



**VANADYUM (V) STRESİNİN
BUĞDAYDA (*Triticum aestivum* L.) AZOT
METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Ahmad Asadzadeh GAJOUTI

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Botanik Bilim Dalı
Prof. Dr. Ökkeş ATICI
2019**

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**VANADYUM (V) STRESİNİN BUĞDAYDA (*Triticum aestivum* L.)
AZOT METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Ahmad Asadzadeh GAJOUTI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Botanik Bilim Dalı

ERZURUM
2019

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**VANADYUM (V) STRESİNİN BUĞDAYDA (*Triticum aestivum* L.) AZOT
METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Prof. Dr. Ökkeş ATTICI danışmanlığında Ahmad Asadzadeh GAJOUTI tarafından hazırlanan bu çalışma 20/09/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı – Botanik Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği/oy çokluğu (../..) ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Rahmi DUMLUPINAR

İmza:

Üye: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

İmza:

Üye: Doç. Dr. Nevzat ESİM

İmza:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu. 26.09.2019 tarih ve 38/104 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2017-6113

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

VANADYUM (V) STRESİNİN BUĞDAYDA (*Triticum aestivum* L.) AZOT METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİLERİ

Ahmad Asadzadeh GAJOUTI

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Botanik Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

Bu araştırmada, bitki azot metabolizmasının vanadyum (V) stresine ilk 24 saat içinde verdiği tepkilerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için buğdayın (*Triticum aestivum* L.) Altındane ve Doğu-88 çeşitleri kullanılmıştır. Kontrollü koşullar altında hidroponik sistemde gerçekleştirilen çalışmada buğday fideleri, çimlenmeyi takiben 14. gün, 0.1 ve 1 mM NaVO₃ stresi koşullarına maruz bırakılmıştır. Uygulamadan 24 saat sonra, V uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) bitkilerin kök ve gövdelerinde (toprak üstü sürgün), azot metabolizmasında rol alan anahtar enzimlerden nitrat redüktaz (NR), nitrit redüktaz (NiR), glutamin sentaz (GS) ve glutamat sentaz (GOGAT) aktiviteleri belirlenmiştir. İlave olarak, dokularda içsel V miktarı, protein ve fotosentetik pigmentler (klorofil ve karotenoid) ile malondialdehid (MDA) içerikleri ölçülmüştür. V uygulamaları, buğday çeşitlerinin kök ve gövdelerinde içsel V içeriğini konsantrasyona bağlı olarak artırmıştır. Köklerde V birikimi gövdeye oranla çok daha yüksek olmuştur. Özellikle 0.1 mM V uygulaması buğday çeşitlerinde protein miktarını genelde düşürmüştür. Aksine V uygulamalarının her ikisi Altındane ve Doğu-88 çeşitlerinde lipid peroksidasyonu (LPO) seviyesini (MDA olarak) artırmıştır. MDA içeriğindeki artışlar her iki çeşidin özellikle köklerinde daha yüksek olmuştur. İki çeşidin yapraklarında klorofil a ve b içerikleri, V uygulamaları tarafından önemli oranda düşürülürken, karotenoid içeriği artırılmıştır. Klorofil a, V stresinden klorofil b'ye göre daha fazla etkilenmiştir. V uygulamaları buğdayın her iki çeşidinde NR, NiR ve GS aktivitelerini önemli seviyede inhibe etmiştir. İnhibisyonlar özellikle köklerde daha yüksek olmuştur. NR, NiR ve GS aktivitelerinin inhibisyonunda 1 mM V uygulaması, 0.1mM'a göre daha etkili olmuştur. Ancak aynı uygulamalar, GOGAT aktivitesini gövdelerde genelde düşürürken, köklerde özellikle 0.1 mM V koşullarında artırmıştır. Sonuçlara göre, V'nin daha çok buğday köklerinde biriktirildiği ve V stresinin ilk 24 saat içinde azot metabolizmasında rol alan ilk üç enzimi (NR, NiR ve GS) büyük oranda inhibe ederek azot asimilasyonunu düşürdüğü ileri sürülmüştür.

2019, 70 sayfa

Anahtar Kelimeler: Azot metabolizması, Buğday, Vanadyum, MDA, Klorofil

ABSTRACT

MS Thesis

EFFECTS OF VANADIUM (V) STRESS ON NITROGEN METABOLISM IN WHEAT (*Triticum aestivum* L.)

Ahmad Asadzadeh GAJOUTI

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Botany Science

Supervisor: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

In this work, it was aimed to determine the response of plant nitrogen metabolism to vanadium (V) stress in the first 24 hours. For this purpose, Altındane and Doğu-88 cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.) were used. The wheat seedlings were exposed to 0.1 and 1 mM NaVO₃ stress conditions on the day 14 following seed germination in a hydroponics system under controlled conditions. After 24 hours, the activities of nitrate reductase (NR), nitrite reductase (NiR), glutamine synthase (GS), and glutamate synthase (GOGAT), which are among the key enzymes involved in plant nitrogen metabolism, were determined in the roots and shoots of V-treated and untreated (control) plants. In addition, endogenous V content, and the levels of protein, photosynthetic pigments (chlorophyll and carotenoid), and malondialdehyde (MDA) were measured in the tissues. The V applications increased endogenous V content in the roots and shoots of wheat cultivars depending on the concentration. V accumulation in the roots was much higher than that in the shoots. In particular, 0.1 mM V application generally decreased protein content in the wheat cultivars. In contrast, both V applications increased lipid peroxidation (LPO) level (as MDA) in the cultivars. The increases in MDA content were higher in the roots of both cultivars. In the shoots of the cultivars, chlorophyll a and b contents were significantly reduced by the V applications while carotenoid content was increased. The V stress more affected chlorophyll a than chlorophyll b. The V applications significantly inhibited NR, NiR and GS activities in roots and shoots of both the cultivars, and the inhibitions were particularly higher in the roots. In the inhibition of NR, NiR and GS activities, 1 mM V was more effective than 0.1 mM. However, the same applications generally decreased GOGAT activity in the shoots while increased in the roots, especially at 0.1 mM V conditions. According to the results, it is suggested that V is accumulated more in wheat roots and V stress decreases nitrogen assimilation by greatly inhibiting the first three enzymes (NR, NiR, and GS) involved in nitrogen metabolism in the first 24 hours.

2019, 70 pages

Keywords: Nitrogen metabolism, Wheat, Vanadium, MDA, Chlorophyll

TEŞEKKÜR

Bu araştırma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Bitki Fizyolojisi Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum mevcut çalışma süresince değerli bilgilerini bizlerle paylaşan ve çalışmayı yöneten değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında çok fazla destekleri olan laboratuvar çalışma arkadaşlarım İhsan YİĞİT ve Gamze KARACA'ya çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca sabır ve desteğini esirgemeyen aileme ve eşime şükranlarımı sunarım.

Ahmad Asadzadeh GAJOUTI

Eylül, 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	19
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	31
3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar	31
3.2. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	31
3.2.1. Toplam çözünebilir protein tayini için gerekli çözeltiler	32
3.2.2. Malondialdehid (MDA) ölçümü çözeltileri.....	32
3.2.3. Nitrat Redüktaz (NR) ve Nitrit Redüktaz (NiR) aktivitesi çözeltileri.....	32
3.2.4. Glutamin Sentaz (GS) aktivitesi ölçümü çözeltileri.....	33
3.2.5. Glutamat Sentaz (GOGAT) aktivitesi çözeltileri	33
3.2.6. Bitki dokularında içsel vanadyum belirlemede kullanılan çözeltiler	34
3.3. Yöntemler.....	34
3.3.1. Bitkilerin büyütülmesi ve ilgili parametreler	34
3.3.2. Arnon ve Hoagland'ın modifiye besin reçetesi.....	35
3.3.3. Bitki dokularında vanadyum tayin yöntemi	36
3.3.4. Fotosentetik pigment içeriğinin belirlenmesi	37
3.3.5. Çözünebilir protein miktarının belirlenmesi	38
3.3.6. Lipid peroksidasyon (LPO) seviyesinin belirlenmesi	39
3.3.7. Azot metabolizması enzimlerinin aktiviteleri	40
3.3.7.a. Nitrat redüktaz (NR) aktivitesinin belirlenmesi	40
3.3.7.b. Nitrit redüktaz (NiR) aktivitesinin belirlenmesi.....	41
3.3.7.c. Glutamin sentaz (GS) aktivitesi ölçümü.....	42
3.3.7.d. Glutamat sentaz (GOGAT) aktivitesi ölçümü.....	43

4. ARAŞTIRMA BULGULARI	45
4.1. Bitki Dokularında İçsel Vanadyum Miktarına Ait Bulgular	45
4.2. Çözünebilir Protein Miktarına Ait Bulgular	46
4.3. Lipid Peroksidasyonu (LPO) İçeriğine Ait (MDA olarak) Bulgular	47
4.4. Fotosentetik Pigment İçeriklerine Ait Bulgular	48
4.5. Nitrat Redüktaz (NR) Aktivitesine Ait Bulgular	50
4.6. Nitrit Redüktaz (NiR) Aktivitesine Ait Bulgular	51
4.7. Glutamin Sentaz (GS) Aktivitesine Ait Bulgular	52
4.8. Glutamat Sentaz (GOGAT) Aktivitesine Ait Bulgular	53
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	55
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	71

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

da	: Dekar
dk	: dakika
EU	: Enzim ünitesi
GOGAT	: Glutamat sentaz
gr	: Gram
GS	: Glutamin sentaz
ha	: Hektar
Kl	: Klorofil
LPO	: Lipir peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehid
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
NiR	: Nitrit redüktaz
nm	: Nanometre
NR	: Nitrat redüktaz
V	: Vanadyum
μM	: Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bir bitki yaprak mezofil hücresinde nitratın alınımı, amonyuma indirgenmesi ve amonyumun asimilasyonu	13
Şekil 1.2. Bezelye (<i>Pisum sativum</i>) ve yoncada (<i>Medicago sativa</i>) rhizobia tarafından oluşturulan kök nodülü	16
Şekil 3.1. Çözünebilir protein miktarını hesaplamada kullanılan standart grafik.....	39
Şekil 3.2. NR ve NiR aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan standart grafik.....	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Doğada bitkiler için stres kaynakları	2
Çizelge 1.2. Vanadyumun bazı önemli türlerinin oksidasyon durumu	4
Çizelge 4.1. Vanadyum (V) uygulamasının buğdayın Altındane ve Doğu-88 çeşitlerinde içsel vanadyum üzerine etkisi	46
Çizelge 4.2. Vanadyum uygulamasının buğdayın Altındane ve Doğu-88 çeşitlerinde çözünabilir protein miktarı üzerine etkisi.....	47
Çizelge 4.3. Vanadyum uygulamasının buğdayın Altındane ve Doğu-88 çeşitlerinde MDA miktarı üzerine etkisi.....	48
Çizelge 4.5. Vanadyum uygulamasının buğdayın Doğu-88 çeşidinde fotosentetik pigment miktarı üzerine etkisi.....	50
Çizelge 4.6. Vanadyum uygulamasının buğdayın Altındane ve Doğu-88 çeşitlerinde NR aktivitesi üzerine etkisi	51
Çizelge 4.7. Vanadyum uygulamasının buğdayın Altındane ve Doğu-88 çeşitlerinde NiR aktivitesi üzerine etkisi	52
Çizelge 4.8. Vanadyum uygulamasının buğdayın Altındane ve Doğu-88 çeşitlerinde GS aktivitesi üzerine etkisi.....	53
Çizelge 4.9. Vanadyum uygulamasının buğdayın Altındane ve Doğu-88 çeşitlerinde GOGAT aktivitesi üzerine etkisi.....	54

1. GİRİŞ

Bitki için stres kavramının tanımı genelde tartışmalı olsa da günümüzde en çok kabul edilenler, iki ana amaç üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bunlar, (i) gün içerisinde küçük çevresel dalgalanmalara cevap olarak oluşan homeostatik değişiklikler ile strese verilen gerçek tepkileri ayırt etmek ve (ii) stres faktörü ile strese cevap arasındaki ayrımı yapabilmektir. Bu kapsamda bitki için stres, çevreden gelen (biyotik veya abiyotik) baskılardan dolayı bitki fonksiyonlarının bozulduğu, ardından normalleşme ve direnç mekanizmasının gelişebildiği bir durum olarak tanımlanmıştır. Eğer bitki tolerans limitlerinin dışına çıkmaya zorlanırsa ve aklimasyon kapasitesi aşılsa, sonuç kalıcı bir hasar veya hatta bitki için nihai olarak ölüm olabilir (Levitt 1980). Stres, yukarıdaki tanıma göre bitki için dinamik bir süreçtir. Stres faktörünün etkili olmadığı dönemde, stres olarak kabul edilmeyen kararsız bir ortam (örneğin fotosentezde hafif dalgalanmalar) olabilir. Ancak stres başladığında, dakikalar, günler veya hatta haftalarca kalabilen az veya çok hızlı ve güçlü bir cevap görülür. Stresin etkileri devam ederse, aklimasyon başlar. Aklimasyon, bitkilerin stres koşullarında dayanmalarını ve performanslarını artırmalarını sağlayan orta vadeli bir süreçtir. Bunun genetik bir temeli vardır (yani genotip fizyolojik süreçleri gerçekleştirmek için birkaç olası alternatif içerir ve bazıları sadece stres davrandığında işlevseldir), fakat çevresel olarak bir arabulucu gibidir. Stres faktörleri nesiller boyunca etkili olmaya devam ederse adaptasyon gerçekleşir, yani adapte olan popülasyonların genetik kompozisyonunda bir değişiklik olduğu anlamına gelir. Fenomen olarak, biyotik ve abiyotik streslerin bitki yaşamı için birer tehdit olmaktan ziyade, evrimsel motorları işleterek biyolojik çeşitliliğin kaynaklarını oluşturdukları ileri sürülmüştür (Reigosa *et al.* 2006; Dubey *et al.* 2018).

Doğada stressiz doğal bir çevrede yaşam sürdüren bitkilerin varlığını düşünmek pek olası değildir. Stres faktörleri, bitkilerin yaşamlarının herhangi bir döneminde ortaya çıkarak onları etkileyebilir, bitki türlerine göre farklı tepkilerin alınmasına yol açabilir, diğer bir ifadeyle farklı bitki türlerini farklı derecede etkileyebilir. Örneğin çoğu bitkiler, sürekli olarak kuraklık, sel, sıcaklık (düşük veya yüksek), aşırı tuz, ağır metaller, yüksek yoğunluklu ışınlama, allelokimyasallar veya patojenik ajanların neden

olduğu enfeksiyon gibi olumsuz çevresel koşullara maruz kalmaktadırlar. Bu nedenle, doğal ekolojik nişlerinde yaşayan bitkiler, genellikle fizyolojik optimimlerinden (en azından yaşam döngüsünün bir bölümünde) daha uzakta yaşar. Bir bitkinin belirli fizyolojik parametreleri (su veya besin Emilimi, fotosentez, solunum, büyüme, gelişme, üreme veya diğerleri) optimal koşullar altında ifade edilen azami oranın altına düştüğü zaman, açıkça onun stres altında olduğunu söyleyebiliriz. Doğada çok farklı biyotik ve abiyotik çevre etmenleri bitkilerde strese neden olabilir (Çizelge 1.1) (Salisbury and Ross 1992; Reigosa *et al.* 2006).

Çizelge 1.1. Doğada bitkiler için stres kaynakları (Reigosa *et al.* 2006)

Çevresel Stres Kaynakları		Antropojenik Kaynaklı
Abiyotik	Biyotik	
SICAKLIK – Düşük sıcaklık (Soğuk, donma) – Yüksek sıcaklık SU: – Su kıtlığı (Kuraklık, Düşük su potansiyeli) – Su basması (aşırı yağmur, Sel, oksijen yetersizliği) RADYAYSON – İnfrared – Görülür ışık (fotoinhibisyon, fotooksidasyon), – UV-A, UV-B – İyonize edici radyasyon KİMYASALLAR – İyonlar – Tuzlar Mineral eksikliği/ fazlalığı – pH (fazla/düşük) – Ozon DİĞER – Yaralama, rüzgar, ses, manyetik ve elektrik alanları, vb.	PATOJENLER -Virüs -Fungi -Bakteri HAYVANLAR -Phytophagia -Otlama –Böceklerin etkileri DİĞER Bitkiler -Parasitizm -Allelopati -Rekabet -Herbisitler, mantar ilaçları, -Tarım ilacı	-Kirlilik –O ₃ ve fotokimyasal tepkimeler -Duman –ROS oluşumu -Photooxidantlar -Asit yağmuru ve sis -Asidik su ve topraklar -Mineral eksiklikleri (Toprak kaybına veya asit yağmuruna bağlı) -Ağır metal kirliliği -Azot fazlalığı (Ötrofikasyon) -UV ışınlarının artması -Küresel iklim değişikliği, -CO ₂ konsantrasyon artışı –Tuzlu ve kuru toprakların artışı -Gürültü -Yangın -Sıkı (geçirimsiz) topraklar

Günümüzde antropojenik kaynaklı atık maddeler; toprakları, yer altı ve yer üstü sularını giderek daha fazla kirletmektedir. Özellikle ağır metal kirliliği diğer streslere göre daha uzun süreli sorunlara neden olmaktadır. Ağır metal kirliliği genelde hızlı büyüyen

sanayi bölgeleri, madencilik, endüstriyel atıkların elden çıkarılması, boya sanayi, bütün ekgzoz gazları, tarım arazisinde tekrarlanan gübre ve pestisit uygulamaları, kompost gübreler, atık su ile sulama, kömür yakılan santraller, petrokimyasalların rafine edilmesi ve atmosferik birikim gibi faaliyetlerin bir sonucu olarak ortaya çıkar. Bunun yanında, yüzyıllar boyunca insanlar ağır metallerin etkilerini bilmeden takı, silah, su borusu vb. çeşitli amaçlar için kullanmışlardır. Sanayileşme ile birlikte ağır metal içeren kömür vb. yakıtların yakılmaya başlanması ile endüstri bölgelerinde ve her geçen gün artan trafik yoğunluğuna maruz kalan dünyamız ve ülkemizde birçok kirleticiyle beraber ağır metallerin de çevredeki miktarlarının artması sonucunda ağır metal kirliliği aşırı boyutlara ulaşmıştır. Son yıllarda ağır metaller, gelişmekte olan sanayi ve agroteknik alanlarında artan kullanımdan ve yüksek biyobirikim ve toksisiteden dolayı canlı organizmalar için ana abiyotik stres ajanlarından biri haline gelmiştir. Bunlar, organizmalarda birikerek besin zincirinde yer almakta ve zararlarını yıllarca sürdürmektedirler. Ağır metalin tanımı daha çok çevresel problemler olduğunda ortaya çıkmakta ve nispeten yüksek yoğunluğa sahip ve düşük konsantrasyonlarda bile toksik veya zehirleyici olan metal olarak tarif edilmektedir. Gerçekte ağır metal tanımı fiziksel özellik açısından yoğunluğu 5 g/cm^3 'ten daha yüksek olan metaller için kullanılır. Bu elementler doğaları gereği yer kürede genellikle karbonat, silikat ve sülfür halinde stabil bileşik olarak veya silikatlar içinde bağlı olarak bulunurlar (Dubey *et al.* 2018; Morkunas *et al.* 2018). Bu grubun içine Çinko (Zn), kurşun (Pb), nikel (Ni), kobalt (Co), krom (Cr), bakır (Cu), mangan (Mn), kadmiyum (Cd), cıva (Hg), arsenik (Ar), alüminyum (Al) ve vanadyum (V) olmak üzere 60'tan fazla metal girebilmektedir. Bunların her biri ekosistemde belirli bir eşik değeri aştığında bitkiler de dahil hemen her organizmada toksik etkilere neden olan kirleticilerdir. Ağır metallerin çoğu gıda maddelerinde bulunmasına rağmen, insanlara maruz kalma durumları beslenme alışkanlıklarındaki farklılıklar nedeniyle önemli ölçüde değişebilir (Dubey *et al.* 2018). Toksitelerini, genellikle elektron taşınım ve redoks reaksiyonlarında devreye girerek özellikle solunum ve fotosentez üzerine olumsuz etki yaparak gösterirler. Bitkilerde hem generatif hem de vejetatif organları biyokimyasal, fizyolojik ve morfolojik düzeyde etkilerler (Dubey *et al.* 2018; Morkunas *et al.* 2018).

Bitkilerin yaşamlarını sağlıklı bir şekilde yürütebilmek için gerekli olan elementlere “bitki besin elementleri” denilmektedir. Bitki dokularının analizinde neredeyse doğada bulunan tüm elementleri bulmak mümkündür. Her ne kadar bitkilerin besin elementleri alımı seçici ise de, yetiştirme ortamında yaygın formda bulunan besin elementleri oranı arttıkça, bitki bünyesine pasif yollarla geçebilen bazı ağır metaller, bitkilere alınarak besin zincirine dahil olmaktadır. Bu yüzden bitkiler yetiştikleri ortamda bulunan elementleri, kendileri için gerekli olsun veya olmasın az çok bünyelerine alırlar. Elementlerin 16 tanesi (C, H, O, N, P, K, S, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu, B, Cl ve Mo) hemen bütün bitkiler için gerekli besin maddeleridir. İlaveten 6 element (Co, Al, Na, Si, Ni ve V) ise sadece bazı bitkiler veya belirli prosesler için gerekli olduğu kabul edilen elementlerdir. Ağır metal grubu içinde olup aynı zamanda bitki besin elementi (Fe, Zn, Mn ve Cu gibi) olanlar bulunduğu gibi bitki yaşamı için gerekli olmayan ve güçlü zehir etkisi olanların bulunmaktadır. Bunlardan en tehlikeli olanlar Cd, Pb ve Hg olduğu ifade edilmektedir. Ancak ağır metal grubunda olan Fe, Mn, Cu, Ni ve Zn gibi esas elementlerin de topraklardaki fazla konsantrasyonları bitkilerde toksik etkilere neden olup diğer taraftan doğal su ve karasal ekosistemlerinin bozulmasına sebep olur (Dubey *et al.* 2018; Morkunas *et al.* 2018). Bitkiler, ağır metal toksisitesini farklı yollarla bertaraf etmeye çalışırlar. Bunlar arasında en yaygın olanları; vakoul içinde immobilizasyon, şelasyon ve ağır metal direncine bağlı stres kaynaklı proteinlerin ekspresyonu bulunur. Örneğin ağır metallerin, fitoşelatör olarak küçük peptidlerle kompleks oluşturduktan sonra vakoul içine taşınıp ve serbet bırakılarak detoksifikasyonu, bitkilerde yağın bir ağır metal detoksifikasyon modelidir (Dubey *et al.* 2018).

Çizelge 1.2. Vanadyumun bazı önemli türlerinin oksidasyon durumu (Barker and Pilbeam 2007)

Tür	Formül	Oksidasyon durumu
Vanadyus	V^{2+}	+2
Vanadik	V^{3+}	+3
Vanadil	VO^{2+}	+4
Pervanadil	VO^{3+} ; $V(OH)_4^+$	+5
Metavanadat	VO_3^-	+5

Geçiş metallere biri olan vanadyum, sembolü V olan 23 atom numaralı bir elementtir. Günümüzde endüstrideki yüksek kullanım alanı nedeniyle 21. yüzyılın en önemli elementlerden biri olarak kabul edilir. Nils Gabriel Sefström, 1831 yılında vanadyumun keşfedilmemiş bir element olduğunu göstermiş ve İskandinav güzellik ve bereket tanrıçası Vanadis'in adını vermiştir (Çevik 2014). Sert, gümüşü gri renkli sünek bir geçiş metaldir. Vanadyumun ağırlığı 50.95 gr/mol, yoğunluğu 6.1 gr/cm³ olup 171°C'de erir ve 300°C de kaynar. Doğal veya sentetik bileşiklerinde kolay yükseltgenmeyen, korozyona dayanıklı ve çelik grisi renkte bir geçiş elementi olan vanadyum, çoğunlukla +3, +4 ve +5 oksidasyon durumlarında bulunmakla birlikte, pH 8'in altındaki normal toprak asitliğinde oksitleyici koşullar altında +4 ve +5 durumları daha baskın halde bulunur (Çizelge 1.2). Doğada metalik halde bulunmaz, ancak 65 farklı mineralin içerisinde vanadyum bileşikleri halinde bulunur. Yer kürede çok dağılmış olması biyolojik bir öneminin veya etkisinin olduğu intibasını verir. Vanadyum pentoksit (V₂O₅) bileşiği sülfürik asit üretimi için bir katalizör olarak kullanılır (Çevik 2014). Sertlik ve alaşım oluşturma kabiliyeti nedeniyle vanadyum makineler ve araçlarda kullanılan sert çelik malzemelerin üretiminde kullanılır (Singh 1971; Çevik 2014). Canlılarda hücre dışı vücut sıvılarında beş değerlikte metavanadat (VO₃¹⁻), hücre içi vücut sıvılarında ise dört değerlikte vanadil veya oksovanadyum IV katyonu (VO₂⁺) halinde bulunur. Genel gıdalar çok düşük derişimlerde (<1 ng/g) vanadyum içermesine rağmen, canlılar için önemli bir vanadyum kaynağıdır (Macara 1980; Olness *et al.* 2000; Çevik 2014). Çevrede vanadyum birikmesine neden olan kaynaklar ise ham petrol yatakları, demir içeren alaşımların üretiminde ve demir içermeyen element (alüminyum ve titan gibi) cevherlerinin özütlenmesinde oluşan cüruflardır (Moskalyka and Alfantazib 2003; Venkataraman and Sudha 2005; Çevik 2014). Bunlara ilaveten çelik ve demir dışı alaşımların üretimi, katalizör olarak sülfürik asit üretimi ve plastik oluşumu için naftalinin ftalik anhidrite dönüştürülmesi, yarı iletkenlerin imalatı, fotoğraf basımında, renklendirici maddelerde, sarı pigmentlerde ve seramik üretimi gibi endüstriyel alanlarda yoğun miktarlarda vanadyum veya vanadyum bileşikleri kullanılır. Vanadyum, yaklaşık 15 ağır metal içerisinde yağ yakma sırasında salınan en yüksek maddedir ve varlığı çoğu zaman yağ kirliliğinin bir göstergesi olarak alınmaktadır (Barker and Pilbeam 2007). Demir içermeyen vanadyum alaşımları nükleer enerji sektörüyle beraber havacılık ve uzay teknolojisinin geliştirilmesinde kullanılmaktadır.

Metalürji sektöründe ferrovanadyum alaşımların cüruflarında vanadyum oksitler bulunur. Antropolojik atmosferik vanadyumun yaklaşık üçte ikisi vanadyum oksitlerdir. Vanadyumun ortalama derişimleri, sırasıyla kömür, ham petrol ve karbon fosillerinde 100 µg V/gr, 600 µg V/gr ve 1500 µg V/gr'dır (Macara 1980; Moskalyka and Alfantazib 2003; Çevik 2014). Metalürji sektöründe ferrovanadyum alaşımların cüruflarında vanadyum oksitler bulunur. Vanadyumun hava ve sudaki derişimleri mevsimlere ve coğrafik etmenlere bağlıdır. Bunlar soğuk/sıcak hava, meteorolojik hava akımları, elektrik ve ısı üretimi sırasında petrol ürünleri ve atık yakıt yağların yakılmasının artması/azalması şeklinde sıralanabilir. Elektrik ve ısı üretimi için fosil yakıtların aşırı kullanılması sebebiyle havadaki vanadyum derişiminin yüksek olduğu gözlenmiştir. Örneğin ABD'nin kuzey doğu bölgesinde elektrik ve ısı üretimi için fosil yakıtların aşırı kullanılması sebebiyle havadaki vanadyum derişiminin yüksek olduğu gözlenmiştir. 1973 yılında bu bölgede vanadyum derişiminin ortalama 0.62 µg V/m³ (aralığı 0.15-1.4 µg V/m³), diğer kentsel alanlarda ise ortalama 0.011 µg V/m³ olduğu tespit edilmiştir. Genellikle kırsal alanlardaki vanadyum derişimi kentsel alanlardakinden daha düşük olduğu da tespit edilmiştir. İçme suyu 1 µg V/L den daha düşük miktarda vanadyum içerdiğinden dolayı insanlar için ciddi bir vanadyum kaynağı değildir (Leonard *et al.* 1994). Atmosferdeki vanadyumun geriye kalan kısmı karasal toz, deniz aerosolü ve az miktarda da volkanik emisyon olarak ortaya çıkar (Macara 1980; Nowakowski 1993; Çevik 2014). Topraklardaki vanadyum derişimi artışının sebebi doğal kaynaklardan daha çok antropojenik kaynaklardır. Bu kaynaklardan en önemli iki tanesi tarımda kullanılan süper fosfat gübreler (0.05-2 gr V/kg) ve çelik endüstrisinde yan ürün olan bazik atık cüruflardır (1-2 gr V/kg). Gübreler (fosfat kayaları ve azot, fosfor ve potasyum gübreleri) yüksek konsantrasyonda V içerdiği ve fosfat gübresi uygulamalarının pirinç köklerinde aşırı V birikimine neden olduğu gösterilmiştir (Nowakowski 1993; Venkataraman and Sudha 2005; Teng *et al.* 2006; Çevik 2014). Vanadyumun toksisitesi söz konusu olduğunda, bu bileşiklerin doğasına ve oksidasyon durumlarına bağlıdır. Pentavanadat mobil vanadyum formundadır ve en toksik olduğu kabul edilir. Yine de vanadyum bileşiklerinin toksisitesi düşüktür ve hiçbir veri düşük dozlarda vanadyumun kanserojen olduğunu göstermemektedir. Ancak bazı araştırmacılar vanadyumun mitoz ve kromozomal dağılımı engellediği için kanserojen olma olasılığının göz ardı edilmemesini önermişlerdir (Leonard *et al.* 1994).

In vitro ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar, belirli dozdaki vanadatlar ve diğer vanadyum bileşiklerinin glukoz metabolizmasını artırdığını göstermiştir (Leonard *et al.* 1994). Doğada kayaların ayrışması sırasında, vanadyum vanadat iyonuna oksitlenir, bu da suda çeşitli pH değerlerinde çözünürlüğünden dolayı vanadyumu bitkilerin kullanımına hazır hale getirir. İlave olarak bitkiler her türlü araç trafiği, elektrik ve ısı üretimi sırasında kullanılan petrol, kömür ve sentetik yağların yakılmasıyla oluşan baca gazlarından çıkan vanadyuma maruz kalırlar. İspanya'da uzun yıllar boyunca toplanan 24 tür vasküler bitki ve 3 briyofitin herbaryum örneklerinin analizi, özellikle 1960'lardan bu yana bitki dokularında vanadyum konsantrasyonlarında büyük bir artış olduğunu göstermiştir (Barker and Pilbeam 2007). Doğu Avrupa'nın Karpat dağlarında, bakır, nikel, demir ve çelik üretimi ile atık su çamurunun yakılması sırasında, beyaz çam (*Abies alba* Mill.) yapraklarının mikro elementleri üzerinde yapılan bir çalışmada, demir metal fabrikalarının yakınındaki populasyonlarda yüksek konsantrasyonlarda vanadyum bulunmuştur (Barker and Pilbeam 2007). Birçok ülkede ise kanalizasyon çamuru yakma işleminin kesilmesiyle birlikte, atık lağım çamurunda topraklara doğrudan vanadyum ilavesinin dünya genelinde arttığı bildirilmiştir. Vanadat iyonu bitkilerde H^+ , Na^+ ve K^+ -ATPaz pompaları için güçlü inhibitörlerden birisidir, buna karşın yeşil alg (*Scenedesmus cinsi*) için mutlak gerekli bir elementtir (Jie *et al.* 2001). Daha önce bazı araştırmacılar vanadyumu bitkilerin büyümesi ve gelişmesi için bir iz element olarak görmüşlerdir, diğer yandan bazıları da vanadyumun bitki büyümesi için gerekliliğini reddetmiştir. Bu nedenle gelişmiş karasal bitkilerde vanadyumun gerekli bir element olduğuna ilişkin somut bir kanıt bulunmamaktadır ve bitkilerin büyüme ve gelişimindeki kesin rolü bilinmemektedir. Örneğin vanadyum fluvo-aquik (organik maddece zengin) toprakta 30 mg kg^{-1} 'i aştığında bitki büyümesi inhibe olmuştur (Wang 1999). Bitkilerde kuru madde ağırlığına göre, vanadyum konsantrasyonları tipik olarak 0.27 ila 4.2 mg/kg aralığındadır (Haidu *et al.* 2017; Essia *et al.* 2017). Düşük oranlarda vanadyum bitkinin büyümesini uyarıyor gibi görünmekle birlikte, daha yüksek oranlarda birçok bitki için toksik olduğu belirlenmiştir. Buna karşın, az miktarda anyon şeklindeki vanadyumun bitki büyümesine olumlu etki yaptığı rapor edilmiştir. Radyoaktif (işaretli) vanadyum içeren çözeltide arpa bitki köklerinin vanadyumu pasif absorpsiyon ile aldığı belirlenmiştir (Lepp *et al.* 1983; Barker and Pilbeam 2007). Yüksek bitkilerde vanadyumun bir besin elementi olduğunu doğrulamak zordur.

Birincisi, vanadyumu besin kültürlerinden tamamen uzaklaştırmak zordur. Ayrıca, vanadat bilinen bir plazma zarı proton pompalayan ATPaz inhibitörü olmasına rağmen, iz konsantrasyonlarının bitki büyümesine fayda sağladığı bildirilmiştir. Kumda yetişen mısır (*Zea mays* L.) üzerinde yapılan bir deneyde, vanadyumun muhtemelen yaprak alnını artışı ve fizyolojik etkilerinden dolayı tahıl verimini artırmıştır. Vanadyumun domatese (*Lycopersicon esculentum* Mill.) besin çözeltisi içinde 0.25 mg/L uygulandığında ise bitki boyu, yaprak, çiçek ve biomasında artışa neden olmuştur. Domates bitki hücrelerinde vanadyum konsantrasyonunun, *Chlorella* hücrelerinde bulunan vanadyum konsantrasyonunun %1'in den az olduğunu belirlenmiştir. Bu da vanadyumun gelişmiş bitkilerde esansiyel bir element olmadığına delil olarak sunulmuştur. Vanadyumun faydalı bir element olarak rolü konusunda bazı şüpheler varsa da yüksek oranlarda (10 ila 20 mg/L) bitkilere zararlı olduğuna şüphe yoktur. Besin çözeltilerinde 1, 10 veya 100 mg/L'de amonyum metavanadat olarak vanadyum ile beslenen sorgum (*Sorghum bicolor* Moench.) fideleri, 1 mg/L çözeltisinde toksik bir etki göstermemiş, ancak alt gövdelerde gözle görülür kırmızı lekelenme belirlenmiştir. Bir çalışmada, %5.6 kg/ha VO_4 uygulamasından 15 ay sonra ekilmiş ve 3 ay sonra hasat edilmiş fasulye sürgün ve köklerinin büyümesi, uygulama yapılmayanlara göre önemli ölçüde düşmüştür. Vanadyumun zararlı etkilerinin sebeplerinden biri demir eksikliğine neden olmasıdır. Kayda değer oranda azalmış demir konsantrasyonları, vanadat ile beslenen Mn eksikliğine hassas bir fasulye çeşidinin yapraklarında ölçülmüştür. Tahıllar, çilek (*Fragaria X ananassa* Duchesne) ve keten (*Linum usitatissimum* L.) çok hassas türler olarak görülmektedir. Örneğin buğday (*Triticum aestivum* L.) ve arpa (*Hordeum vulgare* L.), pirinçten (*Oryza sativa* L.) ve soya fasulyesinden (*Glycine max* L.) daha hassastır (Wallace *et al.* 1977; Davis *et al.* 1978). Demir eksikliğinden kloroza neden olmasının yanı sıra, vanadyumun soya fasulyesi köklerinde Fe konsantrasyonunu düşürdüğü ve soya fasulyesi ve marul köklerinde Mg ve K içeriğini azalttığı gösterilmiştir (Wallace *et al.* 1977; Akoumianaki-Ioannidou *et al.* 2016). Vanadyum ayrıca beyaz hardalda (*Sinapis alba* L.) Mo kök ve hipokotil birikimini azaltmış ve soya yapraklarında kalsiyum konsantrasyonlarını düşürmüştür. Bazı çalışmalar vanadyumun bitki dokularında Al birikimine neden olduğunu da rapor etmiştir. Vanadyum ve fosfor arasındaki negatif ilişki, ATPaz'ların vanadat tarafından inhibe edilmesinin, enzimler üzerinde fosfat bağlanmasının rekabetçi bir şekilde inhibe

edilmesi şaşırtıcı değildir. Ayrıca, vanadyumun bitkilerde Fe noksanlığını indüklediğinden, vanadyumla kirlenmiş topraklara demir ilavesi vanadyum toksisitesini hafifletebilir (Morell *et al.* 1986; Jie *et al.* 2001; Barker and Pilbeam 2007). Vanadyumun yüksek bitkilerde klorofil sentezindeki rolü hakkında net bir kanıt yoktur, ancak Fe eksikliği kloroplast başına daha az miktarda klorofile yol açar. Klorofil sentezi için Fe gereksinimi açıktır ve vanadyum klorofil sentezini ancak demir metabolizması üzerindeki bir etki yoluyla etkileyebilir. Bir aşamada yeşil alglerin vanadyuma bağımlı olan ancak daha yüksek bitkilerde yoldan farklı olan bir Aminolevulinik asit sentezi yoluna sahip olabileceği öne sürülmüştür; ancak, böyle bir yol tespit edilmemiştir. Son yıllarda, bu sentezde yer alan enzimleri kodlayan genler yüksek bitkilerde ve alglerde tanımlanmıştır, bu nedenle, eğer varsa, yoldaki farklılıklar yolun kendisinden ziyade kontrol düzeyinde görünmektedir. Vanadyumun yeşil alglerde klorofil biyosentezi enzimlerinden biri için temel bir kofaktör olması mümkündür, ancak yüksek bitkilerde bu rol normal olarak vanadyumun yerini alabileceği başka bir metal tarafından üstlenilir. Vanadyum uygulaması ile tane verimi artan mısır (*Zea mays* L.) bitkileri yapraklarında daha fazla azot, fosfor, potasyum, kalsiyum ve magnezyum biriktirmiş, ancak yüksek vanadyum konsantrasyonları bu elementlerin konsantrasyonlarını azaltmıştır. Vanadyumun maruldaki Ca ve Fe konsantrasyonlarını artırdığı gösterilmiştir, ancak bu bitkilerde verim sağlanan vanadyum tarafından baskılanmıştır. Vanadyum artışı bitki metabolizmasını kesinlikle etkiler. Örneğin vanadyumun 1 mg/l ilavesi, tütündeki (*Nicotiana tabacum* L.) nikotin konsantrasyonlarını %25 oranında azaltmıştır. Acı bakla (*Lupinus polyphyllus* Lindl.) yapraklarında alkaloid ve vanadyum konsantrasyonları arasında negatif bir ilişki olduğu gözlenmiştir (Jie *et al.* 2001; Barker and Pilbeam 2007).

Bitki kökleri tarafından vanadyumun absorpsiyonu pasif bir proses olduğu belirlenmiştir, çünkü absorpsiyon eksojen vanadyum konsantrasyonlarına bağlı olarak artar ve anaeorobik koşullarda bile absorpsiyon devam eder. Absorpsiyon, pH 4'te en hızlı olup, pH 5 ile 8 arasında nispeten sabit olmasına rağmen, pH 10'da çok yavaş bir hıza düşer. PH'ın absorpsiyon üzerindeki bu etkisinin, vanadyumun mevcut olduğu iyonik formdan kaynaklandığı, VO_2^{+} 'nin pH 4'te baskın olduğu, HVO_3 'ün pH 4 ile 5

arasında baskın olduğu, VO_3^- 'un ise pH 5 ve 8 arasında baskın olduğu ve HVO_4^{2-} 'ün ise pH 9 ila 10 arasında baskın olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle asidik topraklarda baskın olan VO_2^+ formu, bitkiler tarafından nötr ve alkali topraklarda baskın olan diğer formlardan çok daha kolay bir şekilde alınır (Morrell *et al.* 1986). Vanadyumun absorpsiyonunun kalsiyum alımı karşılığında gerçekleştiği görülmekte olup, alınan vanadata karşılık sorgum kültür bitkilerinde kalsiyum birikiminde doğrusal bir düşüş olmuştur. Bu sonuç, muhtemelen kalsiyum akışından sorumlu olan H-ATPaz'ın vanadat ile inhibe edilmesini telafi etmekten daha fazlasını yapan kalsiyum kanalları üzerindeki bir etkiye bağlıdır. Bitkiler aldığı vanadyumu çeşitli vanadyum komplekslerine dönüştürebilir. Düşük vanadyum uygulamalarında, bitkiler vanadil amino bileşikler olduğu düşünülen düşük moleküler ağırlıklı kompleksler oluşturur. Yüksek vanadyum dozlarında, muhtemelen vanadil selüloz bileşikler gibi yüksek moleküler ağırlıklı kompleksler oluşturabilir. Emiliminden sonra, vanadyum kök hücre duvarları üzerinde kısmen hareketsiz görünmektedir. Daha sonra plazmalemmanın dışında çözünür kompleksler oluşturur ve son olarak hücrelerin içindeki boşluklara emilir. Köklerdeki konsantrasyonlar genellikle yapraklardan daha yüksektir. Çin lahanası ile yapılan bir çalışmada vanadyumun daha çok köklerde biriktiği ve köklerde biriken vanadyumun yapraklara translokasyonu sınırlı olduğu belirtilmiştir, ancak vanadyumun toprak ve bitki dinamikleri hakkında güncel bilgiler sınırlıdır (Jie *et al.* 2001; Olness *et al.* 2002; Barker and Pilbeam 2007; Saco *et al.* 2013).

Diğer ağır metallerde olduğu gibi vanadyum uygulaması ROS birikimi ve lipid peroksidasyonu artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, vanadyum oligomerleri, çeşitli proteinlerle etkileşime girer ve membrana bağlı transport sistemleri gibi çeşitli biyolojik mekanizmaları olumsuz etkiler (Wang and Liu 1999; Saco *et al.* 2013). Örneğin vanadyum, bitkilerde Na-ATPaz ve K-ATPaz'ı güçlü bir şekilde inhibe etmiş ve pickleweed'de (*Salicornia pacifica* L.) sürgün ölümlerine ve bitki boy uzunluğunun azalmasına neden olmuştur. Benzer şekilde Olness *et al.* (2002), vanadyumun yüksek konsantrasyonları farklı bitkilerin büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiğini gözlemlemiştir. Çin yeşil hardalı ve domates bitkilerinde sürgünlerin uzunluğunu, yaprak sayısını, kuru kök ağırlıklarını, sürgünleri ve yapraklarını önemli ölçüde

azalttığını belirlemişlerdir. Ağır metallerin fazlalığı, ROS üretimindeki artışın ana nedenlerinden biridir ve yüksek seviyelerdeki ROS'lar, hücrelerde oksidatif hasara neden olur, lipid zarlarını dengesizleştirir ve hücrelerin normal metabolik faaliyetlerini bozarak bitki büyümesini geciktirir ve hatta ölüme neden olur (Morrell *et al.* 1986). Bitkiler, ROS'ları temizlemek için süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POD), glutatyon redüktaz (GR), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) gibi enzimlerden oluşan güçlü antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Buna ilave olarak, düşük molekül ağırlıklı glutatyon, prolin, sistein, tiyoller ve askorbik asit gibi enzimatik olmayan antioksidanları da bu amaç için kullanırlar (Moller 2001; Saco *et al.* 2013). Bazı çalışmalarda vanadyum uygulamasının hücre döngüsünü, üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) vasıtasıyla durdurduğunu ileri sürmüşlerdir (Saco *et al.* 2013). Teng vd. (2006) ise vanadyum ile kontamine olmuş alanlardan toplanan 12 bitki türünde vanadyum birikimini araştırmış ve bitkilerin belirli vanadyum konsantrasyonlarına maruz kaldığında büyümelerinin gerilediğini bulmuştur. Tropik bir bitki olan *Cuphea*'da (*Cuphea viscosissima*) kök uzunluğu, kök yüzeyi alanı ve kök kuru ağırlığı, vanadyum uygulaması konsantrasyon artışına bağlı katlanarak azalmıştır. Yine nohutla yapılan bir çalışmada, vanadyumun tüm nohut genotiplerinde antioksidan enzim aktivitelerini ve protein içeriğini önemli ölçüde düşürdüğünü ve köklerde sürgünlerden daha fazla vanadyum birikimi olduğunu tespit etmiştir (Wang and Liu 1999; Ringelband 2001; Shah 2008; Saco *et al.* 2013). Diğer taraftan vanadyum, özellikle haloperoksidaz enzimlerinin aktif bir merkezi olarak okyanus algleri tarafından kullanıldığı gösterilmiş ve suda yaşayan ekosistemlerde yaşam için temel elementlerden biri olarak sunulmuştur (Butler ve Carter-Franklin, 2004), ayrıca toprak mikroorganizmalarından *Azotobacter* cinsinde azot fiksasyonu için bir katalizör olduğu da belirlenmiştir (Benemann *et al.* 1972).

Azot (N), karbon, hidrojen ve oksijenden sonra canlı sistemlerin yapısında en fazla bulunan temel bir elementtir. Dünya atmosferinin %78'ine yakınıni oluşturan moleküler azot (N_2 ; $N \equiv N$) indirgenmedikçe canlı organizmaların çoğu tarafından kullanılamaz. Canlılar; proteinler, nükleik asitler ve birçok başka biyomoleküllerinde yüksek miktarda

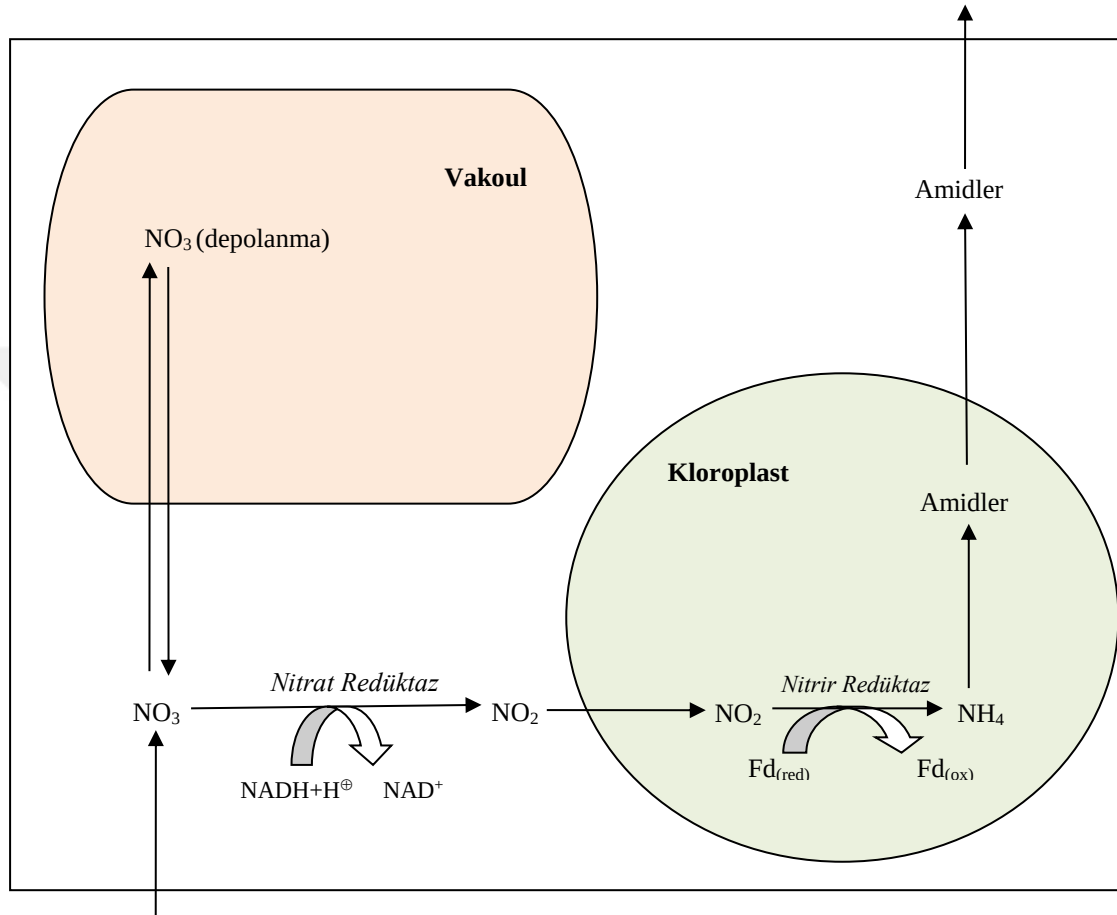
azot içerir. Ototrofik büyüme sırasında, hücresel organik madde oluşumu için azot ihtiyacı iki farklı yolla inorganik azottan karşılanır. Bunlar;

1. Moleküler azotun havadan fiksasyonu;
2. Su veya toprakta bulunan nitrat (NO_3^-) veya amonyumun (NH_4^+) asimilasyonudur.

Siyanobakteriler dahil sadece bazı bakteriler azotu (N_2) havadan fikse edebilirler. Belirli bitkiler, N_2 fiksasyonu yapan bazı siyanobakteri ve bakterilerle simbiyotik bir ilişkiye girebilir. Bununla birlikte, biyosferdeki organik azotun yaklaşık %99'u NO_3 asimilasyonundan türetilir. NH_4 , temel olarak hayvanların ve bakterilerin metabolizmasıyla atık organik maddenin parçalanmasının bir son ürünü olarak oluşur ve toprak bakterileri tarafından nitrifiye edilerek tekrar nitrat haline oksitlenir. Böylece, topraktaki nitrat ve bitkilerdeki organik azot arasında sürekli bir döngü vardır. NH_4 sadece yetersiz drenaja sahip, zayıf havalandırılmış topraklarda yüksek oranda birikir. Burada oksijen yetersizliği nedeniyle, nitrifikasyon bakterileri üremez. Toprakta NO_3 yerine NH_4 varsa, birçok bitki bunu azot kaynağı olarak kullanabilir (Heldt and Piechulla 2011).

Karasal bitkilerde kökler vasıtasıyla alınan nitrat, hem yapraklarda hem de köklerde asimile edilir, yani organik madde yapısına katılır. Otsu bitkilerin çoğunda, nitrat asimilasyonu daha çok yapraklarda meydana gelir, ancak köklerde de nitrat asimile edilebilir. Bu durum, özellikle otsu bitkilerin erken büyüme dönemlerinde önemli bir rol oynar. Aksine, birçok odunsu bitki (örneğin ağaçlar, çalılar) ve ayrıca soya fasulyesi gibi baklagiller esas olarak köklerde nitrati özümsemektedirler. Genel olarak kök hücrelerine alınan nitratin 3 akıbeti vardır. Bunlar şöyle özetlenebilir; alınan nitrat geçici olarak vakoul içerisinde depolanabilir (i), veya kökün epidermal ve korteks parankiması hücrelerinde NH_4 'e düşürülür (ii). Burada oluşan NH_4 , esas olarak, glutamin ve asparagin amino asitlerinin sentezi için kullanılır. Bu iki amino asit (amidler), ksilem kanalları aracılığıyla yapraklara taşınabilir. Ancak, köklerdeki nitrat asimilasyon kapasitesi maksimum seviyeye ulaştığında, absorplanan nitratin fazlası, yapraklara iletmek üzere, köklerden ksileme yüklenir (iii). Yapraklara iletilen nitrat,

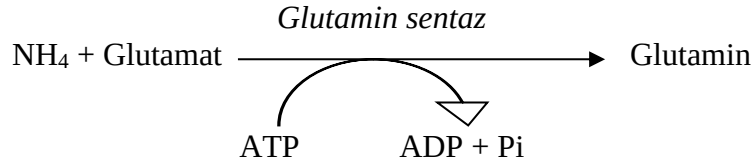
mezofil hücrelerinde ya hemen indirgenerek NH_4 oluşturulur veya nitrat aynı hücrelerin vakoullerinde depolanabilir (Heldt and Piechulla 2011).



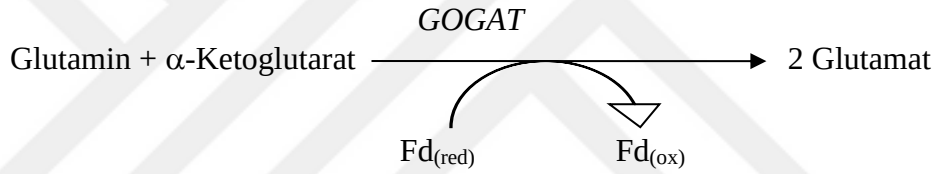
Şekil 1.1. Bir bitki yaprak mezofil hücresinde nitratın alınımı, amonyuma indirgenmesi ve amonyumun asimilasyonu (Fd: Ferredoksin) (Heldt and Piechulla 2011'den modifiye edilerek)

Nitrat bitkilerde kolayca taşınabilir ve vakoulde uzun bir süre depolanabilir, ancak bitkilerde proteinlerin ve diğer organik bileşiklerin sentezinde kullanılması için nitratın amonyuma indirgenmesi gerekir. Nitratın kendisi doğrudan organik madde yapısına katılamadığından, hem kök hem de mezofil hücrelerinde, önce sitozolde bulunan **nitrat redüktaz** (NR) ile nitrite (NO_2), daha sonra plastidlerde (kökler için plastidler, yapraklar için kloroplast) **nitrit redüktaz** (NiR) ile NH_4 'e indirgenir (Şekil 1.1) (Heldt and Piechulla 2011).

Kloroplastlardaki **glutamin sentetaz** (GS), NH_4 'ü ATP harcayarak glutamine dönüştürerek glutamin oluşturur. Bunun reaksiyonu aşağıdaki şekilde gerçekleşir.



α -Ketoglutarat ile birlikte glutamin, **glutamat sentaz** (aynı zamanda glutamin oxoglutarat amino transferaz, kısaltılmışı **GOGAT**) ile iki glutamat molekülüne dönüştürülür. Bunun reaksiyonu aşağıdaki şekilde gerçekleşir.



Yukarıda ifade edildiği gibi nitrat asimilasyonu kısmen ve hatta bazı türlerde esas olarak köklerde de meydana gelir. Toprakta alınan NH_4 da normalde köklerde asimile edilir. Kök hücrelerinde nitrat ve nitritin NH_4 'a indirgenmesi, mezofil hücrelerinininkine benzer şekilde ilerler. Bununla birlikte, kök hücrelerinde, gerekli indirgeyici güçler (NADH veya NADPH), yalnızca karbohidratların oksidasyonu yoluyla sağlanır. Köklerde nitritin indirgenmesi ve ardından NH_4 'ün asimilasyonu yine bir plastid formu olan lökoplastlarda meydana gelir. Kloroplastlarda olduğu gibi, lökoplastlardaki nitrit indirgenmesi de indirgeyici olarak indirgenmiş ferredoksin (Fd) gerektirir. Lökoplastlarda, ferredoksin, oksidatif pentoz fosfat yolu (PPP) tarafından üretilen NADPH ile indirgenir. Lökoplastlarda glutamin sentezi için gereken ATP, mitokondri tarafından üretilir ve ADP ile takas halinde bir plastid ATP translokatorü tarafından lökoplastlara aktarılır. Kök hücre lökoplastları doğrudan indirgeyici olarak NADPH veya NADH kullanan bir glutamat sentaz içermesine rağmen, lökoplast glutamat sentazı indirgenmiş ferredoksin de kullanabilir. Köklerde nitrat indirgenmesi bitkinin toprak üstü kısımlarına, ksilem borularındaki transpirasyon akımı yoluyla, genelde glutamin ve

asparajin (amidler) formunda organik azot bileşikleri sağlar. Bu durum NH_4 'ün topraktaki tek azot kaynağı olması durumunda da geçerlidir (Heldt and Piechulla 2011). Bitki büyümesi için gereken nitrat, biyokütlenin parçalanmasından türetilir. Diğer bitki besin maddelerinin aksine (örneğin, fosfat veya sülfat), nitrat kayaların aşınması ile sağlanamaz. Daha küçük miktarlarda nitrat, yıldırım ile üretilir ve toprağa yağmur suyuyla taşınır (ılıman bölgelerde yılda yaklaşık 5 kg N/ha). Antropojenik faaliyetlerden dolayı (örneğin, araba trafiği, hayvan üretimi vb.) toprağa taşınan nitrat, diğer azot oksitler ve amonyak miktarı kişi başına yılda 15 ila 70 kg N/ha arasında olabilmektedir. Günümüzde tarımsal üretim için neredeyse zorunlu olan gübreler, tarımsal ürünlerin hasatıyla topraktan çekilen azotu telafi etmek için önemli bir kaynaktır. Mısır (*Zea mays*) ekimi için, örneğin, yılda yaklaşık 200 kg N/ha gübre olarak nitrat veya amonyum kullanılır (Heldt and Piechulla 2011).

Önemli sayıda sucul ve sulak karasal ortamlarda yaşayan siyanobakteriler ve bakteriler, atmosferik azotu (N_2) amonyum (NH_4) formunda fikse edebilir. Bazı bitkiler de bitkiye organik azot sağlayan azot fiksasyonu yapan mikroorganizmalarla simbiyoz ilişki kurabilir. Buna karşılık bitkiler, bu bakterilere beslenmeleri için metabolit (besin) sağlarlar. Nodül oluşumunu uyaran bakteri (*Rhizobia*) ile baklagiller arasındaki simbiyoz ilişki tarım için çok önemlidir. Soya fasulyesi, mercimek, bezelye, yonca ve acı baklagilleri içeren baklagiller, yaklaşık 20.000 türden ibaret geniş bir familyayı (*Leguminosae*) oluşturur. Baklagillerin çok büyük bir bölümünün rizobia ile simbiyoz oluşturduğu gösterilmiştir (Wang *et al.* 2008; Shah 2008; Heldt and Piechulla 2011).

Ilıman iklimlerde baklagillerin ekimi, yılda 100 ila 400 kg N_2 /ha azot fiksasyonunun yapıldığını göstermiştir. Bu nedenle baklagiller yeşil gübre olarak kabul edilir ve ürün rotasyonunda yapay gübrelere de ucuz bir alternatiftir. Su eğrelti otu *Azolla* (örn; *A. filiculoides*) ile bir siyanobakteri *Nostoc*'un simbiyozu pirinç tarlaları için önemli miktarda azot sağlar. *Frankia* cinsinin azot fiksasyonu yapan aktinomisetleri, kızılâğaç veya Avustralya Casuarina'sı gibi odunsu bitkilerle bir simbiyoz oluşturur. Nodül oluşumunu indükleyen bakteriler, diğer cinslerin yanı sıra yaygın olarak *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* ve *Azorhizobium*'u cinslerini içerir ve topluca rhizobia olarak

adlandırılır. *Rhizobium* türleri bezelye ile *Bradyrhizobium* türleri soya fasulyesi ile *Azorhizobium* türleri ise tropikal baklagil *Sesbania* ile nodüller oluşturur. Rizobia, toprakta yaşayan ve organik bileşiklerin varlığında heterotrofik olarak çoğalan, aerobik gram negatif çubuklardır. Bazı türler (*Bradyrhizobium*) düşük bir büyüme hızında olmasına rağmen, H_2 varlığında ototrofik olarak da büyüyebilirler (Şekil 1.2).

Azot fiksasyonu, ana bileşenler olarak nitrogenaz redüktaz ve dinitrogenaz içeren çok karmaşık bir sistem olan nitrogenaz enzim kompleksi (NEK) tarafından katalize edilir. Bu kompleks yüksek oranda korunmuş olup bakterilerin sitoplazmasında bulunur. Bu enzim kopleksinin katalizlediği reaksiyonun genel denklemi aşağıdaki gibidir.



Şekil 1.2. Bezelye (*Pisum sativum*) ve yoncada (*Medicago sativa*) rhizobia tarafından oluşturulan kök nodülü

(<https://www.richardmudhar.com/blog/2015/05/nitrogen-fixing-clover-nodules/> ve <https://www.sciencesource.com/archive/Nitrogen-fixing-nodules-on-roots-of-pea-plant-SS2204545.html>).

Vanadyum, birçok ağır metale göre bitki metabolizması üzerinde etkisi çok az bilinen bir metal elementidir. Kentleşme, endüstrileşme ve tarımsal alanlarda artan sentetik gübre kullanımlarından dolayı, işlenebilir topraklarda V seviyesi canlının tolera edebileceği eşik değerleri aşmış bulunmaktadır. Bu nedenle topraklarda, yeraltı ve yer üstü su kaynaklarında seviyesi giderek artan vanadyum elementinin bitki metabolizması üzerinde etkilerinin bilinmesi büyük önem arz etmektedir. Bu etkilerin bilinmesi,

günümüzde ve ileride bitkiler üzerinde vanadyum toksisitesi sorununun çözümüne önemli katkı sağlayacaktır. Bitki metabolizmasının en önemli yollarından biri azot metabolizmasıdır. Bu yolk içerisinde bitkiye alınan inorganik azot formları (NO_3 ve NH_4), asimile edilerek organik azot formlarına (amino asitlere) dönüştürölür. Amino asitler ise başta protein sentezi olmak üzere solunum, klorofil ve nükleotid metabolizması dahil birçok yolkta ham madde olarak kullanılır. Bu nedenle azot metabolizmasını inhibe eden bir faktör, neredeyse metabolizmanın tümünü etkiler ve bitki yaşamında geri dönüşümsüz hasarlar oluşturur.

Yukarıda ifade edilen literatür bilgilerine göre, vanadyumun bitki büyüme ve veriminde önemli kayıplara neden olduğu rapor edilmiş ve sorunun artan şekilde daha fazla ilerleyeceği tahmin edilmektedir. Literatürde Cd, Hg, Ni ve Pb gibi ağır metallerin bitkilerde azot metabolizması, ROS üretimi ve antioksidan mekanizma üzerine etkilerini açıklayan çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Vanadyumun bitkiler üzerindeki etkileriyle ilgili çalışmalar diğerk ağır metaller kadar olmasa da giderek yoğun bir şekilde artmaktadır. Ancak, yaptığımız araştırmalara göre, vanadyumun bitkide azot metabolizması üzerine etkilerini açıklayan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Azot metabolizması bitki yaşamı ve veriminde en temel biyokimyasal süreçleri içermektedir. Azot metabolizmasında küçük bir bozulma, protein sentezinden hücre bölünmesine ve nihayetinde verime kadar bütün bitki proseslerini doğrudan veya dolaylı olarak etkileyecektir. Bu nedenle, özellikle ilk 24 saat içinde, vanadyum stresine karşı bitkide azot metabolizmasında meydana gelen değışmelerin ve vanadyum stresine karşı bitki cevabının bilinmemesi önemli bir eksikliktir.

Bu yüzden mevcut araştırmamızda, bitkilerde azot metabolizmasının ilk 24 saat içinde vanadyum (V) stresine verdiği tepkilerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için buğdayın Altındane ve Doğu-88 çeşitleri kullanılmıştır. Kontrollü koşullar altında hidroponik sistemde gerçekleştirilen çalışmada buğday fideleri, çimlenmeyi takiben 14. gün, V stresi (NaVO_3 olarak) koşullarına maruz bırakılmıştır. Uygulamadan 24 saat sonra, V uygulanmış ve uygulanmamış bitkilerin kök ve gövdelerinde (toprak üstü sürgün), azot metabolizmasında rol alan anahtar enzimlerden nitrat redüktaz (NR), nitrit

redüktaz (NiR), glutamin sentaz (GS) ve glutamat sentaz (GOGAT) aktiviteleri belirlenmiştir. Bunlara ilave olarak, dokularda içsel V miktarı, protein ve fotosentetik pigmentler (klorofil ve karotenoid) ile malondialdehid (MDA) içerikleri ölçülmüştür. Bu parametreler, azot metabolizması enzimlerine ilave olarak, bitkide azot metabolizmasıyla dolaylı olarak ilgili proseslerin değişimi hakkında bilgi vermesi açısından önemlidir. Çalışmada genel streslere nispeten duyarlı (Altındane) ve toleranslı (Doğu-88) çeşitlerin V toksisitesine cevapları da belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların, vanadyum toksisitesinin ilk 24 saat içinde azot metabolizması üzerinde etkilerinin anlaşılmasına önemli bir katkı yapmakla birlikte literatüre de önemli bir veri sağlayacağı düşünülmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bitkilerin beslenme süreçlerinde karbohidrat, protein ve lipid gibi makro besin gruplarının yanında elemen düzeyinde yer alan mikro besinlerin de yeri bulunmaktadır. Tüm besin gruplarının bu süreçte belirli bir denge içerisinde olması gerekmektedir. Ancak bitkiler topraktan ihtiyaç duydukları besinleri kökleriyle bünyelerine alırken, kendilerine faydası olmayan minerallere de maruz kalmaktadırlar. Bitki gelişimi için mutlaka gerekli olan elementler C, H, O, N, P, S, K, Ca, Mg, Mn, Cu, B, Cl, Mo, Fe, Zn şeklinde sıralanabilmektedir. Bunlara ilave olarak Co, Al, Na, Si, Ni ve V gibi elementlerin bazı bitkilere veya bitkilerdeki bazı gelişim aşamalarına gerekli olduğunu kabul eden çalışmalar da bulunmaktadır (Yıldız 2003).

Toprak bünyesinde bulunan ağır metallerin bir kısmı mikro element olarak bitkiler için gerekli olsalar dahi bitkilerin ihtiyaçtan fazla metal yoğunluğuna maruz kalması bitki büyümesinin durmasına veya metabolik süreçlerde düzensizliğe sebep olabilmektedir (Fernandes and Henriques 1991; Claire *et al.* 1991). Ancak bazı bitki türlerinin bu şekilde ağır metal yoğunluğuna sahip ekstrem toprak koşulları dahi tolere edebildiği tespit edilmiştir (Banuelos *et al.* 1997; Blaylock and Huang 2000; Raskin and Ensley 2000; Dahmani-Muller *et al.* 2000).

Bir ağır metal biyolojik açıdan metabolik süreçlere katılıp katılmadığı ile ilişkili olarak yaşamsal ve yaşamsal olmayan ağır metaller olarak sınıflara ayrılmaktadır. Yaşamsal nitelik taşıyan ağır metallerin organizmanın hayati faaliyetlerinde rol oynayan, biyolojik yollarda yer alabilmek adına iz miktarda da olsa organizma bünyesinde yer alması gereken elementlerdir. Bu yapıların yaşamsal açıdan önemi olduğu için, besinlerle organizma içerisine alımı zorunlu olmaktadır. Örnek olarak bakır elementi, özellikle hayvanlar ve insanlarda oksidasyon, redüksiyon gibi süreçlerde yer alan, kırmızı kan hücreleri için gereklilik arz eden bir yaşamsal ağır metal üyesi olarak tanımlanmaktadır (Bigersson *et al.* 1988).

Yaşamsal olmayan nitelikte olan ağır metaller ise oldukça minimal konsantrasyonlarda bile fizyolojik yapının işleyişinde ve durumunda değişikliklere neden olabilmektedirler. Bu tip ağır metallere özellikle kükürt içeren enzimlere bağlanarak işlevini engellediği bilinen cıva (Hg) örnek olarak gösterilebilmektedir (Duffus and Worth 1996).

Bu sınıflandırmaya ek olarak, bir ağır metalin yaşamsal nitelik taşıyıp taşımadığı söz konusu ağır metale maruz kalacak organizma türü ile de ilişkili olmaktadır. Buna örnek olarak nikel (Ni) ağır metali gösterilebilir. Nikel genel itibariyle bitkiler için toksik etki gösteren bir ağır metaldir. Ancak hayvanlarda nikelin bir mikro element olarak iz miktarda bulunması gerekmektedir. Böyle durumlarda ağır metallerin konsantrasyonuna bağlı bir biçimde etki ettikleri mekanizmalar da değişmektedir. Toksisite ve etki üzerine değerlendirme yapılırken, özellikle bu tür organizmalarda söz konusu metalin konsantrasyonu dikkate alınmalıdır. Bunlara ek olarak, ağır metalin konsantrasyonu dışında etkisini ortaya koyacağı organizma türü, metal iyonunun hangi yapıda bulunduğu da oldukça önem arz etmektedir. Metalin çözünürlüğü, kimyasal durumu, vücuda hangi yol ile alındığı, lokal pH değeri, çevrede yaygınlığı ve bulunma sıklığı, redoks veya kompleks oluşturma yeteneği gibi özellikleri de metalin yaşamsal veya yaşamsal olmayan niteliğini anlamada oldukça önemlidir (Kahvecioğlu vd 2004).

Vanadyum hava, toprak ve suda bulunmasının yanında, bitki ve hayvanların yapılarında da yer alan bir elementtir. Doğal kaynakları büyük oranda Güney Afrika, Rusya ve Çin'de bulunmaktadır (The Health and Safety Executive 2002). Doğal kaynağı dolayısıyla ortamda bulunmasa dahi vanadyum toprakta yıkama, yanma gibi işlemlerin ardından veya gübre kullanımı, endüstrilerden kaynaklanan atık materyallerin toprağa karışması gibi durumlar sonucunda toprakta normalde bulunması gereken orandan çok daha yüksek seviyelere erişebilmektedir (Kar *et al.* 2004).

Daha önce bazı araştırmacılar vanadyumun bitkilerdeki rolünü incelemiştir. Bu elementin bitkilerin uygun bir şekilde büyümesi ve gelişmesi için bir iz element olarak gören araştırmacılara ek olarak vanadyumun bitki büyümesi için öneminin olmadığını vurgulayan araştırmacılar da bulunmaktadır. Bazı çalışmalar ise V'nin bitkilerde,

insanlarda ve hayvanlarda bazı toksik etkilere neden olduğunu doğrulamıştır (Wang and Liu 1999; Krapiel *et al.* 2009, Boulassel *et al.* 2011). Düşük seviyede V, uyarıcı bir ajan olarak hareket ederek bitkilerde klorofil oluşumunu uyardığı, klorofil bozulmasını azalttığı ve demiri daha kullanılabilir hale getirdiği bilinmektedir (Basiouny 1984). Vanadyumun biyolojik etkileri ile ilgili araştırmalar, bu iz elementin büyük nütrisyonel, tıbbi ve çevresel önemi nedeniyle son on yılda artış göstermiştir (Sabbioni *et al.* 1989).

Yapılan bir çalışmada *Salicornia* cinsine ait bitkilerde vanadyum stresinin bitki sürgünlerinin ölümüne neden olduğu kaydedilmiştir (Rosso *et al.* 2005). Yüksek vanadyum konsantrasyonlarının test edildiği Çin yeşil hardalı ile domates bitkilerinde, sürgünlerin uzunluğunu, yaprak sayısını, kuru kök ağırlıklarını, sürgünleri ve yaprakları önemli ölçüde azaltarak bitki büyümesini engellediği belirlenmiştir (Vachirapatama *et al.* 2011).

Vanadyumun bitkiler üzerindeki etkisini bildiren birkaç makale vardır: Hara vd. (1976) 0.4-20 mg/mL V ile lahana üzerinde, Wallace vd (1977) çalı fasulyesi üzerinde 10^{-4} M vanadat seviyesinde, Davis vd. (1978) arpa üzerinde kritik seviyede 2 mg/mL, Martin ve Saco (1995) ise çalılarda 4.8 mg/mL seviyesinde vanadyum stresinin etkilerini incelemiştir. Çalı fasulyesinde yapılan çalışmada, yüksek dozda uygulanan vanadyum stresinin bitkilerin kök ve yapraklarındaki Fe seviyelerini azalttığı tespit edilmiştir (Wallace *et al.* 1977).

Yapılan bir başka çalışmada V'nin bitki büyümesi üzerindeki etkisi soya fasulyesinde bildirilmiştir. Fluval toprağa eklenen V konsantrasyonu 30 mg/kg oranını aştığında, sürgünlerin ve köklerin veriminde önemli ölçüde azalma elde edildiği bulunmuştur. Ayrıca, fide yapraklarının sarardığı ve solduğu tespit edilmiştir (Wang *et al.* 1999).

Kasai vd (1999) tarafından yapılan bir çalışmada, çavdar ve buğday tohumları ve bitkileri üzerinde vanadatın etkisi değerlendirilmiştir. Tohumlar üzerine uygulanan 0.1 μ M vanadat neticesinde uygulama yapılmayan gruplara benzer nitelik sergilediği kaydedilmiştir. Çimlenme sonrasında aynı dozda vanadat uygulaması akabinde taze ve

kuru ağırlık bazında ufak farklılıklar oluşumuna neden olduğu gözlemlenmiştir. Vanadat uygulamalarının bazı bitki türlerinde bitki enzimleri üzerinde inhibitör etkisi olduğu belirlenmiştir. Besin alımında, fotosentetik metabolizmada ve çeşitli hücre komponentleriyle ilişkili metabolik reaksiyonlarda etkisi olduğu bilinmekte olan vanadyum çavdar ve buğdayda da test edilmiştir. Kontrol bitkileri ile vanadat uygulaması yapılmış bitkiler arasında oldukça düşük farklılıklar olduğu kaydedilmiştir. Elde edilen veriler buğday ve çavdar gelişimine uygulanan dozdaki vanadatin etkisinin önemsiz olduğunu göstermiştir.

Yapılan bir başka çalışmada vanadyumun ksilem boruları aracılığıyla organik asit taşıma sistemine etkisi incelenmiştir. Çalışma kapsamında salatalık bitkisi üzerine 10^{-5} M konsantrasyonunda vanadyum uygulaması yapılmıştır. Vanadyum organik asit maddelerinin taşınımını nikel, kurşun gibi uygulanan diğer ağır metallere kıyasla en az oranda etkileyen madde olmuştur. Uygulamadan sonraki ilk saatte çok küçük farklılıkların ortaya çıkmasına neden olan vanadyumun kökler tarafından düşük seviyede alınıyor olmasının bu sonucun ortaya çıkmasında etkili olduğu düşünülmektedir (Tatar *et al.* 1999).

Yapılan bir çalışma kapsamında tatlı fesleğen kökleri, yaprakları ve gövdesi üzerinde, aynı zamanda kuru maddesi üzerinde vanadyumun etkileri incelenmiştir. 5, 10, 20, 40 mg/L olacak şekilde dört farklı dozda uygulanan vanadyum, bitkilerde gözle görünür toksik veya inhibitör etki oluşturmamıştır. Bitki yapılarının içeriklerindeki vanadyum konsantrasyonlarına bakıldığında yapraklar ve gövdede tespit edilen vanadyum içeriğinin köklere kıyasla çok daha az olduğu belirlenmiştir. Özellikle vanadyum ile demir elementi arasında negatif bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Artan vanadyum miktarının, bitki içeriğinde yer alan demir elementinde azalmaya sebebiyet verdiği anlaşılmıştır (Akoumianaki-Ioannidou *et al.* 2016).

Marul bitkisi üzerinde yapılan bir çalışmada 0.1, 0.2, 0.5 ve 1 mg/kg şeklinde vanadyum uygulaması yapılmıştır. Bulgularda 0.2 - 1 mg/kg doz aralığında bitki kök ve yapraklarının büyümesi ve gelişmesinde inhibisyon kaydedilmiştir. Köklerdeki toksisite

koyulaşmış bölgeler, kök boyunda ve ikincil köklerin sayısında azalma gibi belirteçlerle tespit edilmiştir. Yaprak yapılarında yapılan 0.5 ile 1 mg/kg doz aralığı uygulamalarında yaprakların şişkinliklerinin azaldığı belirlenmiştir. Vanadyumun köklerde ve az miktarda yapraklarda birikim gösterdiği anlaşılmıştır. Vanadyum içeriğindeki artışın bitki yapraklarının bünyesinde bulunan Ca ve Fe elementlerinin konsantrasyonlarını pozitif bir şekilde etkilediği görülmüştür. Fakat aynı şekilde uygulanan vanadyumun köklerin içeriğindeki K ve Mg elementlerinin konsantrasyonlarında negatif etkiye sebebiyet verdiği anlaşılmıştır (Gil *et al.* 1995).

Vanadyum alımı, protein içeriği, enzim aktivitesi ve vanadyumun gelişim üzerine etkisinin araştırıldığı bir diğer çalışmada nohut (*Cicer arietinum*) bitkisinden faydalanılmıştır. *C. Arietinum* üzerinde yapılan çalışmada, vanadyum uygulamasının enzim aktivitesini artırdığı tespit edilmiştir. Aktivitesinde artış görülen enzimlerin bitkilerin strese karşı tolerans geliştirme amacıyla kullandıkları enzimler olduğu önceki çalışmalar ile gösterilmiştir. Ancak aynı uygulamanın protein içeriği üzerinde azaltıcı nitelikte etkisi olduğu anlaşılmıştır. Vanadyum birikiminin ise gövdeden ziyade köklerde daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Uygulanan vanadyum dolayısıyla bitki biyokütlesi, kök ve sürgün uzunluklarında önemli ölçüde azalma tespit edilmiştir (Imtiaz *et al.* 2015).

Küfeya bitkisinde (*Cuphea hyssopifolia*) gerçekleştirilen bir çalışmada uygulanan Vanadyum elementinin bitkinin lipid metabolizmasını etkilediği belirlenmiştir. Sıfırdan 153 μM 'a kadar artan konsantrasyonlarda uygulanan vanadyumun kök uzunluğu, kök yüzey alanı, kök ağırlığı gibi parametreleri olumsuz yönde etkilediği saptanmıştır. Artan konsantrasyonlarda uygulanan vanadyumun keskin bir azalmayla ikincil kök dallanmalarını etkilediği tespit edilmiştir. Çalışma sonucu, daha yüksek vanadyum içeriğine sahip topraklarda yetiştirilen bitkilerin zayıf kök gelişimi ve düşük verime sahip olduğu gösterilmiştir (Olness *et al.* 2005).

Brassica oleracea bitki türü üzerinde yapılan bir çalışmada vanadyumun etkileri incelenmiştir. Vanadyum varlığının çimlenme üzerine etkisinin olmadığı, ancak bitkinin

yatay uzaması üzerine vanadyumun derinlemesine etki sergilediği tespit edilmiştir. 1 mg/L dozdan az olan uygulama dozlarının yatay uzamayı teşvik ettiği belirlenmiştir. 3 mg/L dozuna eşit veya daha yüksek dozların toksik etkilere neden olduğu görülmüştür. Vanadyumun dokulardaki konsantrasyonu ve lahanalara toksisitesinin toprak tipiyle de ilişkili olduğu ifade edilmiştir (Kaplan *et al.* 1990).

İki farklı tütün türü üzerine yapılan bir çalışmada vanadyumun farklı konsantrasyonlarda etkileri araştırılmıştır. Bu doğrultuda her iki bitki türünde de çimlenme oranında değişim gözlenmezken, kök ve sürgün uzamasının inhibe olduğu kaydedilmiştir. Aynı zamanda uygulanan vanadyum elementinin köklerin morfolojisinde de değişime neden olduğu gözlemlenmiştir. En yüksek vanadyum birikiminin köklerde olduğu tespit edilmiştir. Vanadyumun bitkilerin içerdiği nikotin miktarında değişime neden olup olmadığına bakıldığında ise; vanadyum uygulanan bitkilerin bir türünde nikotin oranında artış olduğu anlaşılmıştır. Ancak vanadyum uygulaması yapılan diğer bir türde nikotin miktarında değişim olmadığı belirlenmiştir. Çalışma sonucunda alkaloid eldesinde nikotin artışını sağlamak adına bu bitki türlerinde vanadyum kullanımının uygun olduğu fikri önerilmiştir (Sánchez *et al.* 2014).

Brassica juncea ile *B. chinensis* bitki türleri üzerinde yapılan bir çalışmada vanadyum elementi çeşitli dozları 40 gün süreyle uygulanmıştır. Çalışma kapsamında vanadyumun bitki tarafından alımı, dokulardaki birikimi, hücresel düzeyde dağılımı parametreleri incelenmiştir. Vanadyumun bitki organlarında hücresel düzeyde dağılımı incelendiğinde, elementin en çok kök hücrelerinde dağılım sergilediği tespit edilmiştir. *B. juncea* türünün diğerine kıyasla daha yüksek oranda vanadyum içerdiği belirlenmiştir. Bu durum bitkilerin vanadyum elementini alım ve işleyiş bakımından farklı nitelikler sergilediğini gösterir niteliktedir. Aynı zamanda *B. juncea* türünün vanadyumu tolere etmede diğer türden çok daha başarılı olduğu görülmektedir (Hou *et al.* 2013).

Yüksek vanadyum konsantrasyonlarının bitkiler için toksik olduğu bilinmektedir. Yapılan bir çalışma ile yüksek dozlarda uygulanan vanadyumun toksik etkisinin hangi

hücrel mekanizma ile ortaya çıktığını ortaya koyma girişiminde bulunulmuştur. Erken dönemde toksisitenin mekanizmasını anlayabilmek için pirinç bitkisi kökleri 1 ile 3 saat süreyle vanadyum stresine maruz bırakılmıştır. Maruziyet süresi sonunda elde edilen mRNA profilleri doğrultusunda hücrel metabolizma süreçleri ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerinde değişiklikler olduğu kaydedilmiştir. Absisik asit, jasmonik asit, oksin üretiminden sorumlu genlerin vanadyum uygulaması neticesinde uyarıldığı (upregüle) olduğu kaydedilmiştir. Aynı zamanda uygulanan vanadyumun pek çok enzimin de ekspresyon düzeylerinde etkili olduğu belirlenmiştir (Lin *et al.* 2013).

Vanadyumun kökler tarafından su alınımı üzerine etkisini belirlemek adına yapılan bir çalışmada, fasulye sürgünleri vanadyum içeren toprakta yetiştirilmiştir. Radyografi ile yapılan ölçümlerde hem ana kök uzantısı hem de yan kök uzantılarının vanadyumdan nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Ana kök uzantısında vanadyumun etkilerini görmek daha uzun bir süre gerektirmiş olsa dahi, yan kök uzantılarında iki gün gibi kısa bir süre içerisinde kök uzantılarında morfolojik değişimlerin gözlemlendiği ifade edilmiştir (Furukawa *et al.* 1999).

Lactuca sativa bitki türü üzerinde yapılan bir çalışmada, Petri kabında vanadyum stresinin bitki çimlenmesine ve canlılığına etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında ise sera koşullarında vanadyum toksisitesinin tür bazında ve besin konsantrasyonlarıyla ilişkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda Petri kaplarında gerçekleştirilen çalışma kısmında, vanadyum stresine bitki canlılığının kuru ağırlık parametresine kıyasla çok daha dayanıklı bir nitelik sergilediği kaydedilmiştir. Sera koşullarında yetiştirilen bitkilerin, Petrilerde gerçekleştirilen dayanıklılık çalışmalarında yer alan bitkilere kıyasla canlılıklarını korumada zorlandıkları tespit edilmiştir. Çalışmanın serada yapılan kısmında besin seviyelerinin vanadyum toksisitesine tolerans geliştirme noktasında oldukça önemli bir yere sahip olduğu belirlenmiştir (Smith *et al.* 2013).

Yüksek dozlardaki vanadyum kök yapısında deformasyonlara, yapraklarda nekrotik görünümlere neden olmakta, besin ve esas elementlerin taşınımını etkilemektedir.

Vanadyumun farklı konsantrasyonlarının makro ve mikro elementler ile bitki büyümesi üzerine etkilerini incelemek adına *Setaria viridis* bitki türü üzerinde bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonuçlarında toprakta bulunan vanadyumun bitki makro besin elementlerini bitki gövdesinde birikmeye teşvik ettiği görülmüştür. Mikro elementlerden olan demirin vanadyum ile birikimi artmıştır. En düşük dozda uygulanan vanadyum çözeltisinin bitki büyüme ve gelişmesini artırdığı görülürken, daha yüksek dozlarda vanadyumun gelişimi inhibe edici etkisi belirlenmiştir. Yüksek dozlarda uygulanan vanadyumun kök ve gövde uzunluğuna da olumsuz etkisi olmuştur. Kök ve gövdenin uzunluğunun %50 oranında azalmasına neden olan bu uygulama neticesinde bu bitki türünün kök uzunluğu gövde gelişimine kıyasla vanadyum toksisitesine daha duyarlı olduğu görülmüştür (Aihemaiti *et al.* 2019).

Trifolium pratense bitki türünün içerdiği izoflavonoidlerin vanadyum uygulaması ile artırılmaya çalışıldığı bir çalışma kapsamında bitkiler 24 ve 48 saat süreyle vanadyum içerikli besin ortamlarında inkübe edilmişlerdir. Kullanılan vanadyum ilavelerinden NH_4VO_3 solüsyonu uygulamasının oldukça yüksek konsantrasyonlarda flavonoid elde edimini sağladığı belirlenmiştir (Kubes *et al.* 2019).

Vanadyumun etkilerini tespit etmek için gerçekleştirilen bir çalışmada *Capsicum annuum* L. (biber) bitkisi kullanılmıştır. Bitkiler üç farklı dozda uygulanan vanadyum elementine dört hafta süreyle maruz bırakılmışlardır. Uygulanan en düşük vanadyum dozunun bitki büyümesini artırdığı, çiçek gelişimini artırarak çiçeklenme süresini kısalttığı tespit edilmiştir. Bitki yapraklarındaki ve köklerindeki amino asit ve şeker seviyeleri en düşük vanadyum dozu olan 5 μM uygulama seviyesinde kontrol grubuna daha yüksek bir seviyeye ulaştığı belirlenmiştir. Diğer dozlarda daha ufak gelişim belirtilerine ek bazı toksisite semptomlarına da rastlandığı bildirilmiştir. Ancak vanadyumun yapraklardaki K, Mg ve Mn elementleriyle ters bir ilişkiye sahip olduğu da bu çalışma ile ortaya koyulmuştur. Araştırmacılar vanadyumun uygun dozlarda amino asit ve şeker seviyelerini artırıcı nitelikte etki ettiğini vurgulamışlardır (Garcia-Jiménez *et al.* 2018).

Fasulye bitkisi (*Phaseolus vulgaris*) üzerinde farklı gelişim safhalarında vanadyum stresinin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, yüksek dozlarda uygulanan vanadyumun çimlenmeyi geciktirdiği, büyümenin yavaşlamasına neden olduğu belirlenmiştir. Fasulye üretiminin ise kontrol grubuna kıyasla %50 oranında azalma sergilediği kaydedilmiştir. Topraktaki vanadyum konsantrasyonu artışına bağlı olarak bitkilerin köklerindeki vanadyum miktarlarında artış saptanmıştır. Bu durum dolayısıyla fasulye üretiminde ve nodlarda azalma görülmüştür. Çalışma neticesinde yüksek konsantrasyonlarda uygulaması gerçekleştirilen vanadyumun fasulye verimini ve çimlenmeyi inhibe ettiği belirlenmiştir (Yang *et al.* 2017).

Brassica rapa türünde gerçekleştirilen bir çalışma kapsamında vanadyum mikro besin elementinin bitki türleşme sürecine etkisi ile elementin bitkide birikimi değerlendirilmiştir. 122 ile 372 mg/kg oranında toprakta bulunan vanadyumun biyokütlenin artmasında pozitif katkılar yaptığı tespit edilmiştir. Bu durumun toprak içeriğindeki düşük vanadyuma eşlik eden yüksek seviyedeki azot içeriğiyle ilişkili olabileceği ifade edilmiştir (Tian *et al.* 2014).

Alfalfa (yonca) bitkisi üzerine yapılan bir çalışma kapsamında vanadyum içeren toprakta yetiştirilen 94 bitki örneğinin vanadyuma tepkileri ile bu elementin büyüme ve gelişmeye etkileri incelenmiştir. Alfalfa bitkisinin vanadyuma karşı oldukça yüksek nitelikte metal adaptasyon yeteneği bulunduğu ve yüksek oranda bitki içeriğinde vanadyumun birikim gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. Kök yapılarının daha iyi absorpsiyon gerçekleştirdiği belirlenirken, köklerde biriken vanadyum miktarının yüksekliği de bu sebeple ilişkilendirilmiştir (Yang *et al.* 2010).

Nane ve lavanta bitkilerinin vanadyum etkilerine verecekleri tepkileri ölçmek adına gerçekleştirilen bir çalışmada, vanadyumun bitkilerin morfolojilerine olan etkileri ile sürgünlerinin elementi ne derecede aldığı belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda dört farklı dozda uygulanan vanadyum elementinin bitkilerde inhibitör veya toksik herhangi bir etkisine rastlanmadığı ifade edilmiştir. Hem köklerin hem de sürgünlerin kuru ağırlıklarında azalma kaydedilmiştir. Vanadyum uygulamasının dozlarında artış

görüldükçe, sürgünler tarafından vanadyumun alımının da arttığı belirlenmiştir (Barouchas *et al.* 2019).

Kolza (*Brassica napus*) tohumlarında yapılan bir çalışma kapsamında bitki yaprak fizyolojisi ve biyokimyasında vanadyumun etkisi araştırılmıştır. Vanadyumun yaprak yüzeylerinde sarılaşmaya neden olduğu belirlenmiştir. Uygulanan vanadyumun hem yaprak kuru ağırlığında hem de taze yaprak ağırlığında azalmaya sebep olduğu kaydedilmiştir. Vanadyum stresinin bitki yaprakları içeriğinde toksik superoksit radikalinin artırdığı tespit edilmiştir. Yaprak LPO seviyesi ve hücre ölümlerinde artan superoksit anyonu (O_2^-) dolayısıyla dikkat çekici bir artış gözlenmiştir (Gokul *et al.* 2018).

Şeker kamışı bitkisi üzerinde vanadyumun etkilerini test etmek amacıyla bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Vanadyumun iki farklı dozunun test edildiği çalışmada üç farklı şeker kamışı varyetesinden faydalanılmıştır. Uygulaması yapılan en yüksek doz vanadyumun (20 μ M) her üç şeker kamışı türünde bitki boylarında önemli ölçüde artışa fayda sağladığı belirlenmiştir. Ancak aynı dozda uygulanan vanadyumun çiçeklenmeyi ve sünger doku oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir (Senties-Herrera *et al.* 2017).

Genista tinctoria (katırtırnağı) bitki türünde yapılan bir çalışmada, vanadyum bileşiklerinin izoflavonoidlerin üretimini ve onların muhtemel salım mekanizmalarının anlaşılması hedeflenmiştir. Gerçekleştirilen çalışmalarda elde edilen verilere göre, vanadyum uygulamalarının izoflavonoidlerin üretiminde artış sağladığı belirlenmiştir. Tam olarak sonuçlandırılmamış olsa da izoflavonoidlerin salınımı ile ilişkili mekanizmalar içerisinde ATP-bağlama kasetleri ile çoklu ilaç toksin çıkarımı proteinleri (MATE) materyallerinin katılımının varlığından söz edilmiştir (Skalicky *et al.* 2018).

Tavşan kaktüsünde (*Opuntia microdasys*) hidroponik koşullar altında vanadyumun birikimi ve biyotransformasyonunun incelendiği bir çalışmada, bitki tarafından geliştirilen tolerans mekanizması ile vanadyum toksisitesinin bitkide ortaya çıkardığı sonuçlar incelenmiştir. Çalışma kapsamında bitki biyokütlesini vanadyumun negatif bir

şekilde etkilediği belirlenmiştir. Su depolayan yapraklardaki su içeriğinde de vanadyum uygulaması neticesinde azalmalar meydana gelmiştir. Vanadyumun yüksek dozlarının tavşan kaktüsü için toksik nitelik taşıdığı tespit edilmiştir. Hücre duvarı veya biyotransformasyon ile ilişkili konularda bitkinin vanadyum toksisitesini tolere edebildiği anlaşılmıştır (Yang *et al.* 2015).

Kurt üzümü (*Lycium barbarum*) tohumları kullanılarak vanadyum stresinin araştırıldığı bir çalışma gerçekleştirilmiştir. 40-45 gün süreyle vanadyum uygulaması yapılan bitkilerde vanadyumun alımı, birikimi ve kurt üzümü tohumlarının gelişimine etkileri incelenmiştir. Vanadyumun en çok bitkinin köklerinde birikim gösterdiği belirlenmiştir. Stres seviyesinde uygulanan vanadyumun kök gelişiminde farklılıklar oluşturduğu kaydedilmiştir. Pektin ve selülozun hücre duvarında koruyucu etkileri dolayısıyla, bu iki materyalin vanadyum ile birlikte uygulandığı durumlarda vanadyum hasarının tohumlarda oldukça azaldığı belirlenmiştir (Hou *et al.* 2014).

Farklı vanadyum bileşiklerinin konsantrasyonlarının test edildiği bir çalışma fasulye bitkisinde gerçekleştirilmiştir. Kök ve yapraklara uygulanan vanadyum neticesinde, hidroponik olarak gelişim göstermekte olan bitkilerin kontrol bitkilerine kıyasla daha kalın kökler, daha az gelişim gösteren ana kök yapısı ve daha az sayıda ikincil kök uzantılarına sahip olduğu ifade edilmiştir. Köklerde birikim gösteren vanadyumun yapraklardaki birikimi köke kıyasla çok daha az olduğu belirtilmiştir. Oldukça küçük oranda vanadyum bileşiklerinin yapraklara taşındığı belirtilmiştir. Vanadyum bileşiği içeren ortamda gelişmekte olan bitkilerin kloroplastlarında tilakoid düzensizlikler gözlenmiştir (Saco *et al.* 2012).

Vanadyum geçiş metalinin buğday bitkisi ve onu azot metabolizması üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Buğday hem dünya genelinde hem de Türkiye’de oldukça yoğun üretim ve tüketim sirkülasyonuna sahip olan bir tahıldır. Dünya genelinde sadece 2018 yılında 747.686 ton buğday tüketimi gerçekleşmiştir (USDA 2018). Türkiye’de ise 2016/2017 yıllarında buğday tüketiminin 18.756 ton olduğu kaydedilmiştir (TÜİK 2018). Bu tez çalışması ile insan ve hayvan

beslenmesinde oldukça önemli bir yere sahip olan buğdayın vanadyum stresi karşısında nasıl etkileneceği ve bitkinin azot metabolizması üzerinde bu metalin etkisinin nasıl olacağı değerlendirilmiştir.



3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çimlenme kabini (İnkübatör)	: Memmert, Germany, INBE, 410 1583
Çalkalayıcı	: Gallenkamp
Otoklav	: Hirayama, Japan, HVE 50
Dijital hassas terazi	: Shimadzu, Japan, AY220
İklim kabini	: JenoTech, Güney Kore
Soğutucu	: Arçelik
Derin dondurucu (-30°C)	: Arçelik
Derin dondurucu (-80°C)	: Nuaire
Tüp Karıştırıcı	: FisonsWhirlimixer
Manyetik karıştırıcı	: Chiltern HS31
Masa santrifüjü	: HettichEBA 21, Germany
Soğutmalı masa santrifüjü	: Hettich Micro 22 R, Germany
Otomatik pipetler	: Axygen, Eppendorf
pH metre	: WTWunilab
Sıcak su banyosu	: Wise-Hot Bath
UV-visible spektrofotometre	: Shimadzu, Japan, UVmini-1240
Multiskan spektrofotometre	: MultiscanGo
Vortextüp karıştırıcı	: IKA, USA, MS2
Kuru blok inkübatör	: Allsheng

3.2. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

Araştırma boyunca kullanılan çözeltilerin kullanım yerleri ile hazırlanış biçimleri aşağıda sunulmuştur. Kullanılan kimyasallar, Sigma, Merck ve Fluka şirketlerinden temin edilmiştir.

3.2.1. Toplam çözünebilir protein tayini için gerekli çözeltiler

1. KH_2PO_4 (0.1 M; pH 6.75): 4.35 gr KH_2PO_4 200 mL saf suda çözünmüş, 1 N HCl kullanılarak pH 6.75'e ayarlandıktan sonra, son hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır.
2. BCA reaktifi: 15 mL Bicionchonic asit 0.3 mL CuSO_4 ile karıştırılmıştır.

3.2.2. Malondialdehid (MDA) ölçümü çözeltileri

1. TCA-trikloro asetik asit (%5): 80 mL saf su içerisine 5 gr TCA ilave edilerek çözünür ve son hacim 100 mL'ye tamamlanır.
2. TBA Reaktifi: %20 TCA içinde %0.5'lik TBA-tiobarbutirik asit (lipid peroksidasyon için reaksiyon çözeltisi): 80 ml saf su içinde 20 gram TCA çözülür ve daha sonra içerisine 0.5 gr TBA ilave edilerek iyice çözünmesi sağlanır ve son hacim 100 mL'ye tamamlanır.

3.2.3. Nitrat Redüktaz (NR) ve Nitrit Redüktaz (NiR) aktivitesi çözeltileri

1. NR aktivitesi için homojenat tamponu (0.1 M Tris-HCl (pH 7.6), %1 PVP, 7.5 mM sistein, 1 mM Na_2EDTA , %0.5 BSA ve 5 mM Merkaptotanol): 1.2 gr Tris 70 mL saf suda çözülüş ve pH: 7.6'ya ayarlanmıştır. Daha sonra içerisine 1 gr PVP, 0.09 gr sistein, 0.037 gr Na_2EDTA , 0.5 gr BSA ve 40 μL merkaptotanol ilave edilerek karıştırılmış ve son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.
2. 100 mM KH_2PO_4 , pH 7.8, 1 mM EDTA, 10 mM KNO_3 , 0.3 mM NADH (NR aktivitesi için kullanılan aktivite tamponu): 0.272 gr KH_2PO_4 , 0.0074 gr Na_2EDTA , 0.02 gr KNO_3 , 4 mg NADH 10 mL saf suda çözölmüş ve pH 7.8'e titre edilmiştir. Son hacmi saf su ile 20 mL tamamlanmış çözelti günlük taze olarak hazırlanmıştır.
3. 1 M Baryum asetat (NR aktivitesinde kullanılan çözelti): 2.56 gr baryum asetatın 8 mL saf suda çözöldükten sonra son hacim 10 mL yapılır.
4. %1'lik Sülfanilamid (NR aktivitesinde kullanılan çözelti): 0.5 gr sülfanilamidin 40 mL 2 N HCl içinde çözöndükten sonra son hacim 50 mL'ye tamamlanır.

5. %0.02'lik N-1-Naftiletilediamnidihiidroklör (NED) (NR aktivitesinde kullanılan çözelti): 0.02 gr N-1-Naftiletilediamnidihiidroklör 80 mL saf suda çözölmüş ve son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.

3.2.4. Glutamin Sentaz (GS) aktivitesi ölçümü çözeltileri

1. Ekstraksiyon Çözeltisi (250 mL için): 6 gr HEPES alınır yaklaşık 200 mL saf suda çözünür ve üzerine 0.19 gr DTT, 0.07 gr EDTA, 18 µL 2-Merkaptoetanol ve 0.24 gr MgCl₂ ilave edilir. Karışım iyice çözöndükten sonra pH'sı 7.6'ya ayarlanır. Son olarak hacmi saf su ile 250 mL yapılır.

2. Reaksiyon Karışımı (100 mL için): 12.15 gr TRIS-HCl alınır ve yaklaşık 80 mL saf suda çözünür, çözelti karıştırılırken üzerine yavaş yavaş 0.5 gr ATP, 0.24 gr sistein, 0.96 gr MgSO₄, 0.55 gr hidroksilamin hidroklör (NH₂OH·HCl) ve 0.95 gr Glutamat ilave edilir ve pH'sı 7.6'ya ayarlanır. Son olarak çözeltinin hacmi 100 mL yapılır.

3. %10'luk FeCl₃ Reaktifi (120 mL için): Bunun için ayı ayrı 3 çözelti hazırlanır.

(A) 12 gr FeCl₃ alınır ve yaklaşık 30 mL 0.2 M HCl içinde çözünür ve son hacmi 40 ml'ye tamamlanır. (B) 28.8 gr TCA alınır ve yaklaşık 30 mL saf su içinde çözünür ve son hacmi 40 ml'ye tamamlanır. (C) Son olarak 40 mL %5'lik HCl çözeltisi hazırlanır. Hazırlanan bu üç çözelti yavaş yavaş sırayla karıştırılır, yani (A+B+C = 120 mL)

3.2.5. Glutamat Sentaz (GOGAT) aktivitesi çözeltileri

1. Ekstraksiyon Çözeltisi (100 mL için): 1.19 gr HEPES yaklaşık 70 mL saf suda çözünür. Bunun üzerine, 0.015 gr DTT, 0.037 gr Na-EDTA, 0.11 gr KCl, 0.1 gr PVP ve son olarak 0.0174 gr PMSF ilave edilir. Sonra çözeltinin pH'sı 7.6'ya ayarlanır ve son hacmi 100 mL yapılır. Bu çözeltiye PMSF en son katılır. PMSF katıldıktan sonra çözelti günlük kullanılır. Direk ışıktan korunur.

2. Reaksiyon karışımı (100 mL için): 0.6 gr HEPES yaklaşık 70 mL saf suda çözünür. Bunun üzerine 0.146 gr Oxoglutarat (α-Ketoglutarat), 0.145 gr Glutamin, 0.01 gr

NADH, 0.075 gr KCl, 0.037 gr Na-EDTA, 500 µL merkaptotanol ilave edilir. Çözelti pH'sı 7.6'ya ayarlanır ve son hacmi 100 mL yapılır. Bu çözelti taze hazırlanmalıdır. Hemen kullanılmayacaksa (0-8 saat gibi) +4°C'de tutulur. Ancak çalışma esnasından önce +30°C'de tutulmalıdır.

3.2.6. Bitki dokularında içsel vanadyum belirlemede kullanılan çözeltiler

1. HNO₃ (%65; 100 mL): 35 mL saf su üzerine yavaş yavaş 65 mL HNO₃ ilave edilir.
2. H₂O₂ (%30; 100 mL): %35'lik H₂O₂ çözeltisinden alınan 85.7 mL üzerine 14.3 mL saf su ilave edilmiştir.
3. HNO₃ (1.5 M; 100 mL): 90.44 mL saf su üzerine %70'lik HNO₃'dan 9.56 mL yavaş yavaş ilave edilir.
4. HNO₃ (1 M; 100 mL): 93.62 mL saf su üzerine %70'lik HNO₃'dan 6.38 mL yavaş yavaş ilave edilir.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Bitkilerin büyütülmesi ve ilgili parametreler

Araştırmamızda genel stres toleransları farklı iki buğday bitki materyali olarak kullanıldı. Bunlar; *Triticum aestivum* L., cv. Doğu-88 ve Altındane çeşitleridir. Buğday tohumları önce %10'luk çamaşır suyu ile 10 dk ve daha sonra %70'lik alkolle 5 dk steril edildikten sonra saf su ile durulandı. Hidroponik sistemde her sepet saksıya (5 cm çapında) yaklaşık 10 buğday tohumu ekildi. Çimlenme sonrası fideler sıcaklık (24/20°C, gündüz/gece) ve nem (%65) kontrolü olan bir iklim kabininde hidroponik (bitki besinlerini içeren su kültürü) ortamda çimlenmeye müteakiben 14 gün büyütüldü. Bu bitkilere 14. gün bitki su kültürü ortamına farklı konsantrasyonlarda (0.0, 5, 10, 50, 100, 250, 500, 750 ve 1000 µM) vanadyum (NaVO₃ olarak) uygulaması yapıldı. Bu uygulamadan 24 saat sonra V uygulanmış ve uygulanmamış bitkilerin kök ve gövde dokuları hasat edildi. Hasat sonrası yapılan ön deneme bulgularına göre (Kök-gövde uzunluğu, kuru ağırlık ve MDA içeriği) çalışmada 0.1 ve 1 mM V konsantrasyonlarının

kullanılmasına karar verildi. Hasat edilen örnekler deneylerde kullanılıncaya kadar - 80°C şartlarında bir derin dondurucuda saklandı. Azot metabolizması enzimleri çevresel faktörlere çok hızlı yanıt vermektedirler. Bu nedenle uygulama yapılmış bitkilerde örnek alınması gündüz vaktine denk getirildi.

3.3.2. Arnon ve Hoagland'ın modifiye besin reçetesi

Çalışmamızda ana amaç olarak vanadyumun azot metabolizması enzimleri üzerindeki etkisi değerlendirilmektedir. Bitki yetiştirme ortamında (Arnon ve Hoagland) NH_4 'ün bulunması, NR ve NiR enzimlerinin baypas edilerek daha çok diğer iki enzimin yani GS ve GOGAT aktif olmasını sağlayacak ve bu yüzden vanadyumun NR ve NiR aktivitesi üzerindeki etkisi tam olarak belirlenemeyecektir. Bu nedenle, NH_4 iyonu, çalışmada kullanılan Arnon ve Hoagland Besin Reçetesinden çıkarılmış ve hidroponik yetiştirme ortamındaki besin içinde azot kaynağı olarak sadece NO_3 'ün bulunması sağlanmıştır (aşağıda sunulmuştur). Böylece bitki azot kaynağı olarak sadece NO_3 alacak ve sırasıyla bu bileşik, NR enzimiyle NO_2 'ye, NO_2 de NiR enzimiyle NH_4 'e, NH_4 te GS ve GOGAT enzimleriyle asimile edilerek amino asit yapısına katılacaktır.

NH_4 eksik makro besin elementlerinin hazırlanması:

Aşağıda verilen stok çözelti 100 mL hacimde hazırlanır.

- a. KH_2PO_4 : Gerekli miktar; 2.3 gr
- b. KNO_3 : Gerekli miktar, 6 gr
- c. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$: Gerekli miktar, 4.9 gr
- d. MgSO_4 : Gerekli miktar, 4.9 gr

Yukarıda verilen miktarlar sırayla yaklaşık 80 mL saf suda yaş yavaş çözünür ve son hacim 100 mL'ye tamamlanır. Hazırlanan makro besin stok çözeltisi +4°C'de saklanır. Hazırlanan bu stok çözeltiden 1 L besin çözeltisi hazırlamak için 10 mL kullanılır (10 mL/1 L).

Mikro besin elementlerinin hazırlanması:

Aşağıda verilen stok çözelti 100 mL hacimde hazırlanır.

- e. H_3BO_3 : Gerekli miktar, 0.286 gr
- f. $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: Gerekli miktar, 0.181 gr
- g. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: Gerekli miktar, 0.022 gr
- h. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: Gerekli miktar, 0.008 gr
- j. $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: Gerekli miktar, 0.009 gr

Yukarıda verilen miktarlar sırayla yaklaşık 80 mL saf suda çözünür ve son hacim 100 mL'ye tamamlanır. Hazırlanan mikro besin stok çözeltisi $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanır. Hazırlanan bu stok çözeltiden 1 L besin çözeltisi hazırlamak için 1 ml kullanılır (1 mL/1 L).

Demir stok çözeltisinin hazırlanması:

Fe-EDTA stok çözeltisi (40.34 mM Fe-EDTA): 0.74 gr Fe-EDTA alınır ve 40 mL saf suda hafif ısıtılarak çözünür. Son hacmi 50 mL'ye tamamlanır. Bu çözelti alüminyum folyo ile kaplı bir şişede (karanlıkta) $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanır. Hazırlanan bu stok çözeltiden 1 L besin çözeltisi için 0.25 mL kullanılır (0.25 mL/1 L). Yani besi yerinde 0.01 mM Fe-EDTA bulunur. Fe-EDTA çözeltisi uzun süre saklanmaz. Taze hazırlanır ve kullanılır.

3.3.3. Bitki dokularında vanadyum tayin yöntemi

1. Tüm cam eşyalar 1-2 saat 1 M nitrik asitle doldurulur ve yıkanır.
2. Bitki örnekleri 70°C 'de 72 saat kurutulur ve bir havanda un haline getirilir.
3. Örneklerden 0.2 gr alınır ve 2-4 saat boyunca 7 mL HNO_3 (%65) içinde maserasyona tabi tutulur.
4. Sonra bu karışım mikrodalga fırında 15 saniye inkübe edilir (800 W, 180°C , 15 sn).

5. Örnekler soğutulur ve ardından karışım üzerine 2 mL H₂O₂ (%30) ilave edilir ve numunelerin açık renkli hacimleri yaklaşık 1 mL oluncaya kadar bir hot-plate üzerinde konsantre edilir.
6. Daha sonra elde edilen solüsyon 5 mL 1.5 M HNO₃ ile 2 dakika kaynatılır.
7. Elde edilen berrak çözelti soğutulur ve deiyonize su ile 25 mL'ye seyreltilir ve filtre kâğıdında süzülür.
8. Berrak çözelti vanadyum içeriğinin belirlenmesi için kullanılır.
9. Bu arada üç tane kör de aynı şekilde hazırlanır.
10. Vanadyum konsantrasyonları İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma-Kütle Spektrometresi (ICP-MS) kullanarak (Perkin-Elmer) belirlenmiştir. Bu işlem Atatürk Üniversitesi, Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) biriminde gerçekleştirilmiştir. Vanadyumun (NaVO₃) standart seyreltilmiş çözeltileri, 1.0 M nitrik asit kullanılarak hazırlanan stok (1000 mg/L) çözeltilerden hazırlanmıştır (Owolabi *et al.* 2016).

3.3.4. Fotosentetik pigment içeriğinin belirlenmesi

Bitki yalpaklarında klorofil a, klorofil b, karotenoid ve toplam pigment miktarlarını belirlemek için Withamvd (1971) tarafından önerilen prosedür uygulandı. Taze yaprak örnekleri (0.2 gr) %80 soğuk aseton içerisinde son hacim 10 mL olacak şekilde homojenize edildi. Daha sonra homojenat filtreye kâğıdından süzülerek elde edilen ekstrakt 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Tüplerden süpernatantlar alınarak 450, 645 ve 663 nm'de absorbans değerleri kaydedildi. Süpernatantların üç farklı dalga boyunda kaydedilen absorbans değerleri aşağıda verilen eşitliklerde yerine konulmasıyla bitki yapraklarında bulunan klorofil a, klorofil b, total klorofil ve karotenoid miktarları hesaplandı ve tez içinde mg/doku olarak sunuldu.

$$\text{mg/klorofil a/gr doku} = [(12.7 \times \text{OD}_{663}) - (2.69 \times \text{OD}_{645})] \times (V / 1000 \times W)$$

$$\text{mg/klorofil b/gr doku} = [(22.9 \times \text{OD}_{645}) - (4.68 \times \text{OD}_{663})] \times (V / 1000 \times W)$$

$$\text{mg/ toplam klorofil /gr doku} = [(20.2 \times \text{OD}_{645}) + (8.02 \times \text{OD}_{663})] \times (V / 1000 \times W)$$

$$\text{mg toplam karotenoid /gr doku} = (4.07 \times \text{OD}_{450}) - (0.0435 \times \text{Kla miktarı}) + (0.367 \times \text{Klb miktarı})$$

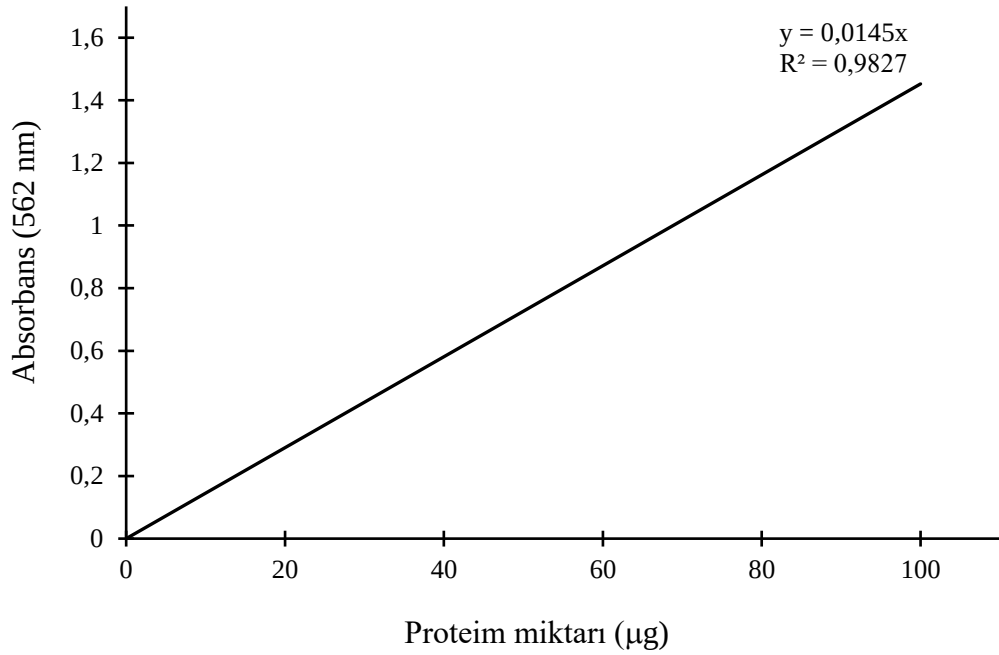
OD: Klorofil ekstraktının belirtilen dalga boylarındaki absorbans değerini,

V: %80'lik asetonun son hacmini,

W: Ekstre edilen dokunun gram olarak yaş ağırlığını gösterir.

3.3.5. Çözünebilir protein miktarının belirlenmesi

Buğday fidelerine ait kök veya yapraklardan rastgele alınan 0.5 gr örnek, bir porselen havan içerisinde alınmış ve sıvı azot içinde un haline gelinceye kadar parçalanmıştır. Daha sonra bu ekstrakt üzerine fosfat tamponundan (100 mM KH_2PO_4 , pH 7.0) 5 mL ilave edilmiş ve doku bir havan eliyle iyice homojenize edilmiştir. Elde edilen karışım bir santrifüj tüpüne alınarak $+4^\circ\text{C}$ 'de 12000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiş ve sonra tüpteki süpernatant başka temiz bir tüpe alınmıştır. Bu tüpten 20 μL alınarak bir mikropleyde pipetlenmiş ve üzerine BCA (Bicinchoninic asid+ CuSO_4) reaktifinden 200 μL ilave edilmiştir. Bu mikropleyde içeriğiyle beraber kısa bir müddet hafif çalkalandıktan sonra 60°C 'de 15 dk inkübe edilmiştir. Mikropleydeki örneğin absorbansı 562 nm'de bir Multiscan'da Kör'e karşı okunmuştur. Kör örnek olarak 200 μL BCA reaktifi kullanılmıştır. Dokuların protein içeriğinin hesaplanmasında standart bir grafikten yararlanılmıştır. Bunun için önce, 10 mL fosfat tamponu (100 mM; pH 7.0) içerisinde 10 mg BSA (bovine serum albumin) çözülerek bir stok çözelti hazırlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan stok BSA (1 mg/1 mL) çözeltiden 0.0, 20, 40, 60, 80, 100 μL 'lik hacimler bir mikroplate kuyularına 3 tekrarlı olacak şekilde pipetlenmiş ve üzerleri saf su ile 100 μL 'ye tamamlanmıştır. Sonra kuyuların her birine 200 μL BCA reaktifi ilave edilmiş ve bu mikropleyde içeriğiyle beraber kısa bir müddet hafif çalkalandıktan sonra 60°C 'de 15 dk inkübe edilmiştir. Yapılan ölçümler sonunda, 562 nm'deki absorbans değerlerine karşılık gelen protein değerlerinden yararlanarak standart bir grafik türetilmiştir (Şekil 3.1). Hazırlanan standart grafik kullanılarak yaprak ve köklerin protein miktarı mg protein/gr yaş ağırlık olarak sunulmuştur (Smith *et al.* 1985).



Şekil 3.1. Çözünabilir protein miktarını hesaplamada kullanılan standart grafik

3.3.6. Lipid peroksidasyon (LPO) seviyesinin belirlenmesi

Tiyo barbitürik asit reaktiflerinin (TBA) spektrofotometrik ölçülmesi ile lipid peroksidasyonu seviyesi belirlendi (Ohkawa *et al.* 1979). Yaprak veya kök örneklerinden 0.5 gr alınarak önce sıvı azotla un haline getirilmiştir. Bu ekstrakt üzerine %5'lik TCA çözeltisinden 5 ml ilave edilerek tamamen parçalanıncaya kadar havanda homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat ependorf tüplerine aktarılarak 13000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmından 1.5 mL alınmış ve üzerine 1.5 mL %0.5'lik TBA reaktifi (%20 TCA içinde) pipetlenmiştir. Karışım iyice vorteksledikten sonra 30 dk 95°C sıcak su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda tüpler buz banyosuna alınarak reaksiyon durdurulmuştur. Elde edilen pembe-kırmızı renkli çözelti tekrar 12000 rpm'de 5 dk daha santrifüj edildikten sonra, süpernatantın 532 ve 600 nm'deki absorbans değerleri belirlenmiştir. Bir mL karışım içerisindeki malondialdehid (MDA) miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanıp sonuçlar nmol/gr doku olarak sunulmuştur. Aynı oranda TCA ve TBA karışımı KÖR örnek olarak kullanıldı.

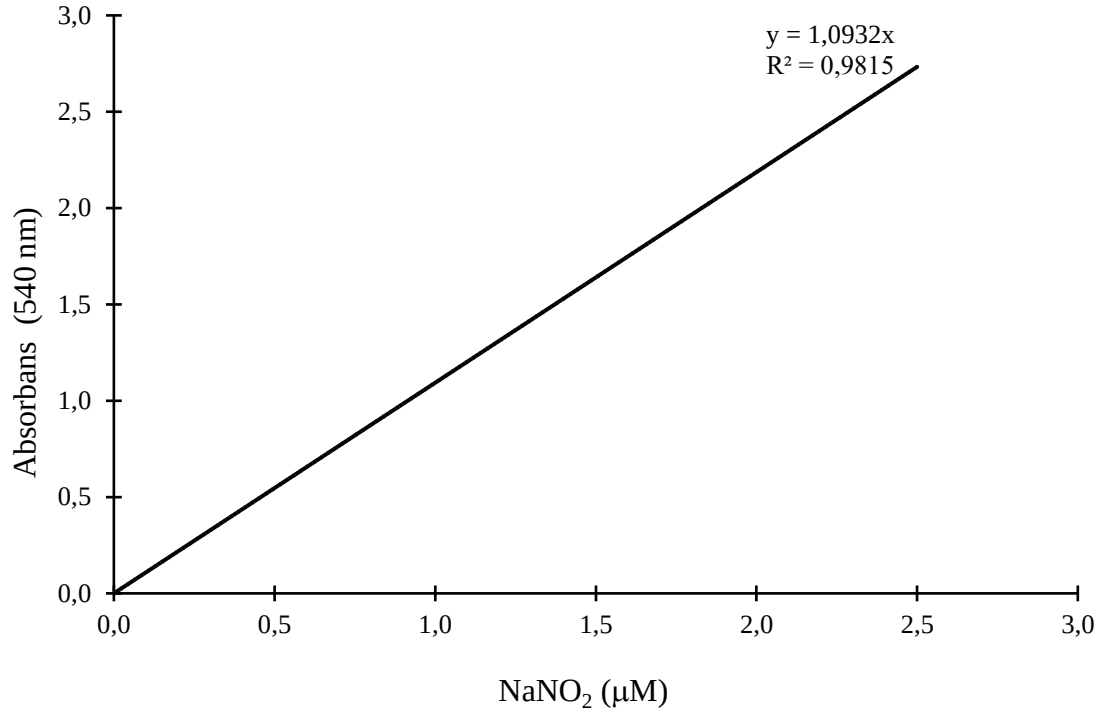
$$\text{MDA (nmol/mL)} = \frac{[(A_{532} - A_{600}) - [(A_{440} - A_{600}) \times (0.0571)]]}{157000} \times 10^6$$

3.3.7. Azot metabolizması enzimlerinin aktiviteleri

Enzim ekstraksiyonu için buğday fidelerine ait kök ve yapraklardan 0.25 gr doku örneği, önce sıvı azot ve daha sonra 2.5 mL hacimde 0.2 mM EDTA, %0.1 polivinilprilidon (PVP) ve 1 mM ditiyotritol (DTT) içeren 50 mM fosfat tamponu (pH 7) içinde homojenize edildi. Homojenize edilen örnekler 12000xg'de 15 dakika santrifüjlendi (+4°C). Berrak süpernatant ham enzim kaynağı olarak kullanıldı (Khan 1996; Zheng-xun *et al.* 2007).

3.3.7.a. Nitrat redüktaz (NR) aktivitesinin belirlenmesi

NR aktivitesi, Jaworski (1971) metoduna göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı (2 mL), 25 mM fosfat tamponu (pH7.5), 10 mM NaNO₃, 0.05 mM EDTA, 2 mM NADH ve 0.2 mL enzim özütü içerir. Reaksiyonu başlatmak için enzim özütü içeren 1.9 mL'lik reaksiyon karışımı üzerine 0.1 mL NADH pipetlenir. Peşine deney solüsyonu alt-üst edilerek karıştırılır ve 30 dakika 30°C'de inkübe edilir. Karışımın renk reaksiyonu için; 1 mL 58 mM sülfanilamid, 3 M HCl + 0.77 mM N-(1-Naftil etilenediamindihidroklörür (NED-HCL) ilave edilir ve karışım bu haliyle 30 dakika inkübe edilir. Gelişen pembe rengin absorbansı 540 nm'de ölçülür (Barro *et al.* 1991). Reaksiyon sonunda tüpte NR etkisiyle oluşan nitrit iyonlarının miktarı üzerinden enzim ünitesi hesaplanır. Bunun için önce, bilinen miktarlarda (0.0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 ve 3 µM) ve 1.9 mL hacimlerde NaNO₂ içeren çözeltiler hazırlanır. Bu çözeltilerin her biri (1.9 mL) üzerine 1 mL %1 sülfanilamid (3 M HCl içinde hazırlanmış olacak) ve 1 mL %0.02 NED-HCl ilave edilir. Peşine 30 dakika sonra gelişen pembe rengin absorbansı 540 nm'de ölçülür. Bu çözeltilerden elde edilen standart eğri (Şekil 3.2) denklemiyle örneklerde oluşan nitrit miktarı hesaplanır. Bir ünite (EU) NR, 1 µmol nitrit üretmek için gerekli enzim miktarı olarak hesaplanır. Sonuçlar µM NaNO₂/gr yaş ağırlık olarak sunulmuştur.



Şekil 3.2. NR ve NiR aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan standart grafik

3.3.7.b. Nitrit redüktaz (NiR) aktivitesinin belirlenmesi

Aktivite ölçümü için bir tüpe; 1.5 mL fosfat tamponu (0.5 M; pH 7.4), 100 μ L sodyum nitrit (15 mM NaNO₂), 200 μ L metilviolojen (5 mM) ve 200 μ L 190 mM sodyum bikarbonat (86 mM sodyum dithionit içerir) konulur. Bu karışımın üzerine 100 μ L enzim özütü pipetlenir ve tüp hafifçe alt-üst edilir. Tüp 35°C’de 30 dk inkübe edilir. Sonra, tüpteki reaksiyon, koyu mavi renk kaybolana kadar şiddetli çalkalanır ve kaynar suda 1 dk tutulur (reaksiyonu durdurmak için). Tüp, 10000 rpm’de 5 dk santrifüj edilir (+4°C) ve elde edilen süpernatant temiz bir tüpe alınır. Karışımın renk reaksiyonu için; Tüp üzerine 1 mL %1 sülfanilamid (1.5 M HCl içinde hazırlanmış olacak) + 1 mL %0.02 N-(1-Naftil etilenediamindihidroklörür (NED-HCL) (1.5 M HCl içinde hazırlanmış olacak) ilave edilir. Tüp karıştırıldıktan sonra, gelişen pembe rengin absorbansı 30 dk sonra 540 nm’de ölçülür. KÖR örnek, enzim özütü (bunun yerine 100 μ L tampon eklenir) haricindeki tüm bileşenleri içermektedir. Tüpte kalan ve tüketilmeyen nitrit iyonlarının miktarı üzerinden enzim ünitesi hesaplanır. Bunun için

önce, bilinen miktarlarda (0.0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 ve 3 μ M) NaNO_2 içeren çözeltiler (1.9 mL) hazırlanır. Bu çözeltiler (1.9 mL) üzerine 1 mL %1 sülfanilamid (3 M HCl içinde hazırlanmış olacak) ve 1 mL %0.02 NED-HCl ilave edilir. 30 dakika sonra gelişen pembe rengin absorbansı 540 nm'de ölçülür (Barro *et al.* 1991; Khan 1996). Bu çözeltilerden elde edilen standart eğri (Şekil 3.2) denklemiyle örneklerde bulunan nitrit miktarı hesaplanır. Bir ünite NiR, 30°C'de 1 dakika başına 1 μ mol nitriti tüketmek için gereken enzim miktarı olarak hesaplanır. Sonuçlar μ M NaNO_2 /gr yaş ağırlık olarak sunulmuştur.

3.3.7.c. Glutamin sentaz (GS) aktivitesi ölçümü

GS aktivitesi ölçümü, hidroksamat biyosentetik yöntem olarak bilinen Zheng-xun vd. (2007) tarafından belirtilen protokole göre yapılmıştır. Özüt elde etmek için diğer enzimler için yapılan ekstraksiyonlardan farklı olarak, örneklerin ekstraksiyonunda 5 mM DTT, 0.2 mM EDTA ve 10 mM MgCl_2 içeren 5 mL 0.1 M HEPES tamponu (pH 7.6) kullanılır. Reaksiyon karışımı; 600 μ L 0.25 M Tris-HCl tamponu (pH7.0), 200 μ L 0.03 M ATP (pH 7.0), 200 μ L 0.5 M MgSO_4 , 200 μ L 1 M hidroksilaminhidroklorür (pH7.0) ve 100 μ L enzim özütü içerir. Bu karışım, 30°C'de 30 dakika inkübe edilir ve sonra üzerine 750 μ L FeCl_3 reaktifi eklenmesinden sonra kahverengi kompleks olarak γ -glutamil hidroksamat (GGH) oluşur. FeCl_3 reaktifi, 0.37 M FeCl_3 , 0.2 M trikloroasetik asit (TCA) ve 0.67 M HCl'den oluşmaktadır. Kahverengi GGH kompleksinin absorbansı 540 nm'de ölçülür. Kör örnek, ATP dışındaki tüm bileşenleri içermektedir. Bir ünite GS, 30 °C ve 1 dakikada absorbansı 0.01 değiştiren enzim miktarıdır (1 μ mol GGH-kompleksi üretmek için gerekli enzim miktarı). Sonuçlar EU/gr yaş ağırlık olarak sunulmuştur. Enzim ünitesinin hesaplanması aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

$$\text{GS (EU/gr doku)} = (\text{ODörnek} - \text{ODkör}) \times V_{\text{total}} / (V_{\text{örnek}} \times W / V_{\text{toplam tampon}}) / 0.01 / T$$

V_{total} : Reaksiyon karışımının hacmi

$V_{\text{örnek}}$: Ölçüm yapılan örnek hacmi

$V_{\text{toplam tampon}}$: 0.25 gr dokunun homojenize edildiği tamponun hacmi

W: Homojenize edilen dokunun ağırlığı

T: Reaksiyon zamanı

3.3.7.d. Glutamat sentaz (GOGAT) aktivitesi ölçümü

NADH'a bağımlı GOGAT aktivitesi, Singh ve Srivastava (1986) tarafından önerilen yöntemle göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı (1.8 mL); 25 mM HEPES tamponu (pH 7.5) olup içinde 10 mM 2-oxoglutarat (α -ketoglutarat; 2-OG), 10 mM Glutamin, 0.14 mM NADH, 10 mM KCl, 1 mM Na-EDTA ve %0.5 β -merkaptoetanol içermelidir (Deney yapmadan hemen önce 30°C'de tutulmalıdır ve her zaman taze hazırlanır). Kör olarak, NADH, 2-OG ve glutamin yerine, 750 μ L 40 mM fosfat tamponu (pH 7.5) kullanılır. Reaksiyon, 1.8 mL reaksiyon karışımı üzerine 200 μ L enzim özütü pipetlenerek başlatılır. NADH oksidasyonu 3 dakika boyunca 340 nm'de izlenir. Sonuçlar EU/gr yaş ağırlık olarak sunulmuştur. Enzim ünitesinin hesaplanması aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

$$\text{GOGAT (EU/gr doku)} = (\text{OD}_{\text{Örnek}} (0. \text{ dk}) - \text{OD}_{\text{Örnek}} (3. \text{ dk})) / (\epsilon \times d) \times V_{\text{Total}} \times 10^9 / (W \times V_{\text{Örnek}} / V_{\text{Ölçüm}}) / T$$

ϵ : Molarektinksiyon katsayısı, 6.22×10^3 L/mol/cm;

W: Örnek ağırlığı

V_{Total} : Enzimatik reaksiyonun total hacmi

$V_{\text{Örnek}}$: Örnek hacmi

$V_{\text{Ölçüm}}$: Örnek hazırlanmasında kullanılan toplam tampon hacmi

T: Reaksiyon zamanı

İstatistik analiz

Çalışmada sunulan veriler ($\pm$ SE olarak), her bir uygulamadan üç örnek (3 paralel) ve her bir örnekten 2 tekerrür yapıldıktan sonra elde edilen 6 bağımsız değerlerin ortalamasıdır.

Sonuçların karşılaştırılması, SPSS 15 paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmış ve gruplar arasındaki farklılıklalar $p<0.05$ önem seviyesinde Duncan'ın çoklu karşılaştırma Testi kullanılarak belirlenmiştir.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada vanadyum (V) stresinin bitki azot metabolizması üzerindeki etkisini belirlemek için stres toleransları farklı iki buğday çeşidi (*Triticum aestivum* L., cv. Altındane ve cv. Doğu-88) kullanılmıştır. Kontrollü koşullar altındaki bir iklim odasında hidroponik sistemde gerçekleştirilen çalışmada buğday fideleri çimlenmeyi takiben 14. gün farklı konsantrasyonlarda (0.0, 0.1 ve 1 mM) vanadyum (NaVO_3 olarak) stresi koşullarına maruz bırakılmıştır. Uygulamadan 24 saat sonra, V uygulanmış ve uygulanmamış bitkilerin kök ve gövde (toprak üstü tüm sürgün) dokuları çalışma materyali olarak kullanılmıştır. Bu kök ve gövdelerde içsel V miktarı, protein ve fotosentetik pigment (klorofil a, klorofil b ve karotenoid) içerikleri, lipid peroksidasyonu seviyesi (MDA olarak) ve azot metabolizmasında rol alan anahtar enzimlerin (NR, NiR, GS ve GOGAT) aktiviteleri belirlenmiştir. Bu parametrelere ait bulgular, istatistik anlamda ($P < 0.05$) kontrolleri ile karşılaştırılarak elde edilen veriler aşağıda sunulmuştur.

4.1. Bitki Dokularında İçsel Vanadyum Miktarına Ait Bulgular

Buğdayın her iki çeşidinin (Altındane ve Doğu-88) kök ve gövdelerinde içsel V seviyeleri Çizelge 4.1’de sunulmuştur. Çizelge incelendiğinde, kontrol bitkilerinin köklerinde V içeriğinin gövdelere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Kök ve gövde arasındaki içsel V farkı köklerde neredeyse %50 daha fazla bulunmuştur. Diğer taraftan, çalışmada buğday fidelerine 0.1 ve 1 mM V uygulamasının her iki çeşidin kök ve gövdelerde V birikimini kontrole göre önemli ($P < 0.05$) oranda artırmıştır. Artışlar özellikle köklerde çok daha yüksek olmuştur. Örneğin 0.1 mM V uygulamasında, Altındane’de köklerin V içeriği 4.184 ppm’den artarak 98.752 ppm’e, Doğu-88’de ise 5.11 ppm’den artarak 138.458 ppm’e çıkmıştır. 1 mM V uygulamasında ise artışlar daha dramatik olarak aynı çeşitlerin köklerinde sırasıyla 188.86 ve 138.46 ppm’e kadar çıkmıştır. Aynı bitkilerin gövdelerinde de V uygulamasıyla içsel V birikiminin arttığı görülmektedir. Ancak bu artışlar köklere göre oldukça düşük olmuştur. Örneğin

Altındane ve Doğu-88'in gövdelerinde 0.1 ve 1 mM V uygulamalarında kontrolde sırasıyla 1.47 ve 1.73 olan V içeriği aynı sırayla 21.51 ve 17.55 ppm olmuştur.

Bu veriler genel olarak değerlendirildiğinde, hidroponik sistemde 0.1 ve 1 mM V uygulaması, buğdayın her iki çeşidinde içsel V içeriğini artırmıştır. Bu artışlar uygulanan V konsantrasyonu artışına paralel olarak daha yüksek olmuştur. Ayrıca her iki bitkinin köklerinde V birikiminin gövdelerine göre çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Buğdayın her iki çeşidi karşılaştırıldığında, Altındane çeşidinin kök ve gövdesindeki V birikiminin Doğu-88 çeşidine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Vanadyum (V) uygulamasının buğdayın Altındane ve Doğu-88 çeşitlerinde içsel vanadyum üzerine etkisi

İçsel Vanadyum Miktarı (ppm)				
Vanadyum	Altındane		Doğu-88	
	Kök	Gövde	Kök	Gövde
Kontrol	4.184±0.13 ^e	1.469±0.07 ^g	5.111±0.12 ^e	1.731±0.19 ^g
0.1 mM	98.752±3.04 ^c	2.935±0.21 ^f	77.462±3.98 ^c	3.014±0.76 ^f
1 mM	188.857±7.18 ^a	21.512±1.98 ^d	138.458±6.24 ^b	17.547±2.56 ^d

Çizelge içinde aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre ($p>0.05$) önemsizdir. $\pm$ standart hatayı ifade eder.

4.2. Çözünabilir Protein Miktarına Ait Bulgular

Buğdayın her iki çeşidinin (Altındane ve Doğu-88) kök ve gövdelerinde çözünabilir protein miktarı verileri Çizelge 4.2'de sunulmuştur. Çizelge incelendiğinde, 0.1 mM V uygulamasının her iki buğday çeşidinin kök ve gövdelerinde protein miktarını kontrole göre önemli oranda ($P<0.05$) düşürdüğü belirlenmiştir. Bu düşüşler Altındane kök ve gövdesinde sırasıyla %18.4 ve %7.52 ve Doğu-88'de sırasıyla %13.3 ve %8.79 oranlarında olmuştur. Ancak ilginç olarak 1 mM V uygulamasında her iki çeşidin kök ve gövdelerinde protein miktarı genelde hafif derecede ($P>0.05$) artmıştır veya

değiştirmemiştir. Bu artışlarda istatistik anlamda önemli ($P<0.05$) olan sadece 1 mM V uygulanmış Doğu-88'in gövdesindeki protein içeriğinde (%7 artış) belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Vanadyum uygulamasının buğdayın Altındane ve Doğu-88 çeşitlerinde çözünebilir protein miktarı üzerine etkisi

Çözünebilir Protein Miktarı ($\mu\text{g}/\text{gr}$ yaş ağırlık)				
Vanadyum	Altındane		Doğu-88	
	Kök	Gövde	Kök	Gövde
Kontrol	733 $\pm$ 13 ^{ef}	1421 $\pm$ 18 ^c	676 $\pm$ 21 ^f	1581 $\pm$ 27 ^b
0.1mM	598 $\pm$ 10 ^g	1314 $\pm$ 40 ^d	586 $\pm$ 18 ^g	1442 $\pm$ 46 ^d
1mM	808 $\pm$ 28 ^e	1418 $\pm$ 34 ^{bc}	689 $\pm$ 12 ^f	1693 $\pm$ 39 ^a

Çizelge içinde aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre ($p>0.05$) önemsizdir. $\pm$ standart hatayı ifade eder.

Çözünebilir protein bulguları genel olarak değerlendirildiğinde, 0.1 mM V uygulamasının her iki buğday çeşidinde protein miktarını düşürürken, 1 mM V uygulamasının hafif derecede artırdığı belirlenmiştir. Buğday çeşitleri birbiriyle karşılaştırıldığında, V uygulamasının protein içeriği üzerinde çeşitler arasında anlamlı bir farka neden olmamıştır.

4.3. Lipid Peroksidasyonu (LPO) İçeriğine Ait (MDA olarak) Bulgular

Buğdayın her iki çeşidinin kök ve gövdelerinde malondialdehid (MDA) verilerine ait bulgular Çizelge 4.3'de sunulmuştur. Çizelge incelendiğinde, 0.1 mM V uygulamasının her iki buğday çeşidinin kök ve gövdelerinde MDA miktarını kontrole göre önemli oranda ($P<0.05$) artırdığı belirlenmiştir. MDA içeriğindeki artışlar 0.1 mM V uygulamasında, Altındane kök ve gövdesinde sırasıyla %45.7 ve %11.8; Doğu-88 çeşidinde sırasıyla %36.8 ve %6.1 oranlarında olmuştur.

Çizelge 4.3. Vanadyum uygulamasının buğdayın Altındane ve Doğu-88 çeşitlerinde MDA miktarı üzerine etkisi.

MDA miktarı (nmol/mL)				
Vanadyum	Altındane		Doğu-88	
	Kök	Gövde	Kök	Gövde
Kontrol	4.02±0.21 ^f	5.65±0.043 ^d	3.75±0.42 ^f	6.74±0.37 ^{bc}
0.1 mM	5.86±0.62 ^d	6.32±0.50 ^{cd}	5.13±0.65 ^e	7.15±0.56 ^a
1 mM	7.12±0.45 ^{ab}	5.21±0.49 ^e	5.92±0.89 ^d	7.46±0.67 ^a

Çizelge içinde aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre ($p>0.05$) önemsizdir. $\pm$ standart hatayı ifade eder.

Vanadyumun 1 mM uygulamasında ise bu MDA artışları özellikle köklerde daha da artmıştır. Örneğin, 1 mM V koşullarında Altındane kök ve gövdesinde sırasıyla %77.1 ve %0.0 (hafif düşüş var), Doğu-88 çeşidinde sırasıyla %57.9 ve %10.7 oranlarında olmuştur.

MDA verileri genel olarak değerlendirildiğinde, V uygulaması buğdayın her iki çeşidinde LPO seviyesini (MDA içeriği olarak) önemli ($P<0.05$) seviyelerde artırmıştır. MDA içeriğindeki artışlar özellikle her iki çeşidin köklerinde daha dramatik seviyelerde olmuştur. Gövdelerinde de artışlar belirlense de bu artışlar köklere göre daha düşük olmuştur. Çeşitler kendi aralarında değerlendirildiğinde V stresi Altındane çeşidinde LPO seviyesini daha yüksek oranda artırmıştır.

4.4. Fotosentetik Pigment İçeriklerine Ait Bulgular

Buğdayın Altındane çeşidinin gövdelerinde fotosentetik pigment verilerine ait bulgular Çizelge 4.4'de sunulmuştur. Çizelge incelendiğinde, 0.1 ve 1 mM V uygulamasının klorofil içeriğini kontrole göre önemli oranda ($P<0.05$) düşürdüğü belirlenmiştir. Örneğin K_{la}, K_{lb} ve total klorofil içeriğindeki düşüşler 0.1 mM V uygulamasında, sırasıyla %9.3 ve %7.74, %16.43 oranlarında olmuştur. V uygulamasının 1 mM uygulamasında ise K_{la}, K_{lb} ve total klorofil içeriğindeki düşüşler sırasıyla %15.11,

%11.16 ve %20 oranlarında olmuştur. Diğer taraftan aynı çeşitte karotenoid içeriği genelde V uygulamaları ile artmıştır (Çizelge 4.4). Karotenoid içeriği artışları 0.1 ve 1 mM V uygulamalarında sırasıyla %13.95 ve %19.53 oranlarında olmuştur.

Buğdayın Doğu-88 çeşidi fotosentetik pigment verilerine ait bulgular Çizelge 4.5’de sunulmuştur. Çizelge incelendiğinde, 0.1 ve 1 mM V uygulamasının klorofil içeriğini kontrole göre önemli oranda ($P<0.05$) düşürdüğü belirlenmiştir. Örneğin Kla, Klb ve total klorofil içeriğindeki düşüşler 0.1 mM V uygulamasında, sırasıyla %3.32, %6.7 ve %9 oranlarında olmuştur. V uygulamasının 1 mM uygulamasında ise Kla, Klb ve total klorofil içeriğindeki düşüşler sırasıyla %13.81, %8.64 ve %21.86 oranlarında olmuştur. Diğer taraftan aynı çeşitte karotenoid içeriği genelde V uygulamaları ile artmıştır (Çizelge 4.5). Karotenoid içeriği artışları 0.1 ve 1 mM V uygulamalarında sırasıyla %6.93 ve %13.86 oranlarında olmuştur.

Fotosentetik pigment içerikleri genel olarak değerlendirildiğinde, V uygulamaları klorofil içeriğini buğdayın hem Altındane hem de Doğu-88 çeşitlerinde önemli oranda düşürmüştür. Klorofil içeriğindeki düşüşler V uygulaması artışıyla genelde daha da belirgin olmuştur. V stresinin Altındane çeşidinde klorofil içeriği üzerindeki negatif etkisi, Doğu-88 çeşidine göre daha yüksek olmuştur. Kla ve Klb çeşitleri arasında negatif etki bakımından değerlendirildiğinde, genelde Kla, V stresinden daha fazla etkilenmiştir. Diğer taraftan V uygulamaları her iki çeşitte karotenoid içeriğini artırmıştır. V stresine karşı karotenoid içeriğini artırmada Altındane çeşidinin daha başarılı olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.4. Vanadyum uygulamasının buğdayın Altındane çeşidinde fotosentetik pigmentlerin miktarı üzerine etkisi

Fotosentetik Pigment Miktarı (mg/gr yaş ağırlık)				
Vanadyum	Altındane			
	Kla	Klb	Toplam Kl	Karotenoid
Kontrol	1.72±0.08 ^c	1.42±0.06 ^e	2.92±0.06 ^a	0.215±0.02 ^b
0.1 mM	1.56±0.06 ^d	1.31±0.08 ^f	2.44±0.06 ^a	0.245±0.01 ^a
1 mM	1.46±0.05 ^{de}	1.26±0.09 ^f	2.35±0.07 ^b	0.257±0.03 ^a

Klorofil a ve b, toplam klorofil ile karotenoid sütunları kendi içinde bağımsız olarak aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre ($p>0.05$) önemsizdir. $\pm$ standart hatayı ifade eder.

Çizelge 4.5. Vanadyum uygulamasının buğdayın Doğu-88 çeşidinde fotosentetik pigment miktarı üzerine etkisi

Fotosentetik Pigment Miktarı (mg/gr yaş ağırlık)				
Vanadyum	Doğu-88			
	Kla	Klb	Toplam Kl	Karotenoid
Kontrol	1.81±0.07 ^a	1.62±0.15 ^{de}	3.11±0.21 ^a	0.274±0.02 ^b
0.1 mM	1.75±0.08 ^d	1.51±0.11 ^{ef}	2.83±0.09 ^b	0.293±0.01 ^{ba}
1 mM	1.56±0.04 ^e	1.48±0.07 ^f	2.43±0.12 ^c	0.312±0.04 ^a

Klorofil a ve b, toplam klorofil ile karotenoid sütunları kendi içinde bağımsız olarak aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre ($p>0.05$) önemsizdir. $\pm$ standart hatayı ifade eder.

4.5. Nitrat Redüktaz (NR) Aktivitesine Ait Bulgular

Buğdayın her iki çeşidinin (Altındane ve Doğu-88) kök ve gövdelerinde NR aktivitesine ait veriler Çizelge 4.6'de sunulmuştur. Çizelge incelendiğinde, öncelikle NR aktivitesinin yapraklarda daha yüksek olduğu görülebilir. Ayrıca 0.1 ve 1 mM V uygulamasının her iki buğday çeşidinin kök ve gövdelerinde NR aktivitesi kontrole göre önemli oranda ($P<0.05$) düşürdüğü belirlenmiştir. NR aktivitesindeki düşüşler 0.1 mM V uygulamasında, Altındane kök ve gövdesinde sırasıyla %16.71 ve %9.2; Doğu-88 çeşidinde sırasıyla %13.73 ve %7.22 oranlarında olmuştur. V uygulamasının 1 mM

uygulamasında ise aktivitedeki düşüşler özellikle köklerde daha keskin olmuştur. Örneğin, 1 mM V koşullarında Altındane kök ve gövdesinde aktivite düşüşü sırasıyla %32.26, %18.4 ve Doğu-88 çeşidinde sırasıyla %31.72 ve %17.42 oranlarında olmuştur.

NR aktivitesi verileri genel olarak değerlendirildiğinde, V uygulaması buğdayın her iki çeşidinde NR aktivitesini önemli ($P<0.05$) seviyelerde inhibe etmiştir. NR aktivitesi inhibisyonu özellikle her iki çeşidin köklerinde daha dramatik seviyelerde olmuştur. Çeşitler kendi aralarında değerlendirildiğinde V uygulamasıyla aralarında çok belirgin bir fark belirlenememiştir, ancak V stresinin Altındane çeşidinin kök ve gövdelerinde NR aktivitesi üzerinde kısmen daha negatif etkiye sahip olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.6. Vanadyum uygulamasının buğdayın Altındane ve Doğu-88 çeşitlerinde NR aktivitesi üzerine etkisi

Vanadyum	NR aktivitesi ($\mu\text{mol NO}_2/\text{gr yaş ağırlık}$)			
	Altındane		Doğu-88	
	Kök	Gövde	Kök	Gövde
Kontrol	6.88 $\pm$ 0.51 ^{ef}	7.50 $\pm$ 0.34 ^e	10.78 $\pm$ 0.71 ^{bc}	12.74 $\pm$ 0.23 ^a
0.1 mM	5.73 $\pm$ 0.33 ^g	6.81 $\pm$ 0.16 ^f	8.52 $\pm$ 0.41 ^d	11.82 $\pm$ 0.12 ^b
1 mM	4.66 $\pm$ 0.14 ^g	6.12 $\pm$ 0.29 ^f	7.36 $\pm$ 0.24 ^e	10.52 $\pm$ 0.14 ^c

Çizelgede aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre ($p>0.05$) önemsizdir. $\pm$ standart hatayı ifade eder.

4.6. Nitrit Redüktaz (NiR) Aktivitesine Ait Bulgular

Buğdayın her iki çeşidinin (Altındane ve Doğu-88) kök ve gövdelerinde NiR aktivitesine ait veriler Çizelge 4.7'de sunulmuştur. Çizelge incelendiğinde, 0.1 ve 1 mM V uygulamaları her iki buğday çeşidinin kök ve gövdelerinde NiR aktivitesini kontrole göre genelde ($P<0.05$) düşürmüştür. Aktivitedeki düşüşler Altındane'nin kök ve gövdelerinde daha belirgin olmuştur. NiR aktivitesindeki düşüşler 0.1 mM V uygulamasında, Altındane kök ve gövdesinde sırasıyla %12.90 ve %9.93; Doğu-88

çeşidinin köklerinde sırasıyla %9.28 ve %3.1 oranında olmuştur. V uygulamasının 1 mM dozunda ise aktivitedeki düşüşler özellikle köklerde daha keskin olmuştur. Örneğin, 1 mM V koşullarında Altındane kök ve gövdesinde aktivite düşüşü sırasıyla %26.47, %18.08 ve Doğu-88 çeşidinde sırasıyla %26.64 ve %11 oranlarında olmuştur.

Çizelge 4.7. Vanadyum uygulamasının buğdayın Altındane ve Doğu-88 çeşitlerinde NiR aktivitesi üzerine etkisi

NiR aktivitesi ($\mu\text{mol NO}_2/\text{gr yaş ağırlık}$)				
Vanadyum	Altındane		Doğu-88	
	Kök	Gövde	Kök	Gövde
Kontrol	16.51 $\pm$ 0.42 ^{de}	19.83 $\pm$ 0.41 ^c	20.13 $\pm$ 0.31 ^{bc}	24.45 $\pm$ 0.97 ^a
0.1 mM	14.38 $\pm$ 0.51 ^g	17.86 $\pm$ 0.61 ^d	18.26 $\pm$ 0.64 ^{cd}	23.71 $\pm$ 0.13 ^a
1 mM	12.14 $\pm$ 0.43 ^h	16.25 $\pm$ 0.24 ^{ef}	15.17 $\pm$ 0.18 ^{fg}	21.76 $\pm$ 0.75 ^b

Çizelge içinde aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre ($p>0.05$) önemsizdir. $\pm$ standart hatayı ifade eder.

NiR aktivitesi verileri genel olarak değerlendirildiğinde, öncelikle kök ve gövdeler kendi aralarında kıyaslandığında, NiR aktivitesinin gövdede köke oranla daha yüksek olduğu görünmektedir (Çizelge 4.7). Diğer taraftan V uygulamalarının her ikisi buğdayın iki çeşidinin kök ve gövdelerinde NiR aktivitesini önemli ($P<0.05$) seviyelerde inhibe etmiştir. Ancak NiR aktivitesinin inhibisyonunda 1 mM V, 0.1 mM'a göre daha etkili olmuştur. Çeşitler kendi aralarında değerlendirildiğinde V uygulaması NiR aktivitesinin inhibisyonunda Altındane çeşidinde daha etkili olurken, Doğu-88 çeşidi V stresine Altındane'ye göre nispeten daha dayanıklı bir durum sergilemiştir.

4.7. Glutamin Sentaz (GS) Aktivitesine Ait Bulgular

Buğdayın her iki çeşidinin (Altındane ve Doğu-88) kök ve gövdelerinde GS aktivitesine ait veriler Çizelge 4.8'de sunulmuştur. Çizelge incelendiğinde, öncelikle GS aktivitesinin yapraklarda kısmen daha yüksek olduğu görülebilir. Ayrıca 0.1 ve 1 mM V uygulamasının her iki buğday çeşidinin kök ve gövdelerinde GS aktivitesi kontrole göre

önemli oranda ($P<0.05$) düşürdüğü belirlenmiştir. GS aktivitesindeki düşüşler 0.1 mM V uygulamasında, Altındane kök ve gövdesinde sırasıyla %26.29 ve %16.98; Doğu-88 çeşidinde ise düşüş sadece kökte %22.59 oranında olmuştur. 1 mM V uygulamasında ise aktivitedeki düşüşler daha keskin olmuştur. Örneğin, 1 mM V koşullarında Altındane kök ve gövdesinde aktivite düşüşü sırasıyla %39.84, %39.15 ve Doğu-88 çeşidinde sırasıyla %37.65 ve %20.59 oranlarında olmuştur.

GS aktivitesi verileri genel olarak değerlendirildiğinde, V uygulaması buğdayın her iki çeşidinde GS aktivitesini önemli ($P<0.05$) seviyelerde inhibe etmiştir. GS aktivitesi inhibisyonu özellikle her iki çeşidin köklerinde daha belirgin seviyelerde olmuştur. Çeşitler kendi aralarında değerlendirildiğinde V uygulamasıyla aralarında çok belirgin bir fark belirlenememiştir, ancak V stresinin Altındane çeşidinin kök ve gövdelerinde GS aktivitesi üzerinde kısmen daha negatif etkiye sahip olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.8. Vanadyum uygulamasının buğdayın Altındane ve Doğu-88 çeşitlerinde GS aktivitesi üzerine etkisi

GS aktivitesi (EU/gr yaş ağırlık)				
Vanadyum	Altındane		Doğu-88	
	Kök	Gövde	Kök	Gövde
Kontrol	3.69±0.14 ^e	4.24±0.25 ^{ed}	5.71±0.29 ^c	9.18±1.14 ^a
0.1 mM	2.72±0.21 ^f	3.52±0.31 ^e	4.42±0.24 ^{cd}	10.16±1.23 ^a
1 mM	2.43±0.13 ^f	2.58±0.09 ^f	3.56±0.19 ^e	7.29±0.19 ^b

Çizelgede aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre ($p>0.05$) önemsizdir. ± standart hatayı ifade eder.

4.8. Glutamat Sentaz (GOGAT) Aktivitesine Ait Bulgular

Buğdayın her iki çeşidinin kök ve gövdelerinde GOGAT aktivitesine ait veriler Çizelge 4.9'de sunulmuştur. Çizelge incelendiğinde, öncelikle GOGAT aktivitesinin gövdede köke nazaran daha yüksek olduğu belirlenmiştir. GOGAT aktivitesi diğer enzimlerden farklı olarak V stresine karşı belirgin bir düzen sergilememiştir. Örneğin 0.1 mM V

uygulaması, GOGAT aktivitesini her iki buğday çeşidinin köklerinde artırırken ($P<0.05$), gövdelerinde düşürmüştür ($P<0.05$). Veriler oranlarla ifade edilirse, 0.1 mM V stresi Altındane gövdelerinde aktiviteyi %21.43 düşürürken, köklerinde %26.75 oranında artırmıştır. Doğu-88’de ise 0.1 V stresi gövdede %12.13 düşürürken, köklerde 20.98 oranında artırmıştır. 1 mM V uygulamasında ise Altındane’nin aktivite gövdesinde %54.53 oranında düşerken, köklerde %33.28 artmıştır. 1 mM V stresi Doğu-88’de aktiviteyi kök ve gövdenin her ikisinde önemli oranda ($P<0.05$) düşürmüştür. Bu düşüşler kök ve gövdede sırasıyla %19.88 ve %23.53 oranlarında olmuştur.

GOGAT aktivitesi verileri genel olarak değerlendirildiğinde, 0.1 ve 1 mM V uygulaması buğdayın her iki çeşidinde GOGAT aktivitesini genelde gövdelerde düşürmüş, ancak aynı bitkilerin köklerinde artırmıştır. Çeşitler kendi aralarında değerlendirildiğinde, GOGAT aktivitesindeki düşüşler ve artışlar Altındane’de daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.9. Vanadyum uygulamasının buğdayın Altındane ve Doğu-88 çeşitlerinde GOGAT aktivitesi üzerine etkisi

GOGAT aktivitesi (EU/gr yaş ağırlık)				
Vanadyum	Altındane		Doğu-88	
	Kök	Gövde	Kök	Gövde
Kontrol	6.43±0.35 ^h	60.02±1.26 ^a	8.15±0.33 ^g	47.16±0.94 ^b
0.1 mM	8.15±1.04 ^g	47.16±0.96 ^b	9.86±0.46 ^f	41.44±0.93 ^c
1 mM	8.57±0.47 ^{fg}	27.29±0.21 ^e	6.53±0.32 ^h	36.15±0.78 ^d

Çizelgede aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan’ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre ($p>0.05$) önemsizdir. ± standart hatayı ifade eder.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu araştırmada, farklı derişimlerde vanadyum (NaVO_3) stresinin, ilk 24 saat içerisinde buğdayın iki varyetesinde azot metabolizmasında rol alan enzimler (NR, NiR, GS ve GOGAT) üzerindeki etkilerini belirlemek amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda genel streslere toleransları farklı iki buğday çeşidi (kısmen daha toleranslı Doğu-88, duyarlı olarak Altındane) kullanılmıştır. V stresi uygulamasından 24 saat sonra, fidelerde azot metabolizması enzimleri (NR, Nir, GS ve GOGAT) ve ilave olarak içsel V miktarı, klorofil, karotenoid, çözünebilir protein ile lipid peroksidasyonu (MDA olarak) seviyeleri belirlenmiştir. Çalışmamızda kök-gövde uzunluğu, kuru ağırlık gibi etkileri stres uygulamasından en az 3 gün sonra belirlenebilen çalışmalar yapılmamıştır. Çünkü stres uygulamasının ilk 24 saati içinde bu parametrelerde anlamlı değişiklikler belirlenmemektedir. Ancak azot metabolizması enzimleri streslere daha kısa süreler içinde cevap vermektedirler. Çalışılan parametreler, azot metabolizması ile birlikte bitkide azot metabolizmasıyla dolaylı olarak ilgili proseslerin değişimi hakkında bilgi vermesi açısından önemlidir. Çalışmadan elde edilen sonuçların, vanadyum (V) toksisitesinin ilk 24 saat içinde azot metabolizması üzerinde etkilerinin anlaşılmasına önemli katkı yapmakla birlikte, literatüre de önemli bir veri sağlayacağı düşünülmektedir.

Çalışmada, amonyum (NH_4) iyonu bitkilerin hidroponik yetiştirme ortamında kullanılan besi ortamından çıkarılmıştır (modifiye Arnon ve Hoagland). Bitki yetiştirme ortamında NH_4 'un bulunması, NR ve NiR enzimlerinin büyük oranda baypas edilerek daha çok diğer iki enzimin yani GS ve GOGAT'ın aktif olmasını sağlayacak ve bu yüzden vanadyumun NR ve NiR aktivitesi üzerindeki etkisi sağlıklı olarak belirlenemeyecektir. Bu nedenle, NH_4 iyonu, çalışmada kullanılan Arnon ve Hoagland Besin reçetesinden çıkarılarak hidroponik yetiştirme ortamındaki besin içinde azot kaynağı olarak sadece NO_3 'ün bulunması sağlanmıştır. Böylece bitki azot kaynağı olarak sadece NO_3 alacak ve sırasıyla bu bileşik, NR enzimiyle NO_2 'ye, NO_2 de NiR enzimiyle NH_4 'e, NH_4 te GS ve GOGAT enzimlerinin katalitik etkisiyle asimile edilerek amino asit yapısına katılacaktır (Şekil 1.1).

Toprakta ağır metallerin bir kısmı mikro element olarak bitkiler için gerekli olsalar da bitkilerin ihtiyaçtan fazla metal yoğunluğuna maruz kalması metabolik süreçlerde düzensizliğe sebep olabilmektedir (Fernandes and Henriques 1991; Claire *et al.* 1991). Vanadyum (V) hava, toprak ve suda bulunmasının yanında, bitki ve hayvanların yapılarında da yer alan bir elementtir. Doğal kaynağı dolayısıyla ortamda bulunmasa dahi V toprakta yıkama, yanma gibi madencilik işlemleri, fosil yakıtların yakılması, böcek ilaçları, sentetik gübre kullanımı, endüstrilerden kaynaklanan atık materyallerin toprağa karışması gibi durumlar sonucunda toprakta normalde bulunması gereken orandan çok daha yüksek seviyelere erişebilmektedir (Kar *et al.* 2004). Genellikle, bitkilerdeki vanadyumun konsantrasyonu, topraklardaki V içeriği ile pozitif olarak ilişkilidir. Bitkilerle ilgili yapılan bir araştırmada 36 bitki numunesinin yaprak dokularında V içeriğinin 2.6 µg ila 42.8 µg/gr doku arasında değiştiğini gösterilmiştir (Imtiaz *et al.* 2015). Bizim çalışmamızda, hidroponik sistemde 0.1 ve 1 mM V uygulamaları buğdayın her iki çeşidinin kök ve gövdesinde içsel V içeriğini artmıştır. V içeriği, konsantrasyon artışına paralel olarak daha yüksek olmuştur. Ayrıca her iki bitkinin köklerinde V birikiminin gövdelerine göre çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Buğdayın her iki çeşidi karşılaştırıldığında, Altındane çeşidinin kök ve gövdesindeki V birikiminin Doğu-88 çeşidine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Daha önce yapılan bir çalışmada da V birikiminin gövdeden ziyade köklerde daha fazla biriktiği tespit edilmiştir (Imtiaz *et al.* 2015; Akoumianaki-Ioannidou *et al.* 2016). Çalışmamızda da V'nin gövdeye nazaran köklerde daha yüksek olması, V'nin köklere alındıktan sonra kök hücrelerinde biriktirilerek toprak üstü organlara mobilizasyonunun düşük olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.1). Bu durum, büyük olasılıkla toprak üstü organların V stresinden daha az etkilenmesini sağlamak amacıyla yapılmış olabilir. Muhtemelen toprak üstü organlarda fotosentez olayı, V stresinden daha çok etkilenmektedir. Çünkü buğday gövdelerinde V miktarı köklere göre daha düşük olmasına rağmen, klorofil içeriği (Çizelge 4.4 ve 4.5), dolayısıyla fotosentez, çok yüksek oranda etkilenmiştir. Bu anlamda bulgularımız bitki stres çalışmalarından öte, V ile ilgili fitoremediasyon çalışmalarına katkı da sağlayabilir.

Çalışmamızda 0.1 ve 1 mM V uygulamalarının fotosentetik pigment içerikleri üzerindeki etkileri genel olarak değerlendirildiğinde, V uygulamaları klorofil içeriğini buğdayın hem Altındane hem de Doğu-88 çeşitlerinde önemli oranda düşürmüştür (Çizelge 4.4 ve 4.5). Klorofil içeriğindeki düşüşler V konsantrasyonu artışıyla daha da belirgin olmuştur. V stresinin Altındane çeşidinde klorofil içeriği üzerindeki negatif etkisi, Doğu-88 çeşidine göre daha yüksek olmuştur. Kla ve Klb çeşitleri arasında negatif etki bakımından değerlendirildiğinde, genelde Kla, V stresinden daha fazla etkilenmiştir. Diğer taraftan V uygulamaları her iki çeşitte karotenoid içeriğini artırmıştır. V stresine karşı karotenoid içeriğini artırmada Altındane çeşidinin daha başarılı olduğu söylenebilir (Çizelge 4.4 ve 4.5). Literatürde V stresinin etkisiyle klorofil içeriğinin düştüğünü gösteren bazı çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin Somasundaram vd. (1994) pirinçle yaptıkları çalışmada V uygulamasının klorofil içeriğini önemli ölçüde düşürdüğü belirlenmiştir. Vanadyumun klorofil üzerinde olumsuz etkisi onun diğer elementlerle antagonistik etkisine dayandırılmıştır. Örneğin, vanadyum ve temel besin elementleri (Mg, Ca ve P) arasında antagonistik etki sonucu soya veriminin azaldığı ileri sürülmüştür (Olness *et al.* 2001; Akoumianaki-Ioannidou *et al.* 2016). Diğer çalışmalarda vanadyumun Ca ve Mg elementlerin alınımını ve klorofil biyosentezinde kullanımını olumsuz etkileyerek klorofil içeriğini düşürdüğü değerlendirilmiştir (Kabata-Pendias and Pendias 1993; Marschner 1986; Akoumianaki-Ioannidou *et al.* 2016). Çalışmamızda V uygulamalarının her ikisi klorofil içeriğinin aksine karotenoid içeriğini stimüle edilmiştir (Çizelge 4.4 ve 4.5). Literatürde V'nin karotenoid içeriği üzerine etkisini gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak bazı ağır metallerin karotenoid içeriği artırdığını ileri süren (Okamoto *et al.* 2001) veya karotenoid içeriğini düşürdüğünü ileri süren (Malar *et al.* 2016) çalışmalar bulunmaktadır.

Lipid peroksidasyonu (LPO) doymamış (poliansature) yağ asitlerinin oksidatif yıkımı olarak bilinir. Hücre membranlarındaki yağ asitleri ve kolesterolün doymamış bağları, ROS'larla hızlıca reaksiyon vererek lipid peroksidasyon ürünlerinin oluşmasına neden olur. Bu olay sonucunda membran geçirgenliği ve özellikleri bozulur ve membranlarda elektrolit sızıntısı artar. Bu durum hücrelerde önemli hasarlara neden olur. Stres

koşullarında LPO seviyesi belirlenerek, hücresele düzeyde stresin sebep olduğu hasarın derecesi hakkında bilgi sağlanabilir. Ağır metal stresi de dahil stres koşullarında, doymamış yağ asitlerinin bozulmasıyla son ürün olarak çok sayıda aldehit bileşikleri oluşur. Bunlar içerisinde en yaygını malondialdehittir (MDA). Hücrelerde MDA içeriğindeki artış doğrudan LPO miktarını göstermekten ziyade, onun hücresele seviyesi hakkında bir bilgi vermektedir. Dolayısıyla MDA içeriğindeki artış, hücresele membranların yapısal bütünlüğünün bozulduğunun ve LPO seviyesinin önemli bir indikatörüdür (Noctor and Foyer 1998; Apel and Hirt 2004; Esim and Atıcı 2016). Çalışmamızda MDA bulguları genel olarak değerlendirildiğinde, V uygulaması buğdayın her iki çeşidinde LPO seviyesini (MDA içeriği olarak) önemli seviyelerde artırmıştır (Çizelge 4.3). MDA içeriğindeki artışlar özellikle her iki çeşidin köklerinde daha dramatik seviyelerde olmuştur. Gövdelerinde de artışlar belirlense de bu artışlar köklere göre daha düşük olmuştur (Çizelge 4.3). Çeşitler kendi aralarında değerlendirildiğinde, V stresi özellikle Altındane çeşidinde LPO seviyesini daha fazla yükseltmiştir. Bu Doğu-88'in genel streslere daha dayanıklı olmasından kaynaklanabilir. Yapılan bazı çalışmalarda da ekzojen V uygulamasının hem kök hem de yapraklarda MDA içeriğini artırdığı belirlenmiştir. Örneğin, kavun ve nohut ile yapılan çalışmalarda uygulanan V, MDA içeriğini günlere bağılı olarak artırmıştır (İmtiyaz *et al.* 2015; Nawaz *et al.* 2018). Bizim sonuçlarımız bu çalışmalarla uygunluk içindedir. Köklerde MDA içeriğinin daha fazla artması sürpriz değildir. Çünkü Çizelge 4.1'e dikkat edilirse her iki buğday çeşidinin köklerinde V birikiminin gövdelere göre daha yüksek olduğu görülebilir. Bu da V birikimiyle MDA artışı arasında bir uygunluk olduğuna işaret eder.

Stres koşullarında çözünebilir protein içeriğinin belirlenmesi, stres cevabı hakkında bilgi veren önemli bir parametredir. Çalışmamızda protein bulguları genel olarak değerlendirildiğinde, 0.1 mM V uygulamasının her iki buğday çeşidinde protein miktarını önemli oranda düşürürken, ilginç olarak 1 mM V uygulamasının hafif derecede ($P>0.05$) artırdığı veya etkili olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Buğday çeşitleri birbiriyle karşılaştırıldığında, V uygulamasının protein içeriği üzerinde çeşitler arasında anlamlı bir farka neden olmamıştır. Vanadyumun bitkilerde büyüme ve

gelişme için eser element olarak kabul edilse de bazı çalışmalarda vanadyumun bitki büyümesi için gerekli olmadığı iddia edilmektedir (Wang and Liu 1999; Krapiel *et al.* 2009, Boulassel *et al.* 2011). Bitkilerde vanadyum absorpsiyonunun, protein içeriği ve enzim aktivitesi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada nohut (*Cicer arietinum* L.) bitkisinden faydalanılmıştır. *C. arietinum* üzerinde yapılan çalışmada, V uygulamasının enzim aktivitesini artırdığı tespit edilmiştir. Uygulamanın protein içeriği üzerinde negatif nitelikte etkisi olduğu anlaşılmıştır. Vanadyum birikiminin ise gövdeden ziyade köklerde daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Uygulanan V dolayısıyla bitki biyokütlesi, kök ve sürgün uzunluklarında önemli ölçüde azalma tespit edilmiştir (Somasundaram *et al.* 1994; Imtiaz *et al.* 2015; Nawaz *et al.* 2018). Özellikle 0.1 V uygulamasıyla protein içeriğinin düşmesi azot metabolizmasının bozulmasıyla açıklanabilir. Çünkü azotun etkili bir şekilde asimile edilememesi yeni sentezlenen proteinlerin miktarını olumsuz etkileyecektir. 1 mM V uygulamasında protein içeriğinin anlamlı düşmemesi ise yüksek V stresinin dokularda su içeriğini azaltmasına bağlanabilir. Bu konuda yüksek V dozlarının çalışıldığı ve daha ayrıntılı değerlendirildiği çalışmalara ihtiyaç vardır.

NR, nitrat indirgeme işleminde ilk enzimdir ve nitratin nitrite indirgenmesini katalize ederek azot asimilasyonunda önemli bir rol oynar. Nitrat, bitkiler için yaygın olarak kullanılan azot kaynağıdır. Nitrat bitkiler tarafından absorbe edildikten sonra köklerde indirgenebilir, vakollerde depolanabilir veya işlenmeden önce sürgünlere taşınabilir (Şekil 1.1). Bitkilerde kökler vasıtasıyla alınan nitrat doğrudan organik madde yapısına asimilasyonu yapılamaz. O kök veya mezofil hücreleri sitozolünde NR ile nitrite (NO_2^-), daha sonra plastidlerde (kökler için amiloplast, yapraklar için kloroplast) NiR ile NH_4^+ 'e indirgenir (Şekil 1.1). Nitrattan başlayan azot asimilasyonu kısmen ve hatta bazı türlerde çoğunlukla köklerde de gerçekleşir. Bu olaylar bitki büyüme ve gelişim aşamalarından, kök ve toprak üstü bölüm gibi bitki kısımlarından ve çevre koşullarından oldukça etkilenir (Heldt and Piechulla 2011; Sangwan *et al.* 2014). Mevcut araştırmadan elde edilen NR aktivitesi verileri genel olarak değerlendirildiğinde, V uygulaması buğdayın her iki çeşidinde NR aktivitesini önemli ($P < 0.05$) seviyelerde inhibe etmiştir. NR aktivitesi inhibisyonu özellikle her iki çeşidin köklerinde daha dramatik seviyelerde olmuştur. Çeşitler kendi aralarında değerlendirildiğinde V

uygulamasıyla aralarında çok belirgin bir fark belirlenememiştir, ancak V stresinin Altındane çeşidinin kök ve gövdelerinde NR aktivitesi üzerinde kısmen daha negatif etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bu bulgularımızın çoğunu destekleyecek bazı çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin çinko (Zn) ile yapılan bir çalışmada, toksik seviyelerde çinkonun NR aktivitesini inhibe ettiği belirlenmiştir (Luna *et al.* 2000). Pirinç fideleri üzerinde yapılan bir çalışmada ise NR aktivitesi ciddi şekilde inhibe olmuştur, ancak yapraklardaki nitrat konsantrasyonu, V stresi altındaki yapraklarda artmamıştır. Bu yüzden V kaynaklı NR aktivitesi inhibisyonu, sadece substrattan ziyade fotosentetik işlemlerden daha düşük oranda NAD(P)H sağlanmasından kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Somasundaram *et al.* 1994). Clusterbean (küme fasulyesi) bitkisinde krom (Cr) stresinin azot metabolizması üzerine etkisinin değerlendirildiği çalışmada da Cr toksisitesinin NR aktivitesini önemli oranda inhibe ettiği belirlenmiştir (Sangwanet *al.* 2014). Bu verileri destekleyecek nitelikte diğer ağır metallerin NR aktivitesini inhibe ettiğini gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır (Singh *et al.* 1994; Gouiaet *al.* 2000; Wang *et al.* 2008; Mishra and Dubey 2011). Bütün bu sonuçlar V dahil ağır metal veya geçiş metallerinin büyük çoğunluğunun NR aktivitesini inhibe ettiğini göstermektedir. Bizim çalışmamız V stresiyle NR aktivitesi inhibisyonunun buğdayın her iki çeşidinin köklerinde daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu durum V'nin büyük oranda köklerde biriktirilmesinden (Çizelge 4.1) kaynaklanmış olabilir.

Azot metabolizmasında NR enzimi kadar önemli olan diğer enzim nitrit redüktazdır (NiR). NiR aktivitesi azot asimilasyonunda ve stres cevabında en az NR kadar önemlidir. Çünkü NR aktivitesinin ürünü olan NO₂, hücrede hızlı bir şekilde metabolize edilemezse, hücre yaşamı için NO₃'ten oldukça yüksek oranda toksik olan NO₂, hücre savunma sistemini (antioksidan) yıkar ve reaktif toksisitesiyle metabolizmayı bozarak hücrede geri dönüşümü olmayan sorunlara neden olur. Bu yüzden normal koşullardaki bitki hücrelerinde bile NiR aktivitesi NR'ninkinden çok daha yüksektir (Heldt and Piechulla 2011). Çalışmamızda NiR aktivitesi verileri genel olarak değerlendirildiğinde, öncelikle kök ve gövdeler kendi aralarında kıyaslandığında, NiR aktivitesinin gövdede köke oranla daha yüksek olduğu görünmektedir (Çizelge 4.7). Diğer taraftan V

uygulamalarının her ikisi buğdayın iki çeşidinin kök ve gövdelerinde NiR aktivitesini önemli ($P<0.05$) seviyelerde inhibe etmiştir. Buna ilave olarak V stresi NiR aktivitesini köklerde gövdeye göre daha yüksek oranlarda inhibe etmiştir (Çizelge 4.7). Ancak NiR aktivitesinin inhibisyonunda 1 mM V uygulaması 0.1mM'a göre daha etkili olmuştur. Çeşitler kendi aralarında değerlendirildiğinde V uygulaması NiR aktivitesinin inhibisyonunda Altındane çeşidinde daha etkili olurken, Doğu-88 çeşidi V stresine Altındane'ye göre nispeten daha dayanıklı bir durum sergilemiştir. Bu bulgular NR aktivitesinde olduğu gibi NiR aktivitesinin de V stresinden olumsuz etkilendiğini göstermektedir. Çalışmamızda V'nin köklerde daha çok biriktirildiğinin belirlenmesine göre (Çizelge 4.1), NiR aktivitesi köklerde V etkisiyle daha yüksek oranda inhibe olduğu görülmektedir. Yukarıda ifade edildiği gibi NiR aktivitesinin düşmesi hücrelerde ölümcül hasarlara neden olmaktadır. NiR aktivitesinin toksik metal iyonlarıyla inhibe olduğunu gösteren bazı çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin *Arachis hypogaea*'da 0.1 mM Cd stresi günlere bağlı olarak NiR aktivitesini %50'den fazla inhibe etmiştir (Dinakar *et al.* 2009). Ayrıca, 100 mM nikele (Ni) 7 gün maruz kalan buğdayda NiR aktivitesi çarpıcı bir düşüşle kontrol grubundan neredeyse %80 daha düşük bir seviyeye ulaşmıştır (Gajewska and Skłodowska 2009). Literatürde V stresinin bitkilerde NiR aktivitesini değerlendiren herhangi bir çalışma bulunamadığından, bu çalışmadaki veriler literatür için önem taşımaktadır.

Azot asimilasyonunda inorganik azotu organik forma dönüştüren anahtar bir enzim glutamin sentazdır (GS). Bu enzim büyük bir, çoklu alt üniteli bir protein kompleksidir ve yaygın olarak plastidlerin tilakoid membranlarda bulunur. Aktivite için, Mg veya Mn gibi iki değerli katyonlar gerektirir. GS, NH_4 için yüksek bir afiniteye sahiptir ve bu nedenle, fitotoksik seviyelerde amonyum birikimini önlemek için amonyumu düşük konsantrasyonlarda bile asimile edebilir. GS, ATP'ye bağlı olarak NH_4 'ün glutamat ile birleşmesini katalize eder ve sonuçta glutamin oluşur. Bu daha sonra doğrudan ya da bitkideki tüm azotlu bileşiklerin biyosentezi için glutamat yoluyla organik azot formları sağlar (Gajewska and Skłodowska 2009; Heldt and Piechulla 2011; Sangwan *et al.* 2014). Azot asimilasyonunda inorganik azotu organik forma dönüştüren enzim olduğundan stres cevaplarında davranışı oldukça önemlidir. Bizim çalışmamızda, GS

aktivitesi verileri genel olarak değerlendirildiğinde, V uygulamaları (0.1 ve 1 mM) buğdayın her iki çeşidinde GS aktivitesini önemli ($P < 0.05$) seviyelerde inhibe etmiştir (Çizelge 4.8). GS aktivitesi inhibisyonu özellikle her iki çeşidin köklerinde daha belirgin seviyelerde olmuştur. Çeşitler kendi aralarında değerlendirildiğinde V uygulamasıyla aralarında anlamlı bir fark belirlenmemiştir, ancak V stresinin Altındane çeşidinin kök ve gövdelerinde GS aktivitesi üzerinde kısmen daha negatif etkiye sahip olduğu söylenebilir. Literatürde V ile doğrudan ilişkili olmasa da toksik ve bitki esansiyel ağır metal elementlerinin toksik düzeyleri GS aktivitesini negatif etkilediğine dair önemli çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin farklı konsantrasyonlarda Ni dozlarına maruz kalan buğday fidelerinde 4. ve 7. gün GS aktivitesinin önemli seviyede inhibe olduğu gözlenmiştir (Gajewska and Skłodowska 2009). Cd stres cevabının araştırıldığı acı baklada (*Lupinus albus*), 150 μM Cd uygulamasının GS aktivitesini yüksek oranda (yaklaşık %50) inhibe ettiği belirlenmiştir (Sánchez-Pardo *et al.* 2013). Benzer şekilde mısırdaki (*Zea mays*) da ağır metal stresinin GS aktivitesini dramatik bir şekilde inhibe ettiği ileri sürülmüştür (Boussama *et al.* 1999). Çalışmamızda, V bir geçiş metali olmasına rağmen, özellikle 1 mM gibi düşük bir konsantrasyonda GS aktivitesini önemli seviyede inhibe ettiğini göstermektedir. Bu bilgi literatür için yeni olmakla birlikte daha farklı çalışmalarla güçlendirilmelidir.

Azot asimilasyonunda son aşama GOGAT tarafından gerçekleştirilir. Bu enzim, iki glutamat molekülü verecek şekilde glutaminin amid azotunun 2-oksooglutarata (α -ketoglutarat) indirgenmesini transferine aracılık eder. Sonuçta 2 adet glutamat oluşur. Bu yolla oluşan amino asitler sırayla diğer amino asitlere, proteinlere ve nükleik asitler gibi diğer azotlu bileşiklere asimile edilir. GOGAT, GS ile koordineli çalışan bir enzimdir. Bu enzimlerin ortak çalışmalarından dolayı reaksiyonlarına GS-GOGAT döngüsü denir. GOGAT amino asit havuzuna kaynak aktardığından ve GS ile koordineli çalıştığından özellikle stres koşullarında azot metabolizması hakkında bilgi veren önemli bir enzimdir. Bu nedenle birçok araştırmacının dikkatini çekmiştir (Esposito *et al.* 2004). Çalışmamızda GOGAT aktivitesi verileri genel olarak değerlendirildiğinde, buğday fidelerinde gövdedeki GOGAT aktivitesi köke göre daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.9). Bu muhtemelen bitkinin yeşil aksamında daha çok GOGAT'ın

ferredoksine bağımlı olan izoenzimlerinden kaynaklanabilir. Vanadyumun 0.1 ve 1 mM uygulamaları buğdayın her iki çeşidinde GOGAT aktivitesini genelde köklerde artırmış, ancak aynı bitkilerin gövdelerinde düşürmüştür. Çeşitler kendi aralarında değerlendirildiğinde, GOGAT aktivitesindeki düşüşler ve artışlar Altındane’de daha yüksek olduğu belirlenmiştir. V uygulamasından sonra, buğday fidelerinin köklerinde V oranının yüksek olması, muhtemelen GOGAT’ı aktive etmiş olmalıdır. Gövdede ise kısmen inhibe etmesi diğer enzimlere göre (GR, GiR, GS) ilginç bir veri olmuştur. Bu düşüşler özellikle 1 mM V uygulamasında daha belirgin, ancak 0.1 mM V uygulamasında ise anlamlı bir düşüş belirlenmiştir. Bitkinin düşük konsantrasyonda V stresine cevapta GOGAT’ın aktivitesini artırarak cevap verebildiği değerlendirilebilir. Literatürde V stresi koşullarında GOGAT cevabını değerlendiren bir çalışma olmamasına rağmen, diğer ağır metallerle GOGAT aktivitesinin ilişkisi belirlenmiştir. Örneğin, Cd stres cevabının araştırıldığı acı baklada (*Lupinus albus*), 150 µM Cd uygulamasının GOGAT aktivitesini etkilemediği belirlenmiştir (Sánchez-Pardo *et al.* 2013). Ancak Cd ile muamele edilmiş bitkilerde en çarpıcı değişikliğin, GS/Fd – GOGAT ve NADH'ye bağlı glutamatsentaz (NADH-GOGAT) aktivitelerinde bozulma ve amonyak birikiminde artış olduğu ileri sürülmüştür (Khan *et al.* 2016). Mısırdaki (*Zea mays*) da ağır metal stresinin GOGAT aktivitesini dramatik bir şekilde inhibe ettiği ileri sürülmüştür (Boussama *et al.* 1999). Benzer olarak kromla muamele, çeşitli bitki organlarında GOGAT aktivitesini farklı büyüme aşamalarında olumsuz etkilemiştir (Sangwan *et al.* 2014). Bu değerlendirmelere göre V stresi ve GOGAT aktivitesi etkileşimi daha detaylı araştırılmalıdır.

Sonuçlar

Bu çalışmada vanadyum stresinin ilk 24 saat içinde buğdayda azot metabolizması üzerine etkisi çalışılmıştır. Çalışmadan elde edilen önemli bulgular aşağıda özetlenmiştir.

1. Hidroponik sistemde V uygulaması buğday çeşitlerinin kök ve gövdelerinde içsel V içeriğini artırmıştır. V birikimi köklerde, gövdeye göre, çok daha yüksektir. Buğdayın

Altındane çeşidinin kök ve gövdesinde V birikimi Doğu-88 çeşidine göre daha yüksektir.

2. Özellikle 0.1 mM V uygulaması buğday çeşitlerinde protein miktarını genelde düşürmüştür. V uygulaması protein içeriği üzerinde çeşitler arasında anlamlı bir farka neden olmamıştır.

3. V uygulaması buğdayın her iki çeşidinde LPO seviyesini (MDA içeriği olarak) artırmıştır. MDA içeriğindeki artışlar özellikle her iki çeşidin köklerinde daha yüksektir. MDA içeriği açısından çeşitler arasında belirgin bir fark yoktur.

4. Fotosentetik pigment içerikleri, V uygulamaları tarafından buğdayın Altındane ve Doğu-88 çeşitlerinde önemli oranda düşmüştür. V stresinin Altındane çeşidinde klorofil içeriği üzerindeki negatif etkisi, Doğu-88 çeşidine göre daha yüksek olmuştur. V uygulamaları her iki çeşitte karotenoid içeriğini artırmıştır. V stresi karotenoid içeriğini Doğu-88'de daha fazla artırmıştır.

5. V uygulaması buğdayın her iki çeşidinde NR aktivitesini inhibe etmiştir. NR aktivitesi inhibisyonu özellikle köklerde daha yüksektir.

6. V uygulamaları, buğdayın iki çeşidinin kök ve gövdelerinde NiR aktivitesini inhibe etmiştir. NiR aktivitesinin inhibisyonunda 1 mM V, 0.1 mM'a göre daha etkili olmuştur. NiR aktivitesinin inhibisyonu Altındane çeşidinde daha yüksek, Doğu-88 nispeten daha düşük olmuştur.

7. V uygulaması GS aktivitesini önemli seviyelerde inhibe etmiştir. GS aktivitesi inhibisyonu özellikle her iki çeşidin köklerinde daha belirgin seviyelerde olmuştur. V stresi Altındane çeşidinin kök ve gövdelerinde GS aktivitesi üzerinde kısmen daha negatif etki yapmıştır.

8. Çalışmada 0.1 ve 1 mM V uygulaması buğdayın her iki çeşidinde GOGAT aktivitesini genelde gövdelerde düşürmüş, ancak köklerde kısmen artırmıştır. GOGAT aktivitesindeki düşüşler ve artışlar Altındane'de daha yüksektir.

Çalışma sunduğu verilerle literatürde önemli bir boşluğu doldurmuştur. Sonraki çalışmalarda ise bu çalışmadan elde edilen bulguların öncülüğünde, vanadyum stresinin azot metabolizmasında rol alan enzimlerin gen düzeyinde cevaplarının belirlenmesi önemli veriler sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Aihemaiti, A., Jiang, J., Gao, Y., Meng, Y., Zou, Q., Yang, M., Xu, Y., Han, S., Yan, W., Tuerhong, T., 2019. The effect of vanadium on essential element uptake of *Setaria viridis* seedlings. *J. Environ. Manag.*, 237, 399–407.
- Akoumianaki-Ioannidou A, Barouchas PE, Ilia E, Kyramariou A, Moustakas N.K., 2016. Effect of vanadium on dry matter and nutrient concentration in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Austral J. Crop Sci.*, 10: 199–206.
- Banuelos, G. S., Ajwa H.A., Mackey B., Wu L., Cook C., Akohoue S., Zambrzuski S., 1997. Selenium-induced growth reduction in brassica land races considered for phytoremediation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 36, 282-287 pp.
- Barker, A.V., Pilbeam, D.J., 2007. *Handbook of Plant Nutrition*. CRC Press. Taylor and Francis Group, Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton, FL 33487-2742.
- Barouchas, P. E., Akoumianaki-Ioannidou, A., Liopa-Tsakalidi, A., Moustakas, N.K., 2018. Effects of vanadium and nickel on morphological characteristics and on vanadium and nickel uptake by shoots of mojito (*Mentha villosa*) and lavender (*Lavandula angustifolia*). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(2), 487-492.
- Barro, F., Fontes, A.G., Maldonado, J.M., 1991. Organic nitrogen content and nitrate and nitrite reductase activities in tritordeum and wheat grown under nitrate or ammonium. *Plant and Soil*, 135, 251-256.
- Basiouny, F. M., 1984. Distribution of vanadium and its influence on chlorophyll formation and iron metabolism in tomato plants. *Journal of Plant Nutrition*, 7(7), 1059–1073.
- Benemann, J.R., McKenna, C.E., Lie, R.F., Traylor, T.G., Kamen, M.D., 1972. *Biochim. Biophys. Acta.*, 264, 25-38.
- Bigersson B, Sterner O, Zimerson E, Chemie und G., 1998. Eine verst 2nd liche Einführung in die Toxikologie VCHV erlagsgesellschaft, ISBN 3–527–26455–8
- Blaylock, M.J., Huang J.W., 2000. Phytoextraction of Metals, In: I.Raskin and B.D. Ensley (Eds.) *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up The Environment*, John Wiley and Sons, Inc, Toronto, Canada, pp 303.
- Boulassel, B., Sadeg, N., Roussel, O., Perrin, M., Belhadj-Tahar, H., 2011. Fatal poisoning by vanadium. *Forensic Science International*, 206(1-3), 79–81.
- Butler, A., Carter-Franklin, J.N., 2004. The role of vanadium bromoperoxidase in the biosynthesis of halogenated marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 21, 180-8.
- Claire, L.C., Adriano D.C., Sajwan K.S., Abel S.L., Thoma, D.P., Driver J.T., 1991. Effects of selected trace metals on germinating seeds of six plant species. *Water, Air, and Soil Pollution*, 59, 231-240.
- Çevik, S., 2014. Vanadyum. *AKU J. Sci. Eng.*, 14, 9-18.
- Dahmani-Muller, H., Oort F., Gelie B., Blabene M., 2000. Strategies of heavy metal uptake by three plants species growing near a metal smelter, *Environ. Pollut.*, 109, 231-238.
- Davis, R.D., Beckett, P.H.T., Wollan, E., 1978. Critical levels of twenty potentially toxic elements in young spring barley. *Plant Soil*, 49, 395–408

- Dubey, S., Shri, M., Gupta, A., Rani, V., Chakrabarty, D., 2018. Toxicity and detoxification of heavy metals during plant growth and metabolism. *Environmental Chemistry Letters*, 16, 1169–1192.
- Duffus, J., Worth, H., 1996. *Fundamental toxicology for chemists*, Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry Information Services.
- Essia, D., Abou-Shady, A., Ismaeil, S., Bahnasawy, N., 2017. Distribution and mobility of vanadium in cultivated calcareous soils and some food chain crops. *Egypt. J. Soil. Sci.*, 57(4), 385–392.
- Fernandes, J.C., Henriques F.S., 1991. Biochemical, physiological and structural effects of excess copper in plants. *The Botanical Review*, 57, 246–273.
- Furukawa, J., Nakanishi, T.M. Matsubayashi, H., 1999. Neutron radiography of a root growing in soil with vanadium. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research. Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 424, 116–121.
- García-Jiménez, A., Trejo-Teñilez, L.I., Guille'n Sa'nchez, D., Go'mez-Merino, F.C., 2018. Vanadium stimulates pepper plant growth and flowering, increases concentrations of amino acids, sugars and chlorophylls, and modifies nutrient concentrations. *PLOS ONE*, 13(8), 1–13.
- Gil, J., Alvarez, C.E., Martinez, M.C., Pérez, N., 1995. Effect of vanadium on lettuce growth, cationic nutrition, and yield. *J. Environ. Sci. Health.*, 30(1), 73–87.
- Gokul, A., Cyster, L. F., Keyster, M., 2018. Efficient superoxide scavenging and metal immobilization in roots determines the level of tolerance to vanadium stress in two contrasting *Brassica napus* genotypes. *South African Journal of Botany*, 119, 17–27.
- Haidu, D., Párkányi, D., Moldovan, R.I., Savii, C., Pinzaru, I., Dehelean, C., Kurunczi, L., 2017. Elemental characterization of Romanian crop medicinal plants by neutron activation analysis. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2017, 1–12.
- Hara, T., Sonoda, Y., Iwai, I., 1976. Growth response of cabbage plants to transition elements under water culture conditions. *Soil Science and Plant Nutrition*, 22(3), 317–325.
- Health and Safety Executive, 2002. *Health and Safety Regulation: A short guide HSE*, London.
- Heldt, H.-W., Piechulla, B., 2011. *Plant Biochemistry*, Translation of the 4th German edition, Academic Press is an imprint of Elsevier, 32 Jamestown Road, London NW1 7BY, UK.
- Hou, M., Hu, C., Xiong, L., Lu, C., 2013. Tissue accumulation and subcellular distribution of vanadium in *Brassica juncea* and *Brassica chinensis*. *Microchem J.*, 110, 575–578.
- Hou, M., Lu, C., Wei, K., 2014. Accumulation and speciation of vanadium in lycium seedling. *Biological Trace Element Research*, 159(1–3), 373–378.
- Imtiaz, M., Tu, S., Xie, Z., Han, D., Ashraf, M., Rizwan, M.S., 2015. Growth, V uptake, and antioxidant enzymes responses of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes under vanadium stress. *Plant Soil*, 390, 17–27.
- Jaworski, E.G., 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical and Biophysical Research communications*. 43, 1274 - 1279.

- Jie, N., Zhang, Q., Yao, G., 2001. Study on the adsorption of vanadium (V) with *Scenedesmus obliquus*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 67, 0431-0437.
- Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., 2004. İTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü. Metallerin Çevresel Etkileri 1-II ve III.
- Kaplan, D.I., Sajwan, K.S., Adriano, D.C., Gettier, S., 1990. Phytoavailability and toxicity of beryllium and vanadium. Water Air Soil Pollut., 53, 203–212.
- Kar, B.B., Datta, P., Misra, V.N., 2004. Spent Catalyst: secondary source for molybdenum recovery. Hydrometallurgy, 72(1-2), 87–92.
- Kasai, M., Junichi, Y., Miho K., Miyuki I., Shinichi S., 1999. Concentration of vanadium in soil water and its effect on growth and metabolism of rye and wheat plants. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 30, 971-982,
- Khan, M.G., 1996. Nitrate and nitrite reductase activities in soybean plants raised with saline water. Ind. J. Plant Physiol., 128-129.
- Kraepiel, A.M.L., Bellenger, J.P., Wichard, T., Morel, F.M.M., 2009. Multiple roles of siderophores in free-living nitrogen-fixing bacteria. BioMetals, 22(4), 573–581.
- Kubes, J., Skalicky, M., Tumova, L., Martin, J., Hejnak, V., Martinkova J., 2019. Vanadium elicitation of *Trifolium pratense* L. cell culture and possible pathways of produced isoflavones transport across the plasma membrane. Plant Cell Rep., 38, 657-671.
- Larsson, M.A., Baken, S., Gustafsson, J.P., Hadialhejazi, G., Smolders, E., 2013. Vanadium bioavailability and toxicity to soil microorganisms and plants. Environmental toxicology and chemistry, 32(10), 2266-2273.
- Leonard, A., Gerber, G.B., 1994. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds. Mut. Res., 317, 81–88.
- Lepp, N.W., Morrell, B.G., Phipps D.A., 1983. Vanadium absorption by plants: the uptake of vanadium by excised barley roots (*Hordeum vulgare* cv. Maris Mink). Inorganica Chimica Acta, 79, 228-229.
- Levitt, J., 1980. Responses of Plant to Environmental Stress: Water, Radiation, Salt and Other Stresses. Academic Press, New York, 365.
- Lin, C.Y., Trinh. N.N., Lin, C.W., Huang H.J., 2013. Transcriptome analysis of phytohormone, transporters and signaling pathways in response to vanadium stress in rice roots. Plant Physiol. Biochem., 66, 98–104.
- Macara, I.G., 1980. Vanadium—an element in search of a role. Trends Biochem. Sci., 5, 92–94.
- Martín, S., Saco, D., 1995. Effect of vanadate on *Phaseolus vulgaris* L.: Vegetative development and nitrogen metabolism. Journal of Plant Nutrition, 18(6), 1139–1148.
- Moller, I.M., 2001, Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 52, 561–591.
- Morkunas, I., Wozniak, A., Mai, V.C., Rucinska-Sobkowiak, R., Jeandet, P., 2018. The role of heavy metals in plant response to biotic stress. Molecules, 23, 2320-2350.
- Morrell, B.G., Lepp, N.W., Phipps, D.A., 1986. Vanadium uptake by higher plants: some recent developments. Environ. Geochem. Health, 8, 14–18.
- Moskalyka, R.R., Alfanzib, A.M., 2003. Processing of vanadium: a review, Miner. Eng., 16, 793–805.

- Nowakowski, W., 1993. Vanadium Bioaccumulation in *Pisum sativum* seedlings. Biol. Plant., 35, 461-465.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry, 95, 351-8.
- Olness, A., Gesch, R., Forcella, F., Archer, D., Rinke, J., 2005. Importance of vanadium and nutrient ionic ratios on the development of hydroponically grown cuphea. Ind. Crop Prod., 21, 165–171.
- Olness, A., Nelsen, T., Rinke, J., Voorhees, W.B., 2000. Ionic ratios and crop performance: I. Vanadate and phosphate on soybean. J. Agron. Crop. Sci., 185, 145–151.
- Owolabi, I. A., Mandiwana, K.L., Panichev, N., 2016. Speciation of chromium and vanadium in medicinal plants. South African Journal of Chemistry, 69, 67-71.
- Raskin, I., Ensley, B.D., 2000. Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up to environment, John Wiley and Sons, N. York, 303 pp.
- Reigosa, M.J., Pedrol, N., Luís González, L., 2006. Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications. Springer. Printed in the Netherlands, 171-209.
- Ringelband, U., 2001. Salinity dependence of vanadium toxicity against the brackish water hydroid *Cordylophora caspia*. Ecotoxicol. Environ. Saf., 4, 18–26.
- Rosso, P.H., Pushnik, J.C., Lay, M., Ustin, S.L., 2005. Reflectance properties and physiological responses of *Salicornia virginica* to heavy metal and petroleum contamination. Environ. Pollut., 137, 241–252.
- Sabbioni, E., Bonardi, M., Tanet, G., Da-Kang, L., Gallorini, M., Weckermann, B., Castiglioni, M., 1989. Metallobiochemistry of current environmental levels of trace metals: A new method of cyclotron production of 48 V for toxicological studies. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry Articles, 134(1), 199–208.
- Saco, D., Martín, S., San José, P., 2012. Vanadium distribution in roots and leaves of *Phaseolus vulgaris*: morphological and ultrastructural effects. Biologia Plantarum, 57(1), 128–132.
- Saco, D., Martin, S., San Jose, P., 2013. Vanadium distribution in roots and leaves of *Phaseolus vulgaris*: morphological and ultra-structural effects. Biol. Plant., 57, 128- 132.
- Salisbury, F.B., Ross, C.W., 1992. Plant Physiology, Hormones and Plant Regulators: Auxins and Gibberellins. 4th Edition, Wadsworth Publishing, Belmont, 357-381.
- Sentías-Herrera, H.E., Trejo-Téllez, L.I., Volke-Haller, V.H., Cadena-Iniguez, J., Sánchez-García, P., Gómez-Merino, F.C., 2017. Iodine, silicon, and vanadium differentially affect growth, flowering, and quality components of stalks in sugarcane. Sugar Tech, 20(5), 518–533.
- Shah, S.H., 2008. Effects of nitrogen fertilization on nitrate reductase activity, protein and oil yields of *Nigella sativa* L. as affected by foliar GA3 application. Turk. J. Bot., 32, 165–170.
- Singh, B.B., 1971. Effects of vanadium on the growth, yield and chemical composition of maize. Plant Soil, 34, 209-213.
- Singh, R.P., Srivastava, H.S., 1986. Increase in glutamate synthase (NADH) activity in maize seedlings in response to nitrate and ammonium nitrogen. Physiologia Plantarum, 66, 413-416.

- Skalicky, M., Kubes, J., Hejnak, V., Tumova, L., Martinkova, J., Martin, J., Hnilickova, H., 2018. Isoflavones production and possible mechanism of their exudation in *Genista tinctoria* L. *Molecules*, 23(7), 1-18.
- Smith, P.G., Boutin, C., Knopper, L., 2013. Vanadium pentoxide phytotoxicity: Effects of species selection and nutrient concentration. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 64,87–96.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 76-85.
- Tatar, E., Mihucz, V.G., Varga, A., Zaray, G., Cseh, E., 1999. Effect of lead, nickel and vanadium contamination on organic acid transport in xylem sap of cucumber. *J. Inorg. Biochem.*, 75, 219–223.
- Teng, Y.G., Ni, S.J., Zhang, C.J., Wang, J.S., Lin, X.Y., Huang, Y., 2006. Environmental geochemistry and ecological risk of vanadium pollution in Panzhihua mining and smelting. *Chinese Journal of Geochemistry*, 4, 379–385.
- Teresa, S., Soledad, M., Dolores, S., 2014. Some responses of two *Nicotiana tabacum* L. cultivars exposed to vanadium. *Journal of Plant Nutrition*, 37(5), 777-784.
- Tian, L., Yang, J., Alewell, C., Huang, J.-H., 2014. Speciation of vanadium in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) and soils in response to different levels of vanadium in soils and cabbage growth. *Chemosphere*, 111, 89–95.
- TÜİK, 2018. http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001
- USDA, 2018. <https://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/>
- Vachirapatama, N., Jirakiattikul, Y., Dicoski, G., Townsend, A.T., Haddad, P.R., 2011. Effect of vanadium on plant growth and its accumulation in plant tissues. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 33, 255-261.
- Venkataraman, B.V., Sudha, S., 2005. Vanadium toxicity. *Asian J. Exp. Sci.*, 19, 127–134.
- Wallace, A., Alexander G.V., Chaudry, F.M., 1977. Phytotoxicity of cobalt, vanadium, titanium, silver, and chromium. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.*, 8, 751-756.
- Wang, J.F., Liu, Z., 1999. Effect of vanadium on the growth of soybean seedlings. *Plant Soil*, 216, 47–51.
- Wang, J.F., Liu, Z., 1999. Effect of vanadium on the growth of soybean seedlings. *Plant and Soil*, 216, 47-51.
- Wang, L.I., Zhou, Q., Ding, L., Sun, Y., 2008. Effect of cadmium toxicity on nitrogen metabolism in leaves of *Solanum nigrum* L. as a newly found cadmium hyperaccumulator. *Journal of Hazardous Materials*, 154, 818-825.
- Witham, F.H., Blayles, D.F., Devlin, R.M. 1971. *Experiments in Plant Physiology*. Van Nostrand Reinhold Company. New York. Pp, 55-56.
- Yang, J., Teng, Y., Wang, J., Li, J., 2010. Vanadium uptake by alfalfa grown in V–Cd-contaminated soil by pot experiment. *Biological Trace Element Research*, 142(3), 787–795.
- Yang, J., Wang, M., Jia, Y., Gou, M., Zeyer, J., 2017. Toxicity of vanadium in soil on soybean at different growth stages. *Environ. Pollut.*, 231, 48–58.
- Yang, J.-Y., Tang, Y., 2015. Accumulation and biotransformation of vanadium in *Opuntia microdasys*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 94(4), 448–452.

- Yıldız, N., 2003. Toprak kirletici ağır metaller ve toprak bitki ilişkileri. I. Ulusal Çevre Sempozyumu. Atatürk Üniversitesi Çevre Sorunları Araştırma Merkezi Müdürlüğü Erzurum.
- Zheng-xun, J.Q., Jing, Y., Hai-ying, L. and Zhongze, P., 2007. Changes in activities of glutamine synthase during grain filling and their relation to rice quality. Rice Science, 14, 211–214.



ÖZGEÇMİŞ

1966 yılında İran’da doğdu. Lise ve Üniversite öğrenimi Tahran’da tamamladı. 2014 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine devam etmektedir.

