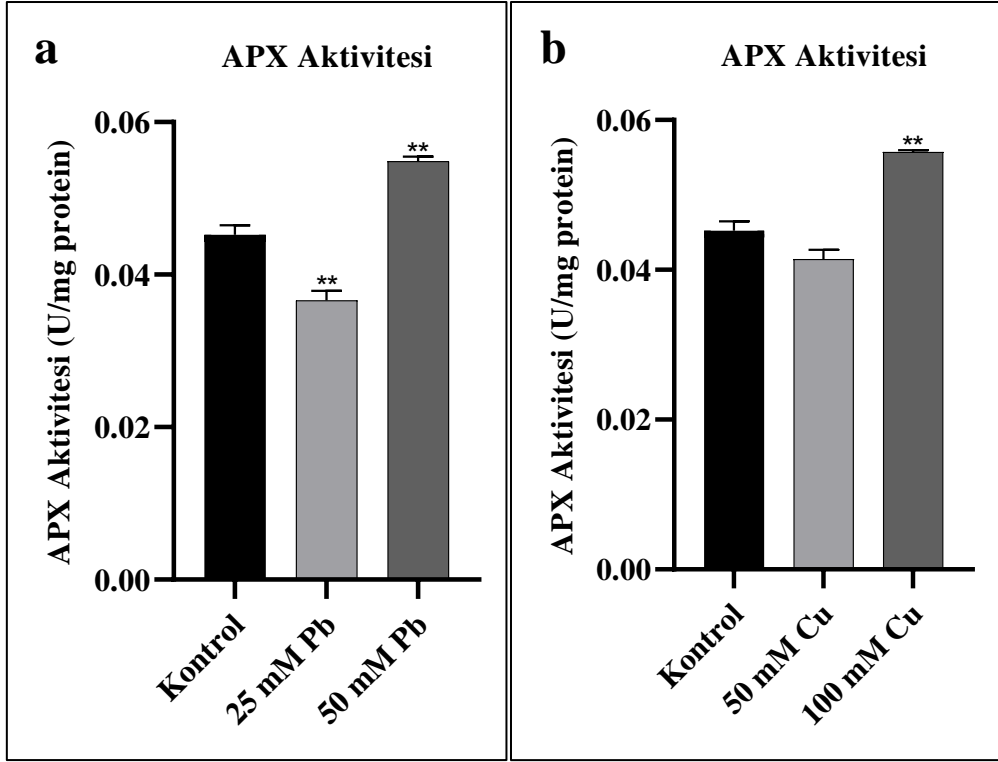
(*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001)

3.1.4.4. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesinin Belirlenmesi

Kurşun uygulanan bitki örneklerinin APX aktiviteleri karşılaştırıldığında, 25 mM kurşun uygulanan bitkilerin APX aktivitesinin (0,0366 U/mg) kontrole (0,0452 U/mg) kıyasla önemli derecede azaldığı; 50 mM kurşun uygulanan bitkilerin APX aktivitesinin (0,05485 U/mg) ise kontrole göre önemli derecede arttığı gözlenmiştir (Grafik 3.16a).

50 mM bakır uygulanan bitkilerin APX aktivitesinin (0,0414 U/mg) kontrole (0,0452 U/mg) göre azaldığı, 100 mM bakır uygulanan bitkilerin APX aktivitesinin (0,0557 U/mg) ise kontrole kıyasla önemli derecede arttığı belirlenmiştir (Grafik 3.16b).

Tüm bitki örnekleri karşılaştırıldığında, en yüksek APX aktivitesine (0,0557 U/mg) 100 mM bakır stresi altındaki bitki grubunda rastlanırken, en düşük APX aktivitesine (0,0366 U/mg) 25 mM kurşun stresi altındaki bitki grubunda rastlanmıştır (Grafik 3.16a ve 3.16b).



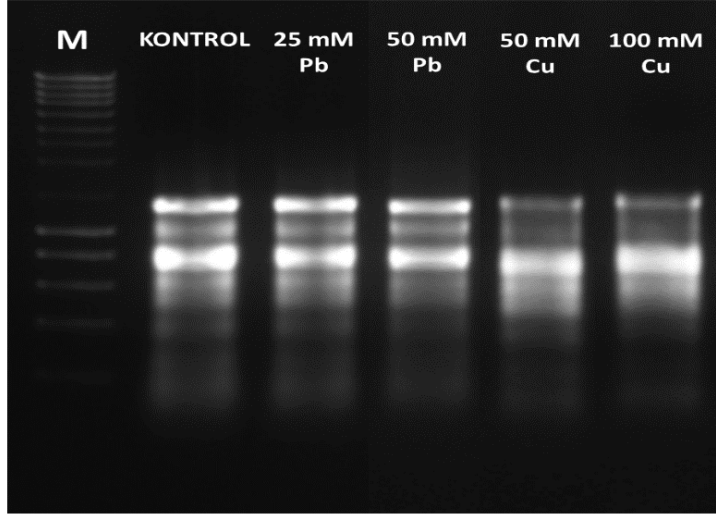
Grafik 3.16. a) Kurşun uygulanan **b)** bakır uygulanan bal kabağı bitkisinin yaprak örneğindeki APX aktivitesi

(*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001)

3.1.5. Antioksidan Enzimlere Ait Gen İfadelerinin Belirlenmesi

3.1.5.1. Total RNA Miktarının Belirlenmesi

Kurşun ve bakır stresinin bal kabağı bitkisinin antioksidan enzimlerine ait gen ifadeleri üzerindeki etkisi gerçek zamanlı PZR ile belirlenmiştir. İki farklı konsantrasyonda kurşun ve yine iki farklı konsantrasyonda bakır stresi uygulanan bitki örneklerinin ve kontrol grubunun yapraklarından izole edilen RNA'lar agaroz jelde yürütülüp RNA miktarları ve kaliteleri tayin edilmiştir (Şekil 3.2).



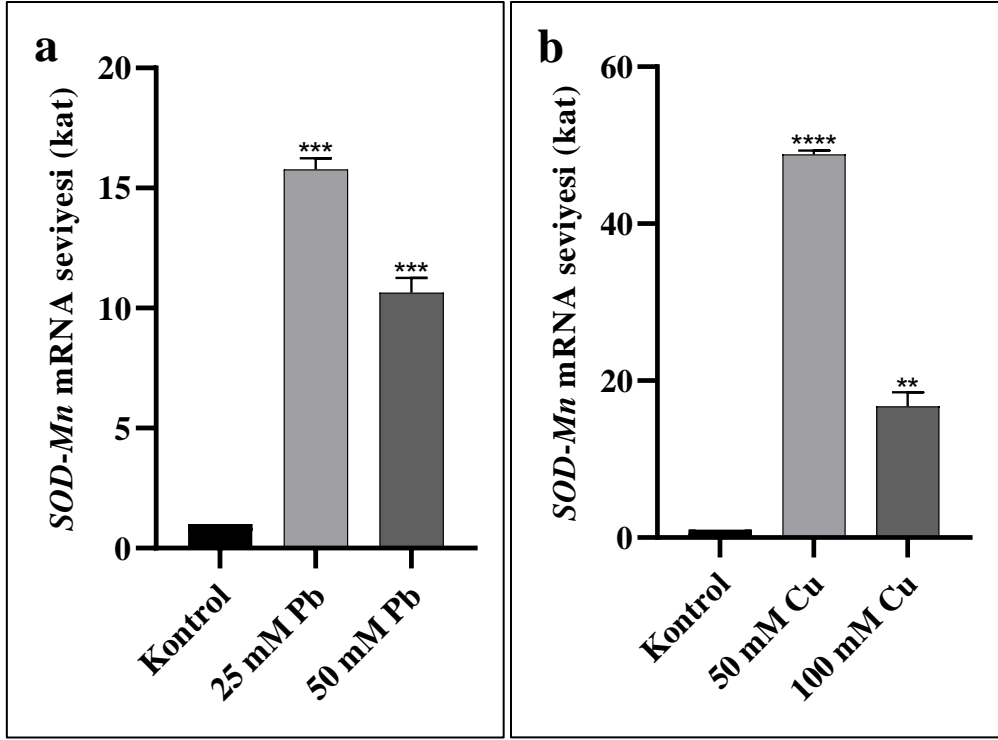
Şekil 3.2. Bal kabağı yapraklarına ait RNA'ların agaroz jel görüntüsü

3.1.5.2. Bal Kabağı Yapraklarında *SOD* mRNA Seviyesindeki Değişimin Belirlenmesi

Bitki örneklerinin yapraklarındaki *SOD-Mn* geninin mRNA seviyelerindeki değişim incelendiğinde, her iki kurşun konsantrasyonunda da kontrole göre *SOD-Mn* gen ifadesinde önemli ölçüde artış olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, 25 mM kurşun uygulamasında *SOD-Mn* gen ifadesinin (15,8) 50 mM kurşun uygulamasındaki örneklerin *SOD-Mn* gen ifadesinden (10,6) daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Grafik 3.17a).

Her iki bakır konsantrasyonunda kontrole kıyasla *SOD-Mn* gen ifadesinde önemli bir artış olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, 50 mM bakır uygulamasında *SOD-Mn* gen ifadesindeki (48,8) artışın, 100 mM bakır uygulamasındaki *SOD-Mn* gen ifadesindeki (16,7) artıştan daha fazla olduğu gözlenmiştir (Grafik 3.17b).

Tüm deney grupları karşılaştırıldığında, en yüksek *SOD-Mn* gen ifadesine (48,8) 50 mM bakır stresi altındaki bitki grubunda rastlanmıştır (Grafik 3.17a ve 3.17b).



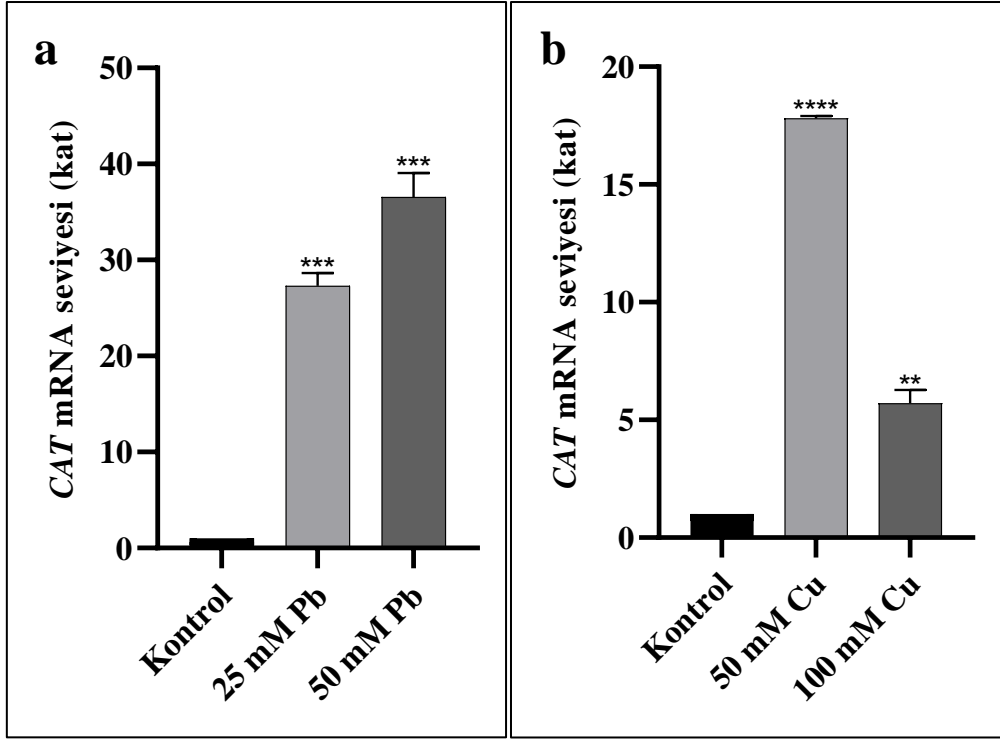
Grafik 3.17. a) Kurşun uygulanan **b)** bakır uygulanan bal kabağı bitkisinin yaprak örneğindeki *SOD-Mn* mRNA seviyesi
 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

3.1.5.3. Bal Kabağı Yapraklarında *CAT* mRNA Seviyesindeki Değişimin Belirlenmesi

Bitki örneklerinin yapraklarındaki *CAT* geninin mRNA seviyelerindeki değişim incelendiğinde, hem 25 mM (27,3) hem de 50 mM (36,55) kurşun uygulamasında *CAT* gen ifadesinin kontrole göre önemli derecede arttığı belirlenmiştir (Grafik 3.18a).

Her iki bakır konsantrasyonunda kontrole kıyasla *CAT* gen ifadesinin önemli ölçüde arttığı ve 50 mM bakır uygulanan örneklerde *CAT* gen ifadesinin (17,8) 100 mM bakır uygulanan örneklere göre (5,71) daha fazla artış gösterdiği tespit edilmiştir (Grafik 3.18b).

Tüm bitki örnekleri karşılaştırıldığında, en yüksek *CAT* gen ifadesine (36,55) 50 mM kurşun stresi altındaki bitki grubunda rastlanmıştır (Grafik 3.18a ve 3.18b).



Grafik 3.18. a) Kurşun uygulanan **b)** bakır uygulanan bal kabağı bitkisinin yaprak örneğindeki *CAT* mRNA seviyesi

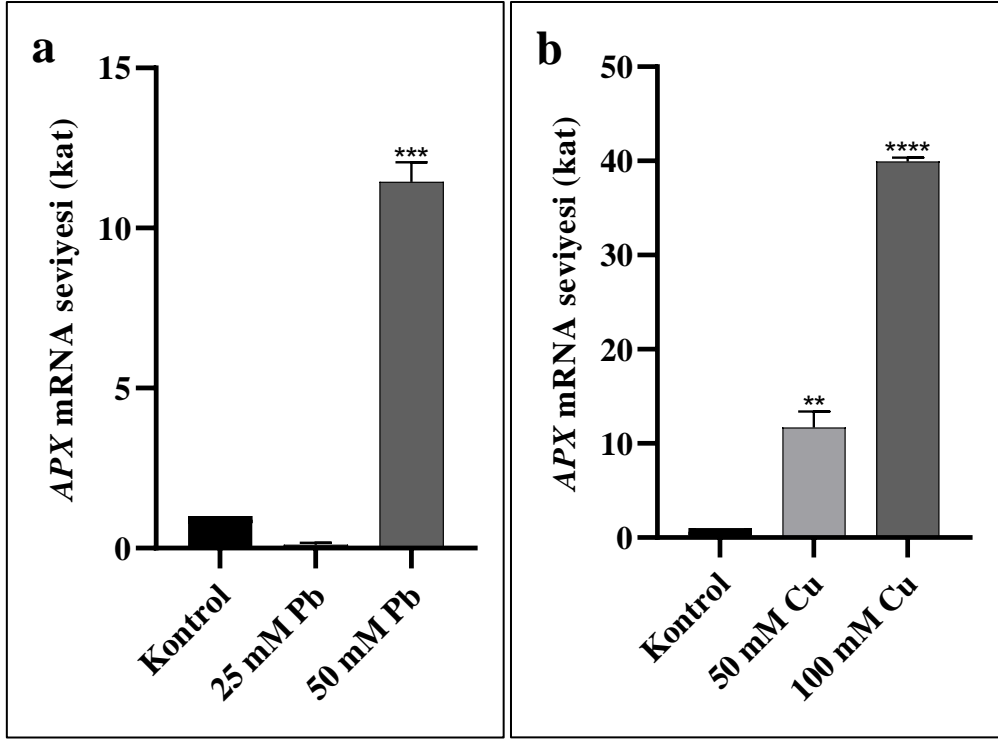
(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

3.1.5.4. Bal Kabağı Yapraklarında *APX* mRNA Seviyesindeki Değişimin Belirlenmesi

Yaprak örneklerinde *APX* genine ait mRNA seviyelerindeki değişim incelendiğinde, 25 mM kurşun uygulanan bitkilerin *APX* gen ifadesinde (0,11) kontrole kıyasla bir azalma gözlemlendiği, 50 mM kurşun uygulamasında ise *APX* gen ifadesinin (11,4) kontrole göre önemli derecede arttığı belirlenmiştir (Grafik 3.19a).

Bakır konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak (sırasıyla 11,7 kat ve 39,9 kat) *APX* gen ifadesinin kontrole göre önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir (Grafik 3.19b).

Tüm deney grupları karşılaştırıldığında, en yüksek *APX* gen ifadesine (39,9) 100 mM bakır uygulamasında rastlanırken, en düşük *APX* gen ifadesine (0,11) 25 mM kurşun uygulamasında rastlanmıştır (Grafik 3.19a ve 3.19b).



Grafik 3.19. a) Kurşun uygulanan b) bakır uygulanan bal kabağı bitkisinin yaprak örneğindeki APX mRNA seviyesi

(*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001)

3.2. Tartışma

Küreselleşen dünya, antropojenik etkiler ve endüstrileşme nedeniyle ciddi oranda artan çevre kirliliği önemli ekolojik sorunların başında gelmektedir. Özellikle toprak ve su kirliliğinin başlıca sebeplerinden olan ağır metal kirliliği, sesil organizmalar olan bitkileri bu strese maruz bırakmaktadır. Bitkileri birçok yönden olumsuz etkileyen bu abiyotik stres, dünyanın farklı coğrafyalarında verim ve kalite kaybı yaşanmasına sebep olmaktadır. Aynı zamanda besin zinciri yoluyla diğer canlıların da sağlığını tehdit etmektedir (Srivastava vd., 2017: 1). Ağır metaller, bitki büyüme ve gelişimi için gerekli olan mikro elementler ile bitki gelişimine hiçbir katkısı olmayan ve çok küçük miktarlarda bile toksik etki yaratan metaller olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır (Yang ve Chu, 2011: 59). Bazal ağır metal toleransının bütün bitki türlerinde bulunduğu varsayılmaktadır. Bitkilerin büyük çoğunluğu akümülatör olmasa da, tüm bitkiler beslenebilmek ve ağır metallerle kontamine olmuş topraklarda büyüebilmek için ağır metallerle baş etmek zorundadır. Bu yüzden bitkilerin, ağır metal stresi altında bile yaşayabilmeleri için etkin mekanizmalara sahip olmaları gerekmektedir (Viehweger, 2014: 1).

3.2.1. Bal Kabağı Bitkisinde Kurşun ve Bakır Uygulamasının Ekolojik Etkileri

Ağır metal fazlalığı, genel olarak bitkiler üzerinde bazı ortak semptomlara sebep olsa da, her bir ağır metal farklı bitki genotipleri üzerinde spesifik etkiler oluşturabilmektedir (Kalaivanan ve Ganeshamurthy, 2016: 96).

Bakıra aşırı miktarda maruz kalan bitkilerde görülen yaygın toksik etkiler, bitki gelişimindeki gecikme ve yaprak klorozudur. Bakır, daha çok kök sisteminde birikme eğiliminde olduğundan büyük ölçüde kök büyümesini ve morfolojisini etkilemektedir. Bakır toksisitesi, bitki morfolojisini etkileyip biyokütlenin azalmasına, kök gelişiminin inhibe edilmesine ve besin dengesizliğine sebep olabilmektedir (Kumar vd., 2021: 11).

Bitkilerin morfolojisi, büyümesi ve fotosentetik süreçleri üzerinde olumsuz etkilere sahip olan kurşun ise, büyüme inhibisyonuna, kloroza, kök sisteminde kararmaya neden olmaktadır. Kurşun, birçok bitki türünde tohum çimlenmesini, kök-gövde uzamasını ve yaprak genişlemesini engellemektedir (Kalaivanan ve Ganeshamurthy, 2016: 93).

Bakır stresinin *Cassia angustifolia* Vahl bitkisinde (Nanda ve Agrawal, 2018: 411) ve iki mısır çeşidinde (Aly ve Mohamed, 2012: 543); kurşun stresinin ise *Acalypha indica* L. bitkisinde (Venkatachalam vd., 2017: 548) ve buğdayda (Yang vd., 2010: 1983) kontrole göre gövde uzunluğunu azalttığı rapor edilmiştir. Bitkilerin ağır metal streslerine karşı göstermiş olduğu tepkiler, farklı ağır metal tolerans düzeylerine bağlı olarak gerçekleşmektedir. Literatürdeki birçok çalışmanın belirttiğinin aksine, çalışmamızda iki farklı konsantrasyonda kurşun ve bakır uygulanan bal kabağı bitkisinde metal tolerant bitkilerde olduğu gibi görünür bir toksisite semptomunun oluşmadığı ve kontrole göre gövde uzunluklarının arttığı belirlenmiştir. 25 mM ve 50 mM kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakılan bal kabağı bitkilerinin kontrole göre gövde uzunluklarının arttığı (sırasıyla $p<0,001$; $p<0,01$), bunun yanında düşük kurşun konsantrasyonundaki bitkilerin gövde uzunluklarının daha yüksek kurşun konsantrasyonundaki bitkilerin gövde uzunluklarından fazla olduğu tespit edilmiştir (Grafik 3.1). 50 mM bakır konsantrasyonundaki bitkilerin gövde uzunluklarında kontrole göre önemli derecede bir değişiklik bulunmazken, 100 mM bakır konsantrasyonundaki bal kabağı bitkilerinin gövde uzunluklarının kontrole göre arttığı ($p<0,01$), ayrıca bal kabağı bitkisinde bakır konsantrasyonunun artmasıyla gövde uzunluğunun arttığı gözlenmiştir (Grafik 3.2). Gözlelediğimiz bu sonuçlara benzer olarak, Wu ve arkadaşları (2018), potansiyel bir kadmiyum hiperakümülatörü olan *Abelmoschus manihot* bitkisiyle yaptıkları çalışmada, 100 mg/kg Cd stresi altında bitki büyümesinin arttığını ve görünür herhangi bir hasar belirtisi olmadığını belirlemişlerdir (Wu vd., 2018: 709). Başka bir çalışmada, mangan

hiperakümülatörü olan *Polygonum lapathifolium* L. bitkisinde artan mangan konsantrasyonlarında kontrole göre bitki uzunluğunun arttığı ve bitki morfolojisinde toksisite semptomu görülmediği tespit edilmiştir (Liu vd., 2016: 351). Benzer şekilde *Hymenaea courbaril* L. bitkisinde 100 ve 200 mg/kg Cu uygulamasının bitki boyunu artırdığı, 400 mg/kg ve 800 mg/kg Cu konsantrasyonlarında ise büyümenin azaldığı gözlenmiştir (Marques vd., 2018: 4). Bezelyede (*Pisum sativum* L.) yapılan bir çalışmada, kurşun ve bakırın düşük konsantrasyonlarında (50 µg/l) gövde uzunluğunda kontrole kıyasla önemli bir farklılık bulunmadığı, 500 µg/L bakır konsantrasyonunda az da olsa gövde uzunluğunda kontrole göre bir artış olduğu, bunun yanında 500 µg/L kurşun konsantrasyonunda ise gövde uzunluğunun kontrole göre önemli derecede arttığı bildirilmiştir (Dinh vd., 2018: 17). Yine bezelye ile yapılan bir başka çalışmada, bezelyenin kurşuna, kadmiyum ve kobalttan daha toleranslı olduğu belirtilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda uygulanan kurşun stresinin kontrole göre gövde uzunluğunu azalttığı, ama uygulanan kurşun stresinin seviyesi arttıkça gövde büyümesinin uyarılıp uzunluğunun arttığı fakat yine de kontrolden düşük olduğu rapor edilmiştir (Majeed vd., 2019: 285).

Farklı konsantrasyonlarda uygulanan kurşun ve bakır stresinin, bal kabağı bitkisinin kök uzunluğunu azalttığı belirlenmiştir. Çalışmamızda 25 mM kurşun stresi uygulanan bal kabağı bitkilerinin kontrole göre kök uzunluklarında anlamlı bir değişiklik saptanmazken, 50 mM kurşun stresi uygulanan örneklerin kök uzunluklarının kontrole göre azaldığı ($p < 0,01$) belirlenmiştir (Grafik 3.1). 50 mM ve 100 mM bakır stresi uygulanan bal kabağı örneklerinin kök uzunluklarının kontrole göre önemli derecede azaldığı (sırasıyla $p < 0,0001$; $p < 0,001$) gözlenmiştir (Grafik 3.2). Gövde uzunluğu artarken kök uzunluğunun azalması, bu ağır metallerin daha çok köklerde birikmesi ile açıklanabilir. Ağır metallerin köklerde tutulması, metallerin bitkinin diğer doku ve organlarına taşınmasını engelleyerek ağır metal stresinin etkisini azaltmak için bitki tarafından geliştirilen bir tolerans mekanizmasından kaynaklanmaktadır. Örneğin, bakıra dayanıklı bazı bitki türleri, bakır köklerinde tutarak gövde ve yapraklara ulaşmasını engeller (Bouazizi vd., 2010: 1306). Bitkiler için esansiyel bir element olan bakır hem aktif hem de pasif yolla taşınırken, kurşun esansiyel bir metal olmadığından geçişi pasif taşınım (apoplastik yolak veya Ca^{+2} geçirgen kanallar) ile gerçekleşmektedir. Bu nedenle kurşunun kökten gövdeye translokasyonu sınırlıdır. Uygun konsantrasyonlardaki bakır bitkiler için esansiyel olduğundan köklerden gövdeye kolayca taşınabilirken, belirli eşik değerini geçen konsantrasyonlarda pasif taşınım yoluyla alınmaktadır. Yüksek konsantrasyonlardaki bakır, pasif taşınım yoluyla geçmek zorunda

olduğundan köklerden gövdeye taşınımı zorlaşmaktadır. Bu yüzden kurşun ve yüksek konsantrasyonlardaki bakır köklerde birikmektedir (Trakal vd., 2015: 71). Mısırdaki artan bakır konsantrasyonlarında kök uzunluğunun azaldığı ve köklerin toprak üstü kısımlardan daha fazla bakır biriktirdiği gözlenmiştir (Ouzounidou vd., 1995: 167). Mısır (*Zea mays*) ve kamış (*Phragmites australis*) ile yapılan bir çalışmada, bakır toksisitesinin, sürgün büyüme hızı ve toplam bitki biyokütlesinden ziyade daha çok kök uzamasını etkilediği ve kök uzunluğunda önemli derecede azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir (Ait Ali vd., 2002: 107). Farklı bir çalışmada ise *Arabidopsis thaliana* bitkisinde farklı konsantrasyonlardaki bakır stresinin kök biyokütlesini gövde biyokütlesinden daha fazla etkileyip inhibe ettiği ve bakırın yine daha çok köklerde tutulduğu belirlenmiştir (Lequeux vd., 2010: 673). Sarımsak (*Allium sativum* L.) ile yapılan bir çalışmada ise, kurşun toksisitesinin düşük seviyelerinde (10^{-4} M ve 10^{-5} M) sürgün ve köklerde inhibe edici etkinin görülmediği, 10^{-3} M Pb konsantrasyonunda kök ve sürgün uzunluğunun azaldığı ve kurşunun kök büyümesini sürgün büyümesinden çok daha fazla inhibe ettiği gözlenmiştir (Liu vd., 2009: 139).

Araştırmamızda özellikle bakır stresi uygulanan bal kabağı örneklerinin kök uzunluğunun kurşun stresi uygulanan bitki örneklerinin kök uzunluğuna göre daha fazla azaldığı tespit edilmiştir. Kurşun konsantrasyonunun artmasıyla kök uzunluğunun daha fazla azaldığı ama bakır stresinde bunun aksine 50 mM bakır stresi altındaki bitkilerin kök uzunluğunun 100 mM bakır stresi altındaki bitkilerin kök uzunluğuna göre daha fazla azaldığı saptanmıştır. Çalışmamızın sonuçlarına paralel olarak, fitoremediasyon için potansiyel bir bitki olan *Sesbania grandiflora* bitkisinde artan kurşun konsantrasyonu kök uzunluğunun ve bitki biyokütlesinin azaldığı gözlenmiştir (Malar vd., 2014: 251). Yapılan farklı bir çalışmada, 150 ve 300 μ M kurşun konsantrasyonunda hardal otunun kök uzunluğunda kontrole göre önemli bir değişiklik bulunmazken daha yüksek kurşun konsantrasyonlarında gövde ve kök uzunluğunda önemli derecede azalma gözlenmiştir. Yüksek konsantrasyonlardaki kadmiyum ve kurşun stresinin hardal otunda büyümeyi azalttığı, bununla birlikte kadmiyum ve kurşunun sürgünden daha çok köklerde biriktiği belirlenmiştir (John vd., 2009: 68).

25 mM kurşun konsantrasyonundaki bal kabağı bitkisinin kök yaş ağırlığının kontrolden bile daha fazla olduğu ($p < 0,0001$), kök kuru ağırlığının ise kontrole göre değişmediği tespit edilmiştir. 50 mM kurşun konsantrasyonunda ise kontrole kıyasla kök yaş ve kuru ağırlığında önemli bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir (Grafik 3.3). 50 mM bakır konsantrasyonundaki bal kabağı bitkisinin kontrole kıyasla kök yaş ağırlığının istatistiksel

olarak önemli derecede azaldığı ($p < 0,0001$), kök kuru ağırlığında ise anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. 100 mM bakır konsantrasyonundaki bal kabağı bitkisinin kontrole kıyasla kök yaş ve kuru ağırlığında istatistiksel olarak önemli bir azalmanın olduğu (sırasıyla $p < 0,0001$; $p < 0,05$), bununla birlikte bakır konsantrasyonu arttıkça kök yaş ve kuru ağırlığının daha fazla azaldığı belirlenmiştir (Grafik 3.4). Tang ve arkadaşlarının (2009) yapmış olduğu çalışma sonuçlarımızı desteklemektedir. *Arabis paniculata* Franch. ile yapılan bu çalışmada, düşük kurşun konsantrasyonlarında kök-gövde kuru ağırlığının kontrole göre arttığı, daha yüksek kurşun konsantrasyonlarında ise azaldığı bildirilmiştir (Tang vd., 2009: 129). Hardal otu (*Brassica juncea* L. Czern.) ve kanola (*Brassica napus* L.) ile yapılan bir çalışmada ise, her iki bitkide de bakır toksisitesinin kontrole göre kök yaş ağırlığını ve kök uzunluğunu azalttığı tespit edilmiştir (Feigl vd., 2013: 183). Mısır fideleriyle yapılan bir başka çalışmada, kurşun konsantrasyonu arttıkça kök-gövde uzunluğunun, yaş ve kuru ağırlığının kontrole göre azaldığı belirlenmiştir (Hussain vd., 2013: 264).

İki farklı konsantrasyonda bakır ve kurşun uygulanan bal kabağı bitkisinin gövde kuru ağırlığında kontrole göre önemli bir değişiklik saptanmamıştır. 25 mM kurşun ve 50 mM bakır konsantrasyonunda gövde yaş ağırlıklarının kontrole kıyasla önemli bir şekilde arttığı (sırasıyla $p < 0,001$; $p < 0,01$), daha yüksek kurşun (50 mM Pb) ve bakır (100 mM Cu) konsantrasyonunda ise gövde yaş ağırlıklarının kontrole göre önemli derecede azaldığı (sırasıyla $p < 0,001$; $p < 0,01$) belirlenmiştir (Grafik 3.5 ve 3.6). Literatürde sonuçlarımızı destekler nitelikte çalışmalar mevcuttur. Örneğin Stingu ve arkadaşları (2009) fasulye ile yaptıkları çalışmada, daha düşük bakır konsantrasyonlarında gövde yaş-kuru ağırlığının ve yaprak yaş ağırlığının kontrole göre arttığını, daha yüksek bakır konsantrasyonlarında ise azaldığını belirlemişlerdir (Stingu vd., 2009: 1250). Gupta ve arkadaşları (2009) ise mısırla yaptıkları çalışmada, farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde uyguladıkları kurşun stresinin gövde yaş ve kuru ağırlığında genel olarak önemli bir değişiklik oluşturmadığını tespit etmişlerdir. Bunun yanında 4 gün için uygulanan kurşun stresinin düşük konsantrasyonlarda mısır fidelerinin gövde yaş ağırlığını kontrole göre artırdığını, en yüksek konsantrasyonda uygulanan kurşun stresinin (200 μM) ise kontrole göre gövde yaş ağırlığını azalttığını bildirmişlerdir (Gupta vd., 2009: 481).

Çalışmamızın sonuçlarıyla benzer bulgular elde edilen farklı bir çalışmada, *Eclipta prostrata* (L.) L., *Scoparia dulcis* L. ve *Phyllanthus niruri* L. olmak üzere üç bitki türü kullanılarak bu bitkilerin kurşun stresine toleransları incelenmiştir. *E. prostrata* bitkisinin toksisite semptomu göstermediği ve biyokütlesinin kontrole göre arttığı gözlenmiştir. Bu

bitkinin uygulanan her kurşun konsantrasyonunda kök-sürgün uzunluğunun ve kuru ağırlığının arttığı, 800 ve 1600 mg/kg Pb konsantrasyonunda gövde yaş ağırlığının, 400 ve 1600 mg/kg Pb konsantrasyonları arasında kök yaş ağırlığının kontrole göre arttığı tespit edilmiştir. *S. dulcis* bitkisinin de, yüksek kurşun konsantrasyonlarında hayatta kaldığı, kök ve sürgün yaş-kuru ağırlığında kontrole göre önemli bir değişiklik olmadığı kaydedilmiştir. *P. niruri* bitkisinin ise kurşun toksisitesine duyarlı olduğu ve kök-sürgün uzunluğunun, yaş-kuru ağırlığının, bitki biyokütlesinin kontrole göre azaldığı belirlenmiştir (Chandrasekhar ve Ray, 2019: 29).

Bitki biyokütlesinin, ağır metal varlığında bitkinin büyüme performansını karakterize etmek için iyi bir gösterge olduğu düşünülmektedir (Malar vd., 2014: 252). 25 mM kurşun stresine maruz bırakılan bal kabağı örneklerinin kontrole göre gövde ve kök biyokütleleri önemli bir artış gösterirken (sırasıyla $p<0,001$; $p<0,01$), 50 mM kurşun stresine maruz bırakılan örneklerin kontrole göre gövde ve kök biyokütlelerinde önemli bir azalma (sırasıyla $p<0,01$; $p<0,05$) görülmüştür (Grafik 3.7). 50 mM bakır stresine maruz bırakılan bal kabağı örneklerinin kontrole göre gövde biyokütleleri önemli derecede artarken ($p<0,0001$), 100 mM bakır stresine maruz bırakılan bal kabağı örneklerinin gövde biyokütleleri istatistiksel olarak önemli derecede azalmıştır ($p<0,0001$). Her iki bakır konsantrasyonunda da kök biyokütlesi kontrole göre azalmıştır (50 mM Cu konsantrasyonunda $p<0,05$; 100 mM Cu konsantrasyonunda $p<0,01$) ve bu azalma konsantrasyon arttıkça daha belirgin hale gelmiştir (Grafik 3.8). 25 mM kurşun stresine maruz bırakılan bitkiler haricinde diğer deney gruplarında kontrole kıyasla kök biyokütlelerinde azalma gözlenmiştir. Kurşun ve bakır stresinin daha düşük konsantrasyonlarında gövde biyokütleleri artarken daha yüksek konsantrasyonlarında ise gövde biyokütlelerinde azalma görülmüştür. Literatürde yer alan çalışmalar sonuçlarımızı destekler niteliktedir. Moso bambu (*Phyllostachys pubescens*) ile yapılan bir çalışmada, düşük seviyelerdeki kurşun uygulamalarının büyümeyi teşvik edebileceği bildirilmiştir. 200 mg/kg ve 400 mg/kg kurşun konsantrasyonu gibi daha düşük kontaminasyon seviyelerinde kök ve gövde biyokütlesinin arttığı ama 800 mg/kg gibi daha yüksek kurşun kontaminasyonu seviyelerinde kök-gövde biyokütlesinin azaldığı tespit edilmiştir (Zhong vd., 2017: 74). Yapılan farklı bir çalışmada, salatalık bitkisine farklı konsantrasyonlarda (0,2 μ M, 5 μ M, 25 μ M ve 50 μ M) bakır stresi uygulandığında, artan bakır konsantrasyonu kök ve gövde biyokütlesinin düzenli olarak azaldığı tespit edilmiştir (Feil vd., 2020: 142). Bir süs bitkisi olan *Calandula officinalis* L. bitkisinin dış fitotoksikite belirtileri göstermeden bakır stresi altında normal büyüdüğü ve bakırın toksik seviyesinde

(150 mg/kg) kök uzunluğunun, kök ve gövde biyokütlesinin kontrolle aynı kaldığı belirlenmiştir (Goswami ve Das, 2016: 211). Çin lahanasında artan bakır konsantrasyonu kök ve gövdedeki biyokütle üretiminin azaldığı ama kök-gövde kuru madde içeriğinin arttığı gözlenmiştir (Aghajanzadeh vd., 2020: 1292). Çalışmamızda biyokütle ile ilgili elde edilen sonuçlar, bazı ağır metallerin zararlı olmasına ya da toksik etkilerine bakılmaksızın belirli konsantrasyonlara kadar hiperakümülatörler gibi bazı bitkilerde büyümede uyarıcı etkilere sahip olabileceğini, ancak daha yüksek konsantrasyonlarda inhibe edici etkiler oluşturabileceğini göstermektedir (Tang vd., 2009: 132).

Tolerans indeksi (TI), bitkilerin ağır metallere karşı toleransını yansıtan ve o metale karşı ekolojik hoşgörülülüğünü ortaya koyan önemli bir belirteçdir (Wang vd., 2011b: 14518). Bitki büyüme parametleri esas alınarak elde edilen tolerans indeksi, stres uygulanan grupların büyüme parametreleriyle kontrol grubunun büyüme parametreleri arasındaki oran olarak ifade edilmektedir (Liang vd., 2011: 574). Ağır metallerin varlığında kök ve/veya sürgün büyümesinin engellenmesine bağlı olarak ağır metal stresine karşı bitki toleransı tahmin edilmektedir. Kontrol grubundan daha yüksek tolerans indeksine sahip olan bitkilerin büyüme parametrelerindeki net artışla ağır metallere karşı tolerans geliştirdiği, kontrol grubundan daha düşük tolerans indeksine sahip olanların ise büyüme parametrelerindeki net azalışla ağır metal stresinden etkilendiği, bunun yanında kontrol grubuyla aynı tolerans indeksine sahip olanların ise ağır metal kirliliğinden etkilenmediği öne sürülmektedir (Amin vd., 2018: 56). Çalışmamızda 25 mM kurşun stresi uygulanan bitkilerin tolerans indeksinin kontrol grubundan önemli derecede fazla olduğu ($p < 0,0001$), 50 mM kurşun, 50 mM bakır ve 100 mM bakır stresi uygulanan örneklerin ise tolerans indekslerinin kontrol grubuna kıyasla önemli bir azalma gösterdiği (her biri için $p < 0,0001$), özellikle 50 mM bakır stresi altındaki bitkilerin en düşük tolerans indeksine sahip olduğu belirlenmiştir (Grafik 3.9a ve 3.9b). 50 mM bakır stresi altındaki bitkilerin gövde uzunluğu, gövde yaş ağırlığı ve gövde biyokütlesi kontrolden daha yüksek olsa da çalışmamızda tolerans indeksi hesaplanırken total (kök+gövde) bitki uzunluğu baz alındığı için, kontrole göre daha düşük tolerans indeksine sahip olduğu gözlenmiştir. Deney grupları karşılaştırıldığında, bakır stresi uygulanan grupların her iki konsantrasyonda da kurşun stresi uygulanan örneklere göre daha düşük tolerans indekslerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bir süs bitkisi ve potansiyel Cd hiperakümülatörü olan kurdele çiçeğiyle (*Chlorophytum comosum*) yapılan bir çalışmada, farklı konsantrasyonlarda (5,10,20 ve 50 mg/kg) kadmiyum stresi altında yetişen bitkilerde kontrole göre tolerans indeksinin arttığı, 100 ve 200 mg/kg Cd konsantrasyonunda yetişen

bitkilerde tolerans indeksinin azaldığı belirlenmiştir (Wang vd., 2012: 931). Kurdele çiçeğinde yapılan başka bir çalışmada da 250 ve 500 mg/kg Pb konsantrasyonunda kök ve sürgün uzunluklarının ve yaş ağırlıklarının kontrole göre arttığı, bu iki konsantrasyondaki tolerans indeksinin kontrolden fazla olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda artan kurşun konsantrasyonu bu parametrelerin azaldığı tespit edilmiştir (Wang vd., 2011b: 14517).

3.2.2. Bal Kabağı Bitkisinde Kurşun ve Bakır Uygulamasının Klorofil Miktarları Üzerine Etkileri

Klorofil, ışığı absorbe etme kabiliyeti nedeniyle fotosentez sürecinde temel bir rol oynamaktadır. Ağır metal stresi altında sıklıkla görülen kloroz ve bitki büyümesinin yavaşlaması, fotosentezdeki pigmentlerin biyosentetik yollarının bozulduğunu işaret etmektedir. Dolayısıyla ağır metal varlığında plastid gelişimi, fotosentez etkinliği ve genel metabolizma da etkilenmektedir (Rai vd., 2016: 130-131).

Çalışmamızda her iki kurşun konsantrasyonunda da kontrole göre klorofil *a* ($p<0,0001$), klorofil *b* (25 mM Pb için $p<0,001$; 50 mM Pb için $p<0,01$) ve toplam klorofil miktarlarının ($p<0,0001$) arttığı, 25 mM kurşun stresi altındaki bitkilerin klorofil *a*, klorofil *b* ve toplam klorofil içeriklerindeki artışın 50 mM kurşun konsantrasyonundakilerden daha fazla olduğu saptanmıştır. Kurşun konsantrasyonu arttığında klorofil *a*, klorofil *b* ve toplam klorofil miktarı azalmış olsa da kontrole göre klorofil miktarlarında artış olduğu tespit edilmiştir (Grafik 3.10). 50 mM bakır stresi altındaki bitkilerin kontrole kıyasla klorofil *a*, klorofil *b* ve toplam klorofil miktarları artarken (sırasıyla $p<0,01$; $p<0,001$; $p<0,0001$), 100 mM bakır uygulamasında bitkilerin klorofil *a* ve toplam klorofil miktarlarında kontrole göre azalma olduğu ($p<0,05$), klorofil *b* miktarında ise istatistiksel olarak önemli bir değişim olmadığı gözlenmiştir. Düşük bakır konsantrasyonunda kontrole göre klorofil miktarları artarken, yüksek bakır konsantrasyonunda klorofil miktarlarının azaldığı belirlenmiştir (Grafik 3.11). Yüksek bakır konsantrasyonunda klorofil miktarlarındaki azalmanın sebebinin, bakır konsantrasyonu arttıkça yapraklardaki demir konsantrasyonunun azalması olduğu düşünülmektedir (Pätsikkä vd., 2002: 1363). Bir diğer olası sebep ise bakırın klorofil biyosentezinde gerekli olan magnezyumun yerine geçerek pigmente müdahale etmesidir (Rai vd., 2016: 131). Kurşun stresinin bakır stresine kıyasla daha geniş konsantrasyon aralığında klorofil içeriğinde artış meydana getirdiği görülmektedir. Bu durumun, aynı konsantrasyon seviyesi altında kontamine olmuş toprakta, bakırın kurşundan daha yüksek miktarda ekstrakte edilebilir iyon içeriğine sahip olmasından kaynaklanabileceği öngörülmektedir. Böylece stres altındaki bitkiler tarafından Pb iyonlarından daha fazla zararlı Cu iyonları alınmaktadır.

Çalışmamızın sonuçlarına benzer olarak, Li ve arkadaşlarının (2020) marul ile yaptıkları bir çalışmada, 250 mg/kg kurşun ve bakır uygulanan marul bitkilerinin, yüksek oranda kurşun ve bakır biriktirse bile kontrole göre daha verimli olması ve yaprak klorofil miktarının kontrole göre daha yüksek olması sebebiyle morfolojide sağlıklı bitkiler oldukları gözlenmiştir. 25, 50 ve 250 mg/kg kurşun ve bakır konsantrasyonunun kontrole göre yaprak klorofil içeriğini artırdığını, bununla birlikte 500 mg/kg kurşun stresinin kontrole göre yaprak klorofil içeriğini artırdığını ancak 500 mg/kg bakır konsantrasyonunda yaprak klorofil miktarının kontrole kıyasla azaldığını tespit etmişlerdir (Li vd., 2020: 14). Farklı bir çalışmada; bakır, kurşun, çinko, demir, kadmiyum ve nikel içeren atık su uygulamasının reproduktif aşamada deniz börülcesinde (*Salicornia europaea* L.) kontrole göre biyokütleyi artırdığı, çiçeklenme aşamasında klorofil *a* ve toplam klorofil miktarını artırdığı ancak hem reproduktif hem de çiçeklenme aşamasında klorofil *b* içeriğini azalttığı rapor edilmiştir (Khalilzadeh vd., 2020: 1574).

Yüksek konsantrasyonlarda olmadığı müddetçe kurşunun bakıra göre fotosentetik aparata daha az zarar verdiği tespit edilmiştir. Çoğu bitki türü, büyüme ve gelişim için esansiyel olmadığından kurşunun sürgünlere girişini engellemektedir. Ayrıca biriken kurşun, membran hasarını ve fotosentetik pigmentlerdeki toksik etkileri azaltmak için vakuollerde sekestre edilebilmektedir. Gri mangrov (*Avicennia marina* (Forssk.) Vierh.) fidelerinde, artan bakır konsantrasyonu ile klorofil *a*, klorofil *b* ve toplam klorofil miktarlarının azaldığı fakat farklı konsantrasyonlarda uygulanan kurşunun klorofil *a*, klorofil *b* ve toplam klorofil miktarları üzerinde inhibe edici bir etki göstermediği bildirilmiştir. Uygulanan her kurşun konsantrasyonunda, fidelerin morfolojisinde toksisite belirtisi göstermediği ve kurşuna toleranslı olduğu belirlenmiştir (MacFarlane ve Burchett, 2001: 239). Giannakoula ve arkadaşları (2021), turunç (*Citrus aurantium* L.) ile yaptıkları çalışmada, fotosentetik pigmentlerde konsantrasyona bağlı bir metal stresi tepkisi olduğunu tespit etmişlerdir. Düşük kurşun (500 µM) ve bakır (500 µM) konsantrasyonlarında klorofil *a*, toplam klorofil ve karotenoid içeriklerinin kontrole göre arttığını, yüksek kurşun (800 µM) ve bakır (800 µM) konsantrasyonlarında ise klorofil *a*, toplam klorofil ve karotenoid içeriklerinde kontrole kıyasla azalmanın olduğunu bildirmişlerdir (Giannakoula vd., 2021: 4).

3.2.3. Bal Kabağı Bitkisinde Kurşun ve Bakır Uygulamasının Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkileri

Ağır metaller, toprak tuzluluğu, kuraklık, aşırı sıcaklar gibi çeşitli abiyotik stresler, ROS'ların artan düzeyde üretimini tetikleyip bitkilerde doğrudan ya da dolaylı olarak

oksidatif hasara yol açmaktadır. Lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden olan MDA'nın konsantrasyonunun artması genellikle, oksidatif stresin yoğunluğunun ana belirteci olarak kabul edilmektedir (Verma ve Dubey, 2003: 645; Juknys vd., 2012: 300).

Çalışmamızda 25 mM kurşun uygulanan bitkilerin MDA içeriğinin kontrole göre azaldığı ($p<0,05$), 50 mM bakır uygulanan bitkilerin MDA içeriğindeki azalmanın kontrole göre önemli olmadığı tespit edilmiştir. 50 mM kurşun uygulaması ve 100 mM bakır uygulaması sonucunda örneklerin MDA içeriğinde ise kontrole göre artış olduğu ($p<0,01$) belirlenmiştir (Grafik 3.12a ve 3.12b). 25 mM Pb ve 50 mM Cu uygulamasında MDA içeriğinin neredeyse kontrole yakın miktarlarda olması, bal kabağı bitkisinin kurşun ve bakırın bu konsantrasyon seviyelerini tolere edebilmesiyle açıklanabilir. Bu durum, antioksidatif enzim aktivitelerinin artmasıyla hidrojen peroksit seviyesinin ve membran hasarının azalmasından kaynaklanıyor olabilir. İki farklı mangrov bitkisinin (*Kandelia candel* ve *Bruguiera gymnorrhiza*) fidelerine farklı konsantrasyonlarda kurşun, kadmiyum ve civa uygulanmıştır. Ağır metal konsantrasyonu arttıkça, *B. gymnorrhiza* bitkisinin yapraklarında MDA içeriğinin kontrole göre arttığı fakat uygulanan en yüksek ağır metal seviyesi hariç diğer ağır metal konsantrasyonlarında *K. candel* yapraklarında MDA içeriğinin kontrole göre azaldığı tespit edilmiştir. Düşük ağır metal konsantrasyonlarında, *B. gymnorrhiza* bitkisinin köklerinde MDA içeriğinin azaldığı, *K. candel* bitkisinin köklerinde ise MDA içeriğinin değişmediği belirlenmiştir. En yüksek ağır metal stresinde her iki bitkinin de köklerinde MDA içeriğinin kontrole göre arttığı ancak *B. gymnorrhiza* bitkisinin MDA içeriğindeki artışın daha fazla olduğu belirlenmiştir. *K. candel* bitkisinin oksidatif hasardan daha iyi korunabileceği ve antioksidan sistemini hızla yukarı regüle edebileceği ifade edilmiştir (Zhang vd., 2007: 49). Çalışmamızda, bal kabağı bitkisinde bakır ve kurşun konsantrasyonu arttığında MDA içeriğinin arttığı tespit edilmiştir. 50 mM bakır uygulanan bitkilerin MDA içeriği 25 mM kurşun uygulamasıyla ve 100 mM bakır uygulanan örneklerin MDA içeriği 50 mM kurşun uygulanan örneklerle karşılaştırıldığında bakır stresi altındaki grupların kurşun stresi altındaki gruplara göre daha yüksek MDA içeriğine sahip olduğu gözlenmiştir. Arpada yapılan bir çalışmada, farklı ağır metallerin (kurşun, bakır, kadmiyum, çinko, krom ve nikel) konsantrasyonları arttıkça genel olarak MDA içeriğinin arttığı ve lipid peroksidasyonundaki en belirgin artışın bakır stresi altındaki bitkilerde olduğu belirlenmiştir. Bakırdan kaynaklı oksidatif hasarın şiddetinin, redoks aktif bir metal olan bakırın Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları yoluyla ROS sentezini doğrudan indükleyebilmesiyle ve doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna katılabilmesiyle açıklanabileceği belirtilmiştir. Aynı zamanda

lipid peroksidasyonundaki en düşük artışlardan birinin kurşun uygulanan arpa gruplarında olduğu gözlenmiştir. Bu durumun ise redoks aktif olmayan kurşunun oksidatif stresi dolaylı olarak başlatabilmesinden ve apoplastik ile simplastik taşınımının köklerde sınırlandırılarak bitkilerde kurşun direncine yol açmasından kaynaklı olabileceği ifade edilmiştir (Juknys vd., 2012: 302).

Literatürde yapılan çalışmaların çoğunluğu, kurşun ve bakır toksisitesinin MDA içeriği üzerindeki etkileriyle ilgili elde ettiğimiz sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Buğday fidelerinde farklı konsantrasyonlarda uygulanan kurşun stresinin sürgün ve köklerdeki MDA içeriğini artırdığı belirlenmiştir (Dey vd., 2007: 58). Kanola ile yapılan bir çalışmada 100 µM ve 400 µM kurşun uygulamasının kontrole göre yaprak ve köklerdeki MDA içeriğini artırdığı ve kurşun konsantrasyonu arttıkça MDA içeriğindeki artışın daha fazla olduğu bildirilmiştir (Ali vd., 2014: 267). Pirinçte ise 100 µM bakır konsantrasyonunun kontrole göre MDA içeriğini artırdığı, bununla birlikte bakır stresine daha uzun süreli maruz bırakılan örneklerde MDA içeriğinin daha fazla arttığı tespit edilmiştir (Mostofa vd., 2015: 3). Jüt (*Corchorus capsularis* L.) ile yapılan bir çalışmada ise 50 µM ve 100 µM bakır uygulamasının kontrole göre MDA içeriğini artırdığı ve bakır konsantrasyonundaki artışa paralel olarak MDA içeriğinin de yükseldiği gözlenmiştir (Parveen vd., 2020: 8).

3.2.4. Bal Kabağı Bitkisinde Kurşun ve Bakır Uygulamasının Toplam Protein İçeriği Üzerine Etkileri

Ağır metallerin birincil hedeflerinden biri de proteinlerdir. Bu nedenle, proteinlerde meydana gelen herhangi bir değişiklik bitkilerde oksidatif stresin önemli bir göstergesi olarak kabul edilebilmektedir (Rastgoo ve Alemzadeh, 2011: 379). Çalışmamızda 25 mM kurşun konsantrasyonuna maruz bırakılan bal kabağı bitkilerinde kontrole göre toplam protein miktarının azaldığı ($p < 0,05$), 50 mM kurşun stresi altındaki bitkilerde ise kontrole göre toplam protein miktarının arttığı ($p < 0,01$) belirlenmiştir (Grafik 3.13a). 50 mM kurşun stresine maruz bırakılan bitkilerin kontrole göre toplam protein içeriğindeki artış, çeşitli antioksidan enzimleri de içerebilen stres proteinlerinin indüklenmesinden ve Pb iyonlarını detoksifiye etmeyi amaçlayan fitoşelatinlerin üretiminden kaynaklı olabilmektedir (Lamhamdi vd., 2013: 34). Bal kabağı bitkisinde uygulanan her iki bakır konsantrasyonunda da kontrole göre toplam protein miktarının azaldığı (50 mM Cu için $p < 0,05$; 100 mM Cu için $p < 0,01$) tespit edilmiştir (Grafik 3.13b). Toplam protein miktarının azalması, ağır metal stresi altında proteaz aktivitesinin artmasının bir sonucu olarak artan protein degradasyon sürecinden kaynaklanıyor olabilir (John vd., 2009: 73). Toplam protein miktarındaki azalmanın bir diğer

nedeni ise, ağır metallerin, ROS'ların toksik etkilerinden dolayı proteinlerin parçalanmasını ve lipid peroksidasyonunu indükleyebilmesi olabilir. Çünkü ROS'lar, amino asit yan zincirlerinin oksidasyonu ya da lipid peroksidasyonunun aldehidik ürünleri ile ikincil reaksiyonlar yoluyla proteinlerin işlevselliğini etkileyebilmektedir (Solanki ve Dhankhar, 2011: 197). 25 mM kurşun uygulanan örnekler için toplam protein miktarının, kontrole göre azalmış olsa da 50 mM ve 100 mM bakır stresi altındaki bitkilerin toplam protein miktarlarından daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, bakır konsantrasyonu arttıkça toplam protein miktarının daha fazla azaldığı belirlenmiştir. Fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) ile yapılan bir çalışmada, farklı konsantrasyonlarda uygulanan bakır stresinin kontrole göre toplam protein miktarını azalttığı ve bakır konsantrasyonu arttıkça toplam protein miktarının daha fazla azaldığı bildirilmiştir (Georgiadou vd., 2018: 10).

Literatürde kurşun ve bakırın toplam protein içeriği üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmaların sonuçları farklılık göstermektedir. Beş farklı pirinç çeşidiyle yapılan bir çalışmada, kurşun stresinin bütün pirinç çeşitlerinde kontrole kıyasla toplam protein içeriğini azalttığı tespit edilmiştir (Khan vd., 2021: 11). Fasulyede yapılan bir çalışmada ise, kurşun konsantrasyonunun ve maruziyet süresinin artmasıyla toplam protein miktarının azaldığı rapor edilmiştir (Hamid vd., 2010: 241). İki farklı bamyaya çeşidi ile yapılan bir çalışmada, kurşun stresinin her iki bamyaya çeşidinde de kontrole göre toplam protein içeriğini artırdığı belirlenmiştir (Hussain vd., 2017: 8). Ayçiçeğinde ise bakır stresinin köklerde kontrole göre toplam protein içeriğini artırdığı fakat sürgün ve yapraklardaki toplam protein içeriğini etkilemediği tespit edilmiştir (El-Tayeb vd., 2006: 196).

3.2.5. Bal Kabağı Bitkisinde Kurşun ve Bakır Uygulamasının Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri

Serbest radikallerin oluşturduğu hasarlara karşı ilk savunma hattını oluşturan antioksidanlar, bitki hücrelerinin optimum sağlığı için oldukça önemlidir. Bitkilerde oksidatif streslere maruziyet sırasında ROS'un temizlenmesiyle ilişkili antioksidan enzimlerin sentezinin arttığı bilinmektedir (Rajput vd., 2021: 2). SOD, çeşitli çevresel streslerin yol açtığı yüksek ROS seviyelerinin toksik etkilerine karşı ilk savunma hattını sağlamaktadır. Bitki stres toleransında önemli olduğu öne sürülen SOD, süperoksit radikalının ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizlemektedir. Stresli koşullar sırasında ROS detoksifikasyonu için önemli olan CAT, hidrojen peroksidi suya ve oksijene dönüştürmektedir. ROS temizlenmesinde en önemli rolü oynadığı düşünülen APX ise,

H₂O₂'nin temizlenmesinde yer almakta ve elektron donörü olarak askorbatı kullanmaktadır (Gill ve Tuteja, 2010: 917-919).

Literatürdeki çalışmalarda, kurşun ve bakır stresinin SOD, CAT ve APX aktiviteleri üzerindeki etkileri bitki türüne ve dokusuna, stresin konsantrasyonuna ve maruziyet süresine göre değişkenlik göstermektedir. Kurşun stresinin, *Atractylodes macrocephala* Koidz bitkisinde SOD, CAT ve APX aktivitesini azalttığı (Wang vd., 2013: 1441), pirinç sürgünlerinde konsantrasyon ve maruziyet süresi arttıkça SOD ve APX aktivitesini artırıp CAT aktivitesini azalttığı belirlenmiştir (Thakur vd., 2017: 597). Bakır stresinin, kanolann kök ve yapraklarında SOD, CAT ve APX aktivitesini artırdığı (Zaheer vd., 2015: 315), pirincin kök ve sürgünlerinde konsantrasyon arttıkça SOD ve APX aktivitesini kontrole göre artırdığı ancak CAT aktivitesinde kontrole kıyasla anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı bildirilmiştir (Thounaojam vd., 2012: 33).

25 mM ve 50 mM kurşun uygulamasının bal kabağı bitkisinde SOD aktivitesini kontrole göre artırdığı (sırasıyla p<0,001; p<0,01) ve 25 mM kurşun konsantrasyonundaki SOD aktivitesinin 50 mM kurşun konsantrasyonundakinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Grafik 3.14a). Çalışmamızın materyali olan bal kabağı bitkisinde kurşun stresinin CAT aktivitesi üzerine etkileri SOD aktivitesine oldukça benzemektedir. Her iki kurşun konsantrasyonunda da CAT aktivitesi kontrole göre artmaktadır (25 mM Pb için p<0,0001; 50 mM Pb için p<0,01). 25 mM kurşun uygulanan bitkilerin CAT aktivitesinin, 50 mM kurşun uygulanan örneklerin CAT aktivitesinden daha fazla artış gösterdiği belirlenmiştir (Grafik 3.15a). 25 mM kurşun konsantrasyonuna maruz bırakılan örneklerin APX aktivitesi kontrole göre azalırken (p<0,01), 50 mM kurşun konsantrasyonuna maruz bırakılan örneklerin APX aktivitesi kontrole göre artış göstermiştir (p<0,01) (Grafik 3.16a). Sonuçlarımızla benzer olarak, kurşun konsantrasyonu arttıkça *Tetraena qataranse* bitkisinde SOD, CAT ve APX aktivitelerinin kontrole göre arttığı ve aktivite sıralamasının SOD>CAT>APX şeklinde olduğu rapor edilmiştir (Usman vd., 2020: 5).

Çalışmamızda, 50 mM ve 100 mM bakır stresinin SOD aktivitesini kontrole kıyasla artırdığı (p<0,001) ve artan bakır konsantrasyonuyla SOD aktivitesindeki artışın daha fazla olduğu gözlenmiştir (Grafik 3.14b). Bakır stresinin CAT aktivitesi üzerindeki etkileri SOD aktivitesindekiyle benzer sonuçlar vermektedir. 50 mM ve 100 mM bakır konsantrasyonuna maruz bırakılan örneklerin kontrole göre CAT aktivitesinin arttığı (p<0,01) ve bakır konsantrasyonu arttığında CAT aktivitesindeki artışın daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Grafik 3.15b). 50 mM bakır stresi uygulanan bitkilerin APX aktivitesinde ise kontrole göre

anlamli bir değişiklik gözlenmemiştir. 100 mM bakır uygulamasında örneklere ait APX aktivitesinin ise kontrole göre arttığı ($p < 0,01$) gözlenmiştir (Grafik 3.16b). Literatürdeki bilgiler ışığında, çalışmamızda bakır ve kurşun uygulamasına maruz kalan örneklerde antioksidan enzimlerin aktivitelerinin artması, ağır metallerin neden olduğu stres hasarının azaltılması ve stres toleransının geliştirilmesini sağlayan bir tür detoksifikasyon tepkisi olarak ifade edilebilir.

Bitkilerin ROS'un toksik etkilerini temizleyebilme yeteneği, farklı stres faktörlerine karşı toleranslarının belirlenmesinde önem arz etmektedir. Bitkilerin başlıca ROS temizleme mekanizmaları SOD, CAT ve APX enzimlerinden oluşmaktadır ve bunların arasındaki denge oldukça önemlidir (Lu vd., 2010: 588). SOD enzimi, süperoksit radikalini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürmektedir. SOD aktivitesinin ürünü olan hidrojen peroksit, hala toksiktir ve sonraki reaksiyonlarda suya dönüştürülerek elimine edilmelidir. Bitkilerde hücre içi hidrojen peroksit seviyelerini düzenleyen bir dizi enzim olsa da CAT ve APX en önemlileri olarak kabul edilmektedir (Zhang vd., 2007: 48).

Yapılan bir çalışmada, biri tek yıllık (*Halogeton glomeratus*) diğeri çok yıllık (*Peganum harmala*) olan iki çöl bitkisine bakır ve nikel stresi uygulanmıştır. Bakır ve nikel stresinin her iki bitkide de SOD aktivitesini kontrole göre artırdığı ve *H. glomeratus* bitkisinin yapraklarındaki SOD aktivitesinin, *P. harmala* bitkisinden her zaman daha yüksek olduğu belirlenmiştir. *H. glomeratus* bitkisinin ağır metal stresine tepkisinin daha güçlü olduğu ve SOD enzimidaki bu artışın oksidan hasara karşı daha iyi koruma sağladığı öne sürülmüştür. Yüksek ağır metal konsantrasyonlarında *H. glomeratus* bitkisinin yapraklarında CAT aktivitesinin arttığı, *P. harmala* bitkisinin yapraklarında ise artan ağır metal konsantrasyonuyla CAT aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir. Daha yüksek ağır metal konsantrasyonlarında, *H. glomeratus* bitkisinin yapraklarında APX aktivitesinin arttığı ve tepkisinin *P. harmala* bitkisinden daha güçlü olduğu gözlenmiştir. *H. glomeratus* bitkisi daha efektif SOD, CAT ve APX aktivitesine sahip olduğundan bu bitkinin ROS temizleme mekanizmasının *P. harmala* bitkisinden daha etkili olduğu belirtilmiştir SOD aktivitesiyle koordineli CAT ve APX aktivitesinin $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 temizleme sürecinde daha etkin rol oynadığı ifade edilmiştir (Lu vd., 2010: 588).

Çalışmamızda, her iki kurşun ve bakır konsantrasyonunda da SOD ve CAT aktivitelerinin kontrole göre arttığı, APX aktivitesinin ise sadece daha yüksek konsantrasyonlardaki kurşun ve bakır stresinde arttığı belirlenmiştir. Düşük kurşun konsantrasyonunda (25 mM Pb) APX aktivitesi kontrole kıyasla azalırken, düşük bakır

konsantrasyonunda (50 mM Cu) APX aktivitesi kontrole göre anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. APX aktivitesinde gözlenen bu azalma ya da aktivitede büyük bir indüksiyon olmaması, H₂O₂'yi detoksifiye eden diğer enzimlerden CAT'ın aktivitesinin artmasından kaynaklanmış olabilir (Singh vd., 2010: 3031). Çünkü antioksidan savunma sisteminin bir veya iki bileşenin yukarı regülasyonu, bitkilerde stres toleransının geliştirilmesi için yeterli olabilmektedir (Hossain vd., 2020: 16). H₂O₂ temizleyicileri olan CAT ve APX enzimlerinden CAT enziminin efektif bir şekilde H₂O₂'yi temizleyebilmesiyle APX enziminin aktivitesinde artışa gerek duyulmamış olabileceği düşünülmektedir. APX enzim aktivitesinin azalmasının olası bir diğer nedeni ise, APX enzim aktivitesinin önemli bir öncüsü olan askorbik asit içeriğinin azalmasıyla açıklanabilir (Kohli vd., 2018: 15170).

3.2.6. Bal Kabağı Bitkisinde Kurşun ve Bakır Uygulamasının *SOD*, *CAT* ve *APX* Gen İfadeleri Üzerine Etkileri

Antioksidan enzimleri kodlayan genlerin transkripsiyon seviyelerinin artması, çeşitli abiyotik streslere maruz kalan bitkilerde ROS aşırı birikimi ile başa çıkmada önemli bir rol oynamaktadır (Zhang vd., 2015: 20939-20940).

Her iki kurşun konsantrasyonunda *SOD-Mn* gen ifadesinin kontrole göre arttığı (p<0,001), 25 mM kurşun uygulamasında *SOD-Mn* gen ifadesinin 50 mM kurşun uygulamasındakine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Grafik 3.17a). 25 ve 50 mM kurşun konsantrasyonlarında örneklerin *CAT* gen ifadesinin kontrole göre yüksek olduğu (p<0,001) ve kurşun konsantrasyonu artışına bağlı olarak *CAT* gen ifadesinin de arttığı tespit edilmiştir (Grafik 3.18a). 25 mM kurşun uygulanan örneklerin *APX* gen ifadesinin kontrole göre azaldığı, 50 mM kurşun uygulanan örneklerin *APX* gen ifadesinin ise kontrole göre önemli ölçüde arttığı (p<0,001) gözlenmiştir (Grafik 3.19a).

Bakır stresinin, bal kabağı bitkisinde *SOD-Mn* ve *CAT* gen ifadeleri üzerindeki etkisi oldukça benzer sonuçlar göstermektedir. 50 mM ve 100 mM bakır konsantrasyonunda *SOD-Mn* ve *CAT* gen ifadesinin kontrole göre arttığı (sırasıyla p<0,0001; p<0,01), ancak 50 mM bakır uygulanan bitkilerin *SOD-Mn* ve *CAT* gen ifadesinin 100 mM bakır uygulanan örneklere göre daha fazla artış gösterdiği tespit edilmiştir (Grafik 3.17b ve 3.18b). 50 mM ve 100 mM bakır stresi altındaki bitkilerin *APX* gen ifadesinin ise kontrole kıyasla arttığı (sırasıyla p<0,01; p<0,0001) ve konsantrasyon artışına paralel olarak *APX* gen ifadesindeki artışın da daha fazla olduğu belirlenmiştir (Grafik 3.19b).

Deney gruplarının SOD, CAT ve APX aktiviteleri ve transkriptleri arasındaki paralellik, kurşun ve bakır stresi tarafından artan antioksidan enzim aktivitelerine, gelişmiş gen ekspresyonlarının katkıda bulunduğunu düşündürmektedir. Bir istisna olarak, 50 mM bakır stresi altındaki bitkilerin APX aktivitesi kontrole göre değişiklik göstermezken, *APX* gen ifadesi kontrole göre artmıştır. Bu durum, 50 mM bakır konsantrasyonuna maruz bırakılan bal kabağı örneklerinde sentezlenen APX mRNA transkriptlerinin tamamının translasyonla proteine çevrilmemiş olması ile açıklanabilir.

25 mM kurşun uygulamasının *SOD-Mn* ve *CAT* gen ifadesini kontrole göre artırdığı, *APX* gen ifadesini ise değiştirmediğ gözlenmiştir. 50 mM kurşun, 50 mM bakır ve 100 mM bakır uygulamasında *SOD-Mn*, *CAT* ve *APX* gen ifadelerinin kontrole göre arttığı belirlenmiştir. Kurşun deney gruplarının bakır deney gruplarına göre *CAT* gen ifadesinde daha fazla artış görüldüğü, bunun aksine *SOD-Mn* ve *APX* gen ifadesinde ise bakır stresi uygulanan deney gruplarında kurşun deney gruplarına göre daha fazla artış olduğu tespit edilmiştir.

Literatürde antioksidan enzimlerin gen ifadelerine ait sınırlı sayıda çalışmaya rastlansa da, mevcut çalışmalar sonuçlarımızı destekler niteliktedir. Hardal otu ile yapılan bir çalışmada, kurşun stresinin SOD, CAT, POD, GR, GST ve DHAR aktiviteleriyle *SOD*, *CAT*, *POD*, *GR*, *GST* ve *DHAR* gen ekspresyonlarını kontrole göre artırdığı bildirilmiştir. Bitkilerde kurşun ile tetiklenen ROS'un etkisine karşı koymak için antioksidan enzimlerin aktivitesinin ve ekspresyonunun hızlı ve büyük bir aktivasyonuna gerek duyulduğu ifade edilmiştir (Singh vd., 2020: 286). Hardal otu ile yapılan bir diğer çalışmada, kurşun stresinin *SOD* ve *CAT* gen ifadelerini artırdığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, SOD ile CAT aktivitelerindeki artışın, kurşun stresi altında *SOD* ve *CAT* genlerinin transkript seviyelerindeki artışla ilişkili olduğu ifade edilmiştir (Kohli vd., 2018: 15170). Üç buğday çeşidinde yapılan bir çalışmada, genel olarak hem yaprak hem de kök dokularında kurşun konsantrasyonunun artmasıyla birlikte *SOD* gen ifadesinin arttığı, *CAT* gen ifadesinin ise belirli bir konsantrasyona kadar arttığı daha sonra azaldığı belirlenmiştir. Artan kurşun konsantrasyonu kök ve yaprak dokularındaki *APX* gen ifadesinin arttığı, uygulanan en yüksek kurşun konsantrasyonunda ise azaldığı bildirilmiştir (Navabpour vd., 2020: 797). Yapılan bir çalışmada, İngiliz çimine (*Lolium perenne*) farklı sürelerde ve konsantrasyonlarda kurşun uygulaması yapılmıştır. 0,5 mM kurşun uygulamasından 24 saat sonra ve 3,2 mM kurşun uygulamasından 4, 6 ve 24 saat sonra *Mn-SOD* gen ifadesinin kontrole göre arttığı gözlenmiştir. Bunun yanında, kurşun uygulamasından 4 saat sonra *pAPX* (peroksizomal tip askorbat peroksidaz) gen ifadesinin kontrole kıyasla arttığı ve kurşun konsantrasyonu arttıkça *pAPX* gen ifadesinin daha fazla

arttığı tespit edilmiştir (Li vd., 2012: 83). *Festuca arundinacea* Schreb. ile yapılan bir çalışmada, kurşun ve kadmiyum stresinin *Cu/ZnSOD*, *FeSOD*, *POD* ve *GPX* ifadelerini kontrole göre artırdığı gözlenmiştir (Lou vd., 2017: 10). Bakır stresinin, mercimekte *APX* ekspresyonunu kontrole kıyasla artırdığı ve bakır konsantrasyonu arttığında artışın daha fazla olduğu belirlenmiştir (Hossain vd., 2020: 11). *Withania somnifera* L. bitkisinde yapılan bir çalışmada, yaprak ve kök dokularında 25 ve 50 µM bakır konsantrasyonunda *Rscat* ve *MnSOD* ekspresyonlarının kontrole göre kademeli olarak yukarı regüle olduğu, 100 ve 200 µM bakır konsantrasyonunda ise aşağı regüle olmaya başladığı bildirilmiştir (Rout ve Sahoo, 2013: 97). İki kanola çeşidinde yapılan bir çalışmada, bakır stresinin her iki çeşidin yapraklarında *BnSod*, köklerinde *BnCat* ve *BnApx* ifadelerini kontrole göre artırdığı rapor edilmiştir (Li vd., 2019: 11838). Pirinç ile yapılan bir çalışmada, bakır (II) oksit nanopartikül uygulamasının 50 ve 100 mg/L konsantrasyonda *SOD*, 10 mg/L konsantrasyonda *APX* gen ifadesini kontrole göre artırdığı belirlenmiştir (Da Costa ve Sharma, 2016: 116). *Zostera muelleri* ile yapılan bir çalışmada farklı sürelerde uygulanan 250 µg/L bakır stresinin, genel olarak *Cu/Zn-sod*, *cat*, *apx* ve *gpx* ifadelerini kontrole göre artırdığı tespit edilmiştir. Antioksidan sistemlerin hem aktivite hem de transkripsiyon seviyelerindeki kooperatif eylemlerinin, bakır stresini azaltmada önemli roller oynadığı öne sürülmüştür (Buapet vd., 2019: 91).

Kavak hibridi ile (*Populus deltoides* × *P. nigra*) yapılan bir çalışmada, kadmiyum stresinin genel olarak *Cu/Zn-SOD*, *CAT1*, *CAT2* ve *APX* gen ifadelerini kontrole göre artırdığı rapor edilmiştir (Zhang vd., 2014: 605). Turp ile yapılan bir çalışmada, kadmiyum stresinin *Mn-Sod*, *Cu/Zn-Sod*, *Fe-Sod*, *Cat1* ve *Cat3* gen ifadelerini yukarı regüle ettiği, *Cat2* gen ifadesini ise aşağı regüle ettiği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, krom stresinin ise turpta *Cu/Zn-Sod*, *Cat1* ve *Cat3* gen ifadelerini yukarı regüle ettiği, *Mn-Sod*, *Fe-Sod* ve *Cat2* gen ifadelerini aşağı regüle ettiği bildirilmiştir (Sharma vd., 2018: 6). Soya fasulyesinde (*Glycine max* L.) nikel ve kadmiyum stresinin, *Fe-SOD*, *CAT*, *APX* ve *POD* gen ekspresyonlarını kontrole göre artırdığı belirlenmiştir (Sirhindi vd., 2016: 6; El-Esawi vd., 2020: 15).

3.3. Öneriler

Antropojenik ve jeolojik etmenlerin yanı sıra yanlış tarımsal uygulamalar ve endüstrileşmenin de neden olduğu ağır metal kirliliği, son yıllarda tüm dünyayı tehdit eden önemli bir çevre sorunu haline gelmiştir. Özellikle sesil organizmalar olan bitkiler kontamine olmuş su ve topraklarda yaşamlarını devam ettirebilmek için ekolojik, fizyolojik ve moleküler düzeyde çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Ağır metallerin bitki üzerindeki etkileri, bitki

türü, ağır metal çeşidi, konsantrasyonu, maruziyet süresi gibi birçok parametreye bağlı olarak değişkenlik göstermektedir.

Çalışmamızda, iki farklı konsantrasyonda kurşun ve bakır bal kabağı bitkisine uygulanarak ekofizyolojik parametreler, antioksidan enzim aktiviteleri ve bu enzimlerin mRNA seviyesindeki değişiklikler belirlenmiştir. Literatürdeki birçok çalışmanın aksine, her iki metal uygulamasında da bal kabağı örneklerinde, yapraklarda kloroz ve nekroz gibi morfolojik olarak herhangi bir toksisite semptomuna rastlanmamıştır. Genel olarak gövdeye ait ekolojik parametrelerde artış, köke ait ekolojik parametrelerde ise azalmanın olduğu görülmektedir. Bu durumu, ağır metallerin olumsuz etkilerini azaltmak için bitkilerin geliştirdiği bir tolerans mekanizmasıyla ağır metalleri daha çok köklerde tutması ile açıklamak mümkündür. Tolerans indeksi sonuçlarına göre, örneklerin 25 mM kurşun konsantrasyonuna toleransının yüksek olduğu, diğer stres gruplarına ise hiç azımsanmayacak derecede tolerans gösterdiği belirlenmiştir.

100 mM bakır uygulaması dışında diğer stres gruplarında klorofil *a*, *b* ve toplam klorofil miktarlarının kontrole göre arttığı belirlenmiştir. Kurşunun her iki konsantrasyonda da fotosentetik pigmentleri artırdığı ama bakırın sadece düşük konsantrasyonda artırdığı görülmektedir. Bu durum, aynı konsantrasyon seviyesinde kontamine olmuş toprakta, bakırın kurşuna göre daha yüksek miktarda ekstrakte edilebilir iyon içeriğine sahip olmasıyla bitkiler tarafından daha fazla alınmasından kaynaklanabilir. Yüksek kurşun ve bakır uygulamasının örneklerde MDA içeriğini artırdığı, düşük kurşun uygulamasının MDA içeriğini azalttığı, düşük bakır uygulamasının ise MDA içeriğinde önemli bir değişiklik oluşturmadığı gözlenmiştir. Stres altında genellikle artış eğiliminde olan MDA içeriğinin azalması ya da kontrole benzer seviyede kalması, antioksidatif enzimlerin aktivitelerinin artarak ROS'ları detoksifiye etmelerinden kaynaklanabilir. 50 mM kurşun konsantrasyonu dışında diğer uygulamalarda toplam protein içeriğinin kontrole göre azaldığı belirlenmiştir. Toplam protein içeriğindeki azalma, ağır metal stresi altında protein degradasyon sürecinin artmasıyla açıklanabilirken, 50 mM kurşun konsantrasyonunda toplam protein içeriğinin artması, çeşitli antioksidan enzimleri de içerebilen stres proteinlerinin indüklenmesiyle ve fitoşelatinlerin senteziyle açıklanabilir.

Kurşun ve bakırın her iki konsantrasyonunda da SOD ve CAT aktivitelerinin arttığı, APX aktivitelerinin ise yüksek kurşun ve bakır konsantrasyonunda arttığı tespit edilmiştir. Düşük kurşun ve bakır konsantrasyonunda APX aktivitesinin artmaması, CAT enziminin etkili bir şekilde hidrojen peroksidi temizlemesiyle APX aktivitesinde artışa ihtiyaç duyulmaması şeklinde açıklanabilir. Antioksidan enzimlerin gen ifadeleri, antioksidan enzim aktiviteleriyle

genel olarak paralel sonuçlar vermektedir. *SOD-Mn* ve *CAT* gen ifadesinin stres gruplarının tamamında, *APX* gen ifadesinin ise 25 mM kurşun konsantrasyonu hariç diğer stres gruplarında arttığı belirlenmiştir. 50 mM bakır uygulanan örneklerin *APX* aktivitesinde değişim gözlenmemesi ve *APX* gen ifadesinin artışı, sentezlenen *APX* mRNA transkriptlerinin tamamının translasyonla proteine çevrilmediğini ve post-transkripsiyonel süreçte bazı modifikasyonların meydana geldiğini düşündürmektedir. Çalışmamızın sonunda elde edilen bulgular, bal kabağının kurşun ve bakıra oldukça toleranslı olduğunu göstermiştir. Ayrıca bal kabağında kurşun toleransının bakıra göre daha yüksek olduğu da ortaya konmuştur. Kurşun ve bakır stresi altında bal kabağı, antioksidan enzimlerin aktivitelerini ve gen ekspresyonlarını artırarak ağır metal stresine karşı daha yüksek bir tolerans geliştirmiştir. Bu çalışma ile dikkat çekilmesi gereken diğer bir konu ise, bal kabağının yetiştirildiği toprağın ağır metal içerip içermediğinin belirlenmesindeki önemdir. Çünkü kurşun ve bakıra maruz kalan bal kabağının morfolojik olarak herhangi bir toksisite semptomu göstermemesi bu bitkinin sağlıklı olarak düşünülmesine sebep olmaktadır. Böyle bir durumda bitkinin besin olarak tüketilmesi gerek insan sağlığını gerek diğer organizmaların yaşamını tehdit etmekte ve oldukça zararlı sonuçlara yol açabilmektedir.

Literatürde, birçok ağır metalin farklı bitki türleri üzerine etkilerini araştıran çalışmalar bulunmasına rağmen, potansiyel bir hiperakümülatör olan bal kabağında ağır metallerin etkilerini inceleyen çalışmalara neredeyse hiç rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamız kurşun ve bakırın bal kabağındaki hem ekofizyolojik hem de moleküler düzeyde etkileri ile ilgili literatüre önemli katkılar sunmaktadır. Ağır metallerle kirlenmiş topraklarda hangi bitkilerin yetiştirilebileceği, bu bitkilerden ne düzeyde verim alınacağı ve toprağın ağır metalden temizlenip ıslah edilmesinde hangi bitkilerin kullanılabileceği yeni bir araştırma konusu oluşturmaktadır. Bal kabağı bitkisinde bakır ve kurşun metallerinin gerek ekolojik ve fizyolojik gerekse moleküler parametreler bakımından farklı sonuçlar oluşturması, bu bitkinin diğer ağır metallere karşı göstereceği tepkilerin incelenmesini gerektirmektedir. Diğer bitkilerden farklı olarak özellikle hiperakümülatör bitkilerin ağır metal maruziyetini tolere etmede geliştirdiği fizyolojik ve moleküler mekanizmalar, özellikle post-transkripsiyonel süreçlerin araştırılması yeni çalışmaların konusunu oluşturmalıdır. Bu sayede, hem bal kabağı bitkisinde hem de diğer bitki türlerinde ağır metal stresine karşı gösterilen tolerans mekanizmaları hakkında daha fazla bilgiye ulaşılabilecektir. Bu mekanizmaların aydınlatılması ağır metal stresine duyarlı bitkilerin ağır metallere direnç kazanmasını amaçlayan transgenik çalışmalara da öncülük edebilecektir.

KAYNAKÇA

- Aghajanzadeh, T. A., Prajapati, D. H., & Burow, M.** (2020). Copper toxicity affects indolic glucosinolates and gene expression of key enzymes for their biosynthesis in Chinese cabbage. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 66(9), 1288-1301. <https://doi.org/10.1080/03650340.2019.1666208>
- Ahmad, P., Jaleel, C. A., Azooz, M. M., & Nabi, G.** (2009). Generation of ROS and non-enzymatic antioxidants during abiotic stress in plants. *Botany Research International*, 2(1), 11-20.
- Ahmad, P., Jaleel, C. A., Salem, M. A., Nabi, G., & Sharma, S.** (2010). Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(3), 161-175. <https://doi.org/10.3109/07388550903524243>
- Ait Ali, N., Bernal, M. P., & Ater, M.** (2002). Tolerance and bioaccumulation of copper in *Phragmites australis* and *Zea mays*. *Plant and Soil*, 239, 103-111. <https://doi.org/10.1023/A:1014995321560>
- Al-Ghzawi, A. L. A., Al Khateeb, W., Rjoub, A., Al-Tawaha, A. R. M., Musallam, I., & Al Sane, K. O.** (2019). Lead toxicity affects growth and biochemical content in various genotypes of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 25(1), 55-61.
- Alaraidh, I. A., Alsaqli, A. A., & Razik, E. A.** (2018). Alteration of antioxidant gene expression in response to heavy metal stress in *Trigonella foenum-graecum* L. *South African Journal of Botany*, 115, 90-93. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.01.012>
- Ali, B., Mwamba, T. M., Gill, R. A., Yang, C., Ali, S., Daud, M. K., ... & Zhou, W.** (2014). Improvement of element uptake and antioxidative defense in *Brassica napus* under lead stress by application of hydrogen sulfide. *Plant Growth Regulation*, 74, 261-273. <https://doi.org/10.1007/s10725-014-9917-9>
- Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A.** (2013). Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7), 869-881. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>
- Alici, E. H., & Arabaci, G.** (2016). Determination of SOD, POD, PPO and cat enzyme activities in *Rumex obtusifolius* L. *Annual Research & Review in Biology*, 1-7. DOI: 10.9734/ARRB/2016/29809
- Alscher, R. G., Erturk, N., & Heath, L. S.** (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1331-1341. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1331>
- Aly, A. A., & Mohamed, A. A.** (2012). The impact of copper ion on growth, thiol compounds and lipid peroxidation in two maize cultivars ('*Zea mays*' L.) grown 'in vitro'. *Australian Journal of Crop Science*, 6(3), 541-549.

- Amin, H., Arain, B. A., Jahangir, T. M., Abbasi, M. S., & Amin, F.** (2018). Accumulation and distribution of lead (Pb) in plant tissues of guar (*Cyamopsis tetragonoloba* L.) and sesame (*Sesamum indicum* L.): profitable phytoremediation with biofuel crops. *Geology, Ecology, and Landscapes*, 2(1), 51-60. <https://doi.org/10.1080/24749508.2018.1452464>
- Anjum, N. A., Sharma, P., Gill, S. S., Hasanuzzaman, M., Khan, E. A., Kachhap, K., ... & Tuteja, N.** (2016). Catalase and ascorbate peroxidase—representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 19002-19029. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7309-6>
- Ara, N., Nakkanong, K., Lv, W., Yang, J., Hu, Z., & Zhang, M.** (2013). Antioxidant enzymatic activities and gene expression associated with heat tolerance in the stems and roots of two cucurbit species (“*Cucurbita maxima*” and “*Cucurbita moschata*”) and their interspecific inbred line “Maxchata”. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(12), 24008-24028. <https://doi.org/10.3390/ijms141224008>
- Armendariz, A. L., Talano, M. A., Travaglia, C., Reinoso, H., Oller, A. L. W., & Agostini, E.** (2016). Arsenic toxicity in soybean seedlings and their attenuation mechanisms. *Plant Physiology and Biochemistry*, 98, 119-127. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.11.021>
- Arnon, D. I.** (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1), 1. DOI: 10.1104/pp.24.1.1
- Ashfaq, F., Inam, A., Sahay, S., & Iqbal, S.** (2016). Influence of heavy metal toxicity on plant growth, metabolism and its alleviation by phytoremediation—a promising technology. *Journal of Agriculture and Ecology Research International*, 6(2), 1-19. DOI: 10.9734/JAERI/2016/23543
- Asri, F. Ö., & Sönmez, S.** (2006). Ağır Metal Toksisitesinin Bitki Metabolizması Üzerine Etkileri. *Derim*, 23(2), 36-45.
- Awa, S. H., & Hadibarata, T.** (2020). Removal of heavy metals in contaminated soil by phytoremediation mechanism: a review. *Water, Air, & Soil Pollution*, 231(2), 47. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-4426-0>
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S.** (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014. DOI: 10.1155/2014/360438
- Baker, A. J., & Walker, P. L.** (1990). Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*, 2, 155-165.
- Berwal, M., & Ram, C.** (2018). Superoxide dismutase: A stable biochemical marker for abiotic stress tolerance in higher plants. *Abiotic and Biotic Stress in Plants*, 1-10. DOI: 10.5772/intechopen.82079

- Bharwana, S. A., Ali, S., Farooq, M. A., Iqbal, N., Abbas, F., & Ahmad, M. S. A.** (2013). Alleviation of lead toxicity by silicon is related to elevated photosynthesis, antioxidant enzymes suppressed lead uptake and oxidative stress in cotton. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 4(4), 10-4172. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-6199.1000187>
- Bhattacharjee, S.** (2012). The language of reactive oxygen species signaling in plants. *Journal of Botany*, 2012. doi:10.1155/2012/985298
- Bouazizi, H., Jouili, H., Geitmann, A., & El Ferjani, E.** (2010). Copper toxicity in expanding leaves of *Phaseolus vulgaris* L.: antioxidant enzyme response and nutrient element uptake. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(6), 1304-1308. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.05.014>
- Bowler, C., Montagu, M. V., & Inze, D.** (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 43(1), 83-116. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.43.060192.000503>
- 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(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Buapet, P., Mohammadi, N. S., Pernice, M., Kumar, M., Kuzhiumparambil, U., & Ralph, P. J.** (2019). Excess copper promotes photoinhibition and modulates the expression of antioxidant-related genes in *Zostera muelleri*. *Aquatic Toxicology*, 207, 91-100. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.12.005>
- Burkhead, J. L., Gogolin Reynolds, K. A., Abdel-Ghany, S. E., Cohu, C. M., & Pilon, M.** (2009). Copper homeostasis. *New Phytologist*, 182(4), 799-816. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02846.x>
- Büyük, İ., Soydam-Aydın, S., & Aras, S.** (2012). Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. *Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology/Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji*, 69(2). DOI: 10.5505/TurkHijyen.2012.40316
- Catalá, A.** (2006). An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(9), 1482-1495. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.02.010>
- Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S. B., Ribeiro, C. W., Lazzarotto, F., & Margis-Pinheiro, M.** (2012). Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology*, 35, 1011-1019. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000600016>
- Chandrasekhar, C., & Ray, J. G.** (2019). Lead accumulation, growth responses and biochemical changes of three plant species exposed to soil amended with different concentrations of lead nitrate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 171, 26-36. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.058>

- Chen, M., Zhang, L. L., Li, J., He, X. J., & Cai, J. C.** (2015). Bioaccumulation and tolerance characteristics of a submerged plant (*Ceratophyllum demersum* L.) exposed to toxic metal lead. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *122*, 313-321. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.08.007>
- Da Costa, M. V. J., & Sharma, P. K.** (2016). Effect of copper oxide nanoparticles on growth, morphology, photosynthesis, and antioxidant response in *Oryza sativa*. *Photosynthetica*, *54*, 110-119. <https://doi.org/10.1007/s11099-015-0167-5>
- DalCorso, G.** (2012). Heavy metal toxicity in plants. In *Plants and Heavy Metals* (pp. 1-25). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4441-7_1
- Dar, M. I., Naikoo, M. I., Khan, F. A., Rehman, F., Green, I. D., Naushin, F., & Ansari, A. A.** (2017). An introduction to reactive oxygen species metabolism under changing climate in plants. *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation Under Abiotic Stress*, 25-52. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5_2
- Das, K., & Roychoudhury, A.** (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, *2*, 53. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>
- del Río, L. A., Corpas, F. J., López-Huertas, E., & Palma, J. M.** (2018). Plant superoxide dismutases: Function under abiotic stress conditions. *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*, 1-26. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75088-0_1
- Dey, S. K., Dey, J., Patra, S., & Pothal, D.** (2007). Changes in the antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in wheat seedlings exposed to cadmium and lead stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *19*, 53-60. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202007000100006>
- Dinh, T. D., Nguyen, D. D., & Dao, T. S.** (2018). Germination and shoot development of *Pisum sativum* L. under exposure to arsenic, lead, and copper in laboratory conditions. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, *60*(4), 15-18. [https://doi.org/10.31276/VJSTE.60\(4\).15-18](https://doi.org/10.31276/VJSTE.60(4).15-18)
- Dumanović, J., Nepovimova, E., Natić, M., Kuča, K., & Jačević, V.** (2021). The significance of reactive oxygen species and antioxidant defense system in plants: A concise overview. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 552969. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.552969>
- El-Amier, Y., Elhindi, K., El-Hendawy, S., Al-Rashed, S., & Abd-ElGawad, A.** (2019). Antioxidant system and biomolecules alteration in *Pisum sativum* under heavy metal stress and possible alleviation by 5-aminolevulinic acid. *Molecules*, *24*(22), 4194. <https://doi.org/10.3390/molecules24224194>
- El-Esawi, M. A., Elkelish, A., Soliman, M., Elansary, H. O., Zaid, A., & Wani, S. H.** (2020). *Serratia marcescens* BM1 enhances cadmium stress tolerance and phytoremediation potential of soybean through modulation of osmolytes, leaf gas exchange, antioxidant

machinery, and stress-responsive genes expression. *Antioxidants*, 9(1), 43. <https://doi.org/10.3390/antiox9010043>

El-Tayeb, M. A., El-Enany, A. E., & Ahmed, N. L. (2006). Salicylic acid-induced adaptive response to copper stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Growth Regulation*, 50, 191-199. <https://doi.org/10.1007/s10725-006-9118-2>

Elleuch, A., Chaâbene, Z., Grubb, D. C., Drira, N., Mejdoub, H., & Khemakhem, B. (2013). Morphological and biochemical behavior of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) under copper stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98, 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.09.028>

Ezin, V., Gbemenou, U. H., & Ahanchede, A. (2022). Characterization of cultivated pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne) landraces for genotypic variance, heritability and agro-morphological traits. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(5), 3661-3674. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.02.057>

FAO (2021). FAOSTAT [Erişim: 04.02.2023, <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>]

Farid, M., Farooq, M. A., Fatima, A., Abubakar, M., Ali, S., Raza, N., ... & Soliman, M. H. (2021). Copper-Induced Responses in Different Plant Species. In *Approaches to the Remediation of Inorganic Pollutants* (pp. 259-280). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6221-1_13

Favas, P. J., Pratas, J., Varun, M., D'Souza, R., & Paul, M. S. (2014). Phytoremediation of soils contaminated with metals and metalloids at mining areas: potential of native flora. *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination*, 3, 485-516. <http://dx.doi.org/10.5772/57469>

Feigl, G., Kumar, D., Lehotai, N., Tugyi, N., Molnár, Á., Ördög, A., ... & Kolbert, Z. (2013). Physiological and morphological responses of the root system of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.) and rapeseed (*Brassica napus* L.) to copper stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 94, 179-189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.04.029>

Feil, S. B., Pii, Y., Valentinuzzi, F., Tiziani, R., Mimmo, T., & Cesco, S. (2020). Copper toxicity affects phosphorus uptake mechanisms at molecular and physiological levels in *Cucumis sativus* plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 157, 138-147. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.10.023>

Georgiadou, E. C., Kowalska, E., Patla, K., Kulbat, K., Smolińska, B., Leszczyńska, J., & Fotopoulos, V. (2018). Influence of heavy metals (Ni, Cu, and Zn) on nitro-oxidative stress responses, proteome regulation and allergen production in basil (*Ocimum basilicum* L.) plants. *Frontiers in Plant Science*, 9, 862. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00862>

Ghosh, M., & Singh, S. P. (2005). A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of it's by products. *Asian Journal on Energy and Environment*, 6(4), 18.

- Giannakoula, A., Therios, I., & Chatzissavvidis, C.** (2021). Effect of lead and copper on photosynthetic apparatus in citrus (*Citrus aurantium* L.) plants. The role of antioxidants in oxidative damage as a response to heavy metal stress. *Plants*, *10*(1), 155. <https://doi.org/10.3390/plants10010155>
- Gill, S. S., & Tuteja, N.** (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, *48*(12), 909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Gjorgieva Ackova, D.** (2018). Heavy metals and their general toxicity on plants. *Plant Science Today*, *5*(1), 15-19. <https://doi.org/10.14719/pst.2018.5.1.355>
- Goswami, S., & Das, S.** (2016). Copper phytoremediation potential of *Calandula officinalis* L. and the role of antioxidant enzymes in metal tolerance. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *126*, 211-218. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.030>
- Gull, A., Lone, A. A., & Wani, N. U. I.** (2019). Biotic and abiotic stresses in plants. *Abiotic and Biotic Stress in Plants*, 1-19. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.85832>
- Gupta, D. K., Nicoloso, F. T., Schetinger, M. R. C., Rossato, L. V., Pereira, L. B., Castro, G. Y., ... & Tripathi, R. D.** (2009). Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown Zea mays seedlings under moderate lead stress. *Journal of Hazardous Materials*, *172*(1), 479-484. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.06.141>
- Hadi, F., & Aziz, T.** (2015). A mini review on lead (Pb) toxicity in plants. *Journal of Biology and Life Science*, *6*(2), 91-101. doi:10.5296/jbls.v6i2.7152
- Hamid, N., Bukhari, N., & Jawaid, F.** (2010). Physiological responses of *Phaseolus vulgaris* to different lead concentrations. *Pakistan Journal of Botany*, *42*(1), 239-246.
- Harinasut, P., Poonsopa, D., Roengmongkol, K., & Charoensataporn, R.** (2003). Salinity effects on antioxidant enzymes in mulberry cultivar. *Science Asia*, *29*(2), 109-113. doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2003.29.109
- Hasan, M. K., Cheng, Y., Kanwar, M. K., Chu, X. Y., Ahammed, G. J., & Qi, Z. Y.** (2017). Responses of plant proteins to heavy metal stress—a review. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1492. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01492>
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. B., Parvin, K., Bhuiyan, T. F., Anee, T. I., Nahar, K., ... & Fujita, M.** (2020a). Regulation of ROS metabolism in plants under environmental stress: a review of recent experimental evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(22), 8695. <https://doi.org/10.3390/ijms21228695>
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Mahmud, J. A., ... & Fotopoulos, V.** (2020b). Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, *9*(8), 681. <https://doi.org/10.3390/antiox9080681>

- Heath, R. L., & Packer, L.** (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Hossain, M. A., Piyatida, P., da Silva, J. A. T., & Fujita, M.** (2012). Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *Journal of Botany*, 2012. doi:10.1155/2012/872875
- Hossain, M. S., Abdelrahman, M., Tran, C. D., Nguyen, K. H., Chu, H. D., Watanabe, Y., ... & Tran, L. S. P.** (2020). Insights into acetate-mediated copper homeostasis and antioxidant defense in lentil under excessive copper stress. *Environmental Pollution*, 258, 113544. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113544>
- Hussain, A., Abbas, N., Arshad, F., Akram, M., Khan, Z. I., Ahmad, K., ... & Mirzaei, F.** (2013). Effects of diverse doses of Lead (Pb) on different growth attributes of *Zea-Mays* L. *Agricultural Sciences*, 4(5), 262-265. <http://dx.doi.org/10.4236/as.2013.45037>
- Hussain, I., Siddique, A., Ashraf, M. A., Rasheed, R., Ibrahim, M., Iqbal, M., ... & Imran, M.** (2017). Does exogenous application of ascorbic acid modulate growth, photosynthetic pigments and oxidative defense in okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) under lead stress?. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39, 1-13. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2439-0>
- Ishtiyaq, S., Kumar, H., Varun, M., Kumar, B., & Paul, M. S.** (2018). Heavy metal toxicity and antioxidative response in plants: An overview. *Plants Under Metal and Metalloid Stress*, 77-106. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2242-6_3
- Islam, E., Yang, X., Li, T., Liu, D., Jin, X., & Meng, F.** (2007). Effect of Pb toxicity on root morphology, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. *Journal of Hazardous Materials*, 147(3), 806-816. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.01.117>
- Jalmi, S. K., Bhagat, P. K., Verma, D., Noryang, S., Tayyeba, S., Singh, K., ... & Sinha, A. K.** (2018). Traversing the links between heavy metal stress and plant signaling. *Frontiers in Plant Science*, 9, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00012>
- Jambunathan, N.** (2010). Determination and detection of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and electrolyte leakage in plants. *Plant Stress Tolerance: Methods and Protocols*, 291-297. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-702-0_18
- Jia-Wen, W. U., Yu, S. H. I., Yong-Xing, Z. H. U., Yi-Chao, W. A. N. G., & Hai-Jun, G. O. N. G.** (2013). Mechanisms of enhanced heavy metal tolerance in plants by silicon: a review. *Pedosphere*, 23(6), 815-825. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(13\)60073-9](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(13)60073-9)
- John, R., Ahmad, P., Gadgil, K., & Sharma, S.** (2009). Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea* L. *International Journal of Plant Production*, 3, 65-75.

- Juknys, R., Vitkauskaitė, G., Račaitė, M., & Vencloviėnė, J.** (2012). The impacts of heavy metals on oxidative stress and growth of spring barley. *Central European Journal of Biology*, 7, 299-306. <https://doi.org/10.2478/s11535-012-0012-9>
- Kalaivanan, D., & Ganeshamurthy, A. N.** (2016). Mechanisms of heavy metal toxicity in plants. *Abiotic Stress Physiology of Horticultural Crops*, 85-102. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2725-0_5
- Karabulut, H., & Gülay, M. Ş.** (2016). Serbest radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1), 50-59.
- Karuppanapandian, T., Moon, J. C., Kim, C., Manoharan, K., & Kim, W.** (2011). Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science*, 5(6), 709-725.
- Khaliq, S., Iqbal, M., Yaseen, W., & Rasheed, R.** (2021). The exogenous menadiol diacetate enhances growth and yield by reducing Pb uptake, translocation and its toxicity through tissue nutrients acquisition in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Environmental Technology & Innovation*, 23, 101666. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101666>
- Khalilzadeh, R., Pirzad, A., Sepehr, E., Khan, S., & Anwar, S.** (2020). Long-term effect of heavy metal-polluted wastewater irrigation on physiological and ecological parameters of *Salicornia europaea* L. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 20, 1574-1587. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00299-7>
- Khan, M., Rolly, N. K., Al Azzawi, T. N. I., Imran, M., Mun, B. G., Lee, I. J., & Yun, B. W.** (2021). Lead (Pb)-induced oxidative stress alters the morphological and physio-biochemical properties of rice (*Oryza sativa* L.). *Agronomy*, 11(3), 409. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030409>
- Khan, M. I. R., & Khan, N. A.** (2014). Ethylene reverses photosynthetic inhibition by nickel and zinc in mustard through changes in PS II activity, photosynthetic nitrogen use efficiency, and antioxidant metabolism. *Protoplasma*, 251, 1007-1019. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0610-7>
- Kohli, S. K., Handa, N., Sharma, A., Gautam, V., Arora, S., Bhardwaj, R., ... & Ahmad, P.** (2018). Interaction of 24-epibrassinolide and salicylic acid regulates pigment contents, antioxidative defense responses, and gene expression in *Brassica juncea* L. seedlings under Pb stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 15159-15173. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1742-7>
- Komal, T., Mustafa, M., Ali, Z., & Kazi, A. G.** (2015). Heavy metal uptake and transport in plants. In *Heavy Metal Contamination of Soils* (pp. 181-194). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14526-6_10

- Kosakivska, I. V., Babenko, L. M., Romanenko, K. O., Korotka, I. Y., & Potters, G.** (2021). Molecular mechanisms of plant adaptive responses to heavy metals stress. *Cell Biology International*, 45(2), 258-272. <https://doi.org/10.1002/cbin.11503>
- Kumar, A., Dutt, S., Bagler, G., Ahuja, P. S., & Kumar, S.** (2012). Engineering a thermo-stable superoxide dismutase functional at sub-zero to > 50 C, which also tolerates autoclaving. *Scientific Reports*, 2(1), 387. <https://doi.org/10.1038/srep00387>
- Kumar, S., & Trivedi, P. K.** (2016). Heavy metal stress signaling in plants. In *Plant Metal Interaction* (pp. 585-603). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803158-2.00025-4>
- Kumar, V., Pandita, S., Sidhu, G. P. S., Sharma, A., Khanna, K., Kaur, P., ... & Setia, R.** (2021). Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: a comprehensive review. *Chemosphere*, 262, 127810. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127810>
- Lamhamdi, M., Bakrim, A., Aarab, A., Lafont, R., & Sayah, F.** (2011). Lead phytotoxicity on wheat (*Triticum aestivum* L.) seed germination and seedlings growth. *Comptes Rendus Biologies*, 334(2), 118-126. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.12.006>
- Lamhamdi, M., El Galiou, O., Bakrim, A., Nóvoa-Muñoz, J. C., Arias-Estevez, M., Aarab, A., & Lafont, R.** (2013). Effect of lead stress on mineral content and growth of wheat (*Triticum aestivum*) and spinach (*Spinacia oleracea*) seedlings. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 20(1), 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.09.001>
- Lange, B., van der Ent, A., Baker, A. J. M., Echevarria, G., Mahy, G., Malaisse, F., ... & Faucon, M. P.** (2017). Copper and cobalt accumulation in plants: a critical assessment of the current state of knowledge. *New Phytologist*, 213(2), 537-551. <https://doi.org/10.1111/nph.14175>
- Lequeux, H., Hermans, C., Lutts, S., & Verbruggen, N.** (2010). Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(8), 673-682. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.05.005>
- Leung, D. W.** (2018). Studies of catalase in plants under abiotic stress. *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*, 27-39. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75088-0_2
- Li, H., Luo, H., Li, D., Hu, T., & Fu, J.** (2012). Antioxidant enzyme activity and gene expression in response to lead stress in perennial ryegrass. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 137(2), 80-85. <https://doi.org/10.21273/JASHS.137.2.80>
- Li, J., Qiu, Y., Zhao, Q., Chen, D., Wu, Z., Peng, A. A., ... & Wu, W.** (2020). Lead and copper-induced hormetic effect and toxicity mechanisms in lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in a contaminated soil. *Science of The Total Environment*, 741, 140440. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140440>
- Li, L., Long, M., Islam, F., Farooq, M. A., Wang, J., Mwamba, T. M., ... & Zhou, W.** (2019). Synergistic effects of chromium and copper on photosynthetic inhibition, subcellular

distribution, and related gene expression in *Brassica napus* cultivars. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 11827-11845. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04450-5>

Liang, C., Xiao-Hua, L., Zhang, Z. H., Zheng, X. T., Rengel, Z., & Zhao-Pu, L. (2011). Cadmium accumulation and translocation in two Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) cultivars. *Pedosphere*, 21(5), 573-580. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(11\)60159-8](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(11)60159-8)

Lichtenthaler, H. K. (1998). The stress concept in plants: an introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851, 187-198. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb08993.x

Liu, D., Zou, J., Meng, Q., Zou, J., & Jiang, W. (2009). Uptake and accumulation and oxidative stress in garlic (*Allium sativum* L.) under lead phytotoxicity. *Ecotoxicology*, 18, 134-143. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0266-1>

Liu, K., Yu, F., Chen, M., Zhou, Z., Chen, C., Li, M. S., & Zhu, J. (2016). A newly found manganese hyperaccumulator—*Polygonum lapathifolium* Linn. *International Journal of Phytoremediation*, 18(4), 348-353. <https://doi.org/10.1080/15226514.2015.1109589>

Liu, W., Zhang, X., Liang, L., Chen, C., Wei, S., & Zhou, Q. (2015). Phytochelatin and oxidative stress under heavy metal stress tolerance in plants. In *Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress* (pp. 191-217). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20421-5_8

Lombardi, L., & Sebastiani, L. (2005). Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. *Plant Science*, 168(3), 797-802. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.10.012>

Lou, Y., Zhao, P., Wang, D., Amombo, E., Sun, X., Wang, H., & Zhuge, Y. (2017). Germination, physiological responses and gene expression of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) growing under Pb and Cd. *PLoS One*, 12(1), e0169495. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169495>

Lu, Y., Li, X., He, M., Zhao, X., Liu, Y., Cui, Y., ... & Tan, H. (2010). Seedlings growth and antioxidative enzymes activities in leaves under heavy metal stress differ between two desert plants: a perennial (*Peganum harmala*) and an annual (*Halogeton glomeratus*) grass. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32, 583-590. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0436-7>

MacFarlane, G. R., & Burchett, M. D. (2001). Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the Grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Marine Pollution Bulletin*, 42(3), 233-240. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(00\)00147-8](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00147-8)

Majeed, A., Muhammad, Z., & Siyar, S. (2019). Assessment of heavy metal induced stress responses in pea (*Pisum sativum* L.). *Acta Ecologica Sinica*, 39(4), 284-288. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2018.12.002>

Maksymiec, W. (2007). Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(3), 177-187. <https://doi.org/10.1007/s11738-007-0036-3>

- Malar, S., Manikandan, R., Favas, P. J., Sahi, S. V., & Venkatachalam, P.** (2014). Effect of lead on phytotoxicity, growth, biochemical alterations and its role on genomic template stability in *Sesbania grandiflora*: a potential plant for phytoremediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 108, 249-257. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.018>
- Malar, S., Shivendra Vikram, S., JC Favas, P., & Perumal, V.** (2016). Lead heavy metal toxicity induced changes on growth and antioxidative enzymes level in water hyacinths [*Eichhornia crassipes* (Mart.)]. *Botanical Studies*, 55(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s40529-014-0054-6>
- Marques, D. M., Veroneze Júnior, V., da Silva, A. B., Mantovani, J. R., Magalhães, P. C., & de Souza, T. C.** (2018). Copper toxicity on photosynthetic responses and root morphology of *Hymenaea courbaril* L.(Caesalpinioideae). *Water, Air, & Soil Pollution*, 229, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3769-2>
- MEGEP** (2009). Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi, Bahçecilik, Kabak Yetiştiriciliği, Ankara [Erişim: 06.02.2023, http://hbogm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/kursprogramlari/bahcecilik/moduller/kabak_yeti_stiriciligi.pdf]
- Mehla, N., Sindhi, V., Josula, D., Bisht, P., & Wani, S. H.** (2017). An introduction to antioxidants and their roles in plant stress tolerance. *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation Under Abiotic Stress*, 1-23. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5_1
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., & Noctor, G.** (2010). Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*, 61(15), 4197-4220. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq282>
- Mir, A. R., Pichtel, J., & Hayat, S.** (2021). Copper: uptake, toxicity and tolerance in plants and management of Cu-contaminated soil. *Biometals*, 34(4), 737-759. <https://doi.org/10.1007/s10534-021-00306-z>
- Mittler, R.** (2017). ROS are good. *Trends in Plant Science*, 22(1), 11-19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>
- Mohammadi, M. A., Cheng, Y., Aslam, M., Jakada, B. H., Wai, M. H., Ye, K., ... & Qin, Y.** (2021). ROS and oxidative response systems in plants under biotic and abiotic stresses: revisiting the crucial role of phosphite triggered plants defense response. *Frontiers in Microbiology*, 12, 631318. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.631318>
- Morales, M., & Munné-Bosch, S.** (2019). Malondialdehyde: facts and artifacts. *Plant Physiology*, 180(3), 1246-1250. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00405>
- Mosa, K. A., El-Naggar, M., Ramamoorthy, K., Alawadhi, H., Elnaggar, A., Wartanian, S., ... & Hani, H.** (2018). Copper nanoparticles induced genotoxicity, oxidative stress, and

changes in superoxide dismutase (SOD) gene expression in cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *Frontiers in Plant Science*, 9, 872. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00872>

Mostofa, M. G., & Fujita, M. (2013). Salicylic acid alleviates copper toxicity in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings by up-regulating antioxidative and glyoxalase systems. *Ecotoxicology*, 22, 959-973. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1073-x>

Mostofa, M. G., Hossain, M. A., Fujita, M., & Tran, L. S. P. (2015). Physiological and biochemical mechanisms associated with trehalose-induced copper-stress tolerance in rice. *Scientific Reports*, 5(1), 11433. <https://doi.org/10.1038/srep11433>

Mushtaq, T., Shah, A. A., Akram, W., & Yasin, N. A. (2020). Synergistic ameliorative effect of iron oxide nanoparticles and *Bacillus subtilis* S4 against arsenic toxicity in *Cucurbita moschata*: polyamines, antioxidants, and physiochemical studies. *International Journal of Phytoremediation*, 22(13), 1408-1419. <https://doi.org/10.1080/15226514.2020.1781052>

Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., & Sreekanth, T. V. M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 8(3), 199-216. <https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>

Nanda, R., & Agrawal, V. (2018). Piriformospora indica, an excellent system for heavy metal sequestration and amelioration of oxidative stress and DNA damage in *Cassia angustifolia* Vahl under copper stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156, 409-419. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.016>

Navabpour, S., Yamchi, A., Bagherikia, S., & Kafi, H. (2020). Lead-induced oxidative stress and role of antioxidant defense in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26, 793-802. <https://doi.org/10.1007/s12298-020-00777-3>

NC State Extension Plant Toolbox (2020). North Carolina Extension Gardener Plant Toolbox [Erişim: 30.11.2022, <https://plants.ces.ncsu.edu/plants/cucurbita-moschata/>]

Okcu, M., Tozlu, E., Kumlay, A. & Pehlivan, M. (2012). Ağır Metallerin Bitkiler Üzerine Etkileri . *Alinteri Journal of Agriculture Science* , 17 (2) , 14-26.

Onaga, G., & Wydra, K. (2016). Advances in plant tolerance to abiotic stresses. *Plant Genomics*, 10, 229-272. <http://dx.doi.org/10.5772/64350>

Ouzounidou, G., Čiamporová, M., Moustakas, M., & Karataglis, S. (1995). Responses of maize (*Zea mays* L.) plants to copper stress—I. Growth, mineral content and ultrastructure of roots. *Environmental and Experimental Botany*, 35(2), 167-176. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(94\)00049-B](https://doi.org/10.1016/0098-8472(94)00049-B)

Paes de Melo, B., Carpinetti, P. D. A., Fraga, O. T., Rodrigues-Silva, P. L., Fioresi, V. S., de Camargos, L. F., & Ferreira, M. F. D. S. (2022). Abiotic stresses in plants and their markers: a practice view of plant stress responses and programmed cell death mechanisms. *Plants*, 11(9), 1100. <https://doi.org/10.3390/plants11091100>

- Pan, L., Luo, Y., Wang, J., Li, X., Tang, B., Yang, H., ... & Zou, X.** (2022). Evolution and functional diversification of catalase genes in the green lineage. *BMC Genomics*, 23(1), 411. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08621-6>
- Panchuk, I. I., Volkov, R. A., & Schöffl, F.** (2002). Heat stress-and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 129(2), 838-853. <https://doi.org/10.1104/pp.001362>
- Pandey, S., Fartyal, D., Agarwal, A., Shukla, T., James, D., Kaul, T., ... & Reddy, M. K.** (2017). Abiotic stress tolerance in plants: myriad roles of ascorbate peroxidase. *Frontiers in Plant Science*, 8, 581. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00581>
- Pandhair, V., & Sekhon, B. S.** (2006). Reactive oxygen species and antioxidants in plants: an overview. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 15, 71-78. <https://doi.org/10.1007/BF03321907>
- Parveen, A., Saleem, M. H., Kamran, M., Haider, M. Z., Chen, J. T., Malik, Z., ... & Azeem, M.** (2020). Effect of citric acid on growth, ecophysiology, chloroplast ultrastructure, and phytoremediation potential of jute (*Corchorus capsularis* L.) seedlings exposed to copper stress. *Biomolecules*, 10(4), 592. <https://doi.org/10.3390/biom10040592>
- Pätsikkä, E., Kairavuo, M., Šeršen, F., Aro, E. M., & Tyystjärvi, E.** (2002). Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition in vivo by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll. *Plant Physiology*, 129(3), 1359-1367. <https://doi.org/10.1104/pp.004788>
- Pirzadah, T. B., Malik, B., Tahir, I., Hakeem, K. R., Alharby, H. F., & Rehman, R. U.** (2020). Lead toxicity alters the antioxidant defense machinery and modulate the biomarkers in Tartary buckwheat plants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 151, 104992. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.104992>
- Pivić, R. N., Sebić, A. B. S., & Jošić, D. L.** (2013). Assessment of Soil and Plant Contamination by Select Heavy Metals Along a Major European Highway. *Polish Journal of Environmental Studies*, 22(5), 1465–1472.
- Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P., & Pinelli, E.** (2011). Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 213*, 113-136. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9860-6_4
- Qamer, Z., Chaudhary, M. T., Du, X., Hinze, L., & Azhar, M. T.** (2021). Review of oxidative stress and antioxidative defense mechanisms in *Gossypium hirsutum* L. in response to extreme abiotic conditions. *Journal of Cotton Research*, 4(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s42397-021-00086-4>
- Qin, X., Zhang, M., & Wu, L.** (2012). Purification and characterization of Cu, Zn superoxide dismutase from pumpkin (*Cucurbita moschata*) pulp. *European Food Research and Technology*, 235(6), 1049-1054. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1829-1>

- Rai, R., Agrawal, M., & Agrawal, S. B.** (2016). Impact of heavy metals on physiological processes of plants: with special reference to photosynthetic system. *Plant Responses to Xenobiotics*, 127-140. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2860-1_6
- Rajput, V. D., Singh, R. K., Verma, K. K., Sharma, L., Quiroz-Figueroa, F. R., Meena, M., ... & Mandzhieva, S.** (2021). Recent developments in enzymatic antioxidant defence mechanism in plants with special reference to abiotic stress. *Biology*, 10(4), 267. <https://doi.org/10.3390/biology10040267>
- Rascio, N., & Navari-Izzo, F.** (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting?. *Plant Science*, 180(2), 169-181. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.08.016>
- Rastgoo, L., & Alemzadeh, A.** (2011). Biochemical responses of Gouan ('*Aeluropus littoralis*') to heavy metals stress. *Australian Journal of Crop Science*, 5(4), 375-383.
- Reddy, A. M., Kumar, S. G., Jyothsnakumari, G., Thimmanaik, S., & Sudhakar, C.** (2005). Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) and bengalgram (*Cicer arietinum* L.). *Chemosphere*, 60(1), 97-104. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.11.092>
- Redondo-Gómez, S.** (2013). Abiotic and biotic stress tolerance in plants. In *Molecular Stress Physiology of Plants* (pp. 1-20). Springer, India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-0807-5_1
- Riyazuddin, R., Nisha, N., Ejaz, B., Khan, M. I. R., Kumar, M., Ramteke, P. W., & Gupta, R.** (2022). A comprehensive review on the heavy metal toxicity and sequestration in plants. *Biomolecules*, 12(1), 43. <https://doi.org/10.3390/biom12010043>
- Rout, J. R., & Sahoo, S. L.** (2013). Antioxidant enzyme gene expression in response to copper stress in *Withania somnifera* L. *Plant Growth Regulation*, 71, 95-99. <https://doi.org/10.1007/s10725-013-9806-7>
- Sachdev, S., Ansari, S. A., Ansari, M. I., Fujita, M., & Hasanuzzaman, M.** (2021). Abiotic stress and reactive oxygen species: Generation, signaling, and defense mechanisms. *Antioxidants*, 10(2), 277. <https://doi.org/10.3390/antiox10020277>
- Saman, M., & Sepehri, A.** (2021). Alleviating Effects of Serendipita indica and Nitric Oxide in Proso Millet Plants (*Panicum miliaceum* L.) Exposed to Copper Toxicity. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 21, 3065-3075. <https://doi.org/10.1007/s42729-021-00589-8>
- Sairam, R. K., & Saxena, D. C.** (2000). Oxidative stress and antioxidants in wheat genotypes: possible mechanism of water stress tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 184(1), 55-61. <https://doi.org/10.1046/j.1439-037x.2000.00358.x>
- Savvas, D., Colla, G., Rouphael, Y., & Schwarz, D.** (2010). Amelioration of heavy metal and nutrient stress in fruit vegetables by grafting. *Scientia Horticulturae*, 127(2), 156-161. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.09.011>

Sevgi, K., & Leblebici, S. (2022). Bitkilerde Ağır Metal Stresine Verilen Fizyolojik ve Moleküler Yanıtlar. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 7(4), 528-536. <https://doi.org/10.35229/jaes.1160228>

Shah, F. U. R., Ahmad, N., Masood, K. R., & Peralta-Videa, J. R. (2010). Heavy metal toxicity in plants. In *Plant Adaptation and Phytoremediation* (pp. 71-97). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9370-7_4

Shahid, M., Khalid, S., Abbas, G., Shahid, N., Nadeem, M., Sabir, M., ... & Dumat, C. (2015). Heavy metal stress and crop productivity. *Crop Production and Global Environmental Issues*, 1-25. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23162-4_1

Sharma, I., & Ahmad, P. (2014). Catalase: a versatile antioxidant in plants. In *Oxidative Damage to Plants* (pp. 131-148). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00004-6>

Sharma, I., Sharma, A., Pati, P., & Bhardwaj, R. (2018). Brassinosteroids reciprocates heavy metals induced oxidative stress in radish by regulating the expression of key antioxidant enzyme genes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 61. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018160679>

Sharma, P., & Dubey, R. S. (2005). Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 35-52. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100004>

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012, 1–26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>

Sharma, R. K., & Agrawal, M. (2005). Biological effects of heavy metals: an overview. *Journal of Environmental Biology*, 26(2), 301-313.

Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., & Yoshimura, K. (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1305-1319. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1305>

Singh, R., Kesavan, A. K., Landi, M., Kaur, S., Thakur, S., Zheng, B., ... & Sharma, A. (2020). 5-aminolevulinic acid regulates Krebs cycle, antioxidative system and gene expression in *Brassica juncea* L. to confer tolerance against lead toxicity. *Journal of Biotechnology*, 323, 283-292. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.09.004>

Singh, R., Tripathi, R. D., Dwivedi, S., Kumar, A., Trivedi, P. K., & Chakrabarty, D. (2010). Lead bioaccumulation potential of an aquatic macrophyte *Najas indica* are related to antioxidant system. *Bioresource Technology*, 101(9), 3025-3032. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.031>

Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2016). Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1143. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01143>

- Sirhindi, G., Mir, M. A., Abd-Allah, E. F., Ahmad, P., & 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. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00591>
- Solanki, R., & Dhankhar, R.** (2011). Biochemical changes and adaptive strategies of plants under heavy metal stress. *Biologia*, 66(2), 195-204. <https://doi.org/10.2478/s11756-011-0005-6>
- Srivastava, V., Sarkar, A., Singh, S., Singh, P., De Araujo, A. S., & Singh, R. P.** (2017). Agroecological responses of heavy metal pollution with special emphasis on soil health and plant performances. *Frontiers in Environmental Science*, 5, 64. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2017.00064>
- Stingu, A., Volf, I., & Popa, V. I.** (2009). Study of copper and cadmium accumulation by bean. *Environmental Engineering and Management Journal*, 8(5), 1247-1252.
- Tang, Y. T., Qiu, R. L., Zeng, X. W., Ying, R. R., Yu, F. M., & Zhou, X. Y.** (2009). Lead, zinc, cadmium hyperaccumulation and growth stimulation in *Arabis paniculata* Franch. *Environmental and Experimental Botany*, 66(1), 126-134. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.12.016>
- Terzi, H., & Yıldız, M.** (2011). Ağır metaller ve fitoremediasyon: fizyolojik ve moleküler mekanizmalar. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 11(1), 1-22.
- Thakur, S., Singh, L., Zularisam, A. W., Sakinah, M., & Din, M. F. M.** (2017). Lead induced oxidative stress and alteration in the activities of antioxidative enzymes in rice shoots. *Biologia Plantarum*, 61, 595-598. <https://doi.org/10.1007/s10535-016-0680-9>
- Thounaojam, T. C., Panda, P., Mazumdar, P., Kumar, D., Sharma, G. D., Sahoo, L., & Sanjib, P.** (2012). Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 53, 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.01.006>
- Trakal, L., Martínez-Fernández, D., Vítková, M., & Komárek, M.** (2015). Phytoextraction of metals: modeling root metal uptake and associated processes. *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants, Volume 1*, 69-83. https://doi.org/10.1007/978-3-319-10395-2_6
- Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)** (2022). Bitkisel Üretim İstatistikleri [Erişim: 04.02.2023, <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>]
- Ulrich, H. G., Vincent, E., & Adam, A.** (2022). Current state of knowledge on the potential and production of *Cucurbita moschata* (pumpkin) in Africa: A review. *African Journal of Plant Science*, 16(1), 8-21. <https://doi.org/10.5897/AJPS2021.2202>

- Usman, K., Abu-Dieyeh, M. H., Zouari, N., & Al-Ghouti, M. A.** (2020). Lead (Pb) bioaccumulation and antioxidative responses in *Tetraena qataranse*. *Scientific Reports*, *10*(1), 17070. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73621-z>
- Venkatachalam, P., Jayalakshmi, N., Geetha, N., Sahi, S. V., Sharma, N. C., Rene, E. R., ... & Favas, P. J.** (2017). Accumulation efficiency, genotoxicity and antioxidant defense mechanisms in medicinal plant *Acalypha indica* L. under lead stress. *Chemosphere*, *171*, 544-553. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.092>
- Verma, S., & Dubey, R. S.** (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*, *164*(4), 645-655. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00022-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00022-0)
- Viehweger, K.** (2014). How plants cope with heavy metals. *Botanical Studies*, *55*(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-55-35>
- Vijayalakshmi, D.** (2018). Abiotic stresses and its management In agriculture. *Tamil Nadu Agricultural University Agritech, Coimbatore*, 361-387.
- Visioli, G., & Marmiroli, N.** (2013). The proteomics of heavy metal hyperaccumulation by plants. *Journal of Proteomics*, *79*, 133-145. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.12.006>
- Wang, J., Chen, J., & Pan, K.** (2013). Effect of exogenous abscisic acid on the level of antioxidants in *Atractylodes macrocephala* Koidz under lead stress. *Environmental Science and Pollution Research*, *20*, 1441-1449. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1048-0>
- Wang, S. H., Zhang, H., Zhang, Q., Jin, G. M., Jiang, S. J., Jiang, D., ... & Li, Z. P.** (2011a). Copper-induced oxidative stress and responses of the antioxidant system in roots of *Medicago sativa*. *Journal of Agronomy and Crop Science*, *197*(6), 418-429. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2011.00476.x>
- Wang, Y., Tao, J., & Dai, J.** (2011b). Lead tolerance and detoxification mechanism of *Chlorophytum comosum*. *African Journal of Biotechnology*, *10*(65), 14516-14521. DOI: 10.5897/AJB11.1496
- Wang, Y., Yan, A., Dai, J., Wang, N., & Wu, D.** (2012). Accumulation and tolerance characteristics of cadmium in *Chlorophytum comosum*: a popular ornamental plant and potential Cd hyperaccumulator. *Environmental Monitoring and Assessment*, *184*(2), 929-937. <https://doi.org/10.1007/s10661-011-2010-1>
- Waśkiewicz, A., Beszterda, M., & Goliński, P.** (2014). Nonenzymatic antioxidants in plants. In *Oxidative Damage to Plants* (pp. 201-234). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00007-1>
- Wu, M., Luo, Q., Zhao, Y., Long, Y., Liu, S., & Pan, Y.** (2018). Physiological and biochemical mechanisms preventing Cd toxicity in the new hyperaccumulator *Abelmoschus manihot*. *Journal of Plant Growth Regulation*, *37*, 709-718. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9765-8>

- Yadav, S. K.** (2010). Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 76(2), 167-179. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.10.007>
- Yamauchi, Y., Furutera, A., Seki, K., Toyoda, Y., Tanaka, K., & Sugimoto, Y.** (2008). Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification in heat-stressed plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(8-9), 786-793. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.04.018>
- Yang, Y., Wei, X., Lu, J., You, J., Wang, W., & Shi, R.** (2010). Lead-induced phytotoxicity mechanism involved in seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(8), 1982-1987. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.08.041>
- Yang, Z., & Chu, C.** (2011). Towards understanding plant response to heavy metal stress. *Abiotic Stress in Plants—Mechanisms and Adaptations*, 10, 24204. DOI: 10.5772/24204
- Yarsan, E.** (1998). Lipid peroksidasyon olayı ve önlenmesine yönelik uygulamalar. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 9(1), 89-95.
- Yerli, C., Çakmakçı, T., Şahin, U., & Tüfenkçi, Ş.** (2020). Ağır metallerin toprak, bitki, su ve insan sağlığına etkileri. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 9(Özel Sayı), 103-114. <https://doi.org/10.46810/tdfd.718449>
- Yin, H., Chen, Q., & Yi, M.** (2008). Effects of short-term heat stress on oxidative damage and responses of antioxidant system in *Lilium longiflorum*. *Plant Growth Regulation*, 54, 45-54. <https://doi.org/10.1007/s10725-007-9227-6>
- Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A.** (2011). Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*, 111(10), 5944-5972. <https://doi.org/10.1021/cr200084z>
- Yruela, I.** (2005). Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 145-156. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100012>
- Zaheer, I. E., Ali, S., Rizwan, M., Farid, M., Shakoore, M. B., Gill, R. A., ... & Ahmad, R.** (2015). Citric acid assisted phytoremediation of copper by *Brassica napus* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 120, 310-317. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.06.020>
- Zhang, F. Q., Wang, Y. S., Lou, Z. P., & Dong, J. D.** (2007). Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*). *Chemosphere*, 67(1), 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.10.007>
- Zhang, F., Wan, X., Zheng, Y., Sun, L., Chen, Q., Zhu, X., ... & Liu, M.** (2014). Effects of nitrogen on the activity of antioxidant enzymes and gene expression in leaves of *Populus* plants subjected to cadmium stress. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 599-609. <https://doi.org/10.1080/17429145.2013.879676>

Zhang, T., Wang, Y., Ma, X., Ouyang, Z., Deng, L., Shen, S., ... & Sun, K. (2022). Melatonin alleviates copper toxicity via improving ROS metabolism and antioxidant defense response in tomato seedlings. *Antioxidants*, *11*(4), 758. <https://doi.org/10.3390/antiox11040758>

Zhang, Y., Li, Z., Peng, Y., Wang, X., Peng, D., Li, Y., ... & Yan, Y. (2015). Clones of *FeSOD*, *MDHAR*, *DHAR* genes from white clover and gene expression analysis of ROS-scavenging enzymes during abiotic stress and hormone treatments. *Molecules*, *20*(11), 20939-20954. <https://doi.org/10.3390/molecules201219850>

Zhong, B., Chen, J., Shafi, M., Guo, J., Wang, Y., Wu, J., ... & Liu, D. (2017). Effect of lead (Pb) on antioxidation system and accumulation ability of Moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *138*, 71-77. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.12.020>

EKLER

EK-1

Bal Kabağı Bitkisine Ait Deney Gruplarının Ekolojik Verileri

	Kök uzunluk (cm)	Gövde uzunluk (cm)	Kök yaş ağırlık (g)	Kök kuru ağırlık (g)	Gövde yaş ağırlık (g)	Gövde kuru ağırlık (g)	Kök biyoktüle (g/ha)	Gövde biyoktüle (g/ha)	Tolerans indeksi (%)
Kontrol	31,4±0,38	30,04±0,06	0,504±0,012	0,112±0,003	12,72±0,016	1,401±0,006	21298±623	266874±1169	100
25 mM Pb	30,85±0,14	31,67±0,00	0,851±0,027	0,139±0,004	13,69±0,25	1,444±0,004	26519±748	275122±752	101,8
50 mM Pb	30,04±0,18	31,13±0,29	0,53±0,014	0,095±0,000	11,51±0,179	1,367±0,01	18089±9	260306±1992	99,56
50 mM Cu	24,13±1,12	30,33±0,00	0,337±0,015	0,092±0,001	13,82±0,315	1,555±0,008	17585±111	296100±1497	88,64
100 mM Cu	27,29±0,06	32,46±0,18	0,312±0,012	0,083±0,000	11,92±0,262	1,31±0,01	15806±21	249441±1823	97,25

EK-2**Bal Kabağı Bitkisine Ait Klorofil, MDA ve Toplam Protein Miktarı Verileri**

	Klorofil <i>a</i> (mg/ml)	Klorofil <i>b</i> (mg/ml)	Toplam klorofil (mg/ml)	MDA (nmol ml⁻¹)	Toplam Protein (μg/ml)
Kontrol	3,913±0,08	1,854±0,14	5,766±0,22	0,42±0,005	5049±150
25 mM Pb	5,212±0,11	2,613±0,02	7,823±0,14	0,36±0,006	4427±90
50 mM Pb	5,066±0,19	2,46±0,08	7,524±0,11	0,54±0,017	5922±19
50 mM Cu	4,727±0,00	2,984±0,23	7,708±0,23	0,418±0,002	4232±90
100 mM Cu	3,409±0,1	1,887±0,06	5,249±0,24	0,549±0,023	4224±107

EK-3**Bal Kabağı Bitkisine Ait Antioksidan Enzim Aktivitelerinin ve Gen İfade Seviyelerinin Verileri**

	Antioksidan Enzim Aktiviteleri			Antioksidan Enzimlerin Gen İfade Seviyeleri		
	SOD (% inhibisyon)	CAT (U/mg)	APX (U/mg)	<i>SOD-Mn</i> (kat)	<i>CAT</i> (kat)	<i>APX</i> (kat)
Kontrol	65,8±1,99	0,0047±0,0002	0,0452±0,0013	1,00	1,00	1,00
25 mM Pb	162,4±3,98	0,0168±0,0003	0,0366±0,0012	15,8±0,46	27,3±1,34	0,11±0,06
50 mM Pb	104,1±5,05	0,00865±0,0005	0,05485±0,0007	10,6±0,63	36,55±2,51	11,4±0,62
50 mM Cu	149,8±2,91	0,00645±0,0002	0,0414±0,0012	48,8±0,48	17,8±0,09	11,7±1,71
100 mM Cu	158,6±3,98	0,00695±0,0002	0,0557±0,0003	16,7±1,8	5,71±0,56	39,9±0,39