



**T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOBALT STRESİ ALTINDAKİ BUĞDAY
(*TRITICUM AESTIVUM* L.) FİDELERİNDE
BİOCHAR UYGULAMALARININ
FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL
PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİLERİ**

Ayşegül YILDIZTUGAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Aralık - 2018
KONYA
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ KABUL VE ONAYI

Ayşegül YILDIZTUGAY tarafından hazırlanan “Kobalt stresi altındaki buğday (*Triticum aestivum* L.) fidelerinde biochar uygulamalarının fizyolojik ve biyokimyasal parametreler üzerine etkileri” adlı tez çalışması 18/12/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Prof.Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK

Danışman

Prof.Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK

Üye

Doç.Dr. Mehmet HAMURCU

Üye

Doç.Dr. Ceyda ÖZFİDAN-KONAKÇI

İmza

.....

.....

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
FBE Müdürü

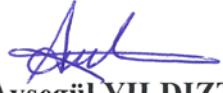
TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza


Ayşegül YILDIZTUGAY

Tarih: 18.12.2018

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kobalt stresi altındaki buğday (*Triticum aestivum* L.) fidelerinde biochar uygulamalarının fizyolojik ve biyokimyasal parametreler üzerine etkileri

Ayşegül YILDIZTUGAY

**Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Prof.Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK

2018, 82 Sayfa

Jüri

Prof.Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK

Doç.Dr. Mehmet HAMURCU

Doç.Dr. Ceyda ÖZFİDAN-KONAKÇI

Kobalt (Co)'nda dahil olduğu ağır metallerin toksik düzeyleri, bitkilerdeki metabolik süreçler üzerinde negatif etkilere sahiptir. Önemli sonuçlarından biri de hücre zarına, nükleik asitlere ve kloroplast pigmentlerine zarar veren reaktif oksijen türlerinin (ROS) artan üretimidir. Sınırlı düzeyde ya da hiç oksijen kaynağı olmayan koşullar altında biyokütlelenin yanmasından geliştirilen karbonca zengin olan biochar (BC) uygulaması, stres koşullarının negatif etkilerini iyileştirmektedir. Fakat, buğdayda aşırı kobalt uygulaması altında fotosentetik, fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmaları üzerine BC'nin cevapları hakkında bilgi mevcut değildir. Bu çalışmanın amacı, aşırı Co (150 ve 300 μM) altında hidroponik olarak yetiştirilen buğdayın (*Triticum aestivum* L.) fotosentetik, fizyolojik ve biyokimyasal cevapları üzerine BC'nin (1 ve 3 gr L^{-1}) rolünü değerlendirmektir. Sonuçlar, artan Co düzeylerinin büyüme (RGR), bağıl su içeriği (RWC), ozmotik potansiyel (Ψ_{π}) ve fotosentetik verimde (F_v/F_m) önemli azalmalara neden olduğunu göstermiştir. En fazla azalma oranı, 300 μM Co uygulamasındadır. Aşırı Co uygulaması, prolin (Pro) miktarında herhangi bir değişime neden olmamıştır. Fakat, aşırı Co altında BC uygulaması, bu parametrelerdeki negatif etkileri azaltmıştır. Bunun yanı sıra, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, Co uygulaması süresince sadece katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) ve NADPH oksidaz (NOX) aktiviteleri artmıştır. Bundan dolayı, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve lipid peroksidasyonu (TBARS miktarı) stresle birlikte birikmiştir. Diğer yandan, aşırı Co uygulamalarına yanıtta 1 gr L^{-1} BC süperoksit dismutaz (SOD), CAT, askorbat peroksidaz (APX), NOX ve monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) aktivitelerini tetiklerken, 3 gr L^{-1} BC-aracılı artış ise SOD, peroksidaz (POX), APX, GR, MDHAR ve DHAR aktivitelerinde gözlenmiştir. Artan antioksidan düzeylerine bağlı olarak, buğdaya BC ve Co birlikte uygulandığında, H_2O_2 ve TBARS miktarları azalmıştır. Sonuç olarak, BC artan büyüme, su içeriği ve antioksidan enzimlerin aktivasyonu ile Co uygulamaları tarafından oluşturulan oksidatif stresin etkilerini iyileştirebilmiştir ve ağır metal ile kontamine olan topraklarda yetiştirilen bitkilerde BC eklenmesi, su yönetimi ve savunma sistemlerinin geliştirilmesi için yeni bir yaklaşım olabilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan enzim, biochar, buğday (*Triticum aestivum* L.), kobalt, oksidatif stres

ABSTRACT**MS THESIS****Effects of biochar applications on physiological and biochemical parameters in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings under cobalt stress****Ayşegül YILDIZTUGAY****THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE****Advisor: Prof.Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK****2018, 82 Pages****Jury****Prof.Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK****Doç.Dr. Mehmet HAMURCU****Doç.Dr. Ceyda ÖZFİDAN-KONAKÇI**

Toxic level of heavy metals including cobalt (Co) has negative effects on metabolic processes in plants. One of the major consequences is the enhanced production of reactive oxygen species (ROS), which damage cell membranes, nucleic acids and chloroplast pigments. Application of biochar (BC), carbon-rich material developed from combustion of biomass under no or limited oxygen supply, ameliorates the negative effects of stress conditions. However, no information exists the BC responses on physiological and biochemical mechanisms under excess cobalt treatment in wheat. The objective of this study was to evaluate the role of BC (1 and 3 gr L⁻¹) on the photosynthetic, physiological and biochemical responses of wheat (*Triticum aestivum* L.) hydroponically grown under excess Co (150 and 300 µM). The results showed that increasing Co levels resulted in significant reductions of growth (RGR), relative water content (RWC), osmotic potential (Ψ_{π}) and photosynthetic efficiency (F_v/F_m). The most reduction rate was at 300 µM Co treatment. Excess Co application did not cause any change in the amount of proline (Pro). However, BC application under excess Co mitigates negative effects on these parameters. Besides, compared to the control groups, only the activities of catalase (CAT), glutathione peroxidase (GR), dehydroascorbate reductase (DHAR) and NADPH oxidase (NOX) increased during Co exposure. Hereby, hydrogen peroxide (H₂O₂) content and lipid peroxidation (TBARS content) accumulated with stress. On the other hand, while, in response to excess Co treatments, addition of 1 gr L⁻¹ BC triggered the activities of superoxide dismutase (SOD), CAT, ascorbate peroxidase (APX), NOX and monodehydroascorbate reductase (MDHAR), 3 gr L⁻¹ BC-mediated increase was observed in the activities of SOD, peroxidase (POX), APX, GR, MDHAR and DHAR. Depends on the activated antioxidant levels, H₂O₂ and TBARS contents decreased when wheat treated with BC plus Co. Consequently, BC could alleviate the effects of the oxidative stress created by Co treatments through the increased growth, water content and the activation of antioxidant enzymes, and incorporation of BC might be a novel approach to improve water management and defense systems in plants grown under heavy metal-contaminated soils.

Keywords: Antioxidant enzyme, biochar, wheat (*Triticum aestivum* L.), kobalt, oxidative stress

ÖNSÖZ

Deneyim, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, desteğini her zaman yanımda hissettiğim danışman hocam Sayın Prof.Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez konumun belirlenmesinde ve analiz sonuçlarımın değerlendirilmesindeki yardımlarındandolayı Sayın Doç.Dr. Ceyda ÖZFİDAN-KONAKÇI hocama teşekkür ederim. Tez çalışmamın hazırlanmasında, denemelerin kurumasında ve analiz süreçlerinde her zaman yanımda olan arkadaşlarım Fevzi ELBASAN ve Büşra ZENGİN'e ve emeği geçen herkese teşekkür ederim. Tez çalışmamızda kullandığımız Biocharı bize temin eden Synpet Teknoloji'ye teşekkür ederim.

Her anımda yanımda bulunan ve destek olan başta eşim Evren YILDIZTUGAY'a ve aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayşegül YILDIZTUGAY

KONYA-2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	7
2.1. Biochar.....	9
2.3. Ağır Metaller ve Biochar Arasında Etkileşim Mekanizması.....	11
2.4. Biocharın Ağır Metaller Üzerine Etkisiyle İlgili Yapılan Çalışmalar	12
2.5. Fitoremediasyon.....	15
2.6. Biochar ve Fitoremediasyonun Kombine Uygulanması.....	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1. Tohumların Temini ve Saklanması.....	20
3.2. Uygulama Dozlarının Belirlenmesi ve Denemelerin Kurulması	20
3.3. Fizyolojik Ölçümler	21
3.3.1. Yaprakların nisbi su içerikleri.....	21
3.3.2. Bağlı sürgün büyüme oranı.....	22
3.3.3. Yaprakların ozmotik potansiyel değişimleri.....	22
3.4. Klorofil Flüoresans Ölçümleri	22
3.5. Buğday Yapraklarında Gerçekleştirilen Biyokimyasal Parametre Ölçümleri	22
3.5.1. Yaprakların protein içeriklerinin tespiti.....	23
3.5.2. Lipid peroksidasyon oranlarının belirlenmesi	23
3.5.3. Yapraklardaki prolin değişimlerinin belirlenmesi	24
3.5.4. Yaprakların hidrojen peroksit içeriklerinin belirlenmesi.....	24
3.5.5. Hidroksil radikali süpürülme aktivitelerinin belirlenmesi	25
3.5.6. Yaprak enzim ekstraktlarının hazırlanması	25
3.5.7. Antioksidan enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesi	26
3.5.7.1. Süperoksit dismutaz enzim aktivitelerinin ve izozim profillerinin belirlenmesi.....	26
3.5.7.2. Katalaz enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	27
3.5.7.3. Peroksidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	27
3.5.7.4. Askorbat peroksidaz enziminin aktivite tayini	28
3.5.7.5. Glutatyon redüktaz enziminin aktivite tayini.....	28
3.5.7.6. Monodehidroaskorbat redüktaz enziminin aktivite tayini	28
3.5.7.7. Dehidroaskorbat redüktaz enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	29

3.6. İstatistiksel Analizler	29
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	30
4.1. Büyüme Parametrelerinde Meydana Gelen Değişimler	30
4.2. Klorofil Flüoresans Ölçümleri	33
4.3. Buğday Yapraklarında Gerçekleştirilen Biyokimyasal Analizlerin Sonuçları	34
4.3.1. Prolin içeriği	34
4.3.2. Yaprakların hidrojen peroksit içeriklerinde meydana gelen değişimler	36
4.3.3. Yaprakların hidroksil radikali süpürülme aktivitelerinde meydana gelen değişimler.....	38
4.3.4. Lipid peroksidasyon seviyeleri (TBARS içeriği)	39
4.3.5. Antioksidan enzim aktivite sonuçları	40
4.3.5.1. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesinde gözlenen değişimler	40
4.3.5.2. Katalaz enzim aktivitesinde gözlenen değişimler.....	43
4.3.5.3. Peroksidaz enzim aktivitesinde gözlenen değişimler	45
4.3.5.4. Askorbat peroksidaz enzim aktivitesinde gözlenen değişimler	46
4.3.5.5. Glutatyon redüktaz enzim aktivitesinde gözlenen değişimler	48
4.3.5.6. Monodehidroaskorbat redüktaz enzim aktivitesinde gözlenen değişimler	49
4.3.5.7. Dehidroaskorbat redüktaz enzim aktivitesinde gözlenen değişimler	51
4.3.5.8. NADPH oksidaz enzim aktivitesinde gözlenen değişimler	52
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	54
5.1.Sonuçlar	54
5.2. Öneriler	56
6. KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ	69

ŞEKİLLER

Şekil 3.1. 21 süresince su kültüründe yetiştirilen buğday (<i>Triticum aestivum</i> L.) fidelerinin genel görünümü.....	21
Şekil 3.2. Enzim ekstraktlarının hazırlanması.....	26
Şekil 4.1. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının bağlı sürgün büyüme oranlarında (RGR) meydana getirdiği ortalama değişimler (n=5). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir (P< 0.05).....	30
Şekil 4.2. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının yaprak nisbi su içeriklerinde (RWC) meydana getirdiği ortalama % değişimler (n=5). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir (P< 0.05).....	31
Şekil 4.3. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının ozmotik potansiyelde meydana getirdiği ortalama değişimler (MPa) (n=5). Sütunlar üzerindeki aynı harfler istatistiksel olarak aynı olan değerleri göstermektedir (P>0.05).....	32
Şekil 4.4. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının maksimum kuantum verimi (Fv/Fm)'nde meydana getirdiği ortalama değişimler (n=5). Sütunlar üzerindeki aynı harfler istatistiksel olarak aynı olan değerleri göstermektedir (P>0.05).....	33
Şekil 4.5. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının yaprak prolin içeriklerinde gözlenen ortalama değişimler (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir (P<0.05).....	35
Şekil 4.6. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının yaprak H ₂ O ₂ seviyesinde meydana getirdiği değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir (P<0.05).....	37
Şekil 4.7. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının yaprak OH [•] radikali süpürülme aktivitelerinde meydana getirdiği değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir (P<0.05).....	38
Şekil 4.8. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının yaprak TBARS içeriklerinde (nmol g ⁻¹ YA) meydana getirdiği değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir (P<0.05).....	39
Şekil 4.9. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının yaprak SOD izozimlerinde (a) ve total SOD (U mg ⁻¹ protein) aktivitelerinde (b) meydana gelen değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir (P<0.05).....	41
Şekil 4.10. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının yaprak CAT izozimlerinde (a) ve total CAT (U mg ⁻¹ protein) aktivitelerinde (b) meydana gelen değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir (P<0.05).....	43
Şekil 4.11. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının yaprak POX izozimlerinde (a) ve total POX (U mg ⁻¹ protein) aktivitelerinde (b) meydana gelen değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir (P<0.05).....	45

Şekil 4.12. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının yaprak APX izozimlerinde (a) ve total APX (U mg^{-1} protein) aktivitelerinde (b) meydana gelen değişimler ($n=4$). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir ($P<0.05$)	47
Şekil 4.13. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının GR (U mg^{-1} protein) aktivitelerinde meydana getirdiği değişimler ($n=4$). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir ($P<0.05$).	48
Şekil 4.14. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının MDHAR ($\mu\text{mol mg}^{-1}$ protein) aktivitelerinde meydana getirdiği değişimler ($n=4$). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir ($P<0.05$)	50
Şekil 4.15. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının DHAR ($\mu\text{mol mg}^{-1}$ protein) aktivitelerinde meydana getirdiği değişimler ($n=4$). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir ($P<0.05$)	51
Şekil 4.16. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının yaprak NOX izozimlerinde (a) ve total NOX (U mg^{-1} protein) aktivitelerinde (b) meydana gelen değişimler ($n=4$). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir ($P<0.05$)	53

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%: Yüzde

H₂O₂: Hidrojen peroksit

O₂: Oksijen

OH[•]: Hidroksit radikali

Kısaltmalar

APX: Askorbat peroksidaz

CAT: Katalaz

Co: Kobalt

DAB: 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid

DHAR: Dehidroaskorbat redüktaz

EDTA: Etilendiamin tetra asetik asit

g: Gram

GR: Glutasyon redüktaz

KA: Kuru ağırlık

KCN: Potasyum siyanür

MDA: Malondialdehit

MDHAR: Monodehidroaskorbat redüktaz

mg: Miligram

ml: Mililitre

mM: Milimolar

NBT: Nitro blue tetrazolium

NOX: NADPH oksidaz

POX: Peroksidaz

PVPP: Polivinilpolipirrolidon

ROS: Reaktif oksijen türleri

RWC: Nispi su içeriği

SOD: Süperoksit dismutaz

TA: Turgorlu ağırlık

TBA: Tiobarbütirik asit

TCA: Trikloroasetik asit

YA: Yaş ağırlık

µg: Mikrogram

µM: Mikromolar

1. GİRİŞ

Antropojenik etkilerden dolayı doğada yaygın bir şekilde birikmeye devam eden ağır metaller, Dünya yüzeyindeki tüm organizmaların yaşamını tehdit eden önemli bir çevre sorunu haline gelmiştir. Endüstriyel faaliyetler, fosil yakıtlı taşıtların kullanımı, aşırı madencilik faaliyetleri, tarımda kullanılan gübre ve ilaçlar ile kentsel atıklar ağır metallerin çevreye yayılmasına neden olan etmenlerin başında gelmektedir (Gür ve ark., 2004). Ağır metallerin birikimi, ekolojik, beslenme ve çevresel nedenlerden dolayı büyük bir sorun teşkil etmektedir. 20'den fazla atomik kütleye sahip olan ve 5 g cm^{-3} 'ten daha yüksek yoğunluğa sahip olan biyolojik olarak çözünmeyen, inorganik kimyasal elementlere ağır metal adı verilmektedir. Bu ağır metaller sitotoksik, genotoksik ve mutajenik etkilere sahip olup insanlar, hayvanlar ve bitkiler üzerinde metabolik, fizyolojik ve biyokimyasal hasarlara yol açmaktadır (Emamverdian ve ark., 2015).

Toprakta bitki gelişimi için esansiyel mikro besin elementleri (Fe, Mn, Zn, Cu, Mg, Mo ve Ni) ile biyolojik ve fizyolojik fonksiyonları tam olarak bilinmeyen temel olmayan elementler (Cd, Sb, Cr, Pb, As, Co, Ag, Se ve Hg) olarak adlandırılan iki tür metal grubu bulunmaktadır (Rascio ve Navari-Izzo, 2011; Ali ve ark., 2013). Bitkilerin hem yeraltı hem de yerüstü yüzeyleriyle bu metalleri bünyelerine alabilmektedir (Patra ve ark., 2004). Esansiyel iz elementler enzimlerin ve proteinlerin yapısında önemli bir rol oynamaktadır. Bitkiler aktif bir şekilde büyümeleri için mikro besin elementlerinde yer alan metalleri yeterince almak durumundadır. Bu besin elementlerinin aşırı miktarda bitki bünyesine alınması halinde büyümede inhibisyona neden olabilmektedir. Toksik seviyedeki ağır metaller normal bitki fonksiyonlarını engeller. Ayrıca i) ağır metaller ve sülfidril grupları arasındaki bağların oluşmasından kaynaklanan protein yapısının bozulması (Hall, 2002), ii) pigmentler veya enzimler gibi biyomoleküllerde temel metallerin işlevlerini üstlenerek ya da bozarak ve sitoplazmik zarın bütünlüğünü olumsuz yönde etkilenmesi (Ali ve ark., 2013) ve iii) fotosentez, solunum ve enzimatik aktiviteler gibi bitkilerde hayati olayların baskılanması gibi metabolik süreçler üzerine olumsuz etkiler gösterirler (Hossain ve ark., 2012).

Ağır metaller bitkilerde transpirasyon (terleme), stoma hareketlerine bağlı olarak gaz değişimleri, su ve mineral alımı, fotosentez, çeşitli enzim aktivitelerinde inhibisyon, çimlenme, azot döngüsü ve protein sentezi, membran bütünlüğünün sürdürülmesi, hormonal düzenleme gibi birçok hayati fizyolojik ve biyokimyasal olayın bozulmasına

neden olmaktadır. Ağır metalden kaynaklanan toksisite, metalin türüne göre değişim gösterebildiği gibi metale maruz kalan bitki türüne göre de değişim gösterebilir (Viehweger, 2014). Bitkilerin ağır metallerin olumsuz etkilerine karşı vereceği cevapların belirlenebilmesi ve tolerans durumlarının ortaya konulabilmesi için ağır metal çeşidinin ve uygulama miktarının, bitkide meydana getireceği hasarın şiddeti ve zarar oluşum süreci göz önüne alınmalıdır.

Son yıllarda zirai alanlarda ağır metal kirliliği bitki verimini ve gelişimini tehdit eden önemli bir çevresel problem olarak gözükmektedir. Ağır metallerin toprakta birikmesi bitkileri olumsuz etkilemekle birlikte besin zinciri yoluyla hayvan ve insan sağlığı üzerinde de olumsuzluklara neden olmaktadır. Ağır metallerin bitki bünyesine ister kökler vasıtasıyla su ve mineral besin elementlerinin alımı sırasında isterse de toprak üstü organlardan alınması durumunda bitkilerin fizyolojik, moleküler ve biyokimyasal aktivitelerinde inhibisyonlar görülmekte, gelişim azaltmakta ve bitki ölümlerine neden olabilmektedir (Öktüren Asri ve Sönmez, 2006).

Ağır metallerin aşırı alımı ve birikimi kloroplastlarda ve mitokondri gibi organellerde metabolik yollarda düzensizliklere yol açarak süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), tekli oksijen ($^1O_2$) ve hidroksil radikalleri ($OH^{\cdot}$) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) fazla miktarda üretimine neden olmaktadır (Sytar ve ark., 2013). Hücre içerisindeki ROS konsantrasyonunun artması, antioksidan savunma sistemi ve reaktif oksijen türlerinin üretimi arasındaki dengeyi bozmakta ve bitkiler oksidatif strese girmektedir (Büyük ve ark., 2012). Üretilen bu aşırı ROS'lar, protein ve lipidlerin oksidasyonuna, iyon sızıntılarına, oksidatif DNA hasarına, redoks dengesizliğine ve hücre yapısının ve membranların denatüre olmasına yol açarak programlanmış hücre ölümü yollarının aktivasyonuna neden olmaktadır (Sharma ve ark., 2012).

Bitkiler ağır metalden kaynaklı oksidatif stres şartlarında yaşamlarını devam ettirebilmek ve stresle başa çıkabilmek için fazlaca üretilen ROS'un kontrolü ve iyi bir şekilde süpürülmesini sağlayan çeşitli antioksidan savunma sistemlerine sahiptirler. Oksidatif strese karşı antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere iki kısma ayrılmaktadır. ROS'ların detoksifikasyonunda görev alan enzimatik antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POX), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) ve monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) olarak bilinmektedir (Hasanuzzaman ve ark., 2018). Askorbik asit (AsA), tokoferoller (vitamin E), karotenoidler, glutatyon ve fenolik bileşikler ise enzimatik olmayan antioksidanlar

arasındadır (Asgher ve ark., 2017). ROS'ların zararsız hale getirilmesini sağlayan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar hücredeki lokalizasyonlarına ve rollerine göre farklılık göstermektedirler (Büyük ve ark., 2012).

Kobalt (Co) genellikle baklagil bitkileri için faydalı olmasına rağmen, diğer bitkiler için esas bir element olarak sınıflandırılmayan toprakta var olan ağır metallerden bir tanesidir (Lwalaba ve ark., 2017). Co bitki metabolizmalarında doğrudan rol oynamamasına rağmen, yüksek bitkiler için yararlı bir unsur olarak kabul edilmektedir. *Euglena gracilis* gibi ilkel fotosentetik organizmaların fotosentez aktivitelerinin başarı ile sürdürülebilmesi için Co, temel bir besin elementidir. Kobalt, özellikle atmosferik azotu fikse eden bazı mikroorganizmalar için vazgeçilmez bir elementtir ve eksikliği, azot fiksasyonunun etkinliğini azaltmaktadır (Gad ve El-Metwally, 2015). Ayrıca kobalt, insan ve hayvan beslenmesi için gerekli olan B12 vitamininin sentezlenmesi için gerekli bir elementtir (Underwood, 2012). Kobalt, insan vücudunda, yaş artışı ile birlikte diğer ağır metaller gibi birikmez. İnsan beslenmesi için günlük kobalt gereksinimleri 8 ppm civarında olup buda, içme suyundan kolaylıkla temin edilebilmektedir (Young, 1983). Domates bitkilerinde tuzluluğun zararlı etkisini azaltmak için kobalt kullanıldığını, fidelerin transpirasyon oranının azaldığı rapor edilmiştir (Gad ve El-Metwally, 2015). Öte yandan tuzluluk altındaki bezelye bitkilerinde kobaltın su içeriğini artırdığı bildirilmiştir (Wright ve Hiron, 1972). Ayrıca tuzluluk şartlarındaki buğday fidelerinin topraklarına 15 ppm'e kadar artan dozlarda Co uygulamaları sürgünlerin verim, büyüme ve besinsel durumlarında (N, P, K, Ca, Mg, Zn ve Cu) pozitif etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Gad ve Kandil, 2011). Diğer ağır metallerin aksine, Co, kadmiyum (Cd) ve kurşun (Pb) gibi toksik elementlerin bitki bünyesine alınmasını inhibe ederek hem yararlı, hemde kalsiyum (Ca) ve demir (Fe) gibi temel besin elementlerin alımını engellemesinden dolayı olumsuz etkiye sahiptir (Wallace ve Abou-Zamzam, 1989). Asidik veya kireçli toprakların Co içeriğinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Chatterjee ve Chatterjee, 2000). Ayrıca, günümüzde toprakların Co ile kirlenmesi, endüstriyel faaliyetler, taşıt ve uçak emisyonları nedeniyle daha şiddetli hale gelmiştir (Sree ve ark., 2015).

Yüksek konsantrasyonda Co, bitkilerde fotosentezin engellenmesi (Mohanty ve ark., 1989), tohum çimlenmesi ve fide büyümesi (Dubby ve Dwivedi, 1987), klorozis, yaprakların nekrozu ve uzamaların engellenmesi ile köklerinin kızarması (Sree ve ark., 2015) gibi geri dönüşümsüz zararlara neden olur (Chatterjee ve Chatterjee, 2000). Co toksisitesinin, bitkilerde karbondioksit (CO₂) asimilasyonunun bozulmasına yol açarak

net fotosentez oranı, stoma iletkenliği, transpirasyon oranı ve karbon alımı üzerinde olumsuz etkileri vardır (Lwalaba ve ark., 2017). Biyokütlenin yanı sıra, kobaltın fazlalığı yapraklarda Fe, klorofil, protein ve katalaz aktivitesini azaltır. Ayrıca, yüksek düzeyde Co; P, S, Mn, Zn ve Cu'nın köklerden üst kısımlara translokasyonunu da etkilemektedir. Aşırı Cu veya Cr'un tersine yüksek konsantrasyondaki Co, difüzyon direnci ve nispi su içeriğini artırırken, su potansiyelini ve transpirasyon oranını önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir (Nagajyoti ve ark., 2010; Kalaivanan ve Ganeshamurthy, 2016). Ayrıca, Co, klorofil biyosentez yolunda yer alan enzimlere müdahale ederek klorofil sentezinin düşmesine ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına neden olabilir. Öte yandan, Co toleransı, bitki türleri ve bir tür içindeki genotipler arasında bile büyük ölçüde farklılık gösterebilir (Ali ve ark., 2011).

Biochar, organik maddelerin, oksijensiz ortamda 400-500°C'de pirolizi veya az miktarda oksijen varlığında gazlaştırma işlemi sonucunda elde edilen yüksek karbon ve mineral içerikli ürüne denilmektedir. Biochar, toprağın havalanmasını ve köklerin toprakta daha kolay ilerlemesini sağlayarak toprak verimini arttıran çevre dostu bir maddedir. İlaveten, içerdiği fazlaca karbonu toprağa kazandırarak toprağın C yönünden zengin hale gelmesini sağlamaktadır (<http://www.marmore.com.tr/>). Biochar materyalleri organik ve inorganik içerikli olmak üzere iki kısımdan oluşur. Biochar hammaddelerin pirolizi sonucunda organik madde bozunur, karbon ve mineral kalır. Karbon ve mineral içerikli bu karışım biocharı oluşturmaktadır. Bu nedenle; mineral içeriği bakımından yüksek olan her organik madde, ısıtma işlemi tabi tutulduğunda biochar elde edilir.

Mısır koçanı, pirinç kabuğu, fıstık kabuğu, ağaç kabuğu gibi tarımsal atıklar, kullanılmış kağıt atığı, hayvan gübresi, kentsel atıklar, ormansal biyokütle atıkları vb. atıklar biochar üretiminde hammadde kaynağı olarak kullanılabilir. Fakat biochar üretimi için hammadde seçiminde; besin maddesi içeriği, pH, ağır metaller, toksinler gibi kirletici maddeler, partiküllerin boyut dağılımı gibi bazı hususlara dikkat edilmesi gerekir (<http://www.marmore.com.tr/>).

Biocharın, toprak için önemi, Amazon ormanlarının koyu renkli "Terra Preta" (Kara Toprak) topraklarının keşfedilmesi ile ortaya çıkmıştır. Araştırmacılar, Terra Preta toprağının normal toprağa oranla 2.7 kata kadar daha fazla organik karbon içerdiğini keşfetmiştir. Dünyanın birçok bölgesinde, çiftçiler bu olaydan esinlenerek Biocharı toprak düzenleyici olarak kullanmaktadır. Biocharlar hemen hemen her türlü toprak çeşidini iyileştirmek için kullanılabilir (<http://www.marmore.com.tr/>). Son

yıllarda araştırmacılar, biocharın in situ toprak iyileştirme tekniği olarak kullanımını çok fazla araştırmış ve topraklardaki ağır metallerin hareketliliğini azaltmada etkili olduğu rapor edilmiştir (Houben ve ark., 2013; Xu ve ark., 2014). Biochar, kirlenmiş topraklarda yüksek kimyasal stabiliteye sahiptir ve C açısından zengin bir materyaldir. Yüksek C içeriğine sahip ve gözenekli bir yapıda olan biochar organik atıkların pirolizi ile hazırlanır (Houben ve ark., 2013). Biochar, ağır metalleri etkin bir şekilde adsorbe etmesi, biyoyararlanımı azaltması ve bitki ile mikroorganizmalar için toksin indüklü stresin olumsuz etkilerini hafifletmesinden dolayı kirlenmiş toprakların iyileştirilmesinde çok etkili bir araç olduğu kanıtlanmıştır (Mackie ve ark., 2015). Biochar bileşikleri mikroplar için iyi bir organik materyal ve mineral besin kaynağıdır. Ağır metalle kirlenmiş toprakların remediasyonunda görev alan yararlı mikropların çoğalmasını teşvik eder (Rutigliano ve ark., 2014). Biochar, toprağın fiziksel ve kimyasal özelliklerini iyileştirerek toprak verimliliğini ve bitki büyümesini artırır ve yararlı besin elementlerin kullanılabilirliğini yükseltir (Houben ve ark., 2013). Topraklarda biochar kullanımının C havuzunu yükselttiği ve artan atmosferik CO₂ konsantrasyonunu en aza indirdiği kanıtlanmıştır (Fang ve ark., 2015).

Toprakların doğal veya antropojenik kaynaklı metal kontaminasyonuna karşı olan çevresel duyarlılık gün geçtikçe artmaktadır. Ağır metalle kirlenmiş alanların temizlenmesi oldukça güçtür. Geleneksel yöntemler (termal prosesler, fiziksel ayırma, elektrokimyasal yöntemler, yıkama, stabilizasyon/katılaşma ve gömme) kullanılarak kirli toprakların temizlenmesi oldukça maliyetlidir. Son yıllarda düşük maliyet, çevre dostu ve aynı zamanda farklı durumlarda uygulanabilirliği nedeniyle ağır metale maruz kalmış bölgelerin iyileştirilmesinde ağır metalleri adsorbe etme kapasitesi yüksek olan biochar uygulamaları artmaktadır.

Buğday ülkemizde ve dünyada temel besin maddesi olarak kullanılan en önemli ekin ürünlerinin başında gelmekte ve önemini gelecek yıllarda da sürdüreceği tahmin edilmektedir. Buğday gerek dünyada; gerekse ülkemizde en fazla üretilen tarım ürünüdür. Genellikle ılık ve serin iklim şartlarında yetişir. Yıllık yağışı 350-1150 mm olan iklim bölgelerinde yetişebilmektedir. Kaliteli ve bol ürün yıllık yağışı 500-600 mm olan yerlerde veya toprakta bu nemi sağlayacak sulamalarda alınabilmektedir. Diğer tarla bitkilerinde olduğu gibi buğday fideleride günümüzde etkileri giderek artan ağır metal toksisitesinden olumsuz etkilenmektedir. Ağır metal çeşidine bağlı olarak büyüme, gelişme ve verimde büyük kayıplar ile karşılaşmaktadır.

Buğdayın ekonomik yeri ve önemi tartışılmaz bir gerçektir. Buğdayın iyi bir besin maddesi oluşu, dünya nüfusunun yaklaşık olarak % 35'nin temel besin kaynağı haline gelmesine sebep olmuştur. Buğday tanesi yaklaşık % 8-15 protein oranı, % 65-75 nişasta oranı, % 1-5 yağ oranı, % 1.5- 3 şeker oranı, % 1-2 kül oranı, % 11-13 su içermektedir. Her bir tanenin karbonhidrat, yağ ve proteinin yanında, içerisinde bulunduğu çeşitli vitaminler ile insan ve hayvan beslenmesinde önemli rol oynamaktadır.

Günümüzde bitkilerin büyüme ortamlarına biochar (biyokömür) uygulamalarının önemi giderek artmaktadır. Bitki topraklarına uygulanan biocharın çeşitli abiyotik stres faktörlerine karşı tolerans artırıcı özellikte olduğu ve büyümeye olumlu yönde etki ettiği çeşitli çalışmalarda bildirilmektedir. Bununla birlikte kobalt stresi altındaki buğday yapraklarının antioksidan enzim sistemi üzerine etkisi bilinmemektedir ve literatür de buna ait bir bilgi girdisi yoktur. Bu nedenle, gerçekleştirmiş olduğumuz tez çalışmasında (i) buğday fidelerinde antioksidan enzim aktivitesi açısından kobalt stresinin etkilerini belirlemek ve (ii) kobalt stresine karşı koruyucu rolü bulunması muhtemel biocharın uygulanmasıyla antioksidan enzim savunma sistemi üzerine etkisini hücre bazında belirlemeye çalışmak temel amaçlarımız arasındadır. Yüksek kobalt içeriğine karşı toleransın sağlanmasında biocharın, reaktif oksijen türleri (ROS) ve antioksidan savunma sistemi arasındaki etkileşim konusu aydınlatılmayı beklemektedir. Tezimizde kobalt stresine maruz bırakılan buğday fidelerine bitki gelişimini teşvik edici ve ağır metalleri kolaylıkla adsorbe eden biocharın, büyüme parametreleri, bağl su içerikleri, bağl büyüme oranı, fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerinde meydana gelen değişimlerin tespiti ve biocharın ağır metal stresinin olumsuz etkilerini azaltarak bitki gelişimindeki rollerinin belirlenmesi başlıca hedeflerimiz arasındadır. Bu amaçla, uygulama konsantrasyonları ön uygulama yapılarak belirlenen biochar, 21 gün süresince kontrollü şartlarda yetiştirilen buğday fidelerine 2 konsantrasyon şeklinde uygulanarak kobalt stresi altındaki fidelerde H_2O_2 gibi reaktif oksijen türleri (ROS) ile süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POX), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) ve NADPH oksidaz (NOX) gibi antioksidan enzim/izozim aktivitelerindeki değişimler belirlenmiştir. Gerçekleştirmiş olduğumuz bu tez çalışması doğrultusunda buğday fidelerinin doğada var olan ağır metallerden birisi olan kobalt stresinin zararlarının hafifletilmesinde ve iyileştirilmesinde biocharın etkileri ilk defa ortaya konulmuştur.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Günümüzde ağır metaller, Dünya yüzeyindeki tüm organizmaların yaşamını tehdit eden önemli bir çevre sorunu halini almıştır. Ağır metallerin çevreye yayılmasına neden olan etmenlerin başında endüstriyel faaliyetler, motorlu taşıtların egzozları, maden yatakları ve işletmeleri, volkanik faaliyetler, tarımda kullanılan gübre ve ilaçlar ile kentsel atıklar gelmektedir (Gür ve ark., 2004).

Endüstrileşme ve sanayideki ilerlemeler ağır metal kirliliğini ve ağır metallerin birikimine sebep olmuştur. Ağır metaller organik maddelerin aksine, çevrede birikir ve parçalanamaz. Bazı topraklar ana kayaların yıkanması veya volkanik aktivitelerden dolayı yüksek miktarda ağır metale sahiptirler. Antropojenik aktiviteler, madencilik, pestisit kullanımı, gübreler ve atıkların kullanılması sonucunda bu topraklarda yüksek seviyede ağır metallerin fazlaca olmasının ana nedenidir. Ağır metalce kirlenen topraklar; toprak mikroorganizma aktiviteleri (Yang ve ark., 2012) ve toprakların fonksiyonel çeşitliği ve sınıflandırması üzerinde zararlı etkileri bulunmaktadır (Vacca ve ark., 2012). Ağır metalce kirlenen topraklar insan sağlığı ve çevreye risk olarak görülür (Roy ve McDonald, 2015). Bazı ağır metaller yaşayan organizmalar için gerekli iken diğerleri ise gerekli değildir. Gerekli elementlerin konsantrasyonu mevcut eşik değerinin üzerinde olduğunda organizma üzerine zararlı etkilere neden olur.

Ağır metaller toksik etkileri nedeniyle bitkilerde transpirasyon, stoma hareketleri, su alımı, fotosentez, enzim aktivitesi, çimlenme, protein sentezi, membran kararlılığı, hormonal denge gibi birçok fizyolojik olayın bozulmasına neden olmaktadır. Toksisite, metalden metale değişebildiği gibi, organizmadan organizmaya da değişebilmektedir. Olumlu veya olumsuz (toksik) etkiler yalnızca elementin tipi ve konsantrasyonuna bağlı olmayıp değişik türlerin genetik esaslı fizyolojik davranışları ile de ilgilidir. Bitkilerin ağır metal toksisite tolerans sınırlarının bilinebilmesi için metal tür ve miktarı, zararın şiddeti ve türü ayrıca zarar oluşum süreci göz önüne alınmalıdır. Bu özelliklerin bilinmesi, bitkilerin gelişimi ve canlılığı açısından oldukça önemlidir (Paschke ve ark., 2005).

Birçok ağır metal toprakta doğal olarak bulunmakla birlikte, farklı endüstriyel uygulamalar sonucu çevreye yayılmaktadır. Bitkiler ağır metal toksisitesinin üstesinden gelebilmek için karmaşık fizyolojik ve biyokimyasal işlevler, gen ekspresyonu, protein modifikasyonları ve metabolit içeriklerindeki değişimlerin bir koordinasyonuna gerek duymaktadır (Urano ve ark., 2010).

Ağır metallere birisi olan kobalt, günümüzde çeşitli kullanım alanlarıyla ve çevre kirliliğindeki önemli rolü ile gündeme gelmiş oldukça toksik bir metaldir. Kobalt endüstriyel faaliyetler ve tarımda gübre kullanımı sonucu su ve toprakta kolaylıkla birikebilen toksik bir metaldir. Doğada mineral olarak bulunan kobalt, her yerde bulunur, ancak insanlar genellikle B12 kaynaklarıyla beraber alırlar. Bundan dolayı da en iyi kaynakların hayvansal yiyecekler olduğu söylenebilir. Kobalt havadan solumun yoluyla, içme sularıyla ve diyet yoluyla organizma tarafından alınır. Fazla miktarda alınması; soluk alıp verme mekanizmasında bozulmaya, kalp büyümesi ve genişlemesine, böbrek ve karaciğer rahatsızlıklarına, sinüs taşikardiye ve bağışıklık sistemine olumsuz yönde etki ederek astım krizlerine sebep olacağı belirtilmiştir (Aksoy, 2008).

Kobalt miktarı insan vücudunda yaklaşık 1.1 mg kg⁻¹ olup çoğunlukla kaslarda, kemiklerde ve dokularda bulunmaktadır. Ayrıca B12 vitaminin yapısında % 4 oranında Co bulunmakta olup hemoglobin sentezinde görev yapmaktadır. Kobalt elementinin fazlalığında akciğer ve kalpte hasar ve işlev bozukluğu, kan şekeri, kolesterol ve yağ düzeylerinde artış, kanser, düşük ve kısırlıklar gibi hastalıklar görülebilmektedir (Akpınar, 2005).

Canlılar üzerinde eser elementlerin etkisi dikkate alındığında, toprak ve su örneklerinde bulunan eser elementlerin analizi büyük bir önem taşımaktadır. Metallerin çoğu bütün aerobik ve genellikle anaerobik organizmalar için esansiyel maddelerdir. Bununla birlikte Cr, Pb, Co, Cd ve Ni gibi birçok ağır metalin yüksek miktarlarının insan sağlığını ciddi derecede etkilediği kanıtlanmıştır. İnsan vücudu ağır metalleri işleyememekte ve kolaylıkla dışarı atamamaktadır. Sonuçta bu ağır metaller insan vücudunun çeşitli organlarında birikmektedir. Yüksek miktarlarda birikimde insan vücudunda ciddi zararlara neden olabilmektedir (Forster ve Wase, 1997).

Toprak çözeltisindeki Co'nın bitkiler tarafından alınabilirliği diğer besin elementlerinde olduğu gibi toprağın pH'sına bağlıdır. Toprağın pH'ı arttıkça kobaltın bitkilerce alınımı ve taşınımı azalmaktadır. Toprakta yetiştirilen bitkilerin kuru maddesinde Co konsantrasyonu, normal olarak 0.02-0.5 mg kg⁻¹ arasında değişir. Toprakta; Fe, Mn, Zn ve Cu gibi Co da kleyt bileşikleri oluşturma eğilimindedir. Ayrıca Co, öteki iyonları fizyolojik yönden önemli bağlanma bölgelerinden değiştirerek onların yerine geçer. Böylece Co, öteki metallerin alınımını azaltır ve davranış biçimlerini etkiler. Yüksek düzeyde Co beslenmesi Fe noksanlığına yol açar (Nicholas ve Thomas, 1954).

2.1. Biochar

Biochar organik materyalin pirolize (anaerobik şartlar altında yanma reaksiyonu) olması sonucunda boşluklu yapıya sahip karbon kaynağı olan bir organik toprak düzenleyicisidir. Çok sayıda materyal, gübreler, bitki dokuları, atıklar ve çeşitli hammaddeler biochar kaynağı olarak kullanılabilir. Odun kömürü çok eski zamandan beri kullanılmasına rağmen, biochar üretimi ve kullanımı için diğer hammaddelerin kullanımı fikri yeni keşfedilmiştir. Benzer olarak biocharlar yüksek katyon değişim kapasitesine sahip ve alkalın yapılıdır. Biochar toprağın biyolojik aktiviteleri ve toprak özellikleri üzerine faydası bulunmakta (Paz-Ferreiro ve ark., 2014), tarımsal kaynaklardan oluşan sera gazı salınımını azaltmakta, toprağın karbon konsantrasyonunu artırmakta ve karbon döngüsünü sağlamaktadır (Gascó ve ark., 2011). Biochar uygulaması ile toprağın kalitesinde değişiklikler meydana gelmekte (Paz-Ferreiro ve ark., 2014) ve tarımsal verim potansiyelini artırmaktadır (Liu ve ark., 2013). Biocharın çok amaçlı faydaları Stephen (2016) tarafından yazılan kitapta da bulunmaktadır. Fakat toprak ağır metalleri üzerine biocharın etkisi hakkında çok az bilgi bulunmaktadır.

Organik maddelerin, oksijensiz ortamda pirolizi veya az miktarda oksijen varlığında gazlaştırma işlemi sonucunda elde edilen yüksek karbon ve mineral içerikli ürüne “Biochar” denilmektedir. Biochar, içine katıldığı toprağın hava almasını ve köklerin toprak içinde daha kolay ilerlemesini sağlayarak toprak kalitesini arttıran doğa dostu bir maddedir. Bunun yanı sıra, içerdiği karbonu toprağa kazandırarak atmosfere geri dönmesini önlemektedir (<http://www.marmore.com.tr/>).

Biochar hammaddeleri organik ve inorganik içerikli olmak üzere iki kısımdan oluşur. Biochar hammaddelerin pirolizi sonucunda organik madde bozunur, karbon ve mineral kalır. Karbon ve mineral içerikli bu karışım biocharı oluşturmaktadır. Bu nedenle; mineral içeriği bakımından yüksek olan her organik madde, ısıtma işlemi tabi tutulduğunda biochar elde edilir.

Odun yongası, mısır koçanı, pirinç kabuğu, fıstık kabuğu, ağaç kabuğu gibi tarımsal atıklar, işlenmiş kağıt atığı, hayvan gübresi, kentsel atıklar, ormansal biyokütle atıkları vb. atıklar biochar üretiminde hammadde kaynağı olarak kullanılabilir. Fakat biochar üretimi için hammadde seçiminde bazı hususlara dikkat edilmesi gerekir. Bu hususlar; besin maddesi içeriği (kullanılabilirliği), pH, kirletici maddeler (ağır metaller, toksinler), partiküllerin boyut dağılımıdır (<http://www.marmore.com.tr/>).

Biocharın bileşimi (karbon, azot, potasyum, kalsiyum vb. miktarları); kullanılan hammaddeye bağlı olarak büyük değişiklikler gösterir. Örneğin kanatlı atıkları gibi hayvansal kaynaklı biochar mineral içeriği (N, P, K) bakımından daha zengindir. Piroliz koşulları biocharın bileşimini büyük ölçüde etkiler. Farklı biyokütle hammaddelerinin, işletme sıcaklığına bağlı ürün verimleri değişmektedir.

Biocharın, toprak için önemi, Amazon ormanlarının koyu renkli “Terra Preta” (Kara Toprak) topraklarının keşfedilmesi ile ortaya çıkmıştır. Araştırmacılar, Terra Preta toprağının normal toprağa oranla 2.7 kata kadar daha fazla organik karbon içerdiğini keşfetmiştir. Dünyanın birçok bölgesinde, çiftçiler bu olaydan esinlenerek biocharı toprak düzenleyicisi olarak kullanmaktadır. Biochar hemen hemen her türlü toprak çeşidini iyileştirmek için kullanılabilir (<http://www.marmore.com.tr/>).

Biocharın Toprağa Faydaları;

- Metan emisyonunu tamamen engeller.
- Nitroz oksit emisyonlarını ~%50 oranında azaltır.
- Gübre gereksinimini ~%10 oranında azaltır.
- Karbonun toprakta uzun süre tutulmasını sağlar.
- Toprak asitliğini giderir, pH değerini yükseltir.
- Alüminyum toksisitesini azaltır.
- Yararlı mantar hiflerini (mikoriza, mikorizal mantar) artırarak, toprak

yapısını düzenler.

- Su kullanımını aktive eder.
- Topraktaki mevcut besinleri tutar.
- Baklagillerin azot fiksasyonunu dengeler.
- Katyon değişim kapasitesini %50 artırır.
- Toprak geçirgenliğini yükseltir (<http://www.marmore.com.tr/>).

Biocharın Bitkisel Üretime Faydaları;

- Bitki büyümesini hızlandırır.
- Toprak çekme dayanımını artırır.
- Karbon emisyonuna katkı sağlar.
- Toprak verimini artırarak birim alandan daha yüksek miktarda ürün

alınmasını sağlayarak ekstra kazanç sağlar. Verimi %20-%120 oranında artırır.

- Ürünün kalitesini artırır ve homojen ürün deseni oluşturur.

- Toprağın daha iyi havalandmasını sağlar ve su geçirgenliğini artırır.
- Toprağın su tutma kapasitesini artırarak, kuraklığa karşı su kaybını azaltır ve toprak nemini korur.
- Toprak rengini koyulaştırdığı için güneşi daha fazla absorbe eder. Güneş enerjisinden daha fazla yararlanmayı sağlar.
- Organik tarım yetiştiriciliği sağlar.
- Toprakta uzun yıllar kalabildiği için gübre maliyetlerini azaltır.
- Bitkinin dayanımını artırır, dolaylı olarak hastalık ve zararlılara karşı bitkinin dirençli olmasını sağlar (<http://www.marmore.com.tr/>).

2.3. Ağır Metaller ve Biochar Arasında Etkileşim Mekanizması

Biocharın özelliklerinde çok sayıda fonksiyonel faktör vardır. Bunlara hammaddenin kaynağı, sıcaklık ve pirolizasyon koşulları da dahildir. Biocharın sahip olabileceği çok çeşitli özelliklerin bazıları ağır metal ıslahında kullanılması daha uygundur. Bu yüzden, ıslah amaçları için seçilecek biochar için bilim adamları sadece toprak özelliklerine değil biocharın özelliklerini de göz önünde bulundurmamalıdır. Dahası da biocharların tıpkı yüzey alanı gibi, pH, kül ve karbon içeriği gibi özellikleri önemli olarak düşünülmektedir. Çünkü uygulama sonrası ağır metallerin immobilize olma kabiliyetlerini artırır (Lima ve ark., 2014).

Biochar toprak ağır metallerinin fraksiyonlarını ve ağır metallerin toprakta sızma gibi vb. hareketlerini azaltabilirler. Biocharların özelliklerinden bir tanesi de geniş yüzey alanına sahip olmasıdır. Yüzey alanında kompleks ağır metaller için yüksek bir kapasite gösterdiği anlamına gelmektedir. Biocharların ağır metalleri yüzeylerinde absorblama kapasitesi elektron mikroskobu taramasıyla gösterilmiştir (Beesley ve Marmiroli, 2011). Bu absorblama farklı fonksiyonel gruplara sahip ağır metallerin ve biochar ile ağır metallerin katyonlarının tıpkı Ca^{+2} ve Mg^{+2} gibi (Lu ve ark., 2012), K^{+} , Na^{+} ve S^{+} (Uchimiya ve ark., 2011) veya fiziksel adsorblamadan dolayı (Lu ve ark., 2012) değişimlerine bağlıdır. Méndez ve ark. (2009) yapmış oldukları bir çalışmada biocharın değişim içeriğinin Ca^{+2} , Mg^{+2} ve yüksek yüzeyel yük yoğunluğu, ortalama por büyüklüğü ve yüksek oksijene sahip yüzey gruplarının Cu^{+2} absorpsiyonu ile ilişkili olduğunu gözlemlemişlerdir. Muhtemelen absorblama mekanizması toprak ve biocharın mevcut katyonlarının, yüksek oranda toprak özelliklerine bağlıdır. Bazı mevcut diğer

yapılar külde karbonatlar, fosfatlar veya sülfat kirleticiler ile bu yapıların çökmesi ile ağır metallerin stabil kalmasına yardımcı olur.

Biocharların alkalın olması biochar uygulanmış topraklarda alınabilir ağır metallerin düşük konsantrasyonda olmasından sorumlu olabilir. Yüksek pH değerleri biochar uygulamalarından sonra topraklarda ağır metallerin çökmesi ile sonuçlanabilir. Biocharın pH değeri pirolizasyon sıcaklığı ile arttırılabilir (Wu ve ark., 2012).

Ayrıca biochar ağır metallerin hareketliliğini azaltabilir. Ağır metallerin redoks durumlarını değiştirebilir (Choppala ve ark., 2012). Örneğin; biochar uygulaması Cr^{+6} 'dan daha az hareketli Cr^{+3} 'e dönüşebilir (Choppala ve ark., 2012). Farklı biochar uygulamaları tarafından ağır metallerin immobilizasyonu farklı mekanizmalara bağlıdır. Houben ve ark. (2013) gibi bazı araştırmacılara göre çoğunlukla pH üzerine etkisinin olduğu savunulmaktadır.

2.4. Biocharın Ağır Metaller Üzerine Etkisiyle İlgili Yapılan Çalışmalar

Fellet ve ark. (2011) yapmış oldukları bir çalışmada maden kirliliğine maruz kalmış çoklu kontamine toprağı ıslah etmek için biochar uygulamalarını denemişlerdir. Biochar uygulaması toprağın toplam ağır metal içeriğini düşürmemiştir. Fakat biochar uygulaması alınabilir Cd, Pb ve Zn'yu azaltmış, ayrıca Cd, Cr ve Pb'un hareketliliğini düşürmüştür.

Park ve ark. (2011), doğal olarak çok kirlenmiş bir toprağa iki farklı kaynaktan elde edilen biochar uygulamışlardır. Bazı ağır metallerin ekstraksiyonlarının ardışık bir dizi şekilde gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir. Tavuk biocharı uygulamasının ekstrakte edilebilir Cd ve Pb'u azalttığını fakat Cu konsantrasyonunu azaltmadığını tespit etmişlerdir. Yeşil atıklardan elde edilen yeşil atık biocharı ağır metal çalışmalarında daha etkili bir şekilde ağır metalleri azalttığını rapor etmişlerdir. Ağır metal fraksiyonları biochar uygulamasından sonra toprak organik maddesine bağlanmaktadır. Ayrıca her iki biochar uygulaması da Cd, Pb ve toprakta mevcut bulunan porlardaki toprak suyunu azaltmıştır.

Uchimiya ve ark. (2012), toprak ağır metalleri üzerine 10 farklı hammaddeden biochar hazırlamış ve iki farklı pirolizasyon sıcaklığında muamele etmişlerdir. Yüksek veya düşük oranda P ve kül ağır metallerin hareketsizliğini etkilemiştir. Bunun aksine, 700 °C'de hazırlanan biocharlar daha etkili olmuştur. Çünkü sızabilir alifatik fonksiyonel gruplar ve heteroaromatik azot içeren bileşikler ortamdan ayrılmış ve

materyal transformasyonu gerçekleştirmiştir. Nispeten Cu ve Pb'un toprakta daha kolay stabilize olduğunu bulmuşlardır. Ni ve Cd'un ise toprağa uygulanan biocharın hammaddesi ile güçlü bir bağlantısının olduğunu bildirilmiştir.

Beesley ve Marmiroli (2011), biocharın yüzey alanında Zn, Cd ve As'i tuttuğunu tespit etmişlerdir. Bu araştırmacılar biocharın yüzey alanında metalleri absorbe ettiği ve bunun geri dönüşümü olmayan bir aşama olduğunu kanıtlamışlardır. Biocharın Zn ve Cd konsantrasyonunun sızma miktarını sırası ile 300 ve 45 kat azaltmıştır.

Namgay ve ark. (2010), biochar uygulamasından sonra mısır gövdesinde Pb, As ve Cd konsantrasyonunun azaldığını tespit etmişlerdir. Beesley ve ark. (2013), ilginç sonuçlar bulmuştur. Biochar uygulamasından sonra porlarda bulunan toprak suyunda As miktarı artmıştır. Ancak bitkiye geçişini azaltmıştır. Bu durum bize en azından bazı biocharların artan ağır metallerin bitki bünyesine geçişini durdurarak gıda zincirine girişi engellediğini göstermektedir. Karami ve ark. (2011), Pb ve Cu'ca kirlenmiş maden toprağına biochar uygulamışlardır. Biochar maden toprağındaki toprak suyunda bulunan Pb içeriğini azaltmıştır. Biochar yeşil atık kompostu ile kombine uygulandığında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında toprak suyunda bulunan Pb konsantrasyonuna göre 20 kat daha az olduğu tespit edilmiştir. Jiang ve ark. (2012), Pb^{+2} ve Cu^{+2} 'in asitte çözünabilir fraksiyonları biocharın konsantrasyonuna da bağlı olarak sırasıyla %18.8-77 ve %19.7-100 azalmıştır. Park ve ark. (2013), iki biocharın absorblama kapasitesini araştırmışlardır. Tavuk gübresinden elde edilen ve yeşil atık (gübre)'dan elde edilen biochar kullanılmıştır. Tavuk biocharı Cd ve Pb'u hareketsizleştirmede daha etkili olmuştur. Her iki biochar da Pb'u yüksek absorblama özelliğini göstermiştir. Bu durum muhtemelen biocharın bünyesinde bulunan fosfatlar, sülfatlar, karbonatlar ile Pb kompleksi veya Pb'un çökmesi ile oluşmuştur.

Ağır metalleri absorblaması için nasıl bir pirolizasyon koşullarında biochar elde edilmesi gerektiği konusunda araştırmacılar kaygılar taşımaktadır. Bu boşluğu doldurmak için Uchimiya ve ark. (2011) yapmış oldukları bir çalışmada beş farklı sıcaklıkta hazırlanan ağaç ve çim biocharlarını kullanmışlardır. Ayrıca dört farklı sıcaklıkta pirolize olan tavuk gübresinden biochar elde etmişlerdir ve bu biocharların kurşunu azalttığını bildirmişlerdir. İlk deneylerinde ıslah amaçlı yüksek sıcaklıkta pirolizasyon yapmışlardır (650 - 800 °C). Buna ek olarak biocharın ağır metali etkin bir şekilde absorblaması için biocharın yüzey alanında bulunan fonksiyonel gruplarındaki (karboksil, karbonil ve hidroksil) oksijeni artırmasından dolayı uygulama sonrası için diğer oksidantlar veya asitlerin kullanılmasını tavsiye etmişlerdir.

Biochar toprakta uzun süre kalması sonucunda oksidasyon hem biyotik hem de abiyotik etkilerle biocharı değiştirir. Uchimiya ve ark. (2010), biocharlar tarafından ağır metallerin immobilize edildiğini bulmuşlardır. Bu da ağır metalleri çöktürmesi ile immobilize ettiğini açıklamaktadır ve ağır metallerin hareketsizliği sırasıyla $Cu^{+2} > Cd^{+2} > Ni^{+2}$ şeklinde olduğu rapor edilmiştir.

Toprağa toprak solucanları uygulandıklarında toprağın bazı ekolojik özelliklerini iyileştirir ve besin elementleri döngüsü, toprak havalanması, toprak yapısı, organik madde içeriği gibi toprak özelliklerine olumlu etkiler gösterirler. Sizmur ve ark. (2011), toprak solucanı (*Lumbricus terrestris*) ve kompostu ile birlikte biochar kombinasyonunu Cu kirliliğine sahip olan bir toprakta test etmiştir. Tüm uygulamalar (yalnız biochar + biochar + kompost ve biochar + kompost + toprak solucanı) kontrol toprağı ile ağır metal içeriği bakımında karşılaştırıldığında ağır metal içeriğinin azaldığını tespit etmişlerdir. Islah amaçlı toprak solucanları ağır metallerin hareketliliğini sınırlandırır ama bitki ağır metal konsantrasyonunu artırır.

Saptan üretilen biochar kullanılarak özellikle çeltik gövdesinde Cd, Pb ve Zn'nun azaltıldığı rapor edilmiştir. Biochar uygulaması ile çeltiğin gövde uzaması artmıştır. Daha önemlisi ise, bitki ağır metalleri üzerine biochar parçacık boyutunun etkisi olduğunu gösteren çalışmalarda mevcuttur. Araştırmacılar parçacık boyutunun azalması ile bitkide Cd, Zn ve Pb birikiminin azaldığını tespit etmişlerdir. Benzer şekilde Cui ve ark. (2011), buğdayın hasat edilmesinden sonra Cd alımının azaldığını tespit etmişlerdir.

Fahad ve ark. (2015), iki çeltik çeşidinin (IR-64 ve Huanghuazhan) polen özellikleri üzerine yüksek sıcaklık, biochar ve fosfor ile gübrelemenin etkilerini araştırmışlardır. Her iki kültüründe biochar ve fosfor ile gübrenmesi, yüksek ısı ile meydana gelen strese karşı direnç sağlamada oldukça etkili olduğunu ve biocharın diğer streslere karşı koruyuculuk özelliklerinin belirlenmesinin önemini bildirmişlerdir.

Pospíšlová ve ark. (2016), marul bitkisinde biochar, kompost, digestat, linyit ve lignohumat uygulamasından sonra bitki ve topraktaki makro ve mikro besin elementlerinin içeriklerini incelenmişlerdir. Elde edilen sonuçlar eksojen olarak uygulanan organik bileşiklerin makro ve mikro besleyiciler üzerine istatistiksel olarak önemli ölçüde etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Zwart ve Kim (2012), ağaç fidelerinde biochar uygulamalarının *Phytophthora* sp. kaynaklı gövde lezyonlarına karşı direnç artırıcı özelliklerini çalışmışlardır. Biochar ile yapılan toprak iyileştirmelerinin, bitki patojenlerine karşı sistemik direnç

indüksiyonu da dahil olmak üzere çok sayıda fayda sağladığını ifade etmişlerdir. Bu çalışmada *Phytophthora sp.*'ya karşı dirençte biocharın rolü ve etkileri ile direnç mekanizmaları araştırılmıştır. Elde edilen bulgularla, biochar uygulamalarının *Phytophthora* patojenleri tarafından neden olunan hastalık ilerlemesini ve fizyolojik stresi hafifletme potansiyeline sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Huang ve ark. (2015), çeltik fidelerine biochar uygulamalarının, kök boğumunda nematod enfeksiyonlarına duyarlılığını azalttığını tespit etmişlerdir. Çeltik saksılarına %1.2 oranında biochar eklenmesinin köklerde nematod gelişimini azaltmada önemli etkiye sahip olduğunu ve biocharın nematod canlılığı, enfeksiyonite veya gelişimi üzerine doğrudan toksik etki göstermediğini rapor etmişlerdir.

2.5. Fitoremediasyon

Fitoremediasyon bitki fizyolojisi, toprak kimyası ve biyolojisi gibi kombine disiplinleri kapsayan bir şemsiyedir (Cunningham ve Ow, 1996). Hali hazırda topraktan ağır metallerin ıslah edilmesi için pratikte birçok yöntem vardır. Bunlar kapsülleme, kazma ve boşaltma işlemleridir. İmmobilizasyon veya ekstraksiyon yöntemleri pahalı işlemlerdir. Fitoremediasyon işlemi bu yöntemlere göre oldukça ucuzdur. Diğer avantajlarından biride kamuda çevreye yararlı bir teknik olduğu ile ilgili geniş bir kanı vardır. Bir diğer avantajı da kirlenmiş bölgelerde yetiştiricilik yapılmasını sağlamakta, toprakta kontaminenin dağılmasını ve toprak erozyonunu engellemektedir. Fitoremediasyon kontamine bölgelerden bitkiler yardımıyla kirleticilerin ortamdan uzaklaştırılması veya daha az zararlı hale çevirilmesi işlemine denir. Fitoremediasyon nispeten yeni bir teknolojidir ve pek çok araştırma 1990'dan günümüze kadar hızla artan bir şekilde yapılmaktadır.

Fitoekstraksiyon topraktan ağır metallerin ayrılmasını sağlayan ümit vadeden bir tekniktir. Temelinde hiperakümülatörler kullanılır. Bu bitkiler ağır metalleri toprak üstü aksamalarına taşırlar. Hiperakümülatör bitkiler verimlerinde azalma olmaksızın bünyelerinde yaygın olarak kullanılan bitkilerden 100 kat daha fazla ağır metal tutarlar (Chaney ve ark., 2007). Bu bitkiler kuru ağırlıklarına göre Zn ve Mn 10000 mg kg⁻¹'den daha fazla veya Pb veya Ni, Cr, Co, Cu 1000 mg kg⁻¹'den daha fazla Cd'u 100 mg kg⁻¹'den daha fazla biriktirir. Fitoekstraksiyon için kullanılan türler sadece hedef elementi yüksek miktarda biriktirmemeli ayrıca yüksek oranda ağır metallerin toksik etkisini tolere etmeli, yüksek gelişim göstermeli, çevreye ve iklime adapte olmalı, patojen ve

pestisitlere dirençli olmalı, kolaylıkla yetiştirilebilmeli ve gıda zincirine girmemelidir (Ali ve ark., 2013).

Bugüne kadar, 400'den fazla tür hiperakümülatör olarak belirlenmiştir. Bunların 300'den fazlası Ni hiperakümülatörleridir (Li ve ark., 2003). Ni'in aksine, sadece birkaç bitki türü potansiyel Cd, Zn, Pb ve Cu akümülatörü olarak gösterilmiştir. Toprakten ekstrakte edilen metal miktarı sadece bitki türlerine bağılı değildir ayrıca bölgenin iklim ve toprak özelliklerine de bağılıdır (Hongbo ve ark., 2011).

Fitoakümülasyonun sebepleri ve mekanizması halen tam olarak bilinmemektedir. Metal konsantrasyonu kök ile gövde arasında karşılaştırıldığında gövdede daha fazladır. Burada ekolojik rolün etkisi olduğu düşünölebilir. Fitoekstraksiyonun asıl amacı: öncelikle toprak bünyesinde bulunan kirleticiyi topraktan ayırmaktır. İkinci olarak elementlerin fitoekstraksiyonu ile yüksek pazar değerine sahip bitkiler yetiştirmek ve aşamalı olarak toprak kalitesini artırmak ve pazar değerini artırmaktır (Vangronsveld ve ark., 2009).

Fitoremediasyon işlemi ağır metal konsantrasyonunun çok yüksek olan alanlarda kullanımı uygun değildir. Çünkü bitkiler fitotoksisite ile ilgili semptomlar gösterirler. Buna ek olarak fitoakümülatörlerin pek çoğu metal alınımini sınırlandırır, yavaş gelişim ve biyokütlenin de az gelişmesine sebep olur.

Fitoekstraktörlerin potansiyelini değerlendirmek için saksı denemeleri kurmanın iyi bir yaklaşım olacağını düşünölmektedir. Ancak sera çalışmaları ağır metal alınımini üzerine arazi çalışmalarının yerini alamaz. Çünkü sera çalışmalarında kullanılan toprak arazi çalışmalarında kullanılan toprak ile aynı olsa bile ağır metallerin alınıminde arazi çalışmalarında alınımini daha yüksektir. Bu durum toprak nemi ve mikroklimanın farklılığından kaynaklanabilmektedir.

Fitostabilizasyon bir diğer fitoremediasyon tekniğidir ve maden atıklarının sebep olduğu kirliliğı stabil seviyede tutmak için kullanılır (Conesa ve ark., 2007). Bu yüzden, kökler su erozyonunu ve sızıntıyı önlerken rüzgar erozyonu ile oluşan dispersiyonun dağılımını azaltır ve ağır metallerin hareketsizleşmesine katkıda bulunur. Fitostabilizasyon mekanizmasına metal iyon değerlerinin azalması, metal kompleksleri, kökün absorbasyon potansiyeli ve yağış miktarı etkiler. Fitostabilizasyonun aksine fitoekstraksiyonun önceliğı ağır metallerin bitki dokularından olmayıp kök rizosfer bölgesinden ayrılmasına odaklanılmaktadır.

2.6. Biochar ve Fitoremediasyonun Kombine Uygulanması

Burada iyileştirme ile ilgili literatürlerde çok sayıda raporlar mevcuttur. Örneğin; Komárek ve ark. (2013), ağır metallerin biyoalınabilirliğinin kompost ve kireç uygulaması ile azaldığını tespit etmişlerdir. Bu yüzden fitoremediasyonlarda kombine bir şekilde uygulanabilir (de Abreu ve ark., 2012). Daha öncede bahsedildiği gibi biocharlar, ağır metallerin bitkiler tarafından alınımını azaltır ve ağır metallerin toprakta stabil olarak bulunmalarını da sağlayabilir.

Biochar bitki gelişimini artırdığı literatürlerde belirtilmiştir. Bu yüzden fitoremediasyonların etkilerini artırmak için biochar potansiyeli kullanılabilir. Bitki üretimindeki bu artış nitel olarak ortalama % 10'dur (Liu ve ark., 2013). Liu ve ark. (2013), biocharın bitki üretimindeki elde ettikleri asimetrik verilere göre verim artışını etkileyen birçok faktörün olduğunu tespit etmişlerdir. Bugüne kadar, birçok arazi genellikle 1-2 yıllık veya laboratuvar şartları altında 1-2 ay inkübasyona tutularak çalışmalar yapılmıştır ve birçok veri setleri elde edilmiştir. Ayrıca bu setlerdeki veriler ılıman bölgelerde yapılan çalışmalara göre daha fazla tropik bölgelerdeki çalışmaları içermektedir.

Biochar uygulamaları bitki gelişimi, besin elementlerinin dönüşümü, toprağın biyolojik özelliklerini, katyon değişim kapasitesini ve toprak suyunun artırılmasına katkıda bulunmaktadır. Besin elementlerinin muhafazası, toprak pH'nın artarak değişmesine etkisi bulunmaktadır. Bu etkilerinin birçoğu sinerjik olarak birbirlerine bağlantılıdır. Genellikle asidik topraklar kaba veya orta tekstüre (toprak bünyesi) sahip olduğu için bitki üretimi daha azdır (Liu ve ark., 2013).

Son yıllarda bilimsel komiteler biocharın toprağı iyileştirdiğini ve ayrıca hastalıklara karşı bitkilerin cevap mekanizmasını geliştirdiğinin farkına varmışlardır (Graber ve ark., 2010). Daha öncede bahsedildiği gibi, biochar toprakta bulunan mikrobiyal topluluğunu değiştirebilir. Toprakta bulunan yararlı mikroorganizmaları artırarak patojenlere karşı bitkileri koruyabilir ve antibiyotik üretimini artırabilir. Bir diğer mekanizmada ise toprak mikrobiyotasında bulunan mevcut patojenlerin bazılarını kinonlar, etilen glikol, bütirik asit, hidroksi propanoik asit, benzoik asit ve 2-fenooksietanol gibi biocharlarda bulunan bileşiklerle baskılayabilir (Elad ve ark., 2012).

Prensip olarak, biochar potansiyel olarak bitki verimini artırmak için herhangi bir materyalden hazırlanabilir ve fitoremediasyon için kullanılabilir. Fakat atık çamurundan biochar elde edilip bunun kullanımı genellikle bitki performansı üzerine

olumsuz etki yapar (Jeffery ve ark., 2011). Dikkat edilmesi gereken bir diğer husus ise atık çamurundan elde edilen biochar'da mevcut ağır metaller hareketli formda değildir (Méndez ve ark., 2012). Uzun bir süre fitoekstraktörlerin mikorizaya sahip olmadığı düşünülmüştür. Fakat son zamanlarda yapılan çalışmalarda arbusküler mikoriza fungi (AMF)'lerde hiperakümülatörlerle simbiyotik bir ilişkisi olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, AMF'ler bitki büyümesini artırır (Orłowska ve ark., 2011). Genellikle biocharın AMF'lerde olumlu etkisi bulunmasına rağmen, besin element içeriği bakımından zengin topraklarda beklenen durumun dışında olduğunu tespit etmişlerdir (Lehmann ve ark., 2011).

Bitkilerin kullanımı ile fitoremediasyon birlikte kombine edilerek kullanımı son zamanlarda ilgi çekici olmaktadır (de Abreu ve ark., 2012). Ağır metal kirliliğine sahip topraklar gıda üretimi için uygun değil iken, ekilen hiperakümülatör bitkiler toprak kirliticilerini azaltır ve toprakta bulunan depo organik madde içeriğini artırır (Hartley ve ark., 2009). Hartley ve ark. (2009), sert ağaç kabuklarından elde ettikleri biochar ile *Miscanthus* (Tropik bölgelerde bulunan uzun çim) ile birlikte üç farklı özelliğe sahip toprağa uygulamış ve bitkilere As transferinin olmadığını tespit etmişlerdir. Fakat araştırmacılar alkalik biocharlarda As'nin hareketli olabileceği konusunda uyarılmışlardır. Bunun sebebi ise As'nin toprak pH'sına bağlı olarak diğer metallerle daha farklı davranış göstermesinden kaynaklanmaktadır.

Farklı bitki türleri ve farklı biocharlar kullanılarak multikontamine (çok kirliliğe sahip) topraklar için *Miscanthus* biocharı ile birlikte fitoekstraktör kullanımı Zn ve Cd için, *Brassica napus* L. kullanılarak Cd kirliliğine sahip topraklarda hedef teknik olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir (Houben ve ark., 2013). Houben ve ark. (2013), biocharın Cd ve Zn'nun fitoekstraksiyonunun *Brassica napus* tarafından baskılandığını belirtmiştir. Biochar ve *Brassica napus* fitostabilizasyon için alternatif olarak kullanılabilir. Fellet ve ark. (2011), meyve bahçelerinden topladıkları ağaç karışımlarından ürettikleri ağaç pellet biocharı iki farklı dozda karıştırdıkları hayvan gübresi ile uygulamışlardır. Ağaç pellet biocharında bitkiler gelişirken içinde bulundurdıkları Pb miktarı yüksek konsantrasyonda olduğu tespit edilmiştir. Fakat bu uygulama ile verim ile birlikte translokasyon indeksi hiçbir artış olmadığı gözlemlenmiştir. Kontrol grubundan önemli derecede yüksek olmasına rağmen fitoekstraksiyon amaçları için yetersiz kalmıştır. Genel olarak, gübrelerden elde edilen biochar bitki biyokütlesini (biyomas) önemli derecede artırmaktadır.

Biochar ve fitoesktraktörlerin kombine kullanımı mutikontamine topraklarda en mantıklı yaklaşım olarak düşünülebilir. Burada hedef farklı elementlerdir. Ayrıca biochar bir toprak düzenleyicisi olarak da maden kirliliğine sahip, asidik karakterli topraklarda bitkileri kolonize etmek için kullanılabilir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Tohumların Temini ve Saklanması

Tez çalışmasında kullanılan Ekiz buğday çeşidine (*Triticum aestivum* L. cv. Ekiz) ait tohumlar Bahri Dağdaş Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Tohumlar tez çalışması gerçekleştirilinceye kadar +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.2. Uygulama Dozlarının Belirlenmesi ve Denemelerin Kurulması

Tez çalışmasında kullanılacak biochar Synpet Teknoloji isimli firmadan temin edilmiştir. Büyük deneme kurulmadan önce tez çalışmasında en uygun biochar ve kobalt uygulama dozlarını belirlemek için ön deneme kurulmuştur. Laboratuvar ortamında dolgun görünüşlü ve aynı boyutta buğday tohumları seçilerek yüzey sterilizasyonu işlemi gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyonda tohumlar % 2.5'lik sodyum hipoklorid içerisinde 10 dakika tutulduktan sonra steril deiyonize su ile yıkanmıştır. Ardından tohumlar 20'şerli gruplar halinde içerisinde steril saf su ıslatılmış kurutma kağıdı bulunan steril petri kutularında 24±1 °C'de, karanlık ortamda inkübatör içerisinde çimlenmeye bırakılmıştır. 72 saat sonunda çimlenen tohumlar, 12 saat aydınlık (350 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde, 24 °C sıcaklık, % 50 nem) ve 12 saat karanlık (21 °C sıcaklık ve % 60 nem) ışık periyodunda su kültürü ortamına aktararak iklim odasında 21 günlük fideler haline getirilmiştir. Buğday fideleri gruplandırılarak en uygun biochar konsantrasyonları için 0, 1 g L⁻¹, 3 g L⁻¹, 5 g L⁻¹, 10 g L⁻¹ ve 20 g L⁻¹ dozları bir hafta süresince buğday fidelerine uygulanmıştır. Buğday fidelerinde kobalt stresi için CoCl₂ kullanılmıştır. En uygun kobalt konsantrasyonları için fideler 50, 100, 150, 200, 300 ve 600 μM 'lık Co'a 7 gün süresince maruz bırakılmıştır. Fidler uygulamanın 7. gününde hasat edilerek analizlere kadar -80 °C'de saklanmıştır. Ardından örneklerde TBARS ve H₂O₂ analizleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlarla en uygun biochar dozlarının 1 ve 3 g L⁻¹, kobalt stresi için ise 150 ve 300 μM 'lık Co konsantrasyonları tez çalışmasında kullanılmak üzere belirlenmiştir.

Tez çalışmamızın ana denemesi kurulurken yukarıda belirtildiği gibi Ekiz çeşidine ait buğday tohumları yüzey sterilizasyonuna maruz bırakılmış ardından çimlenen tohumlar içerisinde yarım kuvvet Hoagland çözeltilisi içeren hidroponik ortama

aktarılarak fideler kontrollü şartlarda 21 günlük hale getirilmiştir. 21. günün sonunda fideler 7 gün süresince kontrol, biochar, yalnız kobalt ve kobalt + biochar uygulamalarına maruz bırakılmıştır. 7 günlük stres ve biochar uygulamalarının ardından örnekler hasat edilerek kök ve sürgünler birbirinden ayrılmış, fizyolojik parametreler ve klorofil flüoresans ölçümlerinin sonrasında sıvı azot ile şoklanarak analizlere kadar -80 °C’de saklanmıştır.



Şekil 3.1. 21 süresince su kültüründe yetiştirilen buğday (*Triticum aestivum* L.) fidelerinin genel görünümü

3.3. Fizyolojik Ölçümler

3.3.1. Yaprakların nisbi su içerikleri

Kobalt stresi ve biocharın yaprak nisbi su içeriklerinde meydana gelen değişimleri belirlemek için her bir gruptan eşit uzunlukta 6’şar yaprak alınarak yaş (YA), turgorlu (TA) ve kuru (KA) ağırlıkları ölçülmüştür. Ardından yaprak su içerikleri;

$$\text{Nisbi Su İçeriği} = [(YA-KA)/(TA-KA)] \times 100$$

formülüne göre % olarak hesaplanmıştır (Smart ve Bingham, 1974).

3.3.2. Bağlı sürgün büyüme oranı

7 gün süresince kontrol, yalnız strese ve stresle birlikte biochara maruz bırakılan buğday fidelerinin bağlı sürgün büyüme oranları; 0. ve 7. günde hasat edilen sürgünlerin kuru sürgün ağırlıkları alınarak;

$$\text{Bağlı Sürgün Büyüme oranı: } (KA_2 - KA_1)/(H_2 - H_1)$$

(KA₁: 1. Hasattaki sürgün ağırlığı (g), KA₂: 2. Hasattaki sürgün ağırlığı (g), H₁: 1. Hasat süresi, H₂: 2. Hasat süresi)

formülüne göre hesaplanmıştır (Hunt ve ark., 2002).

3.3.3. Yaprakların ozmotik potansiyel değişimleri

Stres ve biochar uygulamalarının sonrasında her bir gruba ait 5'er yaprağın ozmotik potansiyellerinde meydana gelen değişimler Wescor 5600 marka ozmometre ile mmol kg⁻¹ olarak ölçülmüştür. Ardından ölçülen değerler Santa-Cruz ve ark. (2002)'a göre 2.408×10^{-3} katsayısıyla çarpılarak MPa'ya dönüştürülmüştür.

3.4. Klorofil Flüoresans Ölçümleri

Hasat işlemleri sırasında klorofil flüoresans ölçümleri, kobalt ve biochar uygulamalarının 7. gününde, her bir gruba ait 5 farklı bitkinin en genç katlanmamış yaprakları kullanarak gerçekleştirilmiştir. Her gruptan yaklaşık 1 cm² yüzey alanına sahip yaprak örnekleri alınarak, 20 dakika boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Buğday fidelerinin kobalt stresine gösterdiği yanıtları ve biocharın fotosentetik aygıtların korunmasında önemli rolünün olup olmadığını anlamak için bitki verim analiz cihazı (Plant Efficiency Analyser-Hansatech Instruments Ltd.) ile PS-II'nin fotokimyasal verimi (*Fv/Fm*)'nin tespiti önemli bir parametredir.

3.5. Buğday Yapraklarında Gerçekleştirilen Biyokimyasal Parametre Ölçümleri

Tez çalışmamızda biocharın kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında stresin olumsuz etkilerini azaltmadaki rollerini tespit edebilmemiz için yapraklarda;

- 1- Yaprakların protein içeriklerinin tespiti,
 - 2- Lipid peroksidasyon oranlarının belirlenmesi,
 - 3- Yapraklardaki prolin değişimlerinin belirlenmesi,
 - 4- Yaprakların hidrojen peroksit içeriklerinin belirlenmesi,
 - 5- Yaprakların hidroksil süpürülme aktivitelerinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesi,
 - 6- Yaprak enzim ekstraktlarının hazırlanması,
 - 7- Antioksidan enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesi;
 - 7.1. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesinin densitometrik olarak belirlenmesi,
 - 7.2. Katalaz enzim aktivitesinin belirlenmesi,
 - 7.3. Peroksidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi,
 - 7.4. Askorbat peroksidaz enziminin aktivite tayini,
 - 7.5. Glutasyon redüktaz enziminin aktivite tayini,
 - 7.6. Monodehidroaskorbat redüktaz enziminin aktivite tayini,
 - 7.7. Dehidroaskorbat redüktaz enziminin aktivite tayini,
 - 7.8. NADPH oksidaz aktivitesi
- gibi biyokimyasal ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3.5.1. Yaprakların protein içeriklerinin tespiti

Stres ve biochar'a maruz bırakılan buğday yaprakların protein içerikleri, modifiye edilmiş Bradford (1976)'a göre, bovin serum albümin (BSA) standart olarak kullanılarak belirlenmiştir. Standartlar 0.01-0.8 mg/ml aralığında hazırlanmıştır.

3.5.2. Lipid peroksidasyon oranlarının belirlenmesi

Stres altında meydana gelen hasarın şiddetini en iyi şekilde gösteren lipid peroksidasyon (TBARS) değişimleri, malondialdehit (MDA) içeriğinin ölçülmesiyle belirlenmiştir. TBARS içeriği, Rao ve Sresty (2000)'nin metodunda ufak değişiklikler yapılarak tespit edilmiştir. Bunun için şoklanmış halde bulunan 0.5 g yaprak örneği, trikloroasetik asit (TCA) ile homojenize edilmiştir. 10.000g x 5 dk santrifüjden sonra

tüplere aktarılan süpernatanta, tiobarbitürik asit (TBA) ve TCA içeren reaksiyon karışımı pipetlenmiş ve 95 °C'de 45 dk ısıtılmıştır. Soğutma işleminden sonra karışım 10.000g x 15 dk santrifüjlenmiştir. Ardından süpernatantın 532 ve 600 nm'deki absorbans değerleri okunmuştur. TBARS konsantrasyonu, $\epsilon=155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmış ve $\mu\text{mol g}^{-1}$ YA olarak ifade edilmiştir.

3.5.3. Yapraklardaki prolin değişimlerinin belirlenmesi

Bates ve ark. (1973)'nın metoduna göre yapılmış olan prolin içeriklerinde meydana gelen değişimler gözlenmesi strese tolerans açısından büyük öneme sahiptir. Hasat edilen buğday yapraklarından 0.1'er g alınarak % 3'lük 5-sülfosalisilik asit hidrat ile homojenize edilmiştir. 6.000g x 5 dk santrifüjden sonra süpernatanta asit ninhidrin ve glasiyel asetik asit eklenerek 95 °C'de 90 dk süre su banyosunda bekletilmiştir. Soğutma işlemi gerçekleştirildikten sonra karışıma toluen ilave edilerek, sıvı fazdan aspire edilen toluen fraksiyonunun 520 nm'deki absorbansı spektrofotometrede okunmuştur. Prolin içerikleri daha önceden hazırlanmış olan kalibrasyon eğrisi yardımıyla hesaplanmıştır ve $\mu\text{mol prolin g}^{-1}$ YA olarak belirtilmiştir.

3.5.4. Yaprakların hidrojen peroksit içeriklerinin belirlenmesi

Reaktif oksijen türlerinden birisi olan H_2O_2 içerikleri, Cheeseman (2006)'nın yöntemine göre yapılmıştır. Yaprakların H_2O_2 içeriği eFOX reaktifi (250 μM ferro amonyum sülfat, 100 μM xilenol orange, 100 μM sorbitol ve % 1 etanol (v/v)) kullanılarak ölçülmüştür. Ekstraksiyon için 25 mM H_2SO_4 içeren soğuk aseton kullanılmıştır. Numuneler 5 dakika boyunca 3.000 x g'de 4 ° C'de santrifüj edilmiş ve 50 μL süpernatant için 950 μL eFOX reaktifi kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 550 ve 800 nm'de absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Örneklerdeki H_2O_2 konsantrasyonları, bilinen H_2O_2 miktarlarına göre hazırlanan standart eğim grafiğine göre hesaplanmıştır.

3.5.5. Hidroksil radikali süpürülme aktivitelerinin belirlenmesi

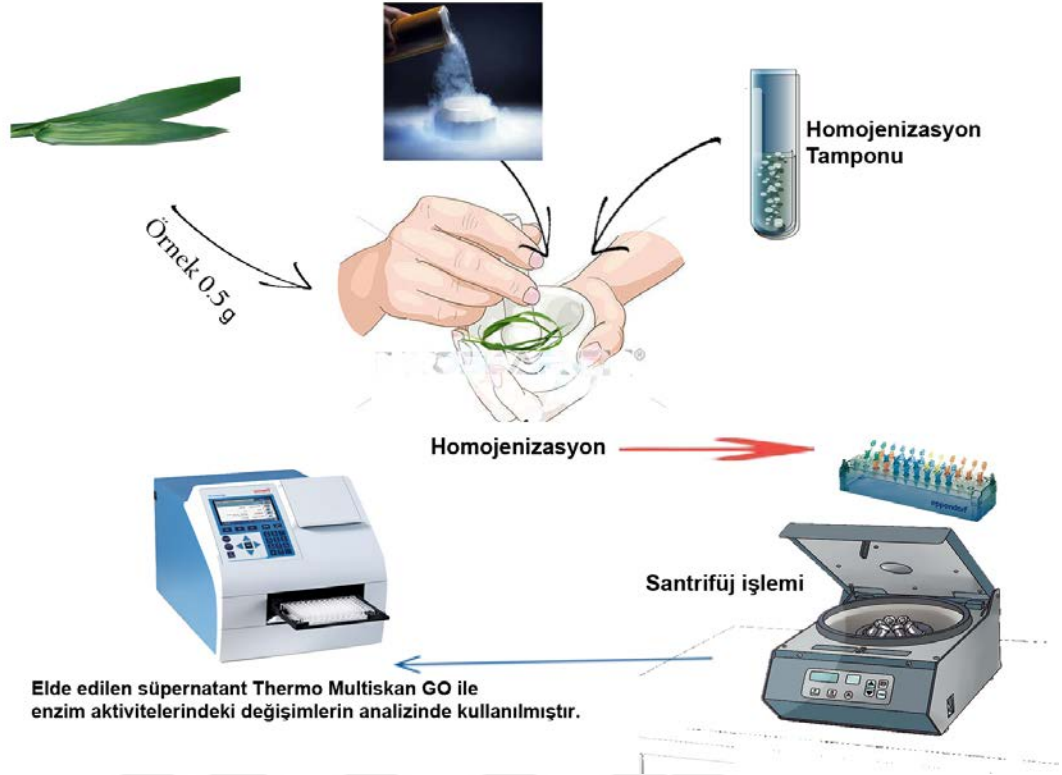
Stres ve/veya biochar uygulamaları altındaki buğday yapraklarının hidroksil (OH[•]) radikali süpürülme aktivitelerinde meydana gelen değişimler Chung ve ark. (1997)'lerinin metotlarında küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz işlemindeki tüm çözeltiler taze olarak hazırlanmıştır. Fe⁺³/askorbat/EDTA/H₂O₂ sisteminden üretilen OH[•] radikallerine karşı deoksiriboz ve örnek arasındaki rekabet OH[•] süpürme aktivitesinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı ve 75 µl örnek 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Test tüplerine 0.75 ml % 2.8'lik TCA ve 0.75 ml % 1'lik TBA eklenmiş ve 30 dakika kaynatılmıştır. Soğutma işleminden sonra karışımın, 520 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. OH[•] süpürülme aktivitesi, hidroksil radikali tarafından 2-deoksiriboz oksidasyonunun inhibisyon oranı olarak aşağıdaki formüle göre değerlendirilmiştir.

$$\text{Hidroksil radikali süpürülme aktivitesi (\%)} = [(A_0 - A_1)/A_0] * 100$$

$$A_0 = \text{Körün Absorbansı}, A_1 = \text{Örnek Absorbansı}$$

3.5.6. Yaprak enzim ekstraktlarının hazırlanması

Enzim ekstraksiyonları ± 4 °C'de gerçekleştirilmiştir. Hasat edilen her bir gruptaki 0.5'er gram yaprak örneği, soğutulmuş havanda sıvı azot yardımıyla, 0.1 mM EDTA, % 0.1 (v/v) Triton-X 100, 1 mM PMSF, ve % 2 (w/v) PVPP içeren 50 mM Tris-HCl (pH 7.8) tamponuyla homojenize edilmiştir. APX ekstraksiyonu için 5 mM askorbat içeren homojenizasyon tamponu kullanılmıştır (pH 7.8). Homojenizat 4 °C'de 10.000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiş ve oluşan süpernatant, protein içeriğinin belirlenmesinde ve enzim aktivitelerinin tayin edilmesinde kullanılmıştır. Tüm spektrofotometrik ölçümler Shimadzu UV-1800 ve Thermo Multiskan GO ile yapılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Enzim ekstraktlarının hazırlanması

3.5.7. Antioksidan enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesi

3.5.7.1. Süperoksit dismutaz enzim aktivitelerinin ve izozim profillerinin belirlenmesi

Beauchamp ve Fridovich (1971)'e göre Süperoksit dismutaz (SOD) izozimlerinin elektroforetik ayrımı riboflavin ve NBT ile boyama yapılarak gerçekleştirilmiştir. 50 µg protein içeren örnekler, denatüre olmayan (SDS içermeyen) poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)'ne tabi tutulmuştur (Laemmli, 1970). SOD örnekleri 4 °C'de sabit akım altında (120 mA), % 5 toplayıcı jel (stacking gel) ve % 12 ayırıcı jelde (seperating gel) yürütülmüştür. Elektroforezden sonra farklı SOD izozimleri, boya çözeltisine inhibitörler eklenerek belirlenmiştir. Potasyum siyanür (KCN), Cu/Zn-SOD inhibisyonu için, H₂O₂ ise Fe-SOD ve Cu/Zn-SOD inhibisyonu için boya çözeltisine eklenmiştir. Mn-SOD aktivitesi ise her iki inhibitöre de direnç göstermiştir. Total SOD aktiviteleri Biorad Image Lab. Version 4.01 software programıyla densitometrik yöntemle tespit edilmiştir.

3.5.7.2. Katalaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Yaprakların katalaz (CAT) enzim aktivitelerinde gözlenen değişimler, Bergmeyer (1970)'in metoduna göre gerçekleştirilmiştir. H_2O_2 'in miktarında oluşan azalma, 240 nm'de maksimum absorbanstaki düşüşle belirlenmiştir. 250 μ l'lık son hacme sahip kuvvetlerdeki reaksiyon karışımı; 0.1 mM EDTA, 50 mM Na-fosfat tamponu (pH 7), deiyonize su ve % 0.3 H_2O_2 'den oluşmaktadır. 180 sn boyunca absorbansta oluşan düşüş takip edilmiştir. CAT aktivitesi, dakikada harcanan μ mol H_2O_2 olarak ifade edilmiştir.

Katalaz (CAT) izozimlerinin elektroforetik ayrımı; CAT izozimleri Woodbury ve ark. (1971) tarafından tanımlanan metoda göre belirlenmiştir. 25 μ g protein içeren örnekler, % 7.5'luk denatüre olmayan jelde yürütüldükten sonra, jeller % 0.01 H_2O_2 'de 5 dakika inkübe edilip deiyonize su ile yıkanmıştır. Daha sonra jeller % 1 $FeCl_3$ ve % 1 $K_3Fe(CN)_6$ içeren çözeltide 20 dakika boyamaya alınmıştır. Yeşil renkte görünmeye başlayan jeller deiyonize su ile yıkanmıştır.

3.5.7.3. Peroksidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Yaprakların peroksidaz (POX) aktivitesi Herzog ve Fahimi (1973)'ye göre belirlenmiştir. Spektrofotometrede 465 nm dalga boyunda DAB'ın oksidasyonu ile birlikte absorbansta meydana gelen artış takip edilerek POX enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Reaksiyon karışımı, DAB, % 0.6'lık H_2O_2 , deiyonize su ve enzim ekstraktından oluşmaktadır. Reaksiyon, ortama H_2O_2 'in katılmasıyla başlatılmış ve 180 sn boyunca absorbans artışı takip edilmiştir. Spesifik enzim aktivitesi, dakikada tüketilen μ mol ml^{-1} H_2O_2 olarak ifade edilmiştir.

Peroksidaz izozimlerinin elektroforetik ayrımı SeEVERS ve ark. (1971)'na göre yapılmıştır. 25 μ g protein içeren örnekler % 10'luk nativePAGE'e yüklenerek sabit akım altında (120 mA) yürütülmüştür. Yürütme işleminden sonra oluşan bantları görebilmek için jeller 15 dakika boyunca, benzidin ve hidrojen peroksit içeren 200 mM Na-asetat tamponunda (pH 5.0) inkübe edilmiştir. Daha sonra jeller deiyonize su ile yıkanmıştır.

3.5.7.4. Askorbat peroksidaz enziminin aktivite tayini

Askorbat peroksidaz (APX) enziminde meydana gelen aktivite değişimleri Nakano ve Asada (1981)'ya göre gerçekleştirilmiştir. Askorbat okside oldukça, 290 nm'deki absorbansta oluşan azalma okunmuş ve hesaplamalar askorbatın ekstinksiyon katsayısı olan $2.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyon karışımı içerisinde; 50 mM Na-P tamponu (pH 7), 0.5 mM askorbat, 0.1 mM EDTA Na_2 ve 1.2 mM H_2O_2 bulunmaktadır. Askorbatın oksidasyonu, enzim ekstraktının katılmasıyla başlatılmış ve absorbanstaki azalma 180 sn boyunca takip edilmiştir. 1 birim APX aktivitesi, dakikada okside olan 1 mmol ml^{-1} askorbat olarak ifade edilmektedir.

Mittler ve Zilinskas (1993)'ın yöntemine göre APX izozimlerinin belirlenmesinde küçük modifikasyonlar yapılmıştır. Örnekler yüklenmeden önce jeller 2 mM askorbat içeren tamponda 30 dakika yrtlmştir. Daha sonra $40 \mu\text{g}$ protein içeren örnekler jele yüklenerek sabit akım altında (60 mA) yrtlmştir. Yürütme işleminin ardından jeller 2 mM askorbat içeren 50 mM K-P (pH 7) tamponunda 20 dakika inkübe edilmiş ve sonra 4 mM askorbat ve 2 mM H_2O_2 içeren 50 mM K-P (pH 7.8) tamponunda 15 dakika bekletilmiştir. Ardından jeller tamponla 1 dakika yıkanmış ve 28 mM TEMED ve 2.5 mM NBT içeren 50 mM K-P tamponuna alınmış ve ışıkta 10-20 dakika bekletilerek bantların görünür hale gelmesi sağlanmıştır.

3.5.7.5. Glutasyon redüktaz enziminin aktivite tayini

Foyer ve Halliwell (1976)'in metoduna göre yapılan glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi, spektrofotometrede 340 nm dalga boyundaki absorbands azalmasından yola çıkılarak tespit edilmiştir. NADPH varlığında, GSSG miktarındaki azalma, kuvartz küvette, 180 sn boyunca takip edilmiştir. Hesaplamalar, GR enziminin ekstinksiyon katsayısı $\epsilon=6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak yapılmıştır. Spesifik enzim aktivitesi, dakikada indirgenen 1 mmol ml^{-1} GSSG miktarı olarak ifade edilmektedir.

3.5.7.6. Monodehidroaskorbat redüktaz enziminin aktivite tayini

Hossain ve ark. (1984)'nın yöntemi izlenerek gerçekleştirilen monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) aktivite değişimlerinin reaksiyon karışımı; 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.2 mM NADPH, 2.5 mM AsA, 0.5 nite askorbat oksidaz

(AO) içermektedir. Reaksiyon AO'nun eklenmesiyle başlamıştır. MDHAR aktivitesi 340 nm'de 1 dakika süresince absorbansta meydana gelen değişim izlenip $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.5.7.7. Dehidroaskorbat redüktaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Nakano ve Asada (1981)'nin yöntemine göre tespit edilen dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) aktivitesinin reaksiyon karışımı; 50 mM K-P (pH 7.0), 2.5 mM GSH ve 0.1 mM DHA içermektedir. Aktivite örnek solüsyonuna reaksiyon karışımının eklenmesiyle başlamıştır. Aktivite 265 nm'de 1 dakika absorbansta meydana gelecek değişime göre $14 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.5.7.8. NADPH oksidaz aktivitesi

XTT'nin 470 nm'de indirgenmesi izlenerek gerçekleştirilen total NADPH oksidaz (NOX) aktivitesinde, Jiang ve Zhang (2002)'in yöntemi takip edilmiştir. NOX izozim profilleri Sagi ve Fluhr (2001)'un metodu ile ortaya konulmuştur. Jellere 25 µg protein içeren örnekler yüklenmiştir.

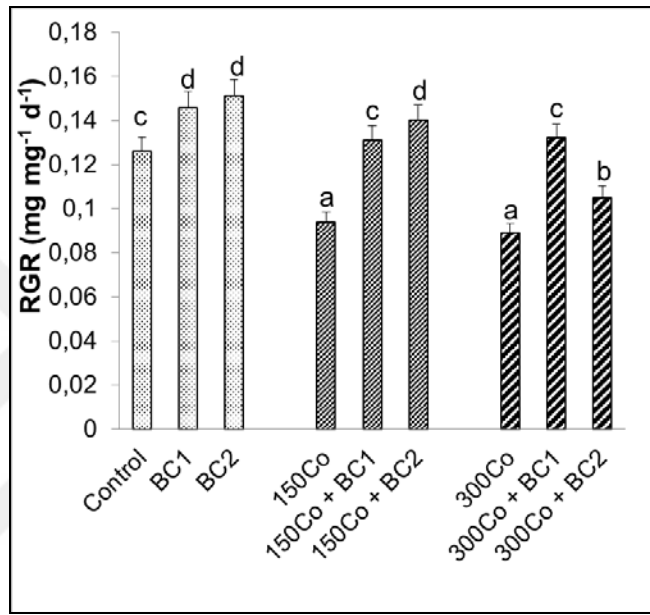
3.6. İstatistiksel Analizler

Tez çalışması süresince deneme en az 3 kez tekrar edilmiş ve büyüme parametreleri dışında (n=10) her bir analiz 2 tekrardan oluşmaktadır (n=6). Elde edilen veriler ANOVA ile analiz edilmiş ve ortalamalar arasındaki farklılıklar LSD testi ile karşılaştırılmıştır. $P < 0.05$ olan değerler istatistiksel bakımdan anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS programı (versiyon 23.0) ile gerçekleştirilmiştir. Bütün şekillerdeki hata çubukları ortalama standart hatayı göstermektedir ve çizelgelerdeki değerler ortalama şeklinde verilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Büyüme Parametrelerinde Meydana Gelen Değişimler

Kobalt stresine maruz bırakılan buğday yapraklarında biochar uygulamalarının bağıl sürgün büyüme oranlarında (RGR) meydana getirdiği ortalama değişimler Şekil 4.1’de verilmiştir.



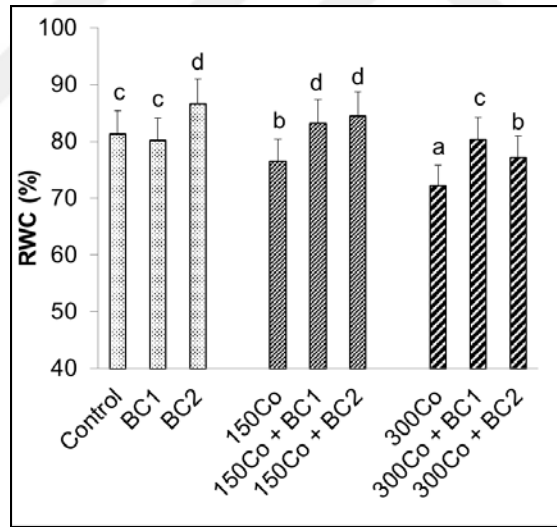
Şekil 4.1. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının bağıl sürgün büyüme oranlarında (RGR) meydana getirdiği ortalama değişimler (n=5). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir (P < 0.05).

Stres uygulamaları buğday fidelerinin RGR’lerinde önemli oranda azalmaya neden olmuştur. En yüksek RGR düşüşüne yalnız 300 μ M Co’a maruz bırakılan fidelerde rastlanmıştır. Stresle birlikte biochar uygulamaları fidelerin RGR oranlarını önemli oranda artırmıştır. Hatta düşük dozda kobalta maruz bırakılan fidelere uygulanan her iki dozdaki biochar, RGR’yi kontrol seviyesine veya kontrol seviyesinin de üzerine çıkarmıştır. 150 μ M Co + 1 g L⁻¹ ve 150 μ M Co + 3 g L⁻¹ uygulanan buğday fidelerindeki artış oranları sırasıyla (150 μ M Co ile karşılaştırıldığında) % 39.3 ve % 48.9’dur. Tüm deneme süresince yalnız biochar uygulamaları ise sürgünlerin RGR’lerini kontrole göre pozitif yönde etkilemiştir.

Bitki büyümesi, belirli bir zaman ölçeğinde birim kütle büyümesini temsil eden nisbi büyüme oranı (RGR) ile değerlendirilebilir (Kartika ve ark., 2018). Bitkilerde

RGR ölçümleri, kobalt gibi ağır metale maruz bırakılan bitkilerin strese karşı verdikleri tepkilerin ölçülmesinde uygulanan önemli bir fizyolojik analizdir (Leblebici ve ark., 2011). Li ve ark. (2017)'ı ağır metal stresine altındaki *Cynodon dactylon* fidelerinin RGR oranlarında azalmanın olduğunu rapor etmişlerdir. Bu araştırmacılar Cd stresi altındaki fidelere eksojen olarak Cd'a karşı toleranslı *Aspergillus aculeatus* isimli fungusu uygulamışlardır. Fungusun uygulanmasıyla birlikte ağır metal stresinin olumsuz etkilerinin hafifletilmesi sağlanmıştır. Li ve ark. (2017), bulgularımızı destekler nitelikte *Cynodon* fidelerinin *Aspergillus aculeatus* uygulamalarıyla birlikte RGR'lerinde önemli oranda artışların olduğunu rapor etmişlerdir. Şekil 4.1'de görüldüğü gibi yalnız veya stresle birlikte biochar uygulamaları RGR'yi artırmıştır. Kartika ve ark. (2018), toprağa biochar uygulamalarının RGR'de artışa neden olduğunu belirtmeleri sonuçlarımızla örtüşmektedir.

Biochar uygulamalarının kobalt stresine maruz bırakılan buğday yapraklarında nisbi su içeriklerinde (RWC) meydana getirdiği ortalama değişimler Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



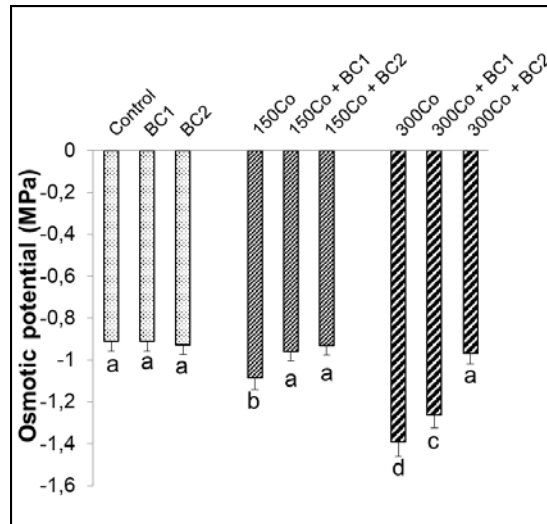
Şekil 4.2. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının yaprak nisbi su içeriklerinde (RWC) meydana getirdiği ortalama % değişimler (n=5). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir (P < 0.05).

Yalnız biochar uygulanan buğday yapraklarının RWC değerlerinde kontrole göre ya önemli değişiklik gözlenmemiş (1 g L^{-1}) yada % 6.5 oranında artış tespit edilmiştir (3 g L^{-1}). Her iki konsantrasyondaki kobalt uygulaması da RWC'yi önemli oranda azaltmış, kontrole göre azalma oranları sırasıyla % 5.9 ve % 11.2'dir. Stresle birlikte biochar uygulamalarında RWC pozitif yönde etkilenmiştir. Yalnız $300 \text{ } \mu\text{M}$

kobalt stresi uygulanan grupla kıyaslandığında kombinasyonlu gruplardaki artış oranları sırasıyla % 11.2 ve % 6.8'dir.

Topraktaki ağır metal konsantrasyonları bitkilerde ozmotik bozukluklara neden olabilir. Köklere su girişi dolaylı olarak metallere etkilenebilir. Ağır metal stresiyle birlikte ana kök uzaması ve sekonder büyümede azalma, artan kök kaybı veya toksik iyonların neden olduğu kök tüylerinin azalması, su alımı ve bitkinin su durumu üzerinde zararlı bir etki gösterir. Metaller hem simplastta hem de apoplastta kısa-mesafeli su transferini yavaşlatabilir, bu da suyun vasküler sisteme girmesini engelleyerek sürgünlere su taşınımını sınırlandırır (Rucinska-Sobkowiak, 2016). Tezimizde Co stresi RWC üzerine olumsuz etki göstermiştir. Kobalt konsantrasyonundaki artışla ters orantılı olarak RWC azalmıştır. Bahri ve ark. (2015)'da benzer şekilde ağır metal stresi altındaki *Paulownia tomentosa* fidelerinin RWC'lerinde önemli azalmaların olduğunu rapor etmişlerdir. Aghaz ve ark. (2013), *Anethum graveolens*'te artan stres yoğunluğuna bağlı olarak RWC'de düşüş olduğunu gözlemlemiştir. Bu azalma, köklerden su emiliminin azalmasıyla açıklanabilir (Alsokari ve Aldesuquy, 2011). Bulgularımızın aksine Pandey ve Sharma (2002), 500 μ M kobalt stresine maruz bırakılan kabak fidelerinde RWC'de artışın olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda stresle birlikte biochar uygulamaları yaprak su içeriğini artırmıştır. Benzer şekilde Hafeez ve ark. (2017)'nin kuraklık stresi altındaki soya fidelerine biochar uygulamalarının nisbi su içeriğini artırdığı rapor edilmiştir.

Kobalt stresi ve biochar uygulamalarının buğday yapraklarının ozmotik potansiyelleri üzerine olası değişimleri Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



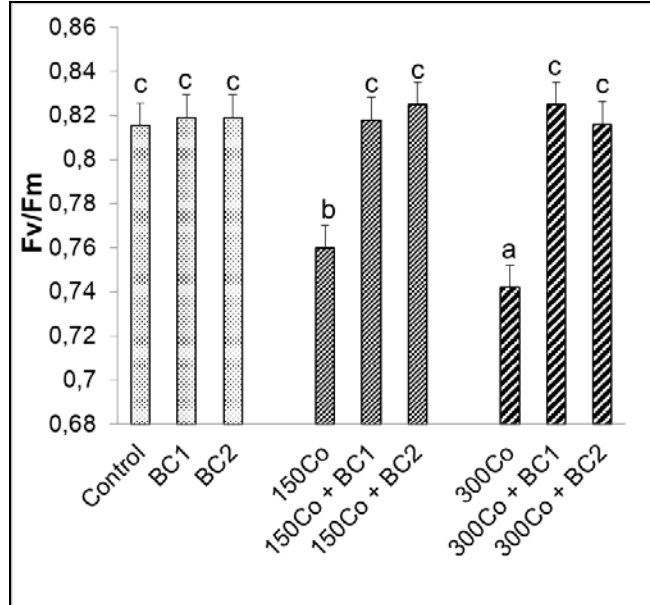
Şekil 4.3. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının ozmotik potansiyelde meydana getirdiği ortalama değişimler (MPa) (n=5). Sütunlar üzerindeki aynı harfler istatistiksel olarak aynı olan değerleri göstermektedir ($P>0.05$)

Yalnız biochara maruz bırakılan buğday yapraklarının ozmotik potansiyellerinin kontrolle aynı seviyede olduğu belirlenmiştir. 150 ve 300 μM kobalt uygulamaları ozmotik potansiyelde kontrole göre negatif yönde artışa (%19.4 ve % 52.8) neden olmuştur. 150 μM kobaltla birlikte uygulanan biocharlı grupların ozmotik potansiyelleri kontrol seviyesinde kalmışken 300 μM Co'lu gruplarda sırasıyla % 9.2 ve % 30.3 azalma belirlenmiştir (Şekil 4.3).

Stres altındaki bitkiler, hücre içi ozmotik dengenin korunması için uyumlu bileşikler biriktirmektedir (Roy ve ark., 2014). Bu ozmolitlerin birikimi, turgorun sürdürülmesini ve ağır metal gibi stres faktörlerinin neden olduğu fizyolojik hasarların önlenmesini sağlar. Çalışmamızda kobalt stresıyla birlikte yaprakların ozmotik potansiyellerinde azalmaların olduğu tespit edilmiştir. Wainwright ve Woolhouse (1977) ve Klimashevskii ve Dedov (1975)'nin çalışmalarında da ozmotik potansiyel benzer şekilde azalmıştır.

4.2. Klorofil Flüoresans Ölçümleri

Fotosentetik aygıtların durumunu gösteren en önemli belirteçlerden birisi olan yaprakların maksimum kuantum verimi (F_v/F_m)'ne ait bulgular Şekil 4.4'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının maksimum kuantum verimi (F_v/F_m)'nde meydana getirdiği ortalama değişimler ($n=5$). Sütunlar üzerindeki aynı harfler istatistiksel olarak aynı olan değerleri göstermektedir ($P>0.05$)

Yalnız biochar uygulamalarının Fv/Fm değerlerinde önemli bir değişime neden olmadığı tespit edilmiştir. Co stresi altındaki yaprakların maksimum kuantum verimleri kontrole göre azalmıştır. Buğday yapraklarına uygulanan Co konsantrasyonundaki artışla ters orantılı olarak Fv/Fm değerleri azalmıştır. Tüm deneme süresince en yüksek Fv/Fm azalmasına 300 μ M Co'a maruz bırakılan buğday fidelerinde rastlanmış olup kontrole göre % 9 azalmanın olduğu belirlenmiştir. Stresle birlikte biochar uygulamalarında ise önemli artışların olduğu ve Fv/Fm değerlerinin kontrol seviyesine ulaştığı gözlenmiştir. Bu durum fotosentetik aygıtların etkin bir şekilde korunmasında biocharın önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir.

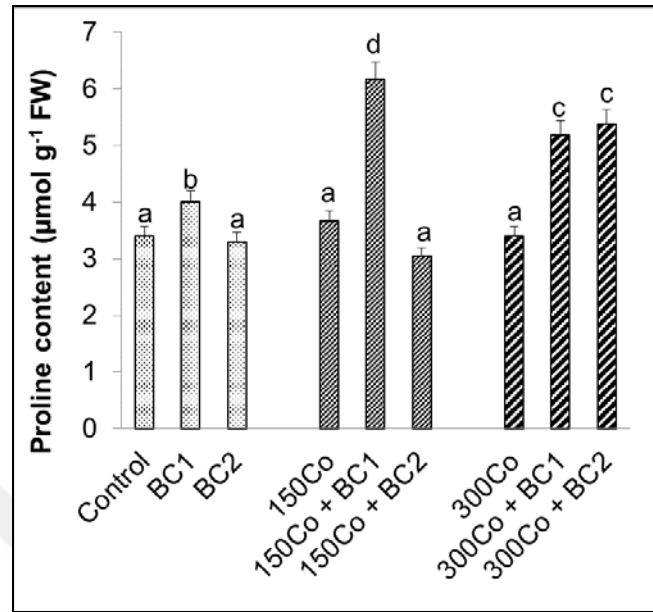
Stres altında fotosentez metabolizmasının başarı ile sürdürülebilmesi için fotosentetik aygıtların etkin bir şekilde korunması gerekmektedir. Fotosentetik aygıtların stres faktörlerinden etkilenme derecelerini gösteren önemli parametrelerden birisi klorofil flüoresans ölçümleridir. Yaprakların maksimum kuantum verimi (Fv/Fm) sıklıkla bir stres göstergesi olarak kullanılır ve fotokimyasal reaksiyonun potansiyel verimini tanımlar (Björkman ve Demmig, 1987). Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarının maksimum kuantum verim (Fv/Fm)'leri Co konsantrasyonundaki artışla paralel olarak azalmıştır. Farklı konsantrasyonda Co stresi altındaki *Pseudevernia furfuracea* türünün Fv/Fm değerleri, uygulama dozuyla ters orantılı olarak azalmıştır (Yiğittürk ve ark., 2016). Bu sonuç çalışmamızla birebir örtüşmektedir. Bakır, krom, nikel, kadmiyum ve çinko stresine maruz bırakılan *Scenedesmus*'un Fv/Fm değerlerinde de önemli azalışların olduğu bildirilmiştir (Mallick ve Mohn, 2003). Kobalt stresıyla birlikte biochar uygulamaları Fv/Fm değerlerini kontrol seviyesine yükseltmiştir. Buradan fotosentetik aygıtların etkin bir şekilde korunmasında biocharın önemli bir rol üstlendiğini söyleyebiliriz. Tuzlulukla birlikte biochar uygulamaları yapılan patlıcan fidelerinin Fv/Fm değerleri de bulgularımızda olduğu gibi önemli oranda artış göstermiştir (Rady ve ark., 2018).

4.3. Buğday Yapraklarında Gerçekleştirilen Biyokimyasal Analizlerin Sonuçları

4.3.1. Prolin içeriği

Prolin, stresle birlikte çoğu bitkide üretimi ve birikimi uyarılan önemli bir ozmotik düzenleyicidir. Kobalt stresi altındaki buğday fidelerinin biochar

uygulamalarıyla yaprak prolin içeriklerinde meydana gelen değişimler Şekil 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.5. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının yaprak prolin içeriklerinde gözlenen ortalama değişimler (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir (P<0.05)

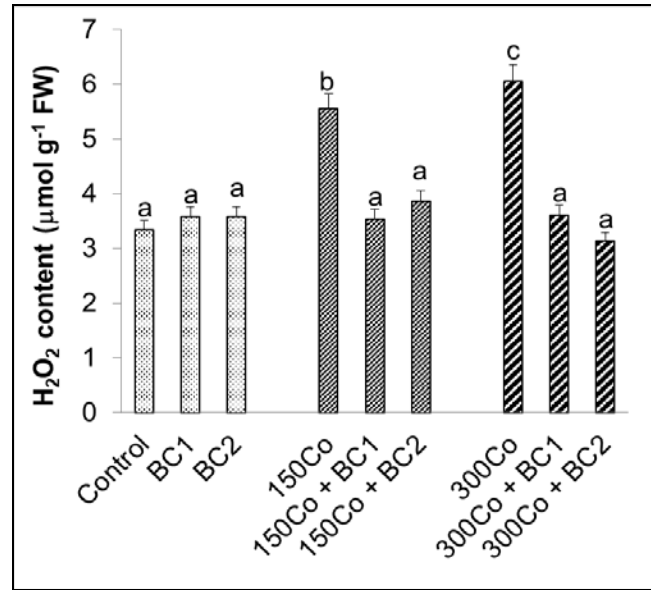
Tüm deneme süresince stres ve biochar uygulamaları yaprakların prolin içeriklerini kontrole göre önemli oranda artırmış yada istatistiki anlamda önemli bir değişim meydana getirmemiştir. En yüksek prolin içeriğine ($6.17 \mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}$) $150 \mu\text{M}$ Co + 1 g L^{-1} uygulanan buğday fidelerinde rastlanmıştır. $150 \mu\text{M}$ Co + 3 g L^{-1} grubu haricinde tüm kombinasyonlu gruplarda prolin içeriği yalnız stres uygulamalarıyla kıyaslandığında önemli artışlara sebep olmuştur. Yalnız biochara maruz bırakılan fidelede ise sadece $150 \mu\text{M}$ Co + 1 g L^{-1} grubunda kontrole göre % 17.6 artış gözlenmiştir (Şekil 4.5).

Prolin (Pro), serbest radikal süpürücü, antioksidan ve makromoleküllerin stabilizasyonunu sağlayan, hücre duvarının bir bileşeni olan, uyumlu ve metabolik bir ozmolit olarak hareket eden proteinojenik beş karbonlu bir amino asittir (Ehsanpour ve ark., 2012; Emamverdian ve ark., 2015). Yüksek bitkiler tarafından fazlaca Pro üretilmesi, aşırı tuzluluk, kuraklık, artan ultraviyole (UV) radyasyonu, ağır metal ve oksidatif stres gibi çok çeşitli biyotik ve abiyotik streslerin neden olduğu hasarlara karşı nonenzimatik bir yanıttır (Szabados ve Savoure, 2010). Pro, bitkilerde stresle mücadele söz konusu olduğunda adaptasyon, iyileşme ve sinyalleme dahil olmak üzere çok yönlü

roller oynar (Fidalgo ve ark., 2013). Ağır metal toksisitesine karşı Pro'nun bitkilerin direncini arttırdığı çok sayıda mekanizma önerilmiştir. Clemens (2006), bitkilerde ağır metal ile indüklenen Pro birikiminin doğrudan ağır metal stresinden kaynaklanmadığını, metal fazlalığının bir sonucu olarak ortaya çıkan su dengesinin bozulmasının Pro indüksiyonuna neden olduğunu ileri sürmüştür. Bu bağlamda Pro, bir osmoregülator veya osmoprotektan olarak işlev görmektedir. Mourato ve ark. (2012) ve Tripathi ve Gaur (2004), ağır metal tarafından indüklenen Pro tarafından ROS'un süpürülmesinde, öncelikle hidroksil radikallerinin detoksifiye edilmesi ve singlet oksijenin yıkılması yoluyla gerçekleştirildiğini bildirmişlerdir. Bitkilerin ağır metallere maruz kaldığı zaman antioksidan enzim aktivitelerindeki artış, bitkilerin korunması, hücrel redoks homeostazının sürdürülmesi (Mourato ve ark., 2012), klorofilin yeniden yapılandırılması ve hücre içi pH'ın düzenlenmesi (Rastgoo ve ark., 2011), Pro sentezi ve akümüasyonu ile doğrudan ilişkilidir. Çalışmamızda kobalt stresine bağlı olarak Pro içeriklerinde önemli bir artış meydana gelmemiştir. Bu sonuçlarımıza ters bir şekilde ağır metal konsantrasyonundaki artış ile Pro içeriğinde kayda değer ve orantılı bir artışın olduğu Alia ve Saradhi (1991) tarafından bildirilmiştir. Ancak, stresle birlikte biochar uygulamaları Pro içeriğini büyük oranda artırmıştır. Ispanak ve hardal fidelerine biochar uygulamaları Pro içeriğini bulgularımızı destekler nitelikte artırmıştır (Zemanová ve ark., 2017).

4.3.2. Yaprakların hidrojen peroksit içeriklerinde meydana gelen değişimler

Co stresi ve tek başına veya stresle birlikte uygulanan biochar uygulamalarının yaprakların H₂O₂ içeriklerinde meydana getirdiği değişimler Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının yaprak H₂O₂ seviyesinde meydana getirdiği değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir (P<0.05)

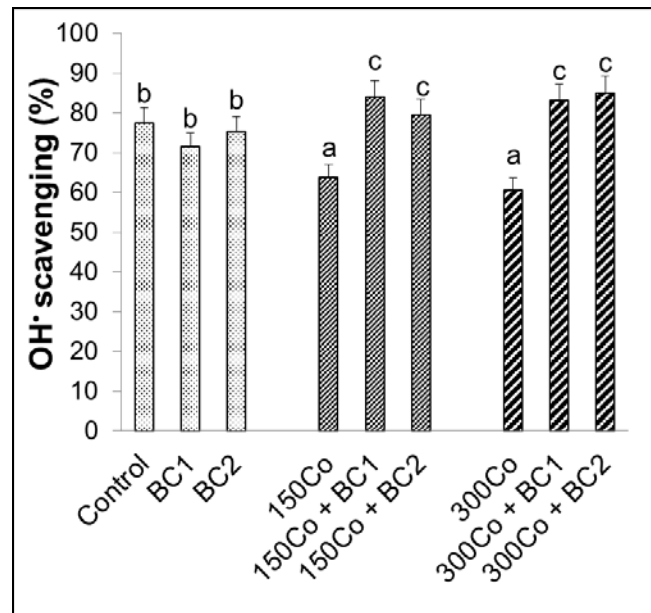
Yalnız biochara maruz bırakılan buğday yapraklarının H₂O₂ içerikleri kontrol grubu ile aynı seviyede kalmıştır. Co uygulamaları H₂O₂ akümülyasyonlarını oldukça artırmıştır. H₂O₂ birikimi stres altındaki buğdayda uygulanan kobalt konsantrasyonlarındaki artışla paralel olup sırasıyla kontrolün 1.7 ve 1.8 katıdır. Tüm deneme süresince stresle birlikte uygulanan her iki biochar konsantrasyonu da yaprakların H₂O₂ içeriğini kontrol seviyesine düşürmüştür. H₂O₂ akümülyasyonundaki en yüksek azalmaya 300 μM Co + 3 g L⁻¹ biochar grubunda rastlanmıştır (Şekil 4.7).

Normal koşullar altında bile, yüksek bitkiler metabolik süreçleri sırasında ROS üretirler. Aşırı ROS konsantrasyonu, oksidatif hasara ve hücrelerin apoptotik ölümüne yol açabilir (Ismail ve ark., 2015). Bitkilerde hücresel seviyede aşırı kobalt akümülyasyonu, süperoksit (O₂^{•-}) anyonu, hidrojen peroksit (H₂O₂), hidroksil radikalleri (OH[•]), singlet oksijen (¹O₂), alkoksil (RO[•]) ve peroksil (ROOO[•]) gibi ROS oluşumunu teşvik eder. Üretilen bu ROS'lar, biyomembranları hasara uğratar, ultrastrüktürel hücresel bileşenleri, DNA'yı bozar ve programlanmış hücre ölümüne yol açabilir (Gill ve Tuteja, 2010; Nahar ve ark., 2016). Bitkilerde metabolik faaliyetler sonucu üretilen H₂O₂, normal fizyolojik süreçlerinde ve streslere karşı dirençte çok yönlü rol oynar. Düşük dozlarda sinyal molekülü olarak görev yapar. H₂O₂'in bitkilerin büyüme ve gelişme süreçleri için hayati öneme sahip olduğu birçok çalışmada kanıtlanmıştır. Tohum çimlenmesinin uyarılması, kök tüy oluşumunun başlatılması, hücre duvarının güçlendirilmesi, hücre çeperinin gevşetilmesi, ksilem farklılaşması ve stoma hareketinin

kontrolünde H_2O_2 'in önemli bir role sahip olduğu rapor edilmiştir (Dempsey ve Klessig, 1995; Wojtyla ve ark., 2016). Yüksek miktarda üretilen H_2O_2 bitki metabolizması için toksik etkiye sahiptir. Buğday fidelerine uygulanan Co konsantrasyonlarıyla doğru orantılı olarak H_2O_2 içeriklerinin arttığı tespit edilmiştir. *Brassica juncea*'a uygulanan 100 μM Co yaprakların H_2O_2 içeriklerini bulgularımızla örtüşür nitelikte artırdığı bildirilmiştir (Karuppanapandian ve Kim, 2013). Benzer şekilde *Vigna radiata*'da Cr'a yanıt olarak H_2O_2 akümüasyonlarında artışların olduğu belirtilmiştir (Karuppanapandian ve ark., 2006). Ancak, bulgularımıza ters olarak farklı bir raporda, *Phaseolus aureus* fidelerinin Co'a maruz bırakılması H_2O_2 düzeyinde belirgin bir şekilde azalmaya yol açtığı rapor edilmiştir (Tewari ve ark., 2002).

4.3.3. Yaprakların hidroksil radikali süpürülme aktivitelerinde meydana gelen değişimler

Co stresinin tek başına veya biocharla birlikte kombinasyonlu olarak uygulamalarının ardından yaprakların hidroksil ($OH^\bullet$) radikali süpürülme aktivitelerinde meydana gelen değişimler Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının yaprak $OH^\bullet$ radikali süpürülme aktivitelerinde meydana getirdiği değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir ($P<0.05$)

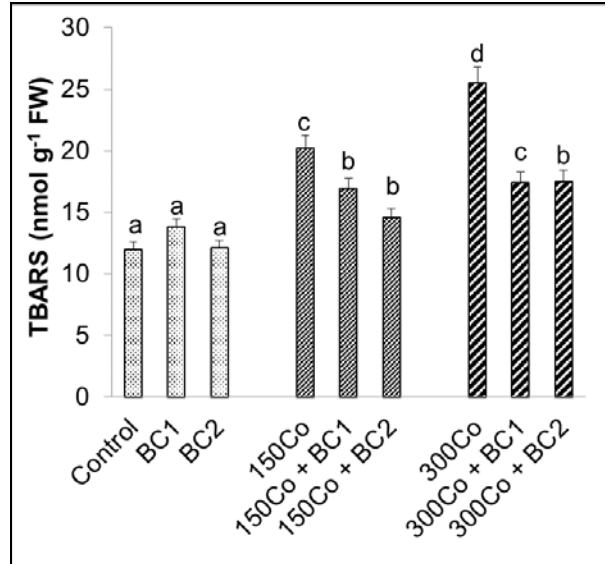
Yalnız biochara maruz bırakılan buğday yapraklarının $OH^\bullet$ radikali süpürülme aktiviteleri kontrol grubu ile aynı seviyesinde kalmıştır. Ağır metal (kobalt)

uygulamaları $\text{OH}^\bullet$ radikali süpürülme aktiviteleri önemli oranda azaltmıştır. Tüm deneme süresince stresle birlikte uygulanan her iki biochar konsantrasyonu da yaprakların $\text{OH}^\bullet$ radikali süpürülme aktivitelerini önemli seviyede artırmıştır. En yüksek $\text{OH}^\bullet$ radikali süpürülme aktivitelerine $300 \mu\text{M Co} + 3 \text{ g L}^{-1}$ biochar grubunda rastlanmıştır (Şekil 4.7).

Ağır metal, kuraklık ve tuzluluk gibi abiyotik streslere maruz kalan bitkilerde ROS üretimi toksik seviyelere kadar ulaşır. $\text{OH}^\bullet$ radikali biyolojik sistemlerde enzimatik süpürücüsü olmayan tek ROS'dur (Gill ve Tuteja, 2010). Bu yüzden bitkilerde en tehlikeli reaktif oksijen türüdür. Kobalt stresi altında $\text{OH}^\bullet$ radikali süpürülme aktiviteleri önemli oranda azalmıştır. Biochar uygulamalarında ise artışların olduğu tespit edilmiştir.

4.3.4. Lipid peroksidasyon seviyeleri (TBARS içeriği)

Lipid peroksidasyonu bitkilerin strese maruz kalması durumunda hücresel hasarın en önemli göstergelerinden birisidir. Buğday fidelerinin kobalt stresi ve biochar uygulamalarıyla yaprakların lipid peroksidasyon (TBARS) seviyelerinde meydana gelen değişimler Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının yaprak TBARS içeriklerinde (nmol g^{-1} YA) meydana getirdiği değişimler ($n=4$). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir ($P<0.05$)

Yalnız biochar uygulamaları yaprakların TBARS içeriklerinde önemli bir değişime neden olmamıştır. TBARS içeriği kobalt uygulamalarıyla kontrole göre artış göstermiştir. Bu artış oranları uygulanan Co konsantrasyonundaki artışla doğru orantılıdır. Yalnız stres uygulanan buğday yapraklarının TBARS içeriklerinin kontrolün sırasıyla 1.68 ve 2.13 katı olduğu tespit edilmiştir. Stresle birlikte biochar uygulamalarında lipid peroksidasyon içeriklerinde önemli azalmaların olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.8). Yalnız strese maruz bırakılan fidelerle kıyaslandığında TBARS içeriklerindeki en yüksek azalmaya % 33.7 ile 300 μM Co + 1 g L⁻¹ grubunda rastlanmıştır.

Stres altındaki bitkilerde hücrel hasarın en önemli göstergelerinden birisi membranların lipid peroksidasyon seviyelerinin belirlenmesidir. Lipid peroksidasyonun son ürünü olan malondialdehit miktarının ölçümü, stres koşulları altında lipid peroksidasyon indeksi olarak rutin olarak kullanılır (Pandey ve ark., 2009). Co gibi ağır metaller bitki hücrelerine girdiğinde, ROS'un üretimi ve detoksifikasyonu arasındaki dinamik denge bozulur, ROS'ların birikimine yol açarak membranların peroksidasyonunun bir sonucu olarak TBARS içeriğini artırır ve hücre membran sisteminin yapısı ve işlevi bozulur. Tez çalışmamızda olduğu gibi daha önceki çalışmalarda Co (Li ve ark., 2005b), Ni (Rao ve Sresty, 2000; Pandey ve Pathak, 2006), Cu (Mazhoudi ve ark., 1997; Lombardi ve Sebastiani, 2005), Zn (Chaoui ve ark., 1997; Rao ve Sresty, 2000) ve Cd (Chaoui ve ark., 1997; Dey ve ark., 2007) ağır metallerinin neden olduğu ROS birikimiyle birlikte, membran bütünlüğünün olumsuz yönde etkilendiği rapor edilmiştir. Stresle birlikte biochar uygulamaları buğday yapraklarındaki TBARS içeriğini önemli oranda azaltmıştır. Bu durum biocharın serbest Co iyonlarını bağlamasıyla bitkiye girişinin azaltılması ve antioksidan enzim sistemini güçlendirmesiyle ROS üretiminin sınırlandırmasından kaynaklandığı söylenebilir. Bakır ile kontamine topraklarda yetiştirilen marul bitkilerine biochar uygulamaları verilerimizi destekler nitelikte H₂O₂ birikimini ve hücre zarı peroksidasyonunu azaltmıştır (Quartacci ve ark., 2015).

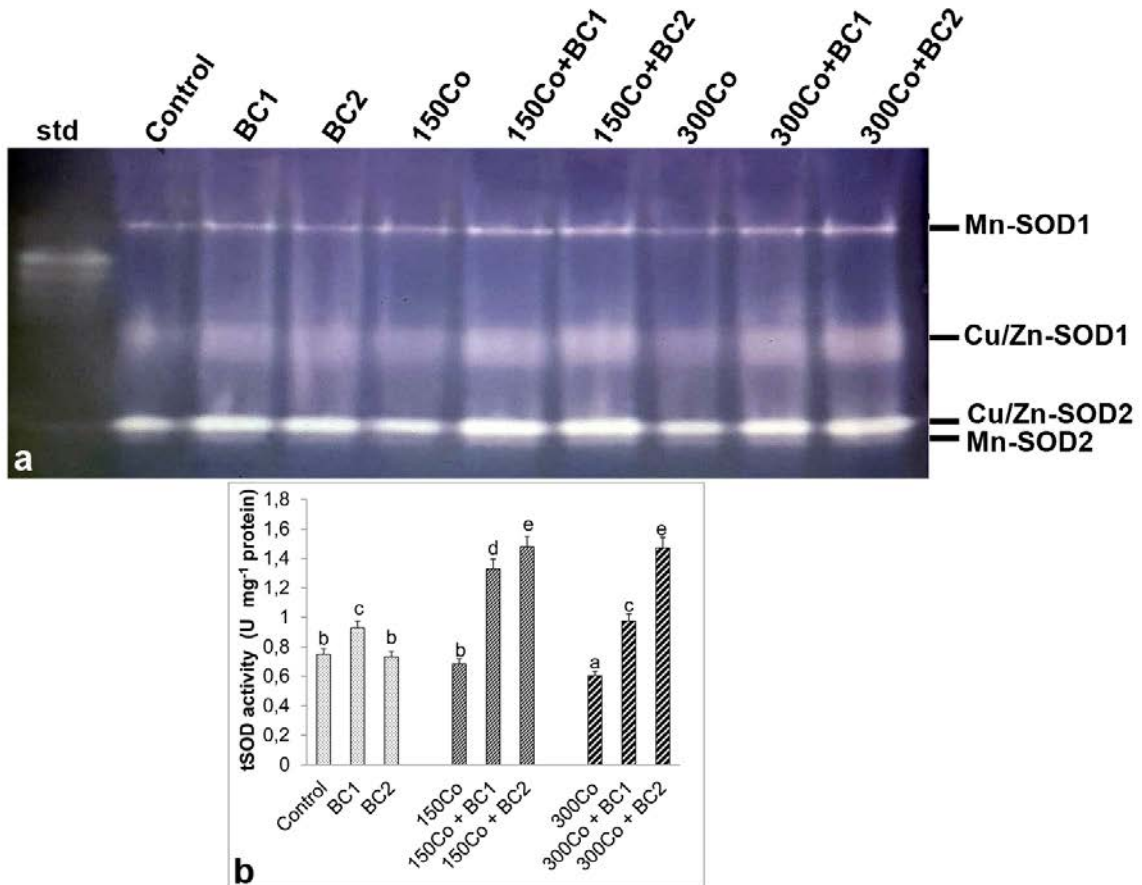
4.3.5. Antioksidan enzim aktivite sonuçları

4.3.5.1. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesinde gözlenen değişimler

Buğday yapraklarının süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitelerinde kobalt stresi ve biochar uygulamalarının meydana getirdiği değişimler Şekil 4.9'da verilmiştir.

Triticum aestivum L. yapraklarına ait SOD izozim profillerinin belirlenmesi için jellere 50 µg protein içeren örnekler ve 0.5 ünite SOD standardı pipetlenmiştir. Yürütme işleminden sonra Biorad Image Lab Version 4.0.1 yazılımı ile densitometrik analiz yapılarak standarta karşılık gelen hacime göre total SOD aktivitesi tespit edilmiştir.

Yalnız 3 g L⁻¹ biochar ve 300 µM Co uygulamaları haricindeki diğer tüm grupların tSOD aktiviteleri artış göstermiştir. 300 µM Co stresi altındaki yaprakların tSOD aktiviteleri kontrole göre % 19.5 azalmıştır. Stresle birlikte biochara maruz bırakılan yaprakların tSOD enzim aktivitelerinde, yalnız stres uygulanan grupla kıyaslandığında önemli oranda artışların olduğu tespit edilmiştir. Hem stres hemde biochar konsantrasyonlarındaki artışla doğru orantılı olarak SOD aktiviteleri artmıştır. Her iki dozdaki Co stresinde de en yüksek SOD aktivitelerine stresle birlikte 3 g L⁻¹ biochar uygulanan buğday yapraklarında rastlanmıştır. SOD aktivitelerindeki en yüksek artış (yalnız stres uygulamalarıyla kıyaslandığında), 2.4 katlık artışla 300 µM Co + 3 g L⁻¹ biochar uygulanan buğday yapraklarında tespit edilmiştir (Şekil 4.9b).



Şekil 4.9. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının yaprak SOD izozimlerinde **(a)** ve total SOD (U mg⁻¹ protein) aktivitelerinde **(b)** meydana gelen değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir (P<0.05)

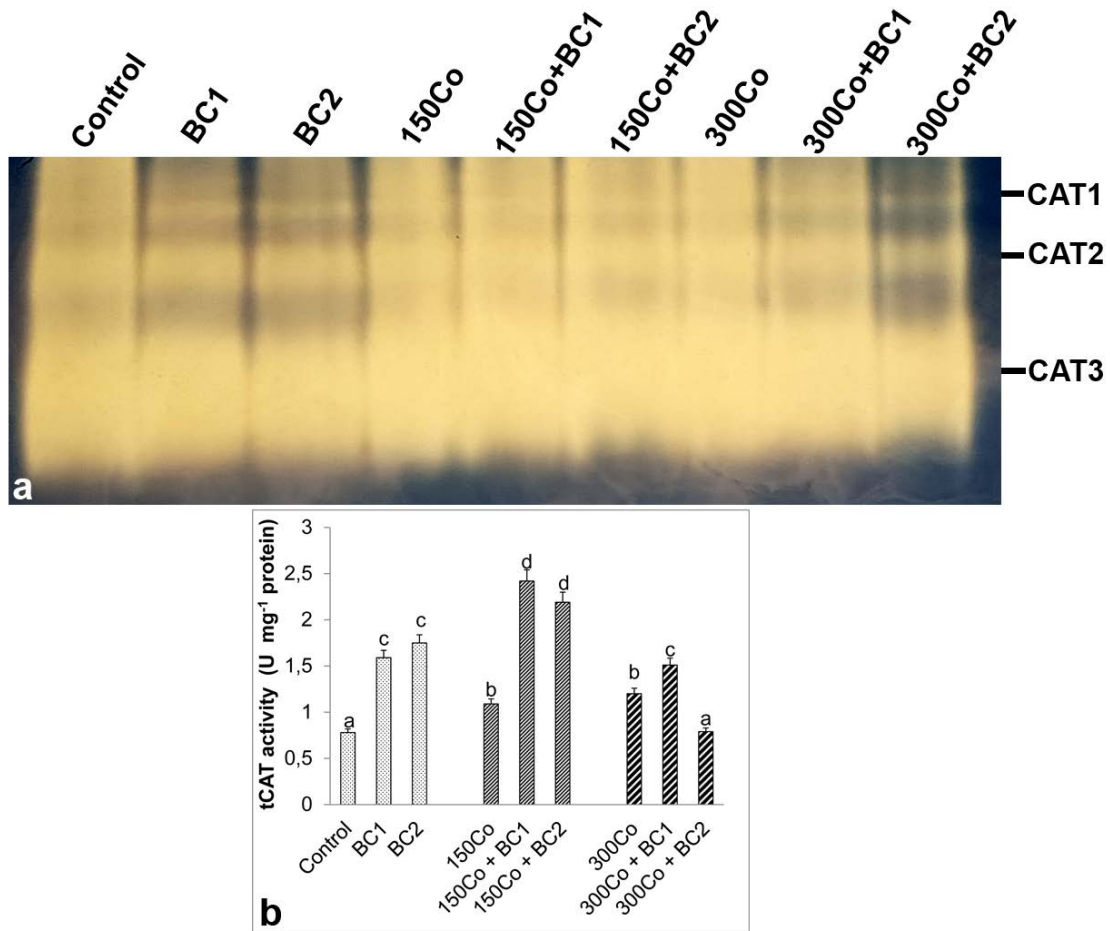
Kobalt stresi ve biochar uygulamalarının 7. gününde hasat edilen buğday yapraklarının SOD enzimine ait izozim profillemesi sonucunda 4 farklı izozim belirlenmiştir. Tanımlanan bu izozimlerin 2 adeti hem KCN hem de H_2O_2 'e direnç göstermelerine göre Mn-SOD, diğer ikisi ise hem KCN hem de H_2O_2 tarafından bantların inhibe olma özelliklerine göre Cu/Zn-SOD olarak tanımlanmıştır (Şekil 4.9a). SOD aktivitelerinde gözlenen artış ve azalışların özellikle Cu/Zn-SOD1 ve Cu/Zn-SOD2 izozimlerinde meydana gelen aktivite değişimlerinden kaynaklandığını söyleyebiliriz.

Bitkilerin metabolik süreçlerde oluşan reaktif oksijen türlerinden ilki olan $O_2^{\bullet-}$ radikalinin toksik etkilerine karşı ilk savunma hattını SOD enzimi oluşturmaktadır. SOD, $O_2^{\bullet-}$ radikalini H_2O_2 'ye dönüştürerek hücreleri oksidatif hasardan korur. Birçok organizmada var olan SOD enzimi, aktif bölgesinde taşıdığı metal kofaktöre göre isimlendirilir. Buna göre Fe-SOD, Mn-SOD ve Cu/Zn-SOD olmak üzere üç farklı SOD bulunmaktadır (Gechev ve ark., 2006). Fe-SOD prokaryotlarda, alglerde ve yüksek bitkilerin kloroplastlarında (stroma), Mn-SOD mitokondri ve peroksizomlarda, Cu/Zn-SOD ise sitoplazma ve kloroplastlarda (tilakoyid) bulunmaktadır. $O_2^{\bullet-}$ 'in süpürülmesi farklı SOD izoform aktivitelerinin düzenlenmesiyle gerçekleşmektedir. Örneğin kloroplastların tilakoyidlerinde $O_2^{\bullet-}$ 'in en etkili süpürücüsü Cu/Zn-SOD'dur (Chew ve ark., 2003). Yüksek konsantrasyonda kobalta maruz bırakılan buğday yapraklarının SOD aktivitesi azalmış, düşük dozda ise kontrol seviyesinde kalmıştır. 2 gün süresince $100 \mu M$ Co'a maruz bırakılan hint hardalının SOD aktivitesi kontrol seviyesinde kalmış olup bulgularımızla örtüşmektedir. Uygulama süresindeki artışa paralel olarak ise SOD aktivitesi artmış olup bu sonuç verilerimizle uyuşmamaktadır (Karuppanapandian ve Kim, 2013). İlginç bir şekilde ıspanakta (Pandey ve ark., 2009), fasülyede (Chaoui ve ark., 1997), mısır fasülyesinde (Pandey ve Pathak, 2006) de ağır metal uygulamalarıyla birlikte SOD aktivitesi azalmıştır. Kobalt ile birlikte biochar uygulamaları buğday yapraklarının SOD aktivitelerini önemli oranda artırmıştır. Buğdayda tuzluluk stresinin olumsuz etkilerinin azaltılması için biochar uygulanmasında (Kanwal ve ark., 2018) SOD aktivitesi artmış olup bulgularımızla uyumludur. SOD kendi substratı $O_2^{\bullet-}$ ile indüklenir ve böylece hücrel SOD'un aktivasyonundaki artış, hücrenin $O_2^{\bullet-}$ stresi yaşadığının bir göstergesi olabilir. Buğday yapraklarındaki SOD aktivitesinin biocharla artışı, SOD izoformlarının nativePAGE jeli üzerindeki analizinin sonuçlarını doğrulamaktadır, bu da Co'a maruz kalmanın neden olduğu SOD izoformlarındaki artışı

göstermektedir. Bu enzimin artan aktivitesi, H_2O_2 seviyelerinin artması veya bitki hücrelerinde SOD'u kodlayan genlerin ifadesinin arttığı bir göstergesidir.

4.3.5.2. Katalaz enzim aktivitesinde gözlenen değişimler

Buğday yapraklarının katalaz (CAT) enzim aktivitelerinde kobalt stresi ve biochar uygulamalarının meydana getirdiği değişimler Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.10. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının yaprak CAT izozimlerinde (a) ve total CAT ($U\ mg^{-1}\ protein$) aktivitelerinde (b) meydana gelen değişimler ($n=4$). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir ($P<0.05$)

Tüm deneme süresince $300\ \mu M\ Co + 3\ g\ L^{-1}$ biochara maruz bırakılan buğday fideleri haricinde diğer tüm grupların total CAT aktivitelerinde artışların olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.10b). Her iki konsantrasyondaki stres uygulamalarında en yüksek total CAT aktivitesine $1\ g\ L^{-1}$ 'lik biochar uygulanan yapraklarda rastlanmıştır. Tüm deneme süresince en yüksek CAT aktivitelerinde düşük konsantrasyondaki stresle ($150\ \mu M\ Co$) birlikte biochar uygulanan gruplarda (yalnız stres uygulanan fidelerin CAT

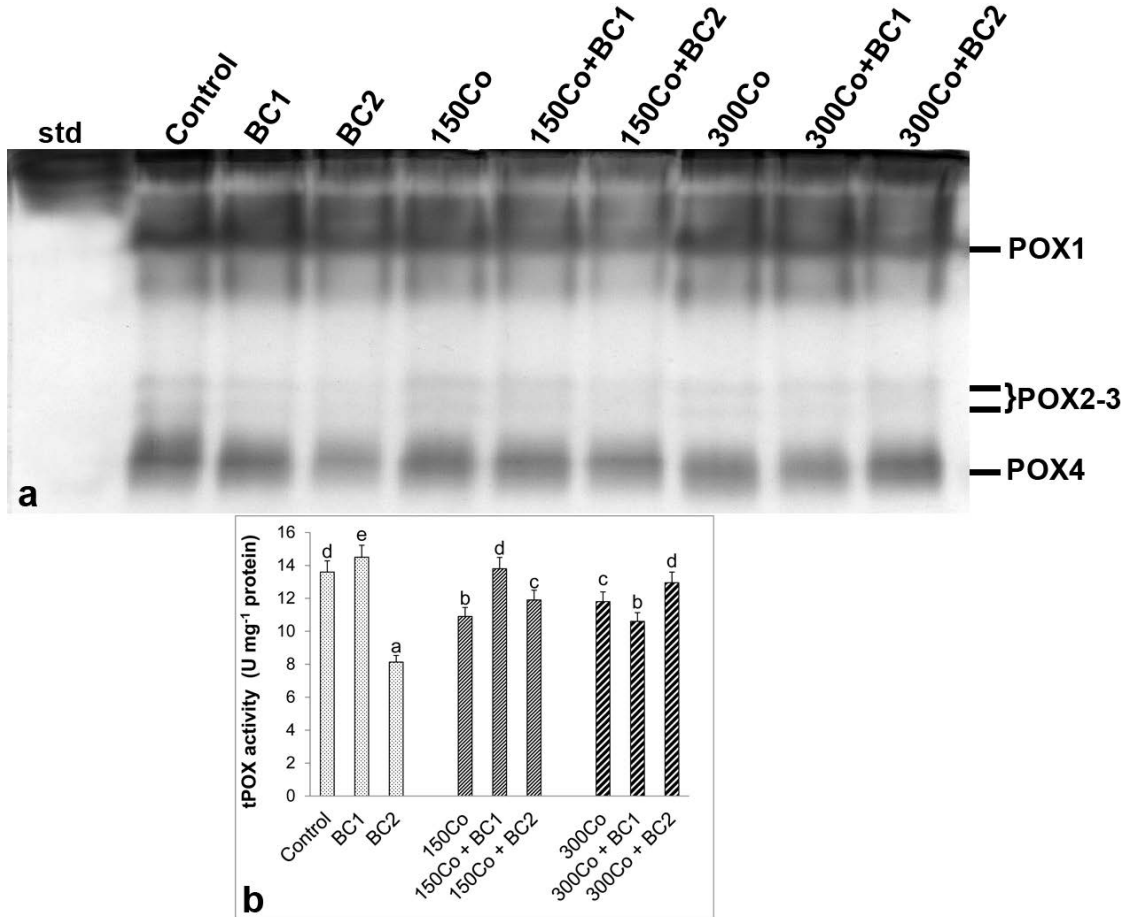
aktiviteleriyle kıyaslandığında) sırasıyla 2.2 ve 2 katlık artışların olduğu tespit edilmiştir.

Ağır metal ve biochar uygulamalarının ardından buğday yapraklarının CAT enzimine ait 3 farklı izozimi belirlenmiştir (Şekil 4.10a). CAT aktivitelerinde gözlenen artış ve azalışların başta CAT3 ve ardından CAT2 izozimlerinden kaynaklandığını söyleyebiliriz. Total CAT aktivite değişimleriyle CAT izozimlerinin bant yoğunluklarının benzer şekilde artış ve azalışa sahip olduğu Şekil 4.10'da görülmektedir. tCAT aktivitesinde olduğu gibi en yüksek bant yoğunluklarına da 150 μ M Co ve biochara maruz bırakılan buğday yapraklarında rastlanmıştır.

SOD enziminin artan aktivitesi sonucunda $O_2^{\bullet-}$ radikali H_2O_2 'e dönüştürülür. H_2O_2 'in acilen ortadan kaldırılması gerekmektedir. Eğer ortamda fazlaca birikmesi halinde Fenton reaksiyonu ile kendiliğinden canlı hücreler için en tehlikeli radikal olan $OH^{\bullet}$ 'a dönüşür. $OH^{\bullet}$ radikali oldukça kararsız olup hücre membranlarına saldırarak lipid peroksidasyonuna yol açar. Bu sebeplerden dolayı CAT enzimi hidrojen peroksidi oksijen ve suya dönüştürerek ortadan kaldıran en önemli antioksidan enzimlerden birisidir (Miller ve ark., 2008). CAT enzimi yığınlar halindeki H_2O_2 'i suya ve oksijene hızla dönüştürürken düşük konsantrasyondaki H_2O_2 'e karşı duyarsızdır. Tez çalışmamızda kobalt stresine maruz bırakılan yaprakların CAT aktivitelerinde kontrole göre artışların olduğu tespit edilmiştir. Stres altında CAT aktivitesinde artış olmasına rağmen H_2O_2 içeriğinin ve TBARS'ın yüksek olması CAT aktivitesi ile H_2O_2 'in yeterince yıkılamadığını göstermektedir. *Kandelia candel* türüne ait fidelere ağır metal uygulamalarıyla birlikte CAT aktivitelerinde artışların olduğu rapor edilmiştir (Zhang ve ark., 2007). *K. candel*'deki yüksek SOD ve CAT aktiviteleri H_2O_2 süpürme mekanizmasının etkili olduğunu göstermektedir. SOD enzimi ile koordine olarak çalışan CAT aktivitesi H_2O_2 'in süpürülmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Liang ve ark., 2003). Bu sonuçlar verilerimizle örtüşmektedir. Bulgularımızın aksine kobalt stresi altındaki hint hardalı yapraklarında CAT aktivitesi olumsuz yönde etkilenmiştir (Karuppanapandian ve Kim, 2013). Stresle birlikte biochar uygulamalarında CAT aktivite artışı daha fazla olmuştur. Cd stresi altındaki japon çeltiği fidelerine stres azaltıcı faktör olarak biochar uygulamaları CAT aktivitesini artırmış olup verilerimizle uyumludur (Zhang ve ark., 2014).

4.3.5.3. Peroksidaz enzim aktivitesinde gözlenen değişimler

Ağır metal (kobalt) stresi altındaki buğday yapraklarının total peroksidaz (POX) ve POX izozimlerinin elektroforetik ayrımı sonucunda elde edilen izozim profilleri Şekil 4.11’de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının yaprak POX izozimlerinde (a) ve total POX (U mg⁻¹ protein) aktivitelerinde (b) meydana gelen değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir (P<0.05)

Yalnız biochar uygulamalarında yüksek konsantrasyondaki biochara (3 g L⁻¹) maruz kalan yapraklarda total POX aktivitesi kontrole göre % 40.2 azalmışken düşük dozdaki biochara (1 g L⁻¹) % 6.6 artış tespit edilmiştir. Kobalt stresi total POX aktiviteleri üzerine negatif etki göstermiştir. Stresle birlikte biochar uygulamalarındaki en yüksek artışlara 150 µM Co + 1 g L⁻¹ ve 300 µM Co + 3 g L⁻¹ biochara maruz bırakılan yapraklarda rastlanmış olup artış oranları sırasıyla % 26.6 ve % 9.7’dir (Şekil 4.11b).

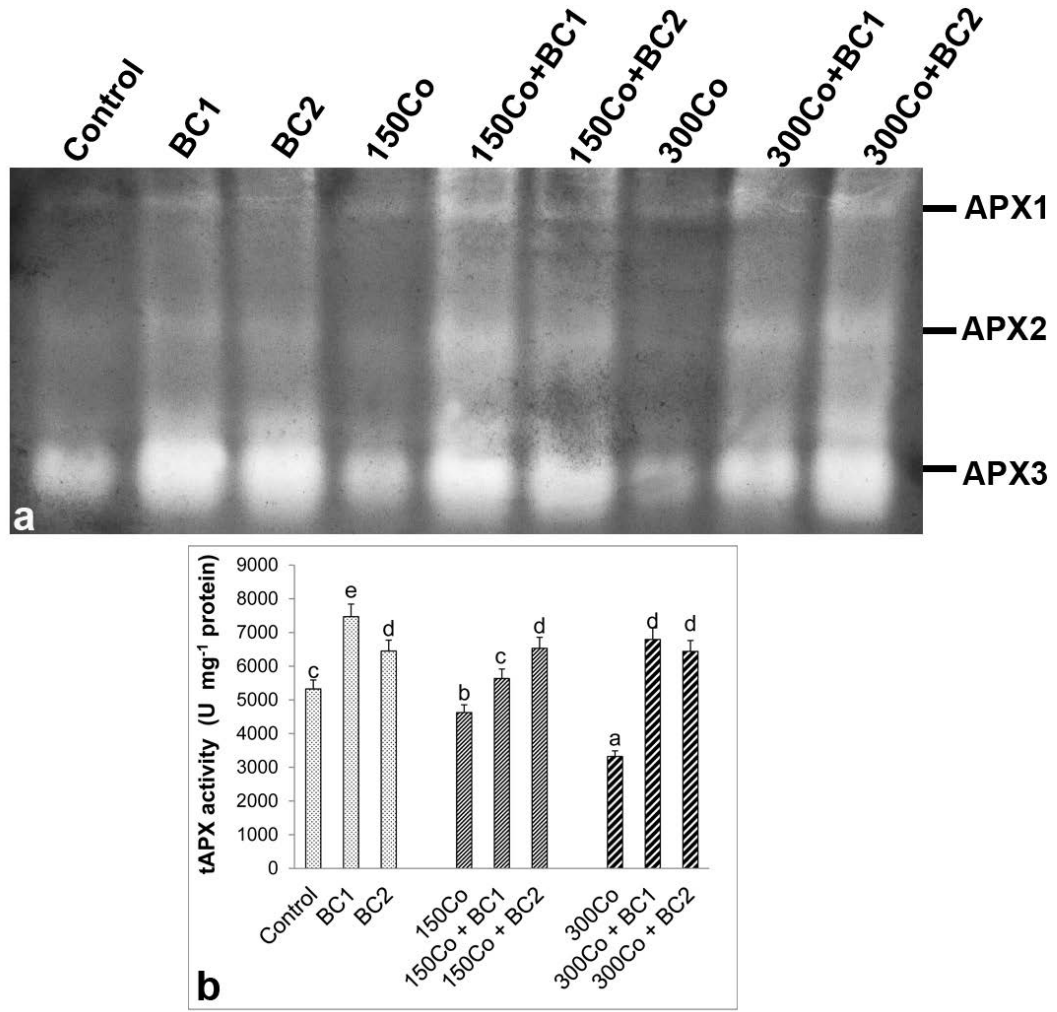
POX izozim profillemesi native PAGE elektroforezi ile belirlenmiştir. 7 gün süresince kobalt ve/veya biochar uygulamaları ardından buğday yapraklarında 4’er POX

izozimi tespit edilmiştir (Şekil 4.11a). Peroksidaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimlerin asıl sebebi POX1 ve POX4 izozimlerinin yoğunluklarında meydana gelen değişimlere bağlıdır. İzozimlerin densitometrik analizleri sonucunda total POX ve izozimlerin aktivite değişimlerinin birbirine uyumlu olduğu görülmektedir (Şekil 4.11).

Stresle birlikte aşırı miktarda üretilen H_2O_2 'in süpürülmesinde CAT'dan sonra POX'da reaktif oksijen türlerinin (ROS) detoksifiye edilmesinde önemli antioksidan enzimlerden biridir (Foyer ve Noctor, 2005). POX, fenolik bileşikler ve/veya antioksidanlar gibi yardımcı substratların oksidasyonu ile H_2O_2 'i ayrıştırır. Peroksidazlar, hidroksilik veya peroksidatif aktiviteleri sayesinde, birçok hücre organelinde ROS üretimini ve süpürülmesini düzenleyebilir ve böylece büyüme ve biyotik/abiyotik stres tepkileri gibi birçok bitki prosesine dahil olabilirler (Passardi ve ark., 2005). Hücre duvarında, POX çözünebilir, iyonik ve kovalent olarak bağlanmış formlar halinde bulunurlar ve çapraz bağlanma reaksiyonlarını katalize ederler, sert bir hücre duvarı oluşturabilir veya daha esnek hale getirmek için ROS bağlantılı duvar gevşetici reaksiyonlara katılabilirler (Lewis ve Yamamoto, 1990; Polle ve ark., 1994; Schweikert ve ark., 2000). POX enzimi strese karşı olan görevinin yanı sıra lignin biyosentezinde rol oynamasından dolayı bitki gelişimine önemli ölçüde katkısı bulunmaktadır (Moura ve ark., 2010). Cd stresi altında tütün (*Nicotiana tabacum*)'de POX aktiviteleri konsantrasyon artışıyla ters orantılı olarak azalmıştır (Zhou ve ark., 2014). Ozmotik stres altındaki patates fidelerine Co uygulamalarında POX aktivitesi önemli oranda azalmıştır (Li ve ark., 2005a). Başka bir çalışmada Co, Hg ve Pb gibi ağır metallere maruz bırakılan *Anabaena variabilis*'te POX kontrole göre indirgenmiştir (Aftab ve Ahmad, 2013). Tüm bu çalışmalar POX enziminin azalan aktivitesi ile ilgili verilerimizle örtüşmektedir. Stres altındaki fasulyeye biochar uygulamaları POX aktivitesini artırmıştır (Farhangi-Abriz ve Torabian, 2017). Benzer şekilde Ali ve ark. (2017) ve Wang ve ark. (2014)'nın yapmış oldukları çalışmalarda da biochar POX aktivitesini artırmıştır. Tezimizde de kobalt stresiyle birlikte uygulanan biochar POX aktivitesi üzerine olumlu etki yapmıştır.

4.3.5.4. Askorbat peroksidaz enzim aktivitesinde gözlenen değişimler

Biochar uygulamalarının kobalt stresi altındaki buğday yapraklarının askorbat peroksidaz (APX) enzim ve izozim aktivitelerinde tespit edilen değişimler Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.12. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının yaprak APX izozimlerinde **(a)** ve total APX (U mg^{-1} protein) aktivitelerinde **(b)** meydana gelen değişimler ($n=4$). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir ($P<0.05$)

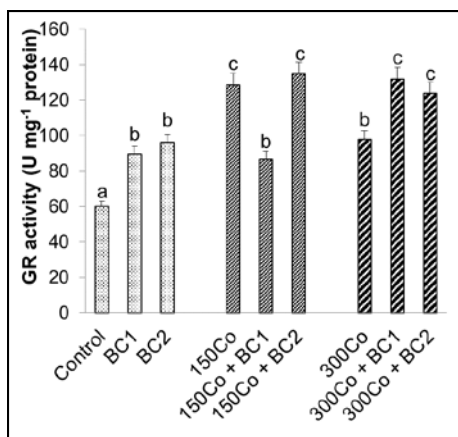
Stres uygulamaları APX aktivitesini kontrole göre önemli oranda azaltmıştır. Azalma oranı ağır metal konsantrasyonundaki artışla doğru orantılı olarak artmıştır. Tüm deneme süresince en düşük APX aktivitesine yalnız 300 μM Co'a maruz bırakılan fidelerin yapraklarında rastlanmış olup azalma oranı kontrole göre % 37.6'dır. Stresle birlikte biochar uygulamaları altında total APX aktivitesi önemli bir şekilde indüklenmiştir. APX aktivitelerinde yalnız 300 μM Co'a maruz bırakılan yapraklarla kıyaslandığında 150 μM Co + 1 g L^{-1} biocharlı grupta 2 katlık ve 300 μM Co + 3 g L^{-1} biocharlı grupta ise 1.9 katlık artış tespit edilmiştir. Tüm deneme süresince en yüksek APX aktivite artışı yalnız 1 g L^{-1} biocharlı grupta kontrolün 1.4 katı olarak belirlenmiştir.

Elektroforetik ayırım sonucunda 3 farklı APX izozimi tanımlanmış olup APX izozim profilleri Şekil 4.12a'da verilmiştir. APX aktivitesinde gözlenen aktivite değişimlerinin ana sebebinin APX3 izoziminin ifade oranında meydana gelen artış ve azalıştan kaynaklandığını söyleyebiliriz. Densitometrik analiz ve total APX aktivite değişimlerinin Şekil 4.12a'da görüldüğü üzere birebir uyumlu olduğu da kolaylıkla anlaşılmaktadır.

Askorbat-glutasyon döngüsünün önemli enzimlerinden birisi olan APX özellikle stromada etkili olan askorbat-glutasyon döngüsünde (Halliwell-Asada yolu) AsA'ı katalizleyerek monodehidroaskorbata (MDA) dönüşürken, H_2O_2 'i suya indirger (Foyer ve Noctor, 2005). APX, H_2O_2 için CAT ve POX'a göre daha yüksek bir afiniteye sahiptir. H_2O_2 'e karşı duyarlılığı fazla olan APX düşük konsantrasyondaki H_2O_2 'in süpürülmesinde elzem bir role sahiptir (Gill ve Tuteja, 2010). Sonuçlarımız, kobalt stresinden kaynaklanan oksidatif hasar ile biocharın antioksidan enzimlerin etkinliğinin düzenlemesi arasında doğrudan bir ilişkinin olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda kobalt konsantrasyonuna bağlı olarak APX aktivitelerindeki azalmanın şiddeti de artmıştır. Benzer bulgulara Co stresi altındaki *Ocimum basilicum* (Azarakhsh ve ark., 2015)'da ve patates (Li ve ark., 2005b)'de rastlanmıştır. Kobaltla birlikte biochar uyguladığımızda biocharın buğday yapraklarının APX aktivitesini, Farhangi-Abriz ve Torabian (2017)'nin tuz stresi altındaki fasülyede bildirdiği gibi artırmıştır.

4.3.5.5. Glutasyon redüktaz enzim aktivitesinde gözlenen değişimler

Buğday yapraklarının glutasyon redüktaz (GR) enzim aktiviteleri üzerine kobalt stresi ve/veya biochar uygulamalarının yol açtığı değişimler Şekil 4.13'de verilmiştir.



Şekil 4.13. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının GR ($U\ mg^{-1}\ protein$) aktivitelerinde meydana getirdiği değişimler ($n=4$). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir ($P<0.05$)

Tüm deneme süresince tüm uygulama gruplarının GR aktivitelerinde artışların olduğu belirlenmiştir. Stresle birlikte biochar uygulamaları ($150 \mu\text{M Co} + 1 \text{ g L}^{-1}$ biocharlı grup haricinde) GR aktivitesini pozitif yönde etkilemiştir. Biocharla kombinasyonlu gruplar içerisinde en yüksek artışın % 35.1'le $300 \mu\text{M Co} + 1 \text{ g L}^{-1}$ biochara maruz bırakılan buğday fidelerinde olduğu tespit edilmiştir. En yüksek GR aktivitesine $150 \mu\text{M Co} + 3 \text{ g L}^{-1}$ biocharlı grupta rastlanmış olup artış miktarı kontrolün 2.25 katıdır (Şekil 4.13).

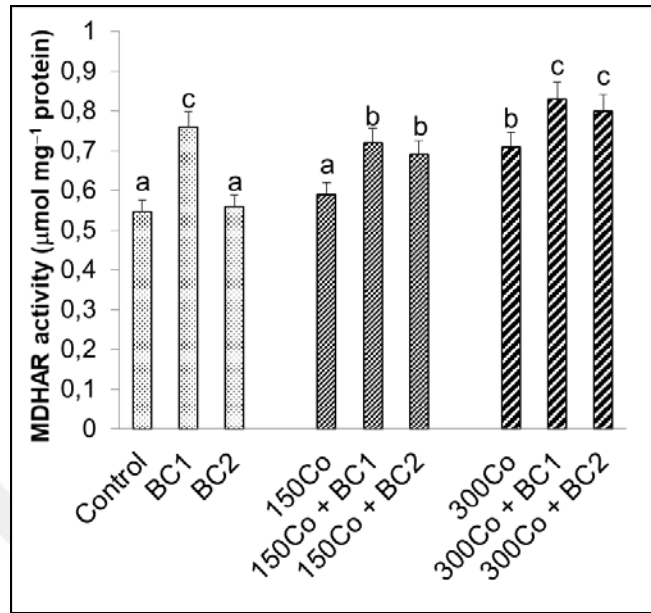
GR, askorbat – glutatyon döngüsünün temel enzimlerinden birisidir. Düşük veya yüksek molekül ağırlıklı disülfür substratları ile indirgenmiş piridin nükleotidleri arasında elektron aktarımını katalizleyen GR enziminin temel görevi, bir hücre ortamındaki GSH/GSSG oranının korunmasını sağlamaktır (Temel ve ark., 2017). Kobalt stresine maruz bırakılan hint hardalında (Karuppanapandian ve Kim, 2013), stres bizim çalışmamızda olduğu gibi GR aktivitesini artırmıştır. Artan GR aktivitesine, total glutatyon içeriğindeki artışın eşlik etmesi ve GSH havuzunun yükselmesi beklenir. AsA-GSH döngüsünde yer alan GR enziminin artan aktivitesi, Cr, Zn, Mn, Cd ve Al (Karuppanapandian ve ark., 2006; Sharma ve Dubey, 2007; Karuppanapandian ve Manoharan, 2008) gibi ağır metal streslerine maruz kalan çeşitli bitki türlerinde bildirilmiştir. Kim ve ark. (2016) ve AbdElgawad ve ark. (2016)'nın çalışmalarında da biochar uygulamalarıyla birlikte bulgularımızı destekler nitelikte GR aktivitesinde artışların olduğu rapor edilmiştir.

4.3.5.6. Monodehidroaskorbat redüktaz enzim aktivitesinde gözlenen değişimler

Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarıyla monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) enziminin aktivitelerinde ortaya çıkan değişimler Şekil 4.14'de verilmiştir.

Yalnız biochar uygulamalarında 1 g L^{-1} 'lik konsantrasyon MDHAR aktivitesini kontrole göre % 38.9 oranında artırmışken, 3 g L^{-1} 'lik biochar dozunda MDHAR aktivitesi kontrol seviyesinde kalmıştır. $150 \mu\text{M Co}$ MDHAR aktivitesi üzerine herhangi bir olumsuz etki göstermemiştir. $300 \mu\text{M Co}$ uygulamasında ise kontrole göre % 29.8 artış tespit edilmiştir. Tüm deneme süresince en yüksek MDHAR aktivite artışına kontrole göre % 51.7 oranı ile $300 \mu\text{M Co} + 1 \text{ g L}^{-1}$ biochara maruz bırakılan buğday yapraklarda rastlanmıştır (Şekil 4.14). Stresle birlikte uygulanan her iki dozdaki

biochar'da MDHAR aktivitesini pozitif yönde etkilemiştir. 150 μM Co + 1 g L⁻¹ biochar uygulamasında buğday yapraklarında % 22 ile en yüksek MDHAR aktivite artışı tespit edilmiştir.



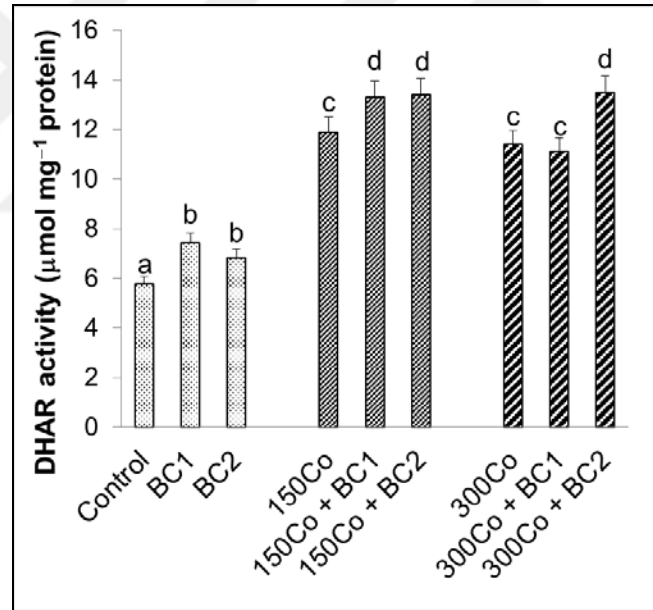
Şekil 4.14. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının MDHAR ($\mu\text{mol mg}^{-1}$ protein) aktivitesinde meydana getirdiği değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir ($P < 0.05$)

Askorbat-glutasyon döngüsünün önemli enzimleri arasında yer alan MDHAR özellikle stromada etkili olan Halliwell-Asada yolunda APX enzimi tarafından H₂O₂'in suya indirgenmesi sırasında kullanılan AsA'nın monodehidroaskorbattan yeniden indirgenmesini katalizleyen önemli bir antioksidan enzimdir. AsA'nın indirgenmesi esnasında elektron vericisi olarak NADPH kullanılır. AsA-GSH döngüsünün aktivasyonu, askorbat ve glutasyonun rejenerasyonu ve hücrel redoks dengesinin sağlanması için gereklidir (Noctor ve Foyer, 1998). MDHAR'ın temel amacı, enzimatik düzensizlik sonrasında monodehidroaskorbat (MDHA) radikallerinin oluşumunu sınırlamak ve dehidroaskorbat (DHA) üretmektir. DHA birikimi genellikle hücre metabolizmasında negatif bir olay olarak kabul edilir (Arrigoni, 1994). Öte yandan, DHA'dan AsA'nın üretimi, GSH'a bağlı DHAR ile katalize edilir. MDHAR ve DHAR aktivitelerindeki artış, Co stresi altındaki yapraklarda ROS'ları süpüren AsA ve GSH birikmesine neden olabilir. Yalnız 300 μM Co stresi altındaki buğday yapraklarında MDHAR aktivitesinde artış tespit edilmiştir. Benzer olarak AsA-GSH döngüsünde yer alan MDHAR enziminin artan aktivitesi, Cr, Zn, Mn, Cd ve Al (Karuppanapandian ve ark., 2006; Sharma ve Dubey, 2007; Karuppanapandian ve Manoharan, 2008) gibi ağır metal streslerine maruz kalan çeşitli bitki türlerinde de rapor edilmiştir.

4.3.5.7. Dehidroaskorbat redüktaz enzim aktivitesinde gözlenen değişimler

Kobalt stresinin yalnız veya biocharla birlikte buğday fidelerine 7 gün süresince uygulanmasının ardından dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) enziminin aktivitelerinde meydana gelen değişimler Şekil 4.15’de verilmiştir.

Tüm deneme süresince bütün uygulama gruplarının DHAR aktiviteleri kontrole göre istatistiki açıdan önemli seviyede artış göstermiştir. Yalnız 150 veya 300 μM Co’a maruz bırakılan buğday yapraklarında DHAR aktivitesi sırasıyla kontrolün 2.1 ve 1.96 katıdır. Stresle birlikte biochar uygulamalarında DHAR aktiviteleri (yalnız strese maruz kalan buğday fideleriyle karşılaştırıldığında) önemli oranda artış gösterdiği Şekil 4.15’de görülmektedir. Tüm deneme süresince en yüksek DHAR aktivite artışına (kontrolün 2.33 katı) 300 μM Co + 3 g L⁻¹ biochara maruz bırakılan buğday yapraklarında rastlanmıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının DHAR ($\mu\text{mol mg}^{-1}$ protein) aktivitelerinde meydana getirdiği değişimler ($n=4$). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir ($P<0.05$)

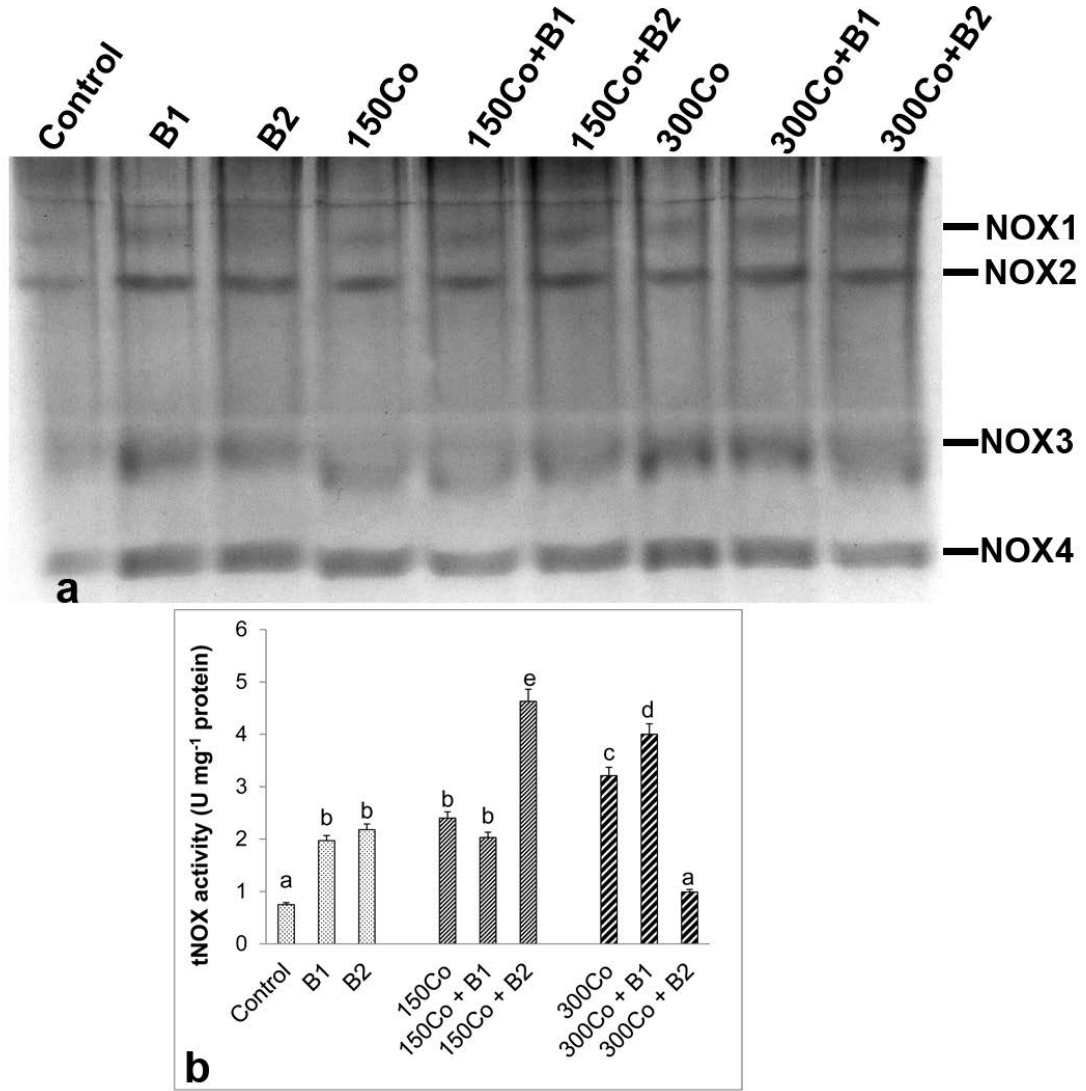
AsA-GSH döngüsünde yer alan DHAR enzimi, MDHAR enzim aktivitesi sonucunda üretilen DHA’nın AsA’ya indirgenmesini katalizleyen önemli bir antioksidan enzimdir. DHA birikimi genellikle hücre metabolizmasında negatif bir olay olarak kabul edilir (Arrigoni, 1994). Bu sebepten dolayı hızla katalizlenmesi gerekmektedir. Öte yandan, DHA’nın AsA’ya indirgenmesinde GSH kullanılır. DHAR aktivitelerindeki artış, Co stresi altındaki yapraklarda ROS’ları süpüren AsA ve GSH

birikmesine neden olabilir. Co stresi altındaki buğday yapraklarında DHAR aktivitesinde artış tespit edilmiştir. Benzer olarak AsA-GSH döngüsünde yer alan DHAR enziminin artan aktivitesi, Cr, Zn, Mn, Cd ve Al (Karuppanapandian ve ark., 2006; Sharma ve Dubey, 2007; Karuppanapandian ve Manoharan, 2008) gibi ağır metal streslerine maruz kalan çeşitli bitki türlerinde de rapor edilmiştir.

4.3.5.8. NADPH oksidaz enzim aktivitesinde gözlenen değişimler

Stres ve/veya biochar uygulamalarına maruz bırakılan buğday yapraklarının total NADPH oksidaz (NOX) aktivitelerinde ve NOX izozim profillerinde meydana gelen değişimler Şekil 4.16a’da verilmiştir.

Tüm deneme süresince 300 μM Co + 3 g L⁻¹ biochar uygulaması haricinde diğer tüm uygulama gruplarında total NOX aktivitesi kontrole göre artış göstermiştir (Şekil 4.16b). Analiz sonucunda en yüksek NOX artışı yalnız stres uygulanan gruba kıyaslandığında 1.93 katlık artışla 150 μM Co + 3 g L⁻¹ biochar grubunda tespit edilmiştir. Farklı NOX izozimlerini tespit etmek için gerçekleştirilen elektroforetik ayırım sonucunda 4 farklı NOX izoziminin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.16a). Bu artış ve azalışların özellikle NOX 2-3-4’den kaynaklandığı söylenebilir. Spektrofotometrik bulgular ve NOX izozimlerinin yoğunluklarıyla ilgili yapılan densitometrik analiz sonuçlarının birbirine uyumlu olduğu Şekil 4.16’da açıkça görülmektedir.



Şekil 4.16. Kobalt stresi altındaki buğday yapraklarında biochar uygulamalarının yaprak NOX izozimlerinde **(a)** ve total NOX (U mg⁻¹ protein) aktivitelerinde **(b)** meydana gelen değişimler (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler istatistiksel olarak farklı olan değerleri göstermektedir (P<0.05)

NADPH oksidazlar (NOX), bir tür reaktif oksijen türü (ROS) olan süperoksit anyonlarının üretimini sağlarlar. NOX, NADPH'ye bağımlı olarak tek elektronlu oksijenin süperokside indirgenmesini sağlar. Membran NADPH-oksidazların kadmiyum, nikel ve bakır stresine karşı bitkilerin tepkilerindeki rolleri birkaç çalışmada rapor edilmiştir (Quartacci ve ark., 2001; Olmos ve ark., 2003; Romero-Puertas ve ark., 2004; Hao ve ark., 2006). Bitkilerde, NOX aktivasyonu metal stresine karşı evrensel bir tepki olarak görülmektedir (Pourrut ve ark., 2013). Bu aktivasyonun mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır (Pourrut ve ark., 2013). Tez çalışmamızda buğday fidelerine kobalt uygulanması sonucunda benzer olarak NOX aktivitesinde artışlar tespit edilmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1.Sonuçlar

Tez çalışmamızda, kobalt stresi altındaki buğday bitkisinde biocharın büyüme, gelişme, tolerans, antioksidan enzim sistemi, ROS içerikleri, lipid peroksidasyonu ve klorofil flüoresans değerleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu hedeflere ulaşmak için birçok fizyolojik ve biyokimyasal ölçümler gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda farklı konsantrasyonlarda (150 ve 300 μM Co) kobalt ve biochar (1 ve 3 g L⁻¹) uygulamaları yapılan buğday yapraklarında, RWC, RGR, ozmotik potansiyel ve klorofil flüoresans gibi fizyolojik ölçümlerle lipid peroksidasyonu, prolin ve ROS içerikleri gibi biyokimyasal parametreler incelenmiştir. Ayrıca enzimatik (SOD, CAT, POX, APX, GR, MDHAR, DHAR ve NOX) antioksidanların aktivitelerindeki değişimler belirlenmiştir. Bu analizlere ek olarak yapraklardan izole edilen süpernatantlara ait proteinlerin native-PAGE ile elektroforetik ayrımlarıyla bazı antioksidan izozim profilleri (SOD, CAT, POX, APX ve NOX) tespit edilmiştir. Daha önce yapılan birçok çalışmada biochar büyüme, gelişme, verim ve çeşitli stres faktörlerine (tuzluluk, kuraklık ve ağır metal stresi) karşı toleransın artırımı amacıyla kullanılmıştır. Literatürde kobalt stresi ve biochar uygulamaları hakkında herhangi bir çalışma ve sonuç bulunmamaktadır. Kobalt stresine karşı biocharın fizyolojik, biyokimyasal ve tolerans mekanizmaları üzerine etkileri hazırlamış olduğumuz tezimizle ayrıntılarıyla ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bitkilerde kobalt stresi ve biochar arasındaki etkileşimin ayrıntılarıyla bilim dünyasının hizmetine sunulması bitkilerde tolerans mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına öncülük edecektir. Biochar buğday fidelerinin kobalt stresine karşı toleranslarını artırma potansiyeline sahiptir. Mevcut çalışmada, *Triticum aestivum* fidelerine kobalt uygulanması sonucunda RGR, RWC, ozmotik potansiyel ve Fv/Fm değerlerinde kontrole göre önemli azalmaların olduğu tespit edilmiştir. Biocharla birlikte stres uygulamalarında ise bu parametrelerde pozitif etkilerin olduğu belirlenmiştir. Co stresine maruz kalan buğday yapraklarının hidrojen peroksit içeriğinde artış, hidroksil radikali süpürülme aktivitelerinde düşüşlerin olduğu kaydedilmiştir. Bu parametrelerdeki artış ve azalışlar hücrelerin ve zarla çevrili organellerin membran bütünlüğünü bozan lipidlerin peroksidasyonunu olumsuz yönde etkilemiştir. Biochar uygulamaları H₂O₂ içeriğini azaltmış ve OH[•] radikali süpürülme aktivitesini artırarak membranların peroksidasyonunu önemli oranda azaltmıştır. Stres

altında su durumunun korunabilmesi için prolin gibi ozmolitlerin artan sentez ve birikiminin olduğu bilinmektedir. Yalnız kobalta maruz bırakılan prolin içerikleri kontrol seviyesinde kalmışken Co+Biochar uygulamalarında prolin içeriklerinde artışların olduğu tespit edilmiştir.

Kobalt gibi bir stres faktörüyle karşılaşan bitkiler hızla artan ROS birikimlerini baskılamak ve olumsuz etkilerini ortadan kaldırma amacıyla enzimatik (SOD, CAT, POX, APX, GR, MDHAR, DHAR ve NOX) antioksidanların aktivitelerini artırır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, Co uygulaması süresince sadece CAT, GR, DHAR ve NOX aktiviteleri artmıştır. Bundan dolayı, H_2O_2 ve TBARS miktarı stresle birlikte birikmiştir. Diğer yandan, aşırı Co uygulamalarına yanıtta 1 gr L^{-1} biochar SOD, CAT, APX, NOX ve MDHAR aktivitelerini tetiklerken, 3 gr L^{-1} biochar -aracılı artış ise SOD, POX, APX, GR, MDHAR ve DHAR aktivitelerinde gözlenmiştir. Artan antioksidan düzeylerine bağlı olarak, buğdaya biochar ve Co birlikte uygulandığında, H_2O_2 ve TBARS miktarları azalmıştır. Sonuç olarak, biochar artan büyüme, su içeriği ve antioksidan enzimlerin aktivasyonu ile Co uygulamaları tarafından oluşturulan oksidatif stresin etkilerini iyileştirebilmiştir ve ağır metal ile kontamine olan topraklarda yetiştirilen bitkilerde biochar eklenmesi, su yönetimi ve savunma sistemlerinin geliştirilmesi için yeni bir yaklaşım olabilmektedir.

5.2. Öneriler

Endüstrileşme ve sanayideki ilerlemeler ağır metal kirliliğini ve ağır metallerin birikimine sebep olmuştur. Ağır metaller organik maddelerin aksine, çevrede birikir ve parçalanamaz. Bazı topraklar ana kayaların yıkanması veya volkanik aktivitelerden dolayı yüksek miktarda ağır metale sahiptirler. Antropojenik aktiviteler, madencilik, pestisit kullanımı, gübreler ve atıkların kullanılması sonucunda bu topraklarda yüksek seviyede ağır metallerin fazlaca olmasının ana nedenidir. Ağır metalce kirlenen topraklar; toprak mikroorganizma aktiviteleri ve toprakların fonksiyonel çeşitliği ve sınıflandırması üzerinde zararlı etkileri bulunmaktadır. Ağır metalce kirlenen topraklar insan sağlığı ve çevreye risk olarak görülmektedir. Son yıllardaki antropojenik faaliyetler dünyadaki ekili alanlarda istenmeyen ağır metallerin birikmesine ve ekosistem üzerinde ciddi tehdit oluşturmaktadır. Günümüzde hızlı bir şekilde artan nüfusa bağlı olarak besin ihtiyaçlarının karşılanabilmesi adına tarım sektöründeki girişimler artmaktadır. Fakat tarım alanlarında yürütülen yanlış uygulamalar ve politikalar, toprakların gittikçe ağır metal kirliliğine ve çoraklaşmasına neden olmakta olup bunun sonucu olarak da tarım alanları kullanılamaz duruma gelmektedir. Bazı çalışmalarda ağır metal toksisitesinin engellenmesi için biochar uygulamaları hem metal stresinin azaltılması hemde bitki verimi için kullanılmaya başlanmıştır. Biochar uygulamaları yapılan araştırmalarda, mahsul veriminde önemli artışların olduğu rapor edilmiştir.

Biocharın stresle ve/veya stressiz koşullarda buğday fidelerine uygulanmasının ardından büyüme ve fizyolojik parametreler üzerinde olumlu etki yaptığı belirlenmiştir. Biochar uygulamaları yaprak bağıl su içerikleri, bağıl büyüme oranı, ozmotik potansiyel ve fotosentetik aygıtların korunmasında olumlu etkiler sağlamıştır. Biochar uygulamaları Co stresinin membranlar üzerindeki olumsuz etkisini azaltarak TBARS seviyesinde azalmaya ve antioksidan enzimleri indükleyerek bitkinin strese karşı toleransının artmasına neden olmuştur. H_2O_2 miktarlarının biochar uygulamalarıyla düşürülmesi, biocharın oksidatif hasara karşı bitkiyi koruduğunu göstermektedir. Biochar uygulamaları genel olarak antioksidan enzimlerden SOD, CAT, POX, APX, GR, MDHAR, DHAR ve NOX aktivitelerini artırmıştır. Biochar uygulamalarıyla birlikte metal alımı ve antioksidan savunma sisteminde gözlenen değişimlerin ve etkileşimlerin anlaşılması, bitki ıslahı çalışmalarında daha etkili sonuçlara ulaşılmasına yardımcı olacağı düşüncesindeyiz.

Elde ettiğimiz veriler, biochar uygulamalarıyla yapılacak genetik mühendisliği, bitki biyolojisi ve biyoteknoloji alanlarındaki bilimsel çalışmalara yol gösterici iyi bir kaynak olacağı görüşündeyiz. Çalışmamız literatür için yeni bilgiler içerdiğinden, Türkiye’de ve dünyada bu alandaki çalışmalara önemli katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Abdelgawad, H., Zinta, G., Hegab, M. M., Pandey, R., Asard, H. ve Abuelsoud, W., 2016, High salinity induces different oxidative stress and antioxidant responses in maize seedlings organs, *Frontiers in Plant Science*, 7.
- Aftab, K. U. ve Ahmad, I. Z., 2013, Alterations in antioxidative defense system of *Anabaena variabilis* in the presence of heavy metals, *4th International Conference on Environmental Science and Development- Icesd 2013*, 5, 491-496.
- Aghaz, M., Bandehagh, A., Aghazade, E., Toorchi, M. ve Ghassemi-Gholezani, K., 2013, Effects of cadmium stress on some growth and physiological characteristics in dill (*Anethum graveolens*) ecotypes, *International Journal of Agriculture*, 3 (2), 409.
- Akpınar, K., 2005, Dünyada ve Türkiye’de suyun kullanımı ve geleceğimiz için önemi, *Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Hizmetiçi Eğitimi*. Yalova, 6-16.
- Aksoy, M., 2008, Beslenme Biyokimyası, Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.
- Ali, A., Guo, D., Zhang, Y., Sun, X. N., Jiang, S. C., Guo, Z. Y., Huang, H., Liang, W., Li, R. H. ve Zhang, Z. Q., 2017, Using bamboo biochar with compost for the stabilization and phytotoxicity reduction of heavy metals in mine-contaminated soils of China, *Scientific Reports*, 7.
- Ali, H., Khan, E. ve Sajad, M. A., 2013, Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications, *Chemosphere*, 91 (7), 869-881.
- Ali, S., Bai, P., Zeng, F., Cai, S., Shamsi, I. H., Qiu, B., Wu, F. ve Zhang, G., 2011, The ecotoxicological and interactive effects of chromium and aluminum on growth, oxidative damage and antioxidant enzymes on two barley genotypes differing in Al tolerance, *Environmental and Experimental Botany*, 70 (2-3), 185-191.
- Alia ve Saradhi, P. P., 1991, Proline accumulation under heavy-metal stress, *Journal of Plant Physiology*, 138 (5), 554-558.
- Alsokari, S. ve Aldesuquy, H., 2011, Synergistic effect of polyamines and waste water on leaf turgidity, heavy metals accumulation in relation to grain yield, *J. Appl. Sci. Res*, 7 (3), 376-384.
- Arrigoni, O., 1994, Ascorbate system in plant development, *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 26 (4), 407-419.
- Asgher, M., Per, T. S., Anjum, S., Khan, M. I. R., Masood, A., Verma, S. ve Khan, N. A., 2017, Contribution of glutathione in heavy metal stress tolerance in plants, In: *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress*, Eds: Springer, p. 297-313.
- Azarakhsh, M. R., Asrar, Z. ve Mansouri, H., 2015, Effects of seed and vegetative stage cysteine treatments on oxidative stress response molecules and enzymes in *Ocimum basilicum* L. under cobalt stress, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 15 (3), 651-662.
- Bahri, N. B., Laribi, B., Soufi, S., Rezgui, S. ve Bettaieb, T., 2015, Growth performance, photosynthetic status and bioaccumulation of heavy metals by *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud growing on contaminated soils, *Int. J. Agron. Agr. Res*, 6, 32-43.
- Bates, L., Waldren, R. ve Teare, I., 1973, Rapid determination of free proline for water-stress studies, *Plant and soil*, 39 (1), 205-207.

- Beauchamp, C. ve Fridovich, I., 1971, Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Analytical biochemistry*, 44 (1), 276-287.
- Beesley, L. ve Marmiroli, M., 2011, The immobilisation and retention of soluble arsenic, cadmium and zinc by biochar, *Environmental Pollution*, 159 (2), 474-480.
- Beesley, L., Marmiroli, M., Pagano, L., Pighi, V., Fellet, G., Fresno, T., Vamerali, T., Bandiera, M. ve Marmiroli, N., 2013, Biochar addition to an arsenic contaminated soil increases arsenic concentrations in the pore water but reduces uptake to tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.), *Science of the Total Environment*, 454, 598-603.
- Bergmeyer, H. U., 1970, Methoden der enzymatischen Analyse. 2, Verlag Chemie, p.
- Björkman, O. ve Demmig, B., 1987, Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins, *Planta*, 170 (4), 489-504.
- Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.
- Büyük, İ., Soydam-Aydın, S. ve Aras, S., 2012, Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar, *Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology*, 69 (2), 97-110.
- Chaney, R. L., Angle, J. S., Broadhurst, C. L., Peters, C. A., Tappero, R. V. ve Sparks, D. L., 2007, Improved understanding of hyperaccumulation yields commercial phytoextraction and phytomining technologies, *Journal of Environmental Quality*, 36 (5), 1429-1443.
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M. H. ve El Ferjani, E., 1997, Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Plant Science*, 127 (2), 139-147.
- Chatterjee, J. ve Chatterjee, C., 2000, Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower, *Environmental Pollution*, 109 (1), 69-74.
- Cheeseman, J. M., 2006, Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions, *Journal of Experimental Botany*, 57 (10), 2435-2444.
- Chew, O., Whelan, J. ve Millar, A. H., 2003, Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in Arabidopsis mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants, *Journal of Biological Chemistry*, 278 (47), 46869-46877.
- Choppala, G. K., Bolan, N., Megharaj, M., Chen, Z. ve Naidu, R., 2012, The influence of biochar and black carbon on reduction and bioavailability of chromate in soils, *Journal of Environmental Quality*, 41 (4), 1175-1184.
- Chung, S. K., Osawa, T. ve Kawakishi, S., 1997, Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*), *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 61 (1), 118-123.
- Clemens, S., 2006, Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants, *Biochimie*, 88 (11), 1707-1719.
- Conesa, H. M., Faz, Á. ve Arnaldos, R., 2007, Initial studies for the phytostabilization of a mine tailing from the Cartagena-La Union Mining District (SE Spain), *Chemosphere*, 66 (1), 38-44.
- Cui, L., Li, L., Zhang, A., Pan, G., Bao, D. ve Chang, A., 2011, Biochar amendment greatly reduces rice Cd uptake in a contaminated paddy soil: a two-year field experiment, *BioResources*, 6 (3), 2605-2618.

- Cunningham, S. D. ve Ow, D. W., 1996, Promises and prospects of phytoremediation, *Plant Physiology*, 110 (3), 715.
- de Abreu, C. A., Coscione, A. R., Pires, A. M. ve Paz-Ferreiro, J., 2012, Phytoremediation of a soil contaminated by heavy metals and boron using castor oil plants and organic matter amendments, *Journal of Geochemical Exploration*, 123, 3-7.
- Dempsey, D. A. ve Klessig, D. F., 1995, Signals in plant-disease resistance, *Bulletin De L Institut Pasteur*, 93 (3), 167-186.
- Dey, S. K., Dey, J., Patra, S. ve Pothal, D., 2007, Changes in the antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in wheat seedlings exposed to cadmium and lead stress, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19 (1), 53-60.
- Dubby, R. C. ve Dwivedi, R. S., 1987, Effect of Heavy-Metals on Seed-Germination and Seedling Growth of Soybean, *National Academy Science Letters-India*, 10 (4), 121-123.
- Ehsanpour, A. A., Zarei, S. ve Abbaspour, J., 2012, The role of over expression of P5CS gene on proline, catalase, ascorbate peroxidase activity and lipid peroxidation of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plant under in vitro drought stress, *Journal of Cell and Molecular Research*, 4 (1), 43-49.
- Elad, Y., Cytryn, E., Harel, Y. M., Lew, B. ve Graber, E. R., 2012, The biochar effect: plant resistance to biotic stresses, *Phytopathologia Mediterranea*, 50 (3), 335-349.
- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F. ve Xie, Y., 2015, Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response, *The Scientific World Journal*, 2015.
- Fahad, S., Hussain, S., Saud, S., Tanveer, M., Bajwa, A. A., Hassan, S., Shah, A. N., Ullah, A., Wu, C. ve Khan, F. A., 2015, A biochar application protects rice pollen from high-temperature stress, *Plant Physiology and Biochemistry*, 96, 281-287.
- Fang, Y. Y., Singh, B. ve Singh, B. P., 2015, Effect of temperature on biochar priming effects and its stability in soils, *Soil Biology & Biochemistry*, 80, 136-145.
- Farhangi-Abriz, S. ve Torabian, S., 2017, Antioxidant enzyme and osmotic adjustment changes in bean seedlings as affected by biochar under salt stress, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 137, 64-70.
- Fellet, G., Marchiol, L., Delle Vedove, G. ve Peressotti, A., 2011, Application of biochar on mine tailings: effects and perspectives for land reclamation, *Chemosphere*, 83 (9), 1262-1267.
- Fidalgo, F., Azenha, M., Silva, A. F., de Sousa, A., Santiago, A., Ferraz, P. ve Teixeira, J., 2013, Copper-induced stress in *Solanum nigrum* L. and antioxidant defense system responses, *Food and Energy Security*, 2 (1), 70-80.
- Forster, C. ve Wase, D., 1997, Biosorption of heavy metals: an introduction, biosorbents for metal ions chapter 1, Taylor and Francis, London.
- Foyer, C. H. ve Halliwell, B., 1976, The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism, *Planta*, 133 (1), 21-25.
- Foyer, C. H. ve Noctor, G., 2005, Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context, *Plant, Cell & Environment*, 28 (8), 1056-1071.
- Gad, N. ve Kandil, H., 2011, Maximizing the tolerance of wheat plants to soil salinity using cobalt. 1-Growth and mineiral composition, *Journal of Applied Sciences Research*, 7 (11), 1569-1574.

- Gad, N. ve El-Metwally, I., 2015, Chemical and physiological response of maize to salinity using cobalt supplement, *International Journal of ChemTech Research*, 8 (10), 45-52.
- Gascó, G., Paz-Ferreiro, J. ve Méndez, A., 2011, Thermal analysis of soil amended with sewage sludge and biochar from sewage sludge pyrolysis, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 108 (2), 769-775.
- Gechev, T. S., Van Breusegem, F., Stone, J. M., Denev, I. ve Laloi, C., 2006, Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death, *Bioessays*, 28 (11), 1091-1101.
- Gill, S. S. ve Tuteja, N., 2010, Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 48 (12), 909-930.
- Graber, E. R., Harel, Y. M., Kolton, M., Cytryn, E., Silber, A., David, D. R., Tsechansky, L., Borenshtein, M. ve Elad, Y., 2010, Biochar impact on development and productivity of pepper and tomato grown in fertigated soilless media, *Plant and Soil*, 337 (1-2), 481-496.
- Gür, N., Topdemir, A., Munzuroğlu, Ö. ve Çobanoğlu, D., 2004, Ağır Metal İyonlarının (Cu^{+2} , Pb^{+2} , Hg^{+2} , Cd^{+2}) *Clivia* sp. bitkisi polenlerinin çimlenmesi ve tüp büyümesi üzerine etkileri, *FÜ Fen ve Matematik Bilimleri Dergisi*, 16 (2), 177-182.
- Hafeez, Y., Iqbal, S., Jabeen, K., Shahzad, S., Jahan, S. ve Rasul, F., 2017, Effect of biochar application on seed germination and seedling growth of *Glycine max* (L.) Merr. under drought stress, *Pakistan Journal of Botany*, 49, 7-13.
- Hall, J. L., 2002, Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance, *Journal of Experimental Botany*, 53 (366), 1-11.
- Hao, F., Wang, X. ve Chen, J., 2006, Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in nickel-induced oxidative stress in roots of wheat seedlings, *Plant Science*, 170 (1), 151-158.
- Hartley, W., Dickinson, N. M., Riby, P. ve Lepp, N. W., 2009, Arsenic mobility in brownfield soils amended with green waste compost or biochar and planted with *Miscanthus*, *Environmental Pollution*, 157 (10), 2654-2662.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Rahman, A., Mahmud, J. A., Alharby, H. F. ve Fujita, M., 2018, Exogenous glutathione attenuates lead-induced oxidative stress in wheat by improving antioxidant defense and physiological mechanisms, *Journal of Plant Interactions*, 13 (1), 203-212.
- Herzog, V. ve Fahimi, H., 1973, Determination of the activity of peroxidase, *Analytical biochemistry*, 55 (554), e62.
- Hongbo, S., Liye, C., Gang, X., Kun, Y., Lihua, Z. ve Junna, S., 2011, Progress in phytoremediating heavy-metal contaminated soils, In: *Detoxification of Heavy Metals*, Eds: Springer, p. 73-90.
- Hossain, M. A., Nakano, Y. ve Asada, K., 1984, Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide, *Plant and cell physiology*, 25 (3), 385-395.
- Hossain, M. A., Piyatida, P., da Silva, J. A. T. ve Fujita, M., 2012, Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation, *Journal of Botany*, 2012.
- Houben, D., Evrard, L. ve Sonnet, P., 2013, Mobility, bioavailability and pH-dependent leaching of cadmium, zinc and lead in a contaminated soil amended with biochar, *Chemosphere*, 92 (11), 1450-1457.

- Huang, W.-k., Ji, H.-l., Gheysen, G., Debode, J. ve Kyndt, T., 2015, Biochar-amended potting medium reduces the susceptibility of rice to root-knot nematode infections, *BMC plant biology*, 15 (1), 267.
- Hunt, R., Causton, D. R., Shipley, B. ve Askew, A. P., 2002, A modern tool for classical plant growth analysis, *Annals of Botany*, 90 (4), 485-488.
- Ismail, S. Z., Khandaker, M. M., Mat, N. ve Boyce, A. N., 2015, Effects of hydrogen peroxide on growth, development and quality of fruits: a review, *J Agron*, 14 (4), 331-336.
- Jeffery, S., Verheijen, F. G., van der Velde, M. ve Bastos, A. C., 2011, A quantitative review of the effects of biochar application to soils on crop productivity using meta-analysis, *Agriculture, ecosystems & environment*, 144 (1), 175-187.
- Jiang, J., Xu, R.-k., Jiang, T.-y. ve Li, Z., 2012, Immobilization of Cu (II), Pb (II) and Cd (II) by the addition of rice straw derived biochar to a simulated polluted Ultisol, *Journal of Hazardous Materials*, 229, 145-150.
- Jiang, M. Y. ve Zhang, J. H., 2002, Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings, *Planta*, 215 (6), 1022-1030.
- Kalaivanan, D. ve Ganeshamurthy, A. N., 2016, Mechanisms of heavy metal toxicity in plants, In: *Abiotic Stress Physiology of Horticultural Crops*, Eds: Springer, p. 85-102.
- Kanwal, S., Ilyas, N., Shabir, S., Saeed, M., Gul, R., Zahoor, M., Batool, N. ve Mazhar, R., 2018, Application of biochar in mitigation of negative effects of salinity stress in wheat (*Triticum aestivum* L.), *Journal of Plant Nutrition*, 41 (4), 526-538.
- Karami, N., Clemente, R., Moreno-Jiménez, E., Lepp, N. W. ve Beesley, L., 2011, Efficiency of green waste compost and biochar soil amendments for reducing lead and copper mobility and uptake to ryegrass, *Journal of Hazardous Materials*, 191 (1-3), 41-48.
- Kartika, K., Lakitan, B., Wijaya, A., Kadir, S., Widuri, L. I., Erna Siaga, E. ve Meihana, M., 2018, Effects of particle size and application rate of rice-husk biochar on chemical properties of tropical wetland soil, rice growth, and yield, *Australian Journal of Crop Science*.
- Karuppanapandian, T., Sinha, P. B., Haniya, A. M. K. ve Mamoharan, K., 2006, Differential antioxidative responses of ascorbate-glutathione cycle enzymes and metabolites to chromium stress in green gram (*Vigna radiata* L. Wilczek) leaves, *Journal of Plant Biology*, 49 (6), 440-447.
- Karuppanapandian, T. ve Manoharan, K., 2008, Uptake and translocation of tri- and hexa-valent chromium and their effects on black gram (*Vigna mungo* L. Hepper cv. Co4) roots, *Journal of Plant Biology*, 51 (3), 192-201.
- Karuppanapandian, T. ve Kim, W., 2013, Cobalt-induced oxidative stress causes growth inhibition associated with enhanced lipid peroxidation and activates antioxidant responses in Indian mustard (*Brassica juncea* L.) leaves, *Acta Physiologiae Plantarum*, 35 (8), 2429-2443.
- Kim, H. S., Kim, K. R., Yang, J. E., Ok, Y. S., Owens, G., Nehls, T., Wessolek, G. ve Kim, K. H., 2016, Effect of biochar on reclaimed tidal land soil properties and maize (*Zea mays* L.) response, *Chemosphere*, 142, 153-159.
- Klimashevskii, E. ve Dedov, V., 1975, Localization of the mechanism of growth inhibiting action of Al^{3+} in elongating cell walls, *Soviet plant physiology*.

- Komárek, M., Vaněk, A. ve Ettler, V., 2013, Chemical stabilization of metals and arsenic in contaminated soils using oxides—a review, *Environmental Pollution*, 172, 9-22.
- Laemmli, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *nature*, 227, 680-685.
- Leblebici, Z., Aksoy, A. ve Duman, F., 2011, Influence of salinity on the growth and heavy metal accumulation capacity of *Spirodela polyrrhiza* (Lemnaceae), *Turkish Journal of Biology*, 35 (2), 215-220.
- Lehmann, J., Rillig, M. C., Thies, J., Masiello, C. A., Hockaday, W. C. ve Crowley, D., 2011, Biochar effects on soil biota—a review, *Soil biology and biochemistry*, 43 (9), 1812-1836.
- Lewis, N. G. ve Yamamoto, E., 1990, Lignin - occurrence, biogenesis and biodegradation, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41, 455-496.
- Li, C.-Z., Li, C.-Z., Wang, D. ve Wang, G.-X., 2005a, The protective effects of cobalt on potato seedling leaves during osmotic stress, *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 46.
- Li, C. Z., Wang, D. ve Wang, G. X., 2005b, The protective effects of cobalt on potato seedling leaves during osmotic stress, *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 46 (2), 119-125.
- Li, X. N., Gitau, M. M., Han, S. J., Fu, J. M. ve Xie, Y., 2017, Effects of cadmium-resistant fungi *Aspergillus aculeatus* on metabolic profiles of bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.)Pers.] under Cd stress, *Plant Physiology and Biochemistry*, 114, 38-50.
- Li, Y.-M., Chaney, R., Brewer, E., Roseberg, R., Angle, J. S., Baker, A., Reeves, R. ve Nelkin, J., 2003, Development of a technology for commercial phytoextraction of nickel: economic and technical considerations, *Plant and Soil*, 249 (1), 107-115.
- Liang, Y. C., Chen, Q., Liu, Q., Zhang, W. H. ve Ding, R. X., 2003, Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.), *Journal of Plant Physiology*, 160 (10), 1157-1164.
- Lima, I. M., Boykin, D. L., Klasson, K. T. ve Uchimiya, M., 2014, Influence of post-treatment strategies on the properties of activated chars from broiler manure, *Chemosphere*, 95, 96-104.
- Liu, X., Zhang, A., Ji, C., Joseph, S., Bian, R., Li, L., Pan, G. ve Paz-Ferreiro, J., 2013, Biochar's effect on crop productivity and the dependence on experimental conditions—a meta-analysis of literature data, *Plant and Soil*, 373 (1-2), 583-594.
- Lombardi, L. ve Sebastiani, L., 2005, Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants, *Plant Science*, 168 (3), 797-802.
- Lu, H., Zhang, W., Yang, Y., Huang, X., Wang, S. ve Qiu, R., 2012, Relative distribution of Pb²⁺ sorption mechanisms by sludge-derived biochar, *Water research*, 46 (3), 854-862.
- Lwalaba, J. L. W., Zvogbo, G., Mulembo, M., Mundende, M. ve Zhang, G. P., 2017, The effect of cobalt stress on growth and physiological traits and its association with cobalt accumulation in barley genotypes differing in cobalt tolerance, *Journal of Plant Nutrition*, 40 (15), 2192-2199.
- Mackie, K. A., Marhan, S., Ditterich, F., Schmidt, H. P. ve Kandeler, E., 2015, The effects of biochar and compost amendments on copper immobilization and soil

- microorganisms in a temperate vineyard, *Agriculture Ecosystems & Environment*, 201, 58-69.
- Mallick, N. ve Mohn, F. H., 2003, Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55 (1), 64-69.
- Mazhoudi, S., Chaoui, A., Ghorbal, M. H. ve ElFerjani, E., 1997, Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill), *Plant Science*, 127 (2), 129-137.
- Méndez, A., Barriga, S., Fidalgo, J. ve Gascó, G., 2009, Adsorbent materials from paper industry waste materials and their use in Cu (II) removal from water, *Journal of Hazardous Materials*, 165 (1-3), 736-743.
- Méndez, A., Gómez, A., Paz-Ferreiro, J. ve Gascó, G., 2012, Effects of biochar from sewage sludge pyrolysis on Mediterranean agricultural soils, *Chemosphere*, 89, 1354-1359.
- Miller, G., Shulaev, V. ve Mittler, R., 2008, Reactive oxygen signaling and abiotic stress, *Physiologia Plantarum*, 133 (3), 481-489.
- Mittler, R. ve Zilinskas, B. A., 1993, Detection of Ascorbate Peroxidase-Activity in Native Gels by Inhibition of the Ascorbate-Dependent Reduction of Nitroblue Tetrazolium, *Analytical biochemistry*, 212 (2), 540-546.
- Mohanty, N., Vass, I. ve Demeter, S., 1989, Impairment of Photosystem-2 Activity at the Level of Secondary Quinone Electron-Acceptor in Chloroplasts Treated with Cobalt, Nickel and Zinc Ions, *Physiologia Plantarum*, 76 (3), 386-390.
- Moura, J. C. M. S., Bonine, C. A. V., de Oliveira Fernandes Viana, J., Dornelas, M. C. ve Mazzafera, P., 2010, Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants, *Journal of integrative plant biology*, 52 (4), 360-376.
- Mourato, M., Reis, R. ve Martins, L. L., 2012, Characterization of plant antioxidative system in response to abiotic stresses: a focus on heavy metal toxicity, In: *Advances in Selected Plant Physiology Aspects*, Eds: InTech, p.
- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D. ve Sreekanth, T. V. M., 2010, Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review, *Environmental Chemistry Letters*, 8 (3), 199-216.
- Nahar, K., Rahman, M., Hasanuzzaman, M., Alam, M. M., Rahman, A., Suzuki, T. ve Fujita, M., 2016, Physiological and biochemical mechanisms of spermine-induced cadmium stress tolerance in mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings, *Environmental Science and Pollution Research*, 23 (21), 21206-21218.
- Nakano, Y. ve Asada, K., 1981, Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant and cell physiology*, 22 (5), 867-880.
- Namgay, T., Singh, B. ve Singh, B. P., 2010, Influence of biochar application to soil on the availability of As, Cd, Cu, Pb, and Zn to maize (*Zea mays* L.), *Soil Research*, 48 (7), 638-647.
- Nicholas, D. ve Thomas, W., 1954, Some effects of heavy metals on plants grown in soil culture, *Plant and Soil*, 5 (2), 182-193.
- Noctor, G. ve Foyer, C. H., 1998, A re-evaluation of the ATP: NADPH budget during C3 photosynthesis: a contribution from nitrate assimilation and its associated respiratory activity?, *Journal of Experimental Botany*, 49 (329), 1895-1908.
- Olmos, E., Martínez-Solano, J. R., Piqueras, A. ve Hellín, E., 2003, Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line), *Journal of Experimental Botany*, 54 (381), 291-301.

- Orłowska, E., Przybyłowicz, W., Orłowski, D., Turnau, K. ve Mesjasz-Przybyłowicz, J., 2011, The effect of mycorrhiza on the growth and elemental composition of Ni-hyperaccumulating plant *Berkheya coddii* Roessler, *Environmental Pollution*, 159 (12), 3730-3738.
- Öktüren Asri, F. ve Sönmez, S., 2006, Ağır metal toksisitesinin bitki metabolizması üzerine etkileri, *Derim; Cilt 23, Sayı 2 (2006)*; 36-45.
- Pandey, N. ve Sharma, C. P., 2002, Effect of heavy metals Co^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} on growth and metabolism of cabbage, *Plant Science*, 163 (4), 753-758.
- Pandey, N. ve Pathak, G., 2006, Nickel alters antioxidative defense and water status in green gram, *Indian Journal of Plant Physiology*, 11 (2), 113.
- Pandey, N., Pathak, G. C., Pandey, D. K. ve Pandey, R., 2009, Heavy metals, Co, Ni, Cu, Zn and Cd, produce oxidative damage and evoke differential antioxidant responses in spinach, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 21 (2), 103-111.
- Park, J. H., Choppala, G. K., Bolan, N. S., Chung, J. W. ve Chuasavathi, T., 2011, Biochar reduces the bioavailability and phytotoxicity of heavy metals, *Plant and Soil*, 348 (1-2), 439.
- Park, J. H., Choppala, G., Lee, S. J., Bolan, N., Chung, J. W. ve Edraki, M., 2013, Comparative sorption of Pb and Cd by biochars and its implication for metal immobilization in soils, *Water, Air, & Soil Pollution*, 224 (12), 1711.
- Paschke, M. W., Valdecantos, A. ve Redente, E. F., 2005, Manganese toxicity thresholds for restoration grass species, *Environmental Pollution*, 135 (2), 313-322.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C. ve Dunand, C., 2005, Peroxidases have more functions than a Swiss army knife, *Plant Cell Reports*, 24 (5), 255-265.
- Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, B. ve Sharma, A., 2004, Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance, *Environmental and Experimental Botany*, 52 (3), 199-223.
- Paz-Ferreiro, J., Fu, S., Méndez, A. ve Gascó, G., 2014, Interactive effects of biochar and the earthworm *Pontoscolex corethrurus* on plant productivity and soil enzyme activities, *Journal of soils and sediments*, 14 (3), 483-494.
- Polle, A., Otter, T. ve Seifert, F., 1994, Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea-Abies* L.), *Plant Physiology*, 106 (1), 53-60.
- Pospíšlová, L., Habová, M., Doleželová, E., Drápelová, I. ve Renčíuková, V., 2016, Effect of exogenous organic matter application on soil and plant elemental composition in pot experiments, *Journal of Life Sciences*, 10, 153-160.
- Pourrut, B., Shahid, M., Douay, F., Dumat, C. ve Pinelli, E., 2013, Molecular mechanisms involved in lead uptake, toxicity and detoxification in higher plants, In: *Heavy Metal Stress in Plants*, Eds: Springer, p. 121-147.
- Quartacci, M., Fantozzi, A., Cardelli, R. ve Sgherri, C., 2015, Biochar amendment reduces oxidative stress in lettuce grown under copper excess, *Agrochimica*, 59 (2), 188-202.
- Quartacci, M. F., Cosi, E. ve Navari-Izzo, F., 2001, Lipids and NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane vesicles from roots of wheat grown under copper deficiency or excess, *Journal of Experimental Botany*, 52 (354), 77-84.
- Rady, M. M., El-Azeem, M. M. A., El-Mageed, T. A. A. ve Abdelhamid, M. T., 2018, Integrative potassium humate and biochar application reduces salinity effects and contaminants, and improves growth and yield of eggplant grown under saline conditions.

- Rao, K. M. ve Sresty, T., 2000, Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses, *Plant science*, 157 (1), 113-128.
- Rascio, N. ve Navari-Izzo, F., 2011, Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting?, *Plant Science*, 180 (2), 169-181.
- Rastgoo, L., Alemzadeh, A. ve Afsharifar, A., 2011, Isolation of two novel isoforms encoding zinc-and copper-transporting P1B-ATPase from Gouan (*Aeluropus littoralis*), *Plant Omics J*, 4 (7), 377-383.
- Romero-Puertas, M., Rodríguez-Serrano, M., Corpas, F., Gomez, M. d., Del Rio, L. ve Sandalio, L., 2004, Cadmium-induced subcellular accumulation of $O_2^{\cdot -}$ and H_2O_2 in pea leaves, *Plant, Cell & Environment*, 27 (9), 1122-1134.
- Roy, M. ve McDonald, L. M., 2015, Metal uptake in plants and health risk assessments in metal-contaminated smelter soils, *Land Degradation & Development*, 26 (8), 785-792.
- Roy, S. J., Negrão, S. ve Tester, M., 2014, Salt resistant crop plants, *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 115-124.
- Rucinska-Sobkowiak, R., 2016, Water relations in plants subjected to heavy metal stresses, *Acta Physiologiae Plantarum*, 38 (11).
- Rutigliano, F. A., Romano, M., Marzaioli, R., Baglivo, I., Baronti, S., Miglietta, F. ve Castaldi, S., 2014, Effect of biochar addition on soil microbial community in a wheat crop, *European Journal of Soil Biology*, 60, 9-15.
- Sagi, M. ve Fluhr, R., 2001, Superoxide production by plant homologues of the gp91phox NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection, *Plant Physiology*, 126 (3), 1281-1290.
- Santa-Cruz, A., Martinez-Rodriguez, M. M., Perez-Alfocea, F., Romero-Aranda, R. ve Bolarin, M. C., 2002, The rootstock effect on the tomato salinity response depends on the shoot genotype, *Plant Science*, 162 (5), 825-831.
- Schweikert, C., Liskay, A. ve Schopfer, P., 2000, Scission of polysaccharides by peroxidase-generated hydroxyl radicals, *Phytochemistry*, 53 (5), 565-570.
- Seevers, P., Daly, J. ve Catedral, F., 1971, The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust disease, *Plant Physiology*, 48 (3), 353-360.
- Sharma, P. ve Dubey, R. S., 2007, Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum, *Plant Cell Reports*, 26 (11), 2027-2038.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S. ve Pessarakli, M., 2012, Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions, *Journal of Botany*, 2012, 1-26.
- Sizmur, T., Wingate, J., Hutchings, T. ve Hodson, M. E., 2011, *Lumbricus terrestris* L. does not impact on the remediation efficiency of compost and biochar amendments, *Pedobiologia*, 54, S211-S216.
- Smart, R. E. ve Bingham, G. E., 1974, Rapid estimates of relative water content, *Plant Physiology*, 53 (2), 258-260.
- Sree, K. S., Keresztes, A., Mueller-Roeber, B., Brandt, R., Eberius, M., Fischer, W. ve Appenroth, K. J., 2015, Phytotoxicity of cobalt ions on the duckweed *Lemna minor* - Morphology, ion uptake, and starch accumulation, *Chemosphere*, 131, 149-156.
- Stephen, J., 2016, Biochar for environmental management-science and technology.
- Sytar, O., Kumar, A., Latowski, D., Kuczyńska, P., Strzalka, K. ve Prasad, M. N. V., 2013, Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and

- detoxification mechanisms in plants, *Acta Physiologiae Plantarum*, 35 (4), 985-999.
- Szabados, L. ve Savoure, A., 2010, Proline: a multifunctional amino acid, *Trends in Plant Science*, 15 (2), 89-97.
- Temel, Y., Bozkuş, T., Karagözoğlu, Y. ve Çiftçi, M., 2017, Glutatyon redüktaz (GR) enziminin japon bildircin (*Coturnix coturnix japonica*) eritrositlerinden saflaştırılması ve karakterizasyonu, *J. Ins. Sci. Tech*, 7, 143-150.
- Tewari, R. K., Kumar, P., Sharma, P. N. ve Bisht, S. S., 2002, Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt, *Plant Science*, 162 (3), 381-388.
- Tripathi, B. ve Gaur, J., 2004, Relationship between copper-and zinc-induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus sp.*, *Planta*, 219 (3), 397-404.
- Uchimiya, M., Lima, I. M., Klasson, K. T. ve Wartelle, L. H., 2010, Contaminant immobilization and nutrient release by biochar soil amendment: roles of natural organic matter, *Chemosphere*, 80 (8), 935-940.
- Uchimiya, M., Chang, S. ve Klasson, K. T., 2011, Screening biochars for heavy metal retention in soil: role of oxygen functional groups, *Journal of Hazardous Materials*, 190 (1-3), 432-441.
- Uchimiya, M., Cantrell, K. B., Hunt, P. G., Novak, J. M. ve Chang, S., 2012, Retention of heavy metals in a typic kandiudult amended with different manure-based biochars, *Journal of Environmental Quality*, 41 (4), 1138-1149.
- Underwood, E., 2012, Trace elements in human and animal nutrition, Elsevier, p.
- Urano, K., Kurihara, Y., Seki, M. ve Shinozaki, K., 2010, 'Omics' analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses, *Current Opinion in Plant Biology*, 13 (2), 132-138.
- Vacca, A., Bianco, M., Murolo, M. ve Violante, P., 2012, Heavy metals in contaminated soils of the Rio Sitzzerri floodplain (Sardinia, Italy): characterization and impact on pedodiversity, *Land Degradation & Development*, 23 (4), 350-364.
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E. ve Nehnevajova, E., 2009, Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field, *Environmental Science and Pollution Research*, 16 (7), 765-794.
- Viehweger, K., 2014, How plants cope with heavy metals, *Botanical Studies*, 55.
- Wainwright, S. ve Woolhouse, H., 1977, Some physiological aspects of copper and zinc tolerance in *Agrostis tenuis* Sibth.: cell elongation and membrane damage, *Journal of Experimental Botany*, 28 (4), 1029-1036.
- Wallace, A. ve Abou-Zamzam, A., 1989, Low levels, but excesses, of five different trace elements, singly and in combination, on interactions in bush beans grown in solution culture, *Soil Science*, 147 (6), 439-441.
- Wang, Y. F., Pan, F. B., Wang, G. S., Zhang, G. D., Wang, Y. L., Chen, X. S. ve Mao, Z. Q., 2014, Effects of biochar on photosynthesis and antioxidative system of *Malus hupehensis* Rehd. seedlings under replant conditions, *Scientia Horticulturae*, 175, 9-15.
- Wojtyla, L., Lechowska, K., Kubala, S. ve Garnczarska, M., 2016, Different modes of hydrogen peroxide action during seed germination, *Frontiers in Plant Science*, 7.
- Woodbury, W., Spencer, A. ve Stahmann, M., 1971, An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes, *Analytical biochemistry*, 44 (1), 301-305.

- Wright, S. ve Hiron, R., 1972, The accumulation of abscisic acid in plants during wilting and under other stress conditions, In: *Plant Growth Substances 1970*, Eds: Springer, p. 291-298.
- Wu, W., Yang, M., Feng, Q., McGrouther, K., Wang, H., Lu, H. ve Chen, Y., 2012, Chemical characterization of rice straw-derived biochar for soil amendment, *Biomass and bioenergy*, 47, 268-276.
- Xu, D. Y., Zhao, Y., Sun, K., Gao, B., Wang, Z. Y., Jin, J., Zhang, Z. Y., Wang, S. F., Yan, Y., Liu, X. T. ve Wu, F. C., 2014, Cadmium adsorption on plant- and manure-derived biochar and biochar-amended sandy soils: Impact of bulk and surface properties, *Chemosphere*, 111, 320-326.
- Yang, D., Zeng, D. H., Zhang, J., Li, L. J. ve Mao, R., 2012, Chemical and microbial properties in contaminated soils around a magnesite mine in northeast China, *Land Degradation & Development*, 23 (3), 256-262.
- Yiğittürk, G., Özakça, D. Ü., Çavuşoğlu, T., Kılıç, K. D., Uyanıkgil, Y. ve Sukatar, A., 2016, Response to cobalt toxicity in lichen *Pseudevernia furfuracea*; uptake, photosynthetic quantum yield, membrane integrity and deoxyribonucleic acid fragmentation, *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Tıp Dergisi*, 2 (1).
- Young, S., 1983, Recent advances of cobalt in human nutrition, *Micronutrients New*, 3 (3).
- Zemanová, V., Břendová, K., Pavlíková, D., Kubátová, P. ve Tlustoš, P., 2017, Effect of biochar application on the content of nutrients (Ca, Fe, K, Mg, Na, P) and amino acids in subsequently growing spinach and mustard, *Plant, Soil and Environment*, 7, 322-327.
- Zhang, F. Q., Wang, Y. S., Lou, Z. P. ve Dong, J. D., 2007, Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza*), *Chemosphere*, 67 (1), 44-50.
- Zhang, Z. Y., Meng, J., Dang, S. ve Chen, W. F., 2014, Effect of biochar on relieving cadmium stress and reducing accumulation in super japonica rice, *Journal of Integrative Agriculture*, 13 (3), 547-553.
- Zhou, B. R., Yao, W. J., Wang, S. J., Wang, X. W. ve Jiang, T. B., 2014, The Metallothionein Gene, TaMT3, from *Tamarix androssowii* Confers Cd²⁺ Tolerance in Tobacco, *International Journal of Molecular Sciences*, 15 (6), 10398-10409.
- Zwart, D. C. ve Kim, S.-H., 2012, Biochar amendment increases resistance to stem lesions caused by *Phytophthora* spp. in tree seedlings, *HortScience*, 47 (12), 1736-1740.

<http://www.marmore.com.tr/>

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ayşegül YILDIZTUGAY
Uyruğu : TC
Doğum Yeri ve Tarihi : Konya-Meram 16.03.1991
Telefon : 05374837929
Faks :
e-mail : Aysegulcaglarbiyo@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Meram 75. Yıl Lisesi, Konya	2009
Üniversite	: S. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Konya	2014
Yüksek Lisans	: S. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji ABD, Konya	2018
Doktora	:	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2013	Başkent Hastanesi Biyokimya Lab.	Lab. Teknikerliği
2014	Dershane	Biyoloji öğretmenliği
2014-2015	Atatürk Anadolu Lisesi	Biyoloji öğretmenliği
2015-	Konya Tropikal Kelebek Bahçesi	Biyolog

UZMANLIK ALANI

Bitki Fizyolojisi, Bitkilerde Stres Fizyolojisi, Bitki Biyolojisi

YABANCI DİLLER

İngilizce, İyi

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR

SCI Yayınlar

G. Zengin, M.Z. Aumeeruddy, A. Diuzheva, J. Jekő, Z. Cziáky, **A. Yıldız tugay**, E. Yıldız tugay, M.F. Mahomoodally (2019). A comprehensive appraisal on *Crocus chrysanthus* (Herb.) Herb. flower extracts with HPLC-MS/MS profiles, antioxidant and enzyme inhibitory properties. *J Pharm Biomed Anal.* 164:581-589.

Uluslararası Bilimsel Konferanslarda Sunulan Bildiriler

- A. Yıldızıtugay**, M. Küçüködük, E. Yıldızıtugay, C. Özfıdan-Konakçı (2017). Induction of growth, water status and osmotic adjustment in wheat exposed to cobalt excess by biochar, a soil-applied carbon sequestering agent. *3rd Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants (MESMAP-3)*, Book of Abstracts, p. 307 (13-16 April 2017, Girne, Cyprus). **(YÜKSEK LİSANS TEZİNDEN)**
- M. Küçüködük, **A. Yıldızıtugay**, C. Özfıdan-Konakçı, F. Elbasan, E. Yıldızıtugay (2017). Biochar application affects water content, lipid peroxidation and antioxidant capacity in wheat roots grown in a cobalt-contaminated soil. The 3rd International Symposium on Euro Asian Biodiversity (SEAB2017), Book of Abstracts, p. 434 (05-08 June 2017, Minsk, Belarus). **(YÜKSEK LİSANS TEZİNDEN)**
- E. Yıldızıtugay, C. Özfıdan, M. Küçüködük, S.A. Tekis, **A. Yıldızıtugay** (2015). The exogenously applied selenium modulates antioxidant system in hydroponically grown *Zea mays* roots under combined osmotic and heat stress. *The International Conference on Science, Ecology and Technology I (ICONSETE'2015)*, Book of Abstracts, pp. 51-52 (25-28 August 2015, Vienna, Austria).
- M. Küçüködük, E. Yıldızıtugay, C. Özfıdan-Konakçı, E. Açıkkel, **A. Yıldızıtugay** (2016). Cadmium induced-heavy metal stress in rice (*Oryza sativa* L.) roots: altered water relations by exogenous tannic acid treatment. *2nd International Conference on Science Ecology and Technology (ICONSETE'2016)*, Book of Abstracts, pp. 302 (14-16 October 2016, Barcelona, Spain).
- M. Küçüködük, C. Özfıdan-Konakçı, E. Yıldızıtugay, **A. Yıldızıtugay** (2015). Influence of Cd and/or Zn induced heavy metal stress on photosynthetic parameters and lipid peroxidation in *Glycine max* leaves. *The International Conference on Science, Ecology and Technology I (ICONSETE'2015)*, Book of Abstracts, p. 63 (25-28 August 2015, Vienna, Austria).
- C. Özfıdan-Konakçı, E. Yıldızıtugay, M. Küçüködük, **A. Yıldızıtugay** (2015). The elucidation of effects of photosynthetic parameters, water status and lipid peroxidation in soybean exposed to gallic acid under cold stress. *The International Conference on Science, Ecology and Technology I (ICONSETE'2015)*, Book of Abstracts, p. 64 (25-28 August 2015, Vienna, Austria).
- C. Özfıdan-Konakçı, E. Yıldızıtugay, M. Küçüködük, S.A. Tekis, **A. Yıldızıtugay** (2015). Potentialities of gallic acid on the cadmium and/or zinc stress tolerance associated with photosynthetic capacity and water management in hydroponically grown soybean leaves. *The International Conference on Science, Ecology and Technology I (ICONSETE'2015)*, Book of Abstracts, p. 53 (25-28 August 2015, Vienna, Austria).

- E. Yıldızıtugay, C. Özfıdan-Konakçı, M. Küçüködük, S.A. Tekis, **A. Yıldızıtugay** (2015). The changes of ascorbate and glutathione contents in soybean roots treated with cadmium and/or zinc stress. *2nd International Conference on Natural Products Utilization: from Plant to Pharmacy Shelf (ICNPU-2015)*, Book of Abstracts, p. 330 (14-17 October 2015, Plovdiv, Bulgaria).
- E. Yıldızıtugay, H. Karahan, C. Özfıdan-Konakçı, M. Küçüködük, **A. Yıldızıtugay** (2016). Alleviation of boron stress on water content and enzymatic/non-enzymatic antioxidant system through exogenous ferulic acid application in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *7th International Scientific Agriculture Symposium (Agrosym 2016)*, Book of Abstracts, p. 781 (06-09 October 2016, Jahorina, Bosnia and Herzegovina).
- C. Özfıdan-Konakçı, E. Yıldızıtugay, M. Küçüködük, **A. Yıldızıtugay**, F. Elbasan (2017). Beneficial effects of humic acid on radical scavenging and water management in wheat (*Triticum aestivum*) treated with cadmium stress. *Ecology*, Book of Abstracts, p. 452 (11-13 May 2017, Kayseri, Turkey).
- E. Yıldızıtugay, C. Özfıdan-Konakçı, M. Küçüködük, **A. Yıldızıtugay** (2017). Understanding protective mechanism of exogenous ectoine treatments to remove oxidative damage induced by cadmium treatment in *Zea mays* leaves. *Ecology*, Book of Abstracts, p. 372 (11-13 May 2017, Kayseri, Turkey). **(Sözlü Sunum)**
- M. Küçüködük, C. Özfıdan-Konakçı, E. Yıldızıtugay, **A. Yıldızıtugay** (2017). Potentialities of humic acids to alleviate of damage induced by cadmium stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *3rd Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants (MESMAP-3)*, Book of Abstracts, p. 248 (13-16 April 2017, Girne, Cyprus).

Görev Alınan Araştırma Projeleri

- M. Küçüködük, E. Yıldızıtugay, C. Özfıdan-Konakçı, **A. Yıldızıtugay** (2015). Kadmiyum stresi altında yetiştirilen mısırdaki (*Zea mays* L.) dışarıdan uygulanan ektoinin su ilişkileri ve fotosentez kapasitesinin düzenlenmesi üzerine etkileri. *S.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü* (Yardımcı yürütücü) (Devam ediyor).
- E. Yıldızıtugay, C. Özfıdan-Konakçı, M. Küçüködük, **A. Yıldızıtugay**, F. Elbasan (2017). Kobalt stresi altındaki buğday (*Triticum aestivum* L.) köklerinde biochar uygulamalarının etkileri. *S.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü* (Yardımcı yürütücü) (Devam ediyor).
- E. Yıldızıtugay, H. Karahan, C. Özfıdan-Konakçı, **A. Yıldızıtugay**, D. Berdi, M. Küçüködük, (2017). Bor stresine karşı buğday (*Triticum aestivum* L.) fidelerinde eksojen ferulik asitin iyileştirici etkilerinin belirlenmesi. *S.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü* (Yardımcı yürütücü) (Devam ediyor).