



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**KOBALT TOKSİSİTESİ ALTINDA
NANOMATERYEL FULEREN UYGULANAN
ZEA MAYS YAPRAKLARINDA
KLOROPLASTİK ANTİOKSİDAN
KAPASİTESİNİN, FOTOSENTETİK VERİM
VE AZOT METABOLİZMASI İLE İLİŞKİLİ
ENZİM/GEN AKTİVASYONUNUN
DEĞERLENDİRİLMESİ**
Zeynep PARMAKSIZOĞLU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Temmuz-2022
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Zeynep PARMAKSIZOĞLU tarafından hazırlanan “Kobalt Toksisitesi Altında Nanomateryal Fuleren Uygulanan Zea mays Yapraklarında Kloroplastik Antioksidan Kapasitesinin, Fotosentetik Verim ve Azot Metabolizması ile İlişkili Enzim/Gen Aktivasyonunun Değerlendirilmesi” adlı tez çalışması 05/07/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Prof. Dr. Evren YILDIZTUGAY

Danışman

Doç. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI

Üye

Doç. Dr. Ali Tefvik UNCU

İmza

.....

.....

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim KALAYCI
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 201315005 nolu proje ile desteklenmiştir.

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.

Zeynep PARMAKSIZOĞLU

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KOBALT TOKSİSİTESİ ALTINDA NANOMATERYEL FULEREN UYGULANAN ZEA MAYS YAPRAKLARINDA KLOROPLASTİK ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNİN, FOTOSENTETİK VERİM VE AZOT METABOLİZMASI İLE İLİŞKİLİ ENZİM/GEN AKTİVASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Zeynep PARMAKSIZOĞLU

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI

2022, 81 Sayfa

Jüri

Doç. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI

Prof. Dr. Evren YILDIZTUGAY

Doç. Dr. Ali Tefvik UNCU

Suda çözünebilen fullerene (F) türevleri gibi karbon nanoyapıları, tarım için perspektif ajanlar olarak kabul edilir. F, stres koşullarına karşı bitki tepkisini modüle eden yeni bir nano-ajan olabilir. Ancak, F'nin agroekosistemlerdeki bitkiler üzerindeki etkilerinin altında yatan mekanizma belirsizliğini koruyor. Zea mays, 3 gün (d) boyunca kobalt stresi (Co, 300 µM) ile/olmadan dışarıdan C₆₀-F uygulamalarına (F1: 100; F2: 250; ve F3: 500 mg L⁻¹) maruz bırakıldı. Kobalt stresi büyüme (RGR) ve su içeriği (RWC) değerlerini azaltmıştır. Ancak Co stresine karşı F uygulamaları, bu parametreleri iyileştirmiştir. F1 ve F2 konsantrasyonları kobalt stresiyle birlikte uygulandığında fotosistemlerle (PSI ve PSII) ile ilişkili proteinlerin genlerin ekspresyonları (*psaA* ve *psbA*) artmıştır. Strese maruz kalan mısır kloroplastlarında süperoksit dismutaz (SOD) ve peroksidaz (POX) aktivitelerini artırmıştır. Ancak bu uyarılma toksik düzeydeki radikallerin süpürülmesinde etkili olmamıştır. Bu durum, lipid peroksidasyonun artışına neden olmuştur. Diğer yandan, fluren ve kobalt stresini aynı zamanda uygulanması SOD ve katalaz (CAT) aktivitesini artırırken, F1 ve F2 uygulama konsantrasyonları askorbat-glutasyon (AsA-GSH) döngüsü içinde yer alan askorbat peroksidaz (APX) ve glutasyon redüktaz (GR) enzim aktivitelerini artırmıştır. Stresin uyardığı amonyum toksisitesinin azaltılmasında hem glutamin sentetaz-glutamat sentaz (GS-GOGAT) yolunun özellikle glutamin sentetaz (GS) aktiviteleri kullanıldığı hem de glutamat dehidrogenaz (GDH) aktivitelerinin etkili olduğu söylenebilir. Stresle azalan nitrat redüktaz (NR), nitrit redüktaz (NiR) ve GS aktiviteleri, fuleren ve stres gruplarında artmıştır. Fuleren, GDH enziminin hem aminasyon hem de deaminasyon aktivitelerini artırarak amonyum toksisitesinden bitkilerin kloroplastlarını korumuştur. Dışarıdan uygulanan F, fotosistemlerin reaksiyon merkezi proteinleriyle ilgili genlerin ekspresyonlarını uyararak, savunma sistemiyle ilgili enzimlerin seviyesini artırarak ve mısır kloroplastlarında azot asimilasyonunu geliştirerek Co toksisitesini makul bir şekilde ortadan kaldırdı.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan sistem; fuleren; kobalt stresi; lipid peroksidasyonu; *Zea mays*

ABSTRACT

MS THESIS

ASSESSMENT OF CHLOROPLASTIC ANTIOXIDANT CAPACITY, PHOTOSYNTHETIC EFFICIENCY AND ENZYME/GENE ACTIVATION RELATED TO NITROGEN ASSIMILATION IN NANOMATERIAL FULLERENE-TREATED *Zea mays* LEAVES UNDER COBALT TOXICITY

Zeynep PARMAKSIZOGLU

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Ceyda OZFIDAN KONAKCI

2022, 81 Pages

Jury

Assoc. Prof. Dr. Ceyda OZFIDAN KONAKCI

Prof. Dr. Evren YILDIZTUGAY

Assoc. Prof. Dr. Ali Tevfik UNCU

Carbon nanostructures, such as the water-soluble fullerene (F) derivatives, are considered perspective agents for agriculture. F can be a novel nano-agent modulating plant response against stress conditions. However, the mechanism underlying the impacts of F on plants in agroecosystems remains unclear. *Zea mays* was exposed to exogenous C₆₀-F applications (F1: 100; F2: 250; and F3: 500 mg L⁻¹) with/without cobalt stress (Co, 300 µM) for 3 days (d). Cobalt stress decreased growth (RGR) and water content (RWC) levels. However, F applications against Co stress improved these parameters. When F1 and F2 concentrations were applied together with cobalt stress, the expression of genes of photosystems (PSI and PSII)-related proteins (psaA and psbA) increased. It increased superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POX) activities in maize chloroplasts exposed to stress. However, this stimulation was not effective in scavenging toxic radicals. This situation caused an increase in lipid peroxidation. On the other hand, simultaneous application of fluorene and cobalt stress increased SOD and catalase (CAT) activities, while F1 and F2 applications concentrations increased ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR) enzyme activities in the ascorbate-glutathione (AsA-GSH) cycle. It can be said that both glutamine synthase-glutamate synthase (GS-GOGAT) pathway, especially GS activities, and glutamate dehydrogenase (GDH) activities are effective in reducing stress-induced ammonium toxicity. Nitrate reductase (NR), nitrite reductase (NiR) and GS activities, which decreased with stress, increased in the fullerene and stress groups. Fulleren protected the chloroplasts of plants from ammonium toxicity by increasing both amination and deamination activities of the GDH enzyme. Exogenous F conceivably removed Co toxicity by improving the expressions of genes related to reaction center proteins of photosystems, increasing the level of enzymes related to the defense system, and improving the nitrogen assimilation in maize chloroplasts.

Keywords: Antioxidant system; fuleren; kobalt stress; lipid peroxidation; *Zea mays*

ÖNSÖZ

Öncelikle yüksek lisans eğitim sürecim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, çalışmanın daha verimli ve kaliteli olması için yol gösteren, zamanını ve desteğini benden esirgemeyen, büyük bir özveri ile bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan ve her zaman öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli danışmanım Doç. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI'ya sonsuz teşekkür ederim.

Tezin denemelerinin kurulmasında ve analizlerin yürütülmesinde engin bilgilerinden yararlandığım Prof. Dr. Evren YILDIZTUGAY'a, laboratuvar çalışmalarımnda desteklerini gördüğüm Arş. Gör. Büşra ARIKAN'a ve Arş. Gör. Fatma Nur ALP'e, Rümeysa EKİM ve Çağrı GÜLENTÜRK'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Maddi ve manevi tüm destekleri için babam İsa SUSAM, annem Gönül SUSAM ve eşim Yavuzcan PARMAKSIZOĞLU' na sonsuz teşekkür ederim.

Zeynep PARMAKSIZOĞLU
KONYA-2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Nanoteknoloji	1
1.2. Fuleren	2
1.3. Ağır Metal Kobalt (Co) Stresi.....	4
1.4. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	5
1.4.1. Reaktif Oksijen Türlerine Karşı Geliştirilen Savunma Mekanizmaları.....	7
1.5. Azot metabolizması ile ilgili enzim aktiviteleri	10
1.5.1. Nitrat redüktaz aktivitesi.....	11
1.5.2. Nitrit redüktaz aktivitesi	12
1.5.3. Glutamin sentetaz ve glutamat sentaz aktivitesi	12
1.6. Mısır (<i>Zea mays</i> L.) Tanıtımı	13
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	16
2.1. Tohumların temini ve sterilizasyonu.....	16
2.2. Çalışma Deneme Grupları ve Uygulama Esasları	16
2.3. Kısmi büyüme oranının (RGR) saptanması	18
2.4. Bağlı Su içeriğinin (RWC) saptanması	18
2.5. Enzim ve izozim aktivitelerinin saptanması için kloroplast izolasyonu	18
2.5.1. Süperoksit dismutaz (SOD) izozim/enzim aktivitesinin saptanması.....	19
2.5.2. Katalaz (CAT) izozim/enzim aktivitesinin saptanması	19
2.5.3. Peroksidaz (POX) izozim/enzim aktivitesinin saptanması	19
2.5.4. Askorbat peroksidaz enzim aktivitesinin saptanması	20
2.6. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarının saptanması	20
2.6.1. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarının saptanması.....	20
2.7. Lipit peroksidasyonun saptanması.....	20
2.8. Prolin miktarının saptanması	21
2.9. Total protein miktarının saptanması	21
2.10. Azot metabolizması ile ilgili enzim aktiviteleri	21
2.10.1. Nitrat redüktaz (NR) enzim aktivitesinin saptanması	21
2.10.2. Nitrit redüktaz (NiR) enzim aktivitesinin saptanması	21

2.10.3. Glutamin sentetaz (GS) enzim aktivitesinin saptanması	22
2.10.4. Glutamat sentaz (GOGAT) enzim aktivitesinin saptanması.....	22
2.10.5. Glutamat dehidrogenaz (GDH) enzim aktivitesinin saptanması	22
2.11. İstatistiksel Analizler	22

3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA..... 24

3.1. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının kısmi büyüme oranı üzerine etkisi.....	24
3.2. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının kısmi su içeriği üzerine etkisi.....	26
3.3. Kobalt stresi ve fuleren uygulama gruplarında antioksidan enzim/izozim profillemesinde oluşan değişimler	27
3.3.1. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının kloroplastik SOD enzim/izozim aktivitesi üzerine etkisi.....	27
3.3.2. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının total CAT enzim/izozim aktivitesi üzerine etkisi.....	29
3.3.3. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının kloroplastik POX enzim/izozim aktivitesi üzerine etkisi.....	31
3.3.4. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının kloroplastik APX enzim/izozim aktivitesi üzerine etkisi.....	33
3.3.5. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının kloroplastik GR enzim/izozim aktivitesi üzerine etkisi.....	35
3.4. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarının belirlenmesi.....	37
3.4.1. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarı üzerine etkisi	37
3.5. Lipit Peroksidasyonun Belirlenmesi	39
3.5.1. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının TBARS miktarı üzerine etkisi	39
3.6. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının prolin miktarı üzerine etkisi	40
3.7. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının protein miktarı üzerine etkisi.....	41
3.8. Azot metabolizmasına ait enzim aktiviteleri	43
3.8.1. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının nitrat redüktaz aktivitesi üzerine etkisi	43
3.8.2. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının nitrit redüktaz aktivitesi üzerine etkisi	44
3.8.3. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının glutamin sentetaz aktivitesi üzerine etkisi	45
3.8.4. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının glutamat sentaz aktivitesi üzerine etkisi	47
3.8.5. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının glutamat dehidrogenaz-aminasyon aktivitesi üzerine etkisi	48
3.8.6. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının glutamat dehidrogenaz-deaminasyon aktivitesi üzerine etkisi	49
3.9. Fotosistemlerle ilişkili bazı proteinleri kodlayan genlerin ekspresyon değişimleri.....	50
3.9.1. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının psaA gen ekspresyonu üzerine etkisi	50

3.9.2. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının psbA gen ekspresyonu üzerine etkisi	52
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	54
4.1 Sonuçlar	54
4.2 Öneriler	56
5. KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	67



SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

APX	Askorbat peroksidaz
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
$O_2^{\cdot-}$	Süperoksit anyon radikali
$OH^{\cdot}$	Hidroksil radikali
H_2O_2	Hidrojen peroksit
CAT	Katalaz
GR	Glutasyon redüktaz
POD	Peroksidaz
MDAR	Monodehidroksiaskorbat redüktaz
DHAR	Dehidroksiaskorbat redüktaz
GPX	Glutasyon peroksidaz
NiR	Nitrit redüktaz
NR	Nitrat redüktaz
GS	Glutamin sentetaz
GOGAT	Glutamat sentaz
RGR	Kısmi büyüme oranı
RWC	Bağıl su içeriği
GDH	Glutamat dehidrogenaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Fulleren, softbol ve dünya arasındaki boyut farklarının şeması (National Nanotechnology Initiative Strategic Plan, 2016'dan alınmıştır).....	3
Şekil 1.2. Reaktif Oksijen Türleri.....	6
Şekil 1.3. Bitki hücresinde ROS üretim yerleri.....	7
Şekil 1.4. ROS süpüren bazı enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sistemleri.....	9
Şekil 1.5. Yaprakta mineral durumundaki azotun asimilasyonunda yer alan süreçlerin özet gösterimi.....	13
Şekil 1.6. Peru'nun Güney And bölgesinden bazı mısır yerel çeşitlerinin fenotipik değişkenliği (Ranilla, 2020).....	15
Şekil 3.1. 300 µM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L ⁻¹) uygulamasının kısmi büyüme oranları (RGR) üzerine etkisi.....	24
Şekil 3.2. 300 µM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L ⁻¹) uygulamasının kısmi su içeriği (RWC) üzerine etkisi.....	25
Şekil 3.3. 300 µM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L ⁻¹) uygulamasının kloroplastik SOD aktivitesi ve SOD izozimlerinin band yoğunluğu üzerine etkisi.....	27
Şekil 3.4. 300 µM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L ⁻¹) uygulamasının total CAT aktivitesi ve CAT izozimlerinin band yoğunluğu üzerine etkisi.....	29
Şekil 3.5. 300 µM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L ⁻¹) uygulamasının kloroplastik POX aktivitesi ve POX izozimlerinin band yoğunluğu üzerine etkisi.....	30
Şekil 3.6. 300 µM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L ⁻¹) uygulamasının kloroplastik APX aktivitesi ve APX izozimlerinin band yoğunluğu üzerine etkisi.....	32
Şekil 3.7. 300 µM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L ⁻¹) uygulamasının kloroplastik GR aktivitesi ve GR izozimlerinin band yoğunluğu üzerine etkisi.....	34
Şekil 3.8. 300 µM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L ⁻¹) uygulamasının kloroplastik H ₂ O ₂ miktarı üzerine etkisi.....	36
Şekil 3.9. 300 µM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L ⁻¹) uygulamasının kloroplastik TBARS (Tiobarbiturik asit maddeleri) miktarı üzerine etkisi.....	37
Şekil 3.10. 300 µM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L ⁻¹) uygulamasının kloroplastik prolin miktarı üzerine etkisi.....	38
Şekil 3.11. 300 µM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L ⁻¹) uygulamasının kloroplastik protein miktarı üzerine etkisi.....	40
Şekil 3.12. 300 µM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L ⁻¹) uygulamasının kloroplastik NR aktivitesi üzerine etkisi.....	41

Şekil 3.13. 300 µM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L ⁻¹) uygulamasının kloroplastik NiR aktivitesi üzerine etkisi.....	42
Şekil 3.14. 300 µM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L ⁻¹) uygulamasının kloroplastik GS aktivitesi üzerine etkisi.....	44
Şekil 3.15. 300 µM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L ⁻¹) uygulamasının kloroplastik GOGAT aktivitesi üzerine etkisi.....	45
Şekil 3.16. 300 µM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L ⁻¹) uygulamasının kloroplastik NADH-GDH aktivitesi üzerine etkisi.....	46
Şekil 3.17. 300 µM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L ⁻¹) uygulamasının kloroplastik NAD-GDH aktivitesi üzerine etkisi.....	47
Şekil 3.18. 300 µM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L ⁻¹) uygulamasının psaA gen ekspresyonu üzerine etkisi.....	49
Şekil 3.19. 300 µM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L ⁻¹) uygulamasının psbA gen ekspresyonu üzerine etkisi.....	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Tezde kullanılan uygulama grupları ve tanımları.....	17
--	-----------



1. GİRİŞ

1.1. Nanoteknoloji

Yirmi birinci yüzyıla girilmesiyle birlikte önem kazanmış olan nanoteknoloji, birçok alanda kullanılarak yaşamımıza girmeye başlamıştır. İlaç, kozmetik, biyolojik, gıda, tarım gibi farklı alanlarda her geçen yıl yaygınlaşan ve insan hayatında da önemli bir yere sahiptir. Yunanca'da Nano terimi "cüce" anlamını vermektedir (Durucan, 2006). "Nanoteknoloji" terimi ise; nano ve teknoloji kelimelerinin birleşiminden oluşmaktadır. Nano ile ifade edilen, herhangi bir ölçünün milyarda birini gösterir. Örneğin; nanometre, metrenin milyarda birini ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) ifade etmektedir. Nanoteknoloji de "çok küçük maddelerin teknolojisi" olmaktadır (Özdoğan ve ark., 2006; Balcı, 2006).

Nanoteknoloji, bahsettiğimiz üzere birçok alanda etkilidir. Tıptan tarıma kadar her alanda kullanılan ürün ve hizmetleri geliştirmek için moleküler düzeylerde bir maddenin fiziksel ve kimyasal özelliklerini farklı alanlara yönlendirebilen malzeme ve ekipmanların kullanımını içeren yeni bir bilimsel yaklaşımdır (Siddiqi ve Husen 2016, 2017). Gelişmekte olan ülkeler de tarımın önemli bir yeri olduğunu biliyoruz. Geçim kaynağı olarak nüfusların %60 'ından fazlası buna bağlıdır (Brock ve ark., 2011).

Nanoteknoloji, bitkilerin hastalıkları moleküler yönetim için yeni araçlar sağlayarak ve bitkilerin besin maddelerini emme ve zorlu çevre koşullarına dayanma yeteneklerini artırarak tarım ve gıda endüstrisinde iyi bir potansiyele sahiptir (Khan ve ark., 2016). Bu nedenle, mahsul verimini ve besin değerlerini artırabilir, çevresel koşulları takip etmek için iyileştirilmiş sistemler geliştirebilir ve bitkinin çevresel strese karşı direncini / toleransını artırabilir (Taraftar ve ark., 2013). Nanoteknoloji, tarım endüstrisine son derece yardımcı olacak algılayıcı sensörleri ve dağıtım sistemleri sağlamayı taahhüt ediyor. Gelecekte, nano yapıları katalizörlerin girdi kullanımının verimliliğini artırması, daha düşük dozlarda tarımsal girdilere izin vermesi ve mahsul üretim sistemlerini daha verimli bir şekilde yönetmesi için mevcut olması muhtemeldir (Liu ve Lal 2015).

Nanoteknolojinin ortaya çıkışı ve çeşitli alanlarda geniş spektrumlu uygulamaları ile Ag, Au, Pb, vb. metallerden veya TiO_2 , SiO_2 , ZnO , vb. gibi metal oksitlerden nanomalzemelerin (NMs) sentezine daha fazla önem verilmektedir. Nanopartiküllerin (NP'ler) sentezlenebileceği birkaç fiziksel, kimyasal veya biyolojik yöntem vardır (Husen

ve Siddiqi 2014; Tulinski ve Jurezyk 2017). Tüm bitkiler enzimler, şekerler, proteinler gibi çeşitli kimyasal bileşikler ve metal sentezi sırasında indirgeyici ve stabilize edici maddeler olarak işlev gören flavanoidler, lateks, fenolikler, terpenoidler, alkoller, aminler, kofaktörler gibi diğer fitokimyasallar içerir (Husen 2017). Bazı şartlar altında bitkilerin büyümeleri için gerekli olan doğal mineralize NM'leri üretebildikleri de gözlenmiştir (Wang ve ark., 2001).

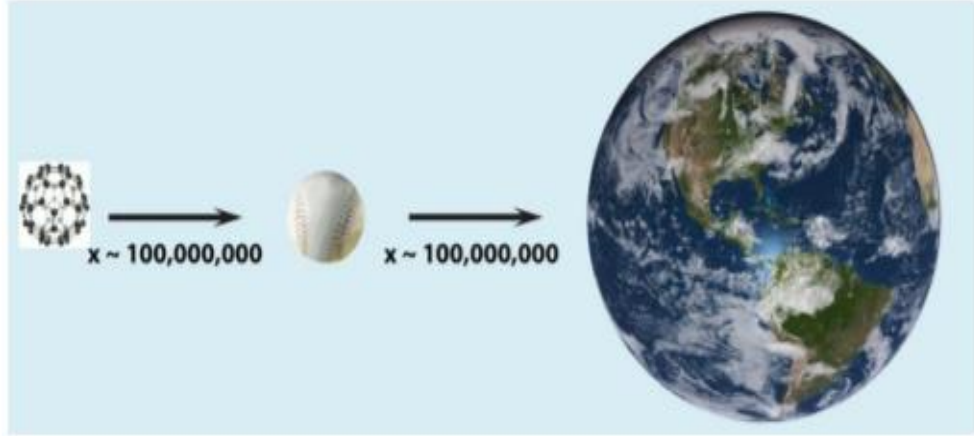
Nanoteknoloji anlayışı derinleştikçe, umarız insanlar ve çevreleri üzerinde hiçbir olumsuz etkisi olmaksızın tüketicilere ve çiftçilere fayda sağlayacak önemli bir ekonomik yükseltici güç olacaktır (Lutz ve Steevens 2009).

1.2. Fuleren

Tarımsal ve ekosistemlerin üretkenliğini ve sürdürülebilirliğini artırmak için etkili çevre dostu hazırlıkların oluşturulması günümüzde ilgi konusudur. Şu anda farmakoloji ve biyotıp da kullanılan suda çözünür C60 fulleren türevleri gibi karbon nanoyapıları, tarım için perspektif ajanlar olarak kabul edilir. Fullerenol (polihidroksi fulleren olarak da adlandırılır) nanopartiküller, bitkilerde tuzluluk kaynaklı oksidatif stresin modülasyonu için potansiyel adaylardır (Shafiq, 2019a). Lipofiliklik ve nano sayesinde hücre zarlarına girebildikleri, antioksidan aktiviteye sahip oldukları ve tıbbi maddeleri hedef hücrelere taşıdıkları gösterilmiştir. Suda çözünür fulleren türevlerinin agro ekosistemlerdeki bitkiler üzerindeki etkisinin altında yatan mekanizma belirsizliğini koruyor. Bununla birlikte, karbon nanomalzemeler fuleren ve türevlerinin fizyolojik, biyokimyasal, beslenme ve genetik seviyelerde bitki büyümesi ve gelişmesindeki rolü belirsiz ve tartışmalıdır (Vithanage ve ark., 2017). Özellikle düşük konsantrasyonlarda tohum çimlenmesi, fotosentez, kök büyümesi ve meyve veriminde dikkate değer bir iyileşmeye neden olur (Husen ve Siddiqi, 2014). Bu olumlu etkilerin tersine, birkaç çalışma, fulleren ve türevlerinin bitkiler üzerindeki olumsuz etkilerinin altını çizmiştir; bu, tohum çimlenmesini, kök ve sürgün büyümesini ve biyokütle oluşumunu engellemek için fitotoksositeye neden olmuştur (Arruda ve ark., 2015). Örneğin bir çalışmada fulleren muamelesine tabi tutulan Arabidopsis fideleri, kısaltılmış uzunlukları olan gecikmiş kökler ve kök gravitropizmi kaybı sergilemiştir (Liu ve ark., 2010).

Ayrıca, fuleren ve türevlerinin, bitkilerin abiyotik stres toleransında önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir (Duhan ve ark., 2017; Khan ve ark., 2017). Karbon atomlarının küresel kafes benzeri molekülü sayesinde, fulleren ve türevleri, özellikle kuraklığa karşı

bitki abiyotik stres toleransını etkileyebilen reaktif oksijen türlerini (ROS) hem üretme hem de temizleme kabiliyetine sahiptir (Trpkovic et al., 2012). Bununla birlikte, daha fazla çalışma, fulleren ve türevlerinin ROS detoksifikasyonu için güçlü antioksidanlar olduğunu vurgulamıştır (Wei ve Wang, 2013; Akhtar ve ark., 2017).



Şekil 1.1 Fulleren, softbol ve dünya arasındaki boyut farklarının şeması (National Nanotechnology Initiative Strategic Plan, 2016'dan alınmıştır).

Bitki hücreleri ile nanomateriyaller arasındaki etkileşim çok karışıktır ve nanomateriyal özelliklerine (örn. Boyut, konsantrasyon, şekil, yüzey özellikleri ve kimya) ve bitki özelliklerine (örn., Genotip ve yaş), ayrıca uygulama zamanına ve yoluna da bağlıdır. C60 fullerenlerinin, yüzeyde delokalize çift bağlara sahip moleküllerin temsili nedeniyle reaktif oksijen türlerini (ROS) süpürmek için güçlü bir kapasite sergilediği kabul edilmiştir. Bununla birlikte, buna zıt sonuçlar, bitki hücre duvarlarında fullerenin adsorpsiyonunun, ROS oluşumuna yol açtığını ve sonuç olarak bitki hücrelerinin hem hücre duvarlarını hem de zarlarını kesintiye uğrattığını gözlemleyen bazı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. ROS' un abiyotik stresler sırasındaki rolü iyi rapor edilmesine rağmen, kobalt stresi ile ilişkili ROS üretiminin ve sinyallemesinin azot metabolizması üzerine rolü henüz bilinmemektedir. Araştırmacılar, kobalt stresi altında bitkilerde aralarında etkileşim olduğunu ve antioksidan sistemin tetiklendiğini bildirmişlerdir, ancak kobalt kaynaklı ROS'un rolü ile stres sinyalinin algılanması arasındaki ilişkiyi gösteren ve fuleren uygulamasının bu stres altında azot metabolizması üzerine koruyucu bir rolünün olabileceğine dair bir çalışma yoktur (Cinisli ve ark., 2019).

1.3. Ağır Metal Kobalt (Co) Stresi

Günümüzde, ekosistemlerin toprak, su ve hava gibi ortamlarında yaygın bir şekilde birikmeye başlayan ağır metaller, Dünya yüzeyindeki tüm organizmaların yaşamını tehdit eden önemli bir çevre sorunu haline 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. Ekosfere ulaşan ağır metallerden çinko, mangan, kobalt, bakır, nikel ve molibden bitki gelişimi için mutlak gerekli iken alüminyum, vanadyum, arsenik, civa, kurşun, kadmiyum ve selenyum toksik etkilidir. Bitki gelişimi için mutlak gerekli element olsun veya olmasın ağır metallerin doku ve organlardaki aşırı birikimi bitkilerin vejetatif ve generatif organlarının gelişimini olumsuz yönde etkilemektedir. Ağır metaller bu toksik etkileri nedeniyle bitkilerde transpirasyon, stoma hareketleri, su alımı, fotosentez, enzim aktivitesi, çimlenme, protein sentezi, membran stabilitesi, hormonal denge gibi birçok fizyolojik olayın bozulmasına neden olmaktadır. Toksikite metalden metale değişebildiği gibi, organizmadan organizmaya da değişebilmektedir. Olumlu veya olumsuz etkiler yalnızca elementin tipi ve konsantrasyonuna bağlı olmayıp değişik türlerin genetik esaslı fizyolojik davranışları ile de ilgilidir (Öktüren Asri ve ark., 2007).

Ağır metal iyonları birçok fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerde temel rol oynar. İz halinde bulunan bu iyonlardan birçoğu metabolizma, büyüme ve gelişme için gereklidir. Fakat hücreler, hücresel hasara neden olan önemli ya da alınması zorunlu olmayan iyonların fazlalığı ile karşılaşılırsa problemler ortaya çıkmaktadır. Metallerle toprak ya da suyun kontaminasyonu, bitki verimliliğinde önemli kayıplara ve tehlikeli sağlık etkilerine neden olan önemli çevresel problemlere neden olmaktadır. Kobalt'ın (Co), bir dizi hayati metabolik bileşene ve bitki hücresi ve hücre zarına geri dönüşü olmayan hasara neden olduğu bilinmektedir. Co'nun insanlar, hayvanlar ve prokaryotlar için esansiyel bir element olduğu uzun yıllardır bilinmesine rağmen, bu elementin yüksek bitkilerde fizyolojik bir fonksiyonu belirlenememiştir. Bitkilerdeki normal Co konsantrasyonlarının 0.1-10 µg g⁻¹ kuru ağırlık kadar düşük olduğu belirtilirken, bir eser element olarak faydalı rolü tarif edilmiştir (Bakkaus ve ark., 2005). İz elementler bitkinin normal metabolik fonksiyonları için gereklidir, ancak daha yüksek konsantrasyonlarda bu metaller toksiktir ve fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonlara ciddi şekilde müdahale edebilir (El-Sheekh ve ark., 2003; Jayakumar ve ark., 2008).

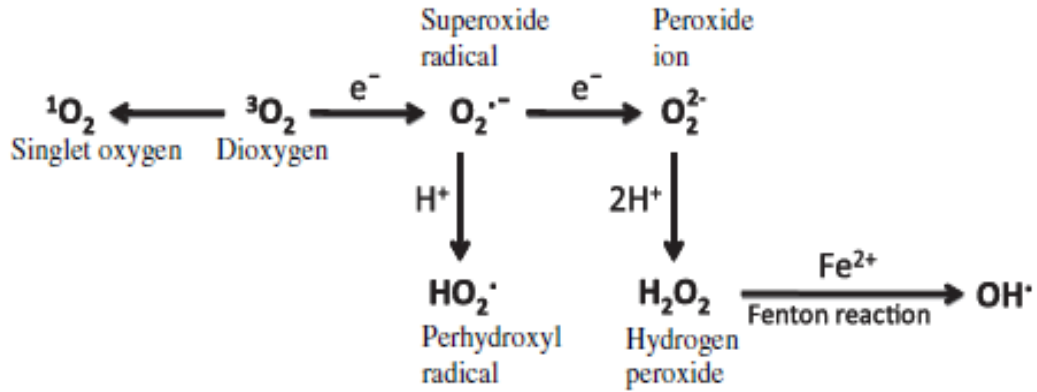
Bununla birlikte, Cd, Cu, Ni ve Zn gibi ağır elementlerin alımı ve etkisi engellendiğinde faydalı görünmektedir (Wallace ve Abou-Zamzam 1989, Dirilgen ve İnel 1994). Co'nun çeşitli bitkilerde hem yararlı hem de toksik bir şekilde diğer elementlerle etkileşiminin rolü için hala kanıt eksikliği olmasına rağmen kobalt toprak da yüksek hareketliliği, bitkilerce kolay ve hızlı alınması ve düşük konsantrasyonlarda bile toksik olması nedeniyle çevresel açıdan en tehlikeli ağır metallere biri olmuştur. Bitki yapısında azot ve karbonhidrat metabolizmalarını değiştirmesi nedeniyle birçok fizyolojik ve biyolojik değişikliğe neden olmaktadır. Ayrıca, proteinlerin -SH gruplarındaki enzimleri inaktive etmekte, fotosentezi engellemekte, stomaların kapanmasına, transpirasyon ile su kaybının azalmasına ve klorofil biyosentezinin bozulmasına neden olmaktadır. Stres altında stoma kapanması sonucu, iç den gelen CO₂ miktarı azalır. Bu durum, kloroplastlarda Calvin döngüsüyle CO₂ fiksasyonunu ve NADP⁺ yenilenmesini sınırlar, CO₂/O₂ oranını azaltır, CO₂ fiksasyonunu engeller. Bu koşullar elektronların oksijene geçişini artırır. Bunun sonucu olarak hücrelerde oksidatif hasara neden olan süperoksit anyon radikali (O₂^{•-}), hidroksil radikali (OH[•]) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu tetikler (Asada, 2006). Radikallerin tümü DNA, protein, klorofil, lipitler ve diğer önemli makromoleküllere zarar vererek bitki metabolizmasını etkiler ve verimi düşürür.

1.4. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Bitkiler sabit olduğundan, çevresel zorluklarla mücadele etmek için çeşitli stratejiler geliştirdiler. Bu stratejiler, biyotik ve / veya abiyotik stres (ler) in tipine, ciddiyetine ve kombinasyonuna bağlıdır ve genellikle atıfta bulunulan birden fazla çevresel işarete uygulanabilecek adaptasyon ve ortama alışma yanıtlarını tetiklemek için sinyal bileşenlerinin spesifik ve esnek kombinasyonlarını gerektirir (Suzuki ve ark., 2012, 2014). Bu işlemlerin başlatılması ve düzenlenmesi çoğunlukla fitohormonlar (Pieterse ve ark., 2012; Bartoli ve ark., 2013), kalsiyum iyonları (Ca²⁺) (Stael ve ark., 2015), reaktif azot türleri (Kocsy ve ark., 2013) ve reaktif oksijen türleri (ROS) gibi iyi karakterize edilmiş sinyal moleküllerini içerir (Baxter ve ark., 2014). Süperoksit anyonu (O₂^{•-}), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikali (HO[•]) ve tekli oksijen (¹O₂) dahil olmak üzere ROS, fotosentez ve solunumdaki elektron taşıma reaksiyonları sırasında organeller

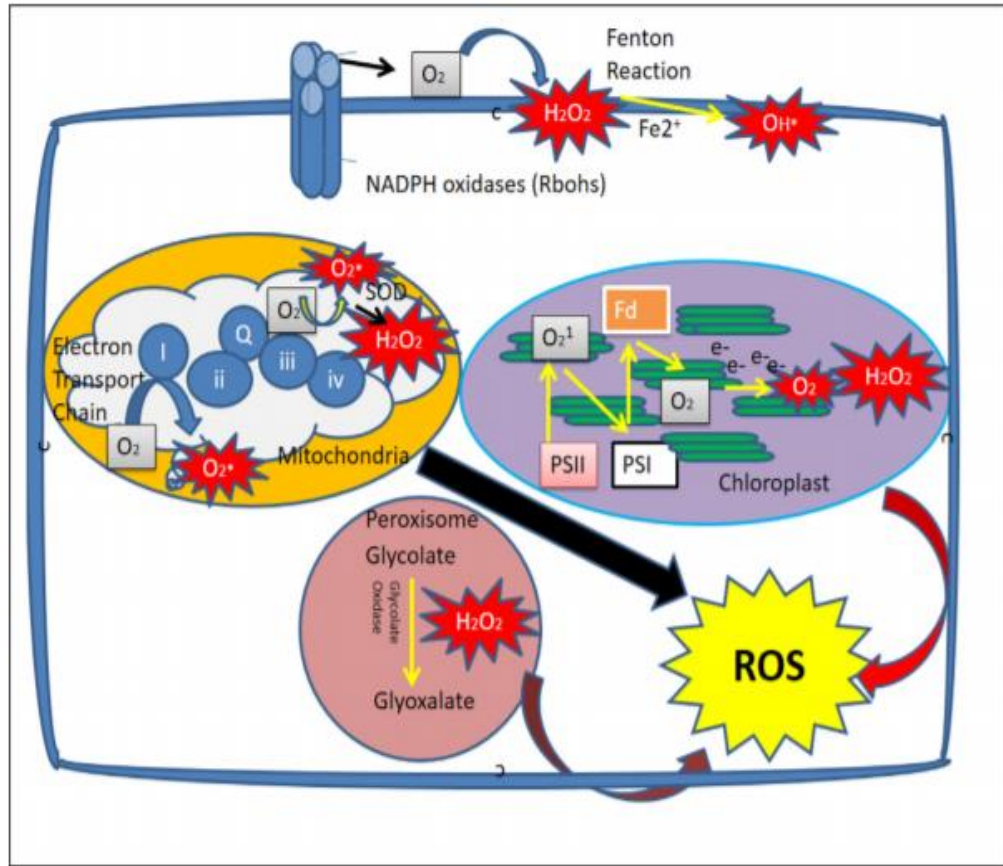
de oluşur ve fotorespirasyon ve diğer metabolizmalarda enzimatik reaksiyonların yan ürünleri olarak ROS üretmektedir (Das ve ark., 2015).

Strese maruz kalan bitkiler, oksidatif stresin zararlı etmenlerinden korunmak için bazı savunma mekanizmaları üretirler demiştik. Bitkilerin ağır metale olan tepkisi , antioksidan enzimler açısından savunma mekanizmalarının aktifleşmesini sağlayan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile sonuçlanacaktır. Bu nedenle, abiyotik streslere karşı kullanılmış savunma tepkilerinden biri de ROS süpürmedir. Mevcut araştırmamız, Co stresinin Zea mays bitkisinde büyüme, besin içeriği ve biyokimyasal bileşenleri üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla yürütülmüştür.



Şekil 1.2. Reaktif Oksijen Türleri

ROS'ların toksik düzeye ulaşmasının engellenmesi, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemler tarafından gerçekleştirilir (Bohnert ve ark., 1999). Enzimatik olmayan antioksidan sistemlerini önemli redoks tepkimelerine tampon görevi yapan askorbat, glutatyon (GSH), α -tokoferoller, karotenoidler ve fenolik bileşikler oluşturur. Enzimatik savunma sistemlerini ise süperoksit dismutaz (SOD) askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR) ve peroksidaz (POD), monodehidroksiaskorbat redüktaz (MDAR) ve dehidroksiaskorbat redüktaz (DHAR) ve glutatyon peroksidaz (GPX) enzimleri oluşturur (Mittler ve ark., 2004).



Şekil 1.3. Bitki hücresinde ROS üretim yerleri

1.4.1. Reaktif Oksijen Türlerine Karşı Geliştirilen Savunma Mekanizmaları

ROS'ların toksik düzeye ulaşmasının engellenmesi, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemler tarafından gerçekleştirilir (Bohnert ve ark., 1999). Enzimatik olmayan antioksidan sistemlerini önemli redoks tepkimelerine tampon görevi yapan askorbat, glutatyon (GSH), α -tokoferoller, karotenoidler ve fenolik bileşikler oluşturur. Enzimatik savunma sistemlerini ise süperoksit dismutaz (SOD) askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR) ve peroksidaz (POX), monodehidroksiaskorbat redüktaz (MDAR) ve dehidroksiaskorbat redüktaz (DHAR) ve glutatyon peroksidaz (GPX) enzimleri oluşturur (Mittler ve ark., 2004).

SOD; AOT'lara karşı koruyucu sistemin ilk adımını oluşturmaktadır ve iki molekül O_2^- ile reaksiyona girerek birer molekül H_2O_2 ve O_2 sentezlenmesini sağlar (Asada, 1999). O_2^- , H_2O_2 gibi zarlardan difüze olabilme özelliğine sahip olmadığından, bu molekülün sentezlendiği hücresel bölümlerde ortadan kaldırılması için SOD enzimi

bulunur (Alscher ve ark., 2002). Metalo enzimler grubunda yer alan SOD, Mangan SOD (Mn SOD), Bakır-çinko SOD (CuZn SOD) ve Demir SOD (Fe SOD) olmak üzere içerdiği metal gruplarına göre üç farklı izoenzim çeşidine sahiptir. Bu izoenzimlerden Fe SOD kloroplastlarda, Mn SOD mitokondri ile peroksizomda ve CuZn SOD ise kloroplast, peroksizom, sitozol ve hücreler arası boşlukta bulunur (Alscher ve ark., 2002). Stres koşulları altında SOD aktivitesinin artması ve bu düzeyin korunması, gen ekspresyonunun ve SOD transkripsiyonunun artmasına bağlıdır (Minkov ve ark., 1999). O_2^- 'den sentezlenen H_2O_2 , thiol gruplarını oksitleyen güçlü bir oksidant olduğu için, bu ROS çeşidinin, thiol-düzenleyici enzimlerin bulunduğu organellerde birikmesi engellenmelidir (Noctor ve ark., 1998). SOD'un sentezlediği H_2O_2 'i CAT, POX ve APX enzimleri detoksifiye eder. CAT, H_2O_2 'i O_2 'e ve H_2O 'ya dönüştüren enzimdir ve bu enzim yüksek bitkilerde peroksizomda bulunur (Jamei ve ark., 2009). Yüksek katalitik aktiviteye fakat düşük substrat afinitesine sahip CAT kloroplastta bulunmadığı için buradaki thiol-düzenleyici enzimlerin korunmasında görev alamaz. Bu enzimin yerine ortamdaki H_2O_2 'leri detoksifiye eden ve H_2O_2 'e karşı daha yüksek affinite gösteren POX (Hidrojen Peroksit Oksidoredüktaz)'lar bulunur (Noctor ve ark., 1998). POX, fenolik bileşikler ve/veya antioksidanlar gibi yardımcı substratlarla H_2O_2 'i suya dönüştürür (Meloni ve ark., 2003). POX, bitkilerde büyük oranda bulunur. POX, elverişsiz dış faktörler altında üretilen zararlı oksijen radikallerinin seviyesini düzenler ve süperoksit dismutaz ve CAT'ı da içeren bitki hücresinin koruyucu enzim kompleksinin parçasıdır (Bakardjieva and Christov, 1996).

APX, H_2O_2 detoksifikasyonunda yer alan diğer bir enzim olup bu enzimin izoenzim grupları kloroplast stroması ile tilakoid zarı, mitokondri, sitozol ve peroksizom olmak üzere dört farklı kısımda bulunur. APX, H_2O_2 'i suya dönüştürürken, askorbatı (AsA) spesifik elektron donörü olarak kullanır ve bu reaksiyona AsA'nın tek değerlikli oksidant formu olan monodihidroaskorbat (MDA, MDAsA olarak da kullanılmaktadır) oluşumu eşlik eder. MDA direkt olarak NADPH-bağlı MDA redüktaz (MDAR) enziminin aktivitesiyle AsA'ya indirgenebilir (Mittler ve ark., 2004).

Ayrıca MDA bir enzimatik reaksiyon olmaksızın kendiliğinden dihidroksiaskorbata (DHA) da indirgenebilir (Sairam ve ark., 2004). DHA'dan AsA sentezlenmesine DHAR enzimi aracılık eder ve bu reaksiyonda itici güç olarak GSH (redükte glutatyon)'ın GSSH (okside glutatyon)'a oksidasyonu kullanılır. Son olarak da GR, NAD(P)H'ı indirgeyici ajan olarak kullanıp GSH'ın GSSH'dan tekrar sentezlenmesini sağlar.

Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	Rolü	Hücreyel Lokasyonu
Askorbik Asit	Direk olarak $O_2^{\cdot -}$, $OH^{\cdot}$ ve H_2O_2 'yu temizler.	Kloroplast, apoplast, vakuol, sitozol
Tokoferoller	Lipit peroksidasyonunu kırar. Lipit peroksitlerini $O_2^{\cdot -}$ ve $OH^{\cdot}$ 'i temizler.	Bitkilerin tüm kısımlarında bulunur. Kloroplast membranlarında tokoferol yoğun olarak bulunur.
Karotenoidler	Peroksi radikalleri ile $O_2^{\cdot -}$ ve $OH^{\cdot}$ 'i temizler.	Sitozol, vakuol
Glutasyon	Redoks döngüsünün bir substratı olarak, $OH^{\cdot}$ ile 1O_2 'nin direk temizlenmesinde yararlıdır.	Sitozol, endoplazmik retikulum, vakuol, mitokondri
Fenolik Bileşikler	Antioksidan özelliklerini iyi birer hidrojen veya elektron vericisi olmaları, zincir kırıcı özellikleri ve geçiş metalleri ile şelat oluşturmaları ile gösterirler.	Sitozol, vakuol
Süperoksit Dismutaz (SOD)	$O_2^{\cdot -}$ 'i H_2O_2 'ye dönüştürür.	Kloroplast, sitozol, mitokondri, peroksizom
Askorbat Peroksidaz (APX)	H_2O_2 'yi H_2O 'ya çevirir.	Kloroplast, sitozol, mitokondri, peroksizom
Katalaz (CAT)	H_2O_2 'yi H_2O 'ya çevirir.	Peroksizom
Glutasyon Peroksidaz (GPX)	H_2O_2 'yi ve lipit peroksitlerini etkisizleştirir.	Kloroplast, sitozol, mitokondri, endoplazmik retikulum

Şekil 1.4. ROS süpüren bazı enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sistemleri

APX'in H_2O_2 'i detoksifiye etmek için ihtiyaç duyduğu ve AsA ile GSH'ın yeniden sentezlendiği bu döngü askorbat-glutasyon döngüsü veya Halliwell-Asada döngüsü olarak adlandırılır (Secenji ve ark.,, 2008). Ayrıca, H_2O_2 gibi glutasyon ve AsA da zarlardan kolayca diffüze olabilir ve farklı bölümler arasında taşınabilirler (Mittler ve ark.,, 2004). APX gibi glutasyon peroksidaz (GPX) enzimi de H_2O_2 'i suya dönüştürür. GPX, GSH'ı direkt olarak indirgeyici ajan olarak kullanır ve bu yüzden GPX döngüsü, GSSH'dan GR aracılığıyla GSH'ın yeniden sentezlendiği reaksiyonla bağlantılıdır (Apel ve ark., 2004). Kloroplast stroması ve sitozolde bulunan Peroksiredoksin (PrxR) enzimi ise tiyoredoksin aracılığıyla H_2O_2 'in zararsız hale getirilmesinde görev alır (Mittler ve ark.,, 2004).

Askorbat (AsA, Vitamin C), antioksidan moleküller içinde en fazla bulunan küçük ağırlıklı bir moleküldür. Heksoz şekerlerden sentezlenen askorbat, kuru tohumlar hariç bütün bitki dokularında bulunur (Smirnoff, 2005). Askorbat, enzimatik reaksiyonlarda rol almasının yanında, H_2O_2 ile enzimatik olmayan reaksiyona girer (Rizhsky ve ark.,, 2002).

Enzimatik olmayan antioksidanlardan bir diğeri olan α -tokoferoller, kloroplastların içsel zar yapılarında sentezlenirler. Hidrofobik özellikleri nedeniyle zarlara tutunan α -tokoferoller, buradaki çoklu doymamış yağ asiti zincirleri ile etkileşerek

zar yapısının stabilizasyonunu sağlarlar (Smirnoff, 2005). Ayrıca α - tokoferoller sahip oldukları antioksidan özellikleri ile zarları oksidatif hasarlara karşı korurlar.

1.5. Azot metabolizması ile ilgili enzim aktiviteleri

Azot (N), oksijen, hidrojen ve karbondan sonra canlı organizmalarda bulunan en temel elementlerden biridir. Atmosferin %78'ine yakın moleküler azot (N_2 ; $N\equiv N$) indirgenme olmadıkça canlıların birçoğu tarafından kullanılamaz. Canlı organizmalar; proteinlerde, nükleik asitler de ve diğer başka biyomoleküllerinde fazla miktarda azot içerirler.

Bitki metabolizmasının en önemli metabolik aktivitelerinden biri azot metabolizmasıdır. Bu metabolik aktivitelerin sonucunda bitkiye alınan inorganik azot biçimleri (NO_3 ve NH_4), asimile yaparak organik azot biçimlerine yani amino asitlere dönüştürülür. Amino asitler ise başta protein sentezi olmak üzere solunum, klorofil ve nükleotid metabolizması dahil birçok metabolik aktivite de ham madde olarak kullanılır. Bu sebepten dolayı azot metabolizmasını inhibe eden bir faktör, neredeyse metabolizmanın tümünü etkiler ve bitki yaşamında geri dönüşümsüz hasarlar oluşturur. Bitkiler ihtiyacı olan azotu nitrat ve amonyum ile bünyesine alır. Bünyeye alınan azotun fazlaca olan kısmı yapraklarda metabolize edilir ve proteine dönüşür. Alınan nitrat nitrite daha sonra da amonyağa dönüşür. En sonda amonyak ise protein sentezinde kullanılmak üzere amino asitlere dönüştürülür.

Azot metabolizması bitki yaşamında ve veriminde en temel biyokimyasal süreçleri içermektedir. Azot metabolizmasında küçük bir değişim, hücre bölünmesinden protein sentezine ve sonunda verimliliğe kadar bütün bitki süreçlerini doğrudan veya dolaylı yoldan etkileyecektir.

Bitkilerin inorganik azot (N)'u organik forma dönüştürmelerinin tek yolu, bitki hücreleri tarafından nitrojenin asimilasyonu ve redüksiyonudur. Azot metabolizmasında rol alan anahtar enzimlerden nitrat redüktaz (NR), nitrit redüktaz (NiR), glutamin sentaz (GS) ve glutamat sentaz (GOGAT) aktiviteleri belirlenmiştir.

1.5.1. Nitrat redüktaz aktivitesi

Toprakta yetişen çoğu yüksek bitki, nitrojenlerini nitrat şeklinde elde eder. $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+ \rightarrow$ amino asitler yolunda, nitratin nitrat redüktaz enzimi tarafından nitrite indirgenmesinin hız sınırlayıcı adım olduğu kabul edilir (Spencer, 1998). Bu, bitki dokularında nitrat birikebilirken, nitrit ve amonyumun birikmemesi gerçeğiyle gösterilir (Hageman ve ark., 1967). NR proteini ve nitrat redüktaz aktivitesinin miktarı, transkripsiyonel ve translasyon sonrası mekanizmaların kontrolü altındadır. Bazı otsu bitkiler de düşük düzeyde nitrojen varlığında nitrat redüktaz aktivitesinde indirgenmiş nitrojen arasında pozitif bir ilişki gözlemlenmiştir (Austin ve ark., 1978). Nitrat redüktazın aktivitesini belirleyen temel etmenlerden en önemlisi ise topraktaki besin elementleridir. Bu elementlerden molibden ve kükürt nitrat redüktazın yapısında yer aldığı için aktif nitrat redüktaz sentezi için elzem elementlerdir (Gebauer ve ark., 1997).

Nitrat redüktaz'ın posttranlasyonel düzenlenmesi, enzim proteininin fosforilasyon / defosforilasyon ativitesini içerir. Fosforilasyon nitrat redüktaz aktivitesini negatif yönde etkileyerek azaltırken, defosforilasyon tam tersi artırır. Bu sebepten dolayı, protein kinazlar ve protein fosfatazlara bağlı olan NR aktivitesi 14-3-3 bağlayıcı protein ve iki değerlikli katyon seviyeleri, enzim aktivitesindeki posttranlasyonel regülasyon için gereklidir. (Campbell, 1999; Kaiser ve ark., 1999).

Nitrat redüktaz aktivitesi birçok çevresel stres koşulları tarafından yüksek duyarlılıkla işlev gösterir. Ağır metallerin seviyesi, nitrat redüktaz aktivitesini önemli düzeyde etkileyen faktörlerden biridir. Birkaç çalışmada ağır metallere maruz bırakılan bitkiler nitrat redüktaz aktivitesi değişimleri elde edilmiştir (Gouia ve ark., 2000). Nitrat redüktaz aktivitesini etkileyen faktörlere bir başka örnek verecek olursak, bitkilerin yapraklarındaki ışık yoğunluğu, gelişim gösterdikleri evre yani fotoperiyot sırasındaki ışık süresi tarafından etkilenmektedirler.

Nitrat redüktaz sitozolde uygun hale gelmiş olan kompleks bir enzim olup NADH ve/veya NAD(P)H dan elektron geçişini gerçekleştiren benzer iki alt birimden oluşmuştur. Nitrat redüktaz enzimi bu elektron geçişinde görev alan ve FAD, sitokrom (Cyt.) ve molibden içeren prostetik gruplar içerir. (Solomonson ve Barber 1990, Tischner 2000, Miller ve Cramer 2004). NADH 'ın FAD'a en iyi şekilde kendi konumlarına elektron geçişini sağlamak için Cys 899 ve Cys 191 iki sistein olduğunu bildirmiştir. Bu Cys 899 ve Cys 191, ağır metallere karşı oldukça duyarlılardır.

1.5.2. Nitrit redüktaz aktivitesi

Azot metabolizmasında nitrit redüktaz enzimi, nitrat redüktaz enzimi kadar önemli bir yere sahiptir. Nitrat redüktaz aktivitesinin sonucunda oluşan NO_2 , hücreden hemen uzaklaştırılmazsa, hücre savunmasını bozar ve hücre de büyük hasarlara yol açar. Bundan dolayı normal şartlarda bitki hücrelerin de NiR aktivitesi NR 'ninkinden çok daha yüksektir (Heldt ve ark., 2011). Bitki hücrelerinde, ağır metaller NO_3 alımını ve nitrat dengesini etkiler. Nitrat redüktaza göre daha dirençlidir nitrit redüktaz.

Nitrat indirgenmesinde iş gören enzimlerden diğeri nitrit redüktaz (NiR) olup, fotosentetik dokuların temel enzimlerinden biri olduğu, fakat kök eksenini boyunca da eşit dağılım gösterdiği saptanmıştır (Polisetty ve Hageman, 1983). Kök hücreleri içerisindeki dağılımı plastidlerle sınırlıdır. Bu enzim serbest ara ürünler oluşturmadan nitriti amonyağa dönüştürmektedir. Düşük molekül ağırlığına sahip olan enzim, yapraklarda kloroplastlarla köklerde ise proplastidlerle ilişkilidir.

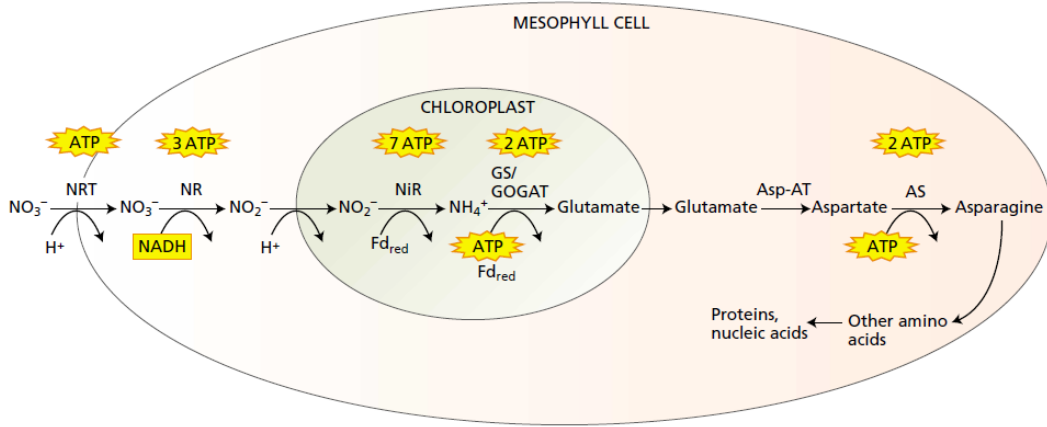
Yararlı enzim olan nitrit redüktaz, enzim plastidlerde sınırlıdır. Nitrit redüktazın proteini daha karardır. Bu olaylardan dolayı ağır metallerin enzimle olan ilişkisi nitrat redüktaz kadar kolay değildir. Bu sebepten kaynaklı metallerin NiR aktivitesi üzerindeki etkisiyle ilgili çalışmalar NR kadar fazla değildir.

1.5.3. Glutamin sentetaz ve glutamat sentaz aktivitesi

Yüksek bitkilerde, köklerin amonyumu almasıyla, nitratin alınması ve indirgenmesi sonucunda amonyak, bitkiler için zararlı olmasından dolayı hemen organik yapılara dönüşmek zorundadır. Amonyakın organik yapılara girişi "Glutamin sentetaz-Glutamat sentaz" yolu adı verilen mekanizma ile gerçekleşir (Haynes, 1986; Marschner, 1995; Pilbeam ve ark., 1999). Bu enzimlere ise glutamin sentetaz (GS) ve glutamat sentaz (GOGAT)'dır.

Yüksek bitkilerde, kökler tarafından amonyumun alınması, nitratin alınması ve indirgenmesi ile oluşan amonyum, bitki dokusu için zehirli olması nedeniyle hızla aminoasitlere dönüştürürler. Bu dönüşüm için, glutamin sentetaz (GS) ve glutamat sentazın (GOGAT) ardışık aktiviteleri gerekir (Lea ve ark., 1992). Glutamin sentetaz (GS), glutamini oluşturmak için amonyumu glutamat ile birleştirir. Bu birleşme bir ATP'nin hidrolizine ihtiyaç duyar. Bitkiler, biri sitosolde ve diğeri kök plastidleri veya gövde kloroplastlarında olmak üzere iki çeşit GS içerir. Sitosolik formlar, çimlenen

tohumlarda veya kök ve gövdenin iletim demetlerinde bulunur ve hücrelerarası azot taşınımı için glutamin üretirler. Kök plastidlerindeki GS yerel tüketim için amid azotu üretir; gövde kloroplastlarındaki GS, fotosolunumda üretilen NH_4^+ 'i yeniden özümleyerek (Lam ve ark., 1996). Glutamin seviyesinin plastidte artması glutamat sentaz (GOGAT) aktivitesini tetikler. Bu enzim, glutaminin amid grubunu iki molekül glutamat oluşturmak için 2- oksoglutarat'a aktarır (Şekil 4) (Lam ve ark., 1996).



Şekil 1.5. Yaprakta mineral durumundaki azotun asimilasyonunda yer alan süreçlerin özet gösterimi

1.6. Mısır (*Zea mays* L.) Tanıtımı

Mısır (*Zea mays* L.), özellikle Mezoamerika ve Güney Amerika'daki yerli popülasyonlar arasında, genetik biyoçeşitliliğinin hala korunduğu Amerika'ya özgü önemli bir tahıl mahsulüdür. Mısır, birçok ülkede temel bir besindir. Ayrıca, bu tahıl aynı zamanda yem, yakıt ve endüstriyel düzeyde çeşitli ürünler için hammadde olarak da kullanılmaktadır (Heldt ve ark., 2011).

Dünya mısır üretimi 2018 yılında yaklaşık 1147 milyon ton olup, başlıca üretici ülkeler Amerika Birleşik Devletleri, Çin ve Brezilya olmuştur (Faostat, 2020). Mısır genetik çeşitliliğinin araştırılması ve sürdürülebilir kullanımı, bu tür zorluklara karşı koymaya yardımcı olabilir. Mısır bitkisinden fazlaca verim alınabilen, yetiştirilmesi, hasatı, nakliye ve depolama gibi işlemlerinin kolay olmasından dolayı, üretim ve fiyat araştırmalarının oldukça değişkensiz oluşu ve mısır bitkisi sürekli gelişme özelliğine sahip olması nedenleriyle mısırın endüstride kullanımı diğer tahıllara göre hızla artmaktadır.

Mısır %96 'lık oranla yabancı döllenen bir bitkidir. Mısır bitkisi 10-11 °C'de çimlenme gerçekleşebilir. Ortalama 5-10 cm derinliğinde, 15 °C sıcaklıkta çimlenmeyi hızlandırabiliriz. Çimlenme esnasında sıcaklık kök ve sap uzama miktarını doğrusal ilişkisi vardır. Uygun olmayan sıcaklık koşulları altında kök ve sap uzamaların da azalma ya da ölüm gerçekleşebilir. Mısır bir sıcak iklim bitkisi olmasına rağmen çok sıcaklık isteyen bir bitki değildir. Mısır bitkisi sıcak ve nemli gecelerde iyi bir gelişme gösteremez. Mısır için ideal olan serin geceler, güneşli günler, orta sıcaklık gereklidir. Bitkiler için dölleme gerçekleştirdikten sonra verimi etkileyen faktörlerden biride ışık alımıdır. Döllemenmeden sonraki 3 günlük dönemde %90 gölgelenme (tam bulutluluk) bir bitkinin verimini %25 düşürdüğünü belirlenmiştir. Fazla güneş enerjisinin de fotosentez olayını durdurabileceğini unutmamalıyız. Mısır (*Zea mays* L.), sınıf olarak tek çenekliler, buğdaygiller familyasına ait tek yıllık bir bitkidir. Mısır bitkisinin kök sistemi iyi gelişmiştir. Embriyonal kökler, bitkinin yaşamı süresince görevlerini yerine getirirler. Mısır geniş adaptasyon seçeneklerine sahiptir. Sıcak iklim bitkisi olan mısır, sıcaklığa ve yağışa elverişli bölgelerde yetişenler daha verimli oluyor. Nemin fazla olduğu yerleri de sever (Elçi ve ark., 1987; Kün, 1997).



Şekil 1.6. Peru'nun Güney And bölgesinden bazı mısır yerel çeşitlerinin fenotipik değişkenliği (Ranilla, 2020).

Nanoteknoloji günümüzde birçok alanda kullanılmaktadır. Fazla Co^{+2} uygulamalarıyla tarafından oluşturulan oksidatif stresin hücrelerde reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunu harekete geçirir. Bitkilerde Co^{+2} konsantrasyonu en yüksek düzeye ulaşıldığında, kloroplast üzerinde art arda gelen dikkat çekici notlar elde edilir: (i) fotosentez için anahtar protein olan rubisco (ribuloz-1,5-bisfosfat-karboksilaz/oksijenaz) içindeki magnezyumun Co^{+2} ile yer değiştirmesi, (ii) klorofil biyosentetik yolda yer alan

enzimlerin bozulması, (iii) karbondioksit asimilasyonunun bozulmasına yol açan karbon alımının azaltılması. ROS'a karşı savunma sistemi, süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR), askorbat (AsA), katalaz (CAT), glutatyon (GSH) ve karotenoidler gibi enzimler ve enzim olmayan antioksidanları meydana getirir.

Birçok çalışma, stresin bitkilerde asimilasyonu etkileyebileceğini ve azot alımını ortaya koymuştur. Azot, nükleik asitlerin, proteinlerin ve diğer birçok hücrel bileşenin temel bileşenidir. Bu nedenle, azot metabolizması bitki büyümesini düzenlemede en önemli süreci ele alır. Azot (N) ve karbon (C) asimilasyonunun korunması, kaynak gücünü sağlamak ve stres toleransını arttırmak için büyük önem taşımaktadır. N ve C metabolizması arasındaki etkileşimler bitki gelişimi ve büyümesi için hayati öneme sahiptir.

Tarımsal ve ekosistemlerin üretkenliğini ve sürdürülebilirliğini artırmak için etkili çevre dostu hazırlıkların oluşturulması günümüzde ilgi konusudur. Şu anda farmakoloji ve biyotıp da kullanılan suda çözünür C60 fulleren türevleri gibi karbon nanoyapıları, tarım için perspektif ajanlar olarak kabul edilir.

Bu çalışmada, mısır bitkilerinde hem dışarıdan fuleren uygulaması hem de kobalt stresi altında H_2O_2 üretimi, redoks regülasyonu, azot metabolizması ile ilişkili enzim aktiviteleri ve antioksidan savunmadaki farklılıkları ve benzerlikleri araştırılacaktır. Aynı zamanda bu çalışma, sadece kobalt stresi altında H_2O_2 üretiminin, redoks regülasyonunun ve antioksidan korumanın mısır bitkilerinde nasıl etkilendiğine dair veri sağlayacaktır. Fuleren, kobalt ve bunların kombinasyonları altında, deneme periyodu süresince su ilişkileri, lipid peroksidasyonu (TBARS miktarı) ve H_2O_2 miktarında değişiklikler araştırılacaktır.

Antioksidan savunma sisteminin rolü ve redoks durumu [süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POX), askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon redüktaz (GR)], fuleren ve kobalt stresi altında açıklanacaktır. Tüm bu etkileşimin azot metabolizması ile bağlantısı da asimilasyon süresinde etkili olan enzimlerin aktivite tayinleri ile belirlenecektir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Tohumların temini ve sterilizasyonu

Yüksek lisans tezinde Türkiye ve Dünya’da ekonomik değere sahip olan mısır (*Zea mays cv. DKC5741*) bitki materyali olarak kullanılmıştır. Bu bitki materyalinin tohumları, Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü’nden temin edilmiştir. Sterilizasyon aşaması çalışmada önemli bir basamaktır. Sterilizasyon aşamaları için makaleler incelenmiş ve tohumlar önce bir dakika süresince etanolde bekletilmiş sonrasında da 5 defa tekrarlanmak üzere de-iyonize su ile yıkanmıştır. Bu işlem bittikten sonra 10 dakika süresince sodyum hipoklorit (%4) solüsyonuna tabi tutulmuştur. Ardından bu solüsyonun uzaklaştırılması için 5 tekrarlı olarak de-iyonize sudan geçirilmiştir.

2.2. Çalışma Deneme Grupları ve Uygulama Esasları

Tez çalışmasında stres faktörü olarak ekosistemde yaygın etkisi olan kobalt stresi seçilmiştir. Uygulama dozunu ayarlayabilmek için bu konuda önceden yapılmış bilimsel çalışmalar incelenmiştir (Wang ve ark., 2010; Salam ve ark., 2022). Bu incelemeyle 300 μM kobalt (S) uygulamasının stres oluşturabilmek için yeterli olduğu sonucuna varılmıştır. Diğer yandan fuleren (F) uygulamasında üç farklı fuleren konsantrasyon seçilmiş ve kimyasal Merck firmasından temin edilmiştir. Bu konsantrasyonların seçilmesinde Ahmadi ve ark., (2020) çalışması temel alınmıştır. Buna göre 100 (F1)-250 (F2) ve 500 (F3) mg L^{-1} C-60-fuleren uygulaması hidroponik olarak uygulanmıştır.

Mısır tohumları petri kaplarında çimlendirildikten 4 gün sonra kobalt stresi ve fuleren uygulamaları yapılmıştır. Uygulama süresi olarak bahsedilen makaleler de göz önüne alındığında 3 gün seçilmiştir. Uygulama süresi sonunda hasat yapılmış ve yapraklar analiz için alınmıştır. Analiz süresine kadar bekletilen örnekler -80°C ortamında tutulmuştur. Tezde yer alan uygulama grupları aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Tezde kullanılan uygulama grupları ve tanımları

	Uygulamalar	Tanımlama
1	Kontrol	Stres ya da F uygulanmayan normal koşullar
2	F1	Stres uygulaması yapılmadan sadece 100 mg L ⁻¹ F uygulaması
3	F2	Stres uygulaması yapılmadan sadece 250 mg L ⁻¹ F uygulaması
4	F3	Stres uygulaması yapılmadan sadece 500 mg L ⁻¹ F uygulaması
5	S	F uygulaması yapılmayan ortama sadece kobalt stresi (300 µM Co) uygulaması
6	S+F1	100 mg L ⁻¹ F uygulaması ve kobalt stresinin (300 µM Co) birlikte uygulanması
7	S+F2	250 mg L ⁻¹ F uygulaması ve kobalt stresinin (300 µM Co) birlikte uygulanması
8	S+F3	500 mg L ⁻¹ F uygulaması ve kobalt stresinin (300 µM Co) birlikte uygulanması

Tezimizin amacı olan kobalt stresi altında fuleren nanomateryalinin muhtemel koruyuculuk rollerini saptayabilmek için fizyolojik ve biyokimyasal analizler yapılmıştır. Fizyolojik analizler içerisinde;

- Kısmi büyüme oranı (RGR)
- Bağıl su içeriği (RWC)

biyokimyasal parametreler içerisinde,

- Antioksidan enzim/izozim aktivite tayinleri (SOD, CAT, POX, APX, GR)
- ROS miktarı (H₂O₂ miktarı)
- Lipid peroksidasyonu (TBARS miktarı)
- Prolin analizi
- Protein miktarı
- Azot metabolizması ile ilişkili enzim aktiviteleri (NR, NiR, GS, GOGAT, GDH) incelenmiştir.

- Moleküler değişimler

2.3. Kısmi büyüme oranının (RGR) saptanması

Hasat esnasında yaprak örnekleri bekletilmeden kısmi büyüme oranlarını (RGR) hesaplayabilmek için kuru ağırlıkları tespit edilmiştir. RGR parametresi tekrarlı olarak 5 örnek üzerinden yapılmıştır. Kısmi büyüme oranı formülünde yer alan kuru ağırlıkları (KA) ölçmek için 72 saat süresince 70°C’de tutulmuştur. Formülde, örneklerin uygulama yapılmadan önceki (0. gün) ve uygulamanın 3. günündeki kuru ağırlıkları bilinmesi gerekmektedir. Kısmi büyüme oranlarını (RGR) hesaplamada Hunt ve ark., (2002) tarafından verilen formül kullanılmıştır. t_1 ve t_2 olarak adlandırılan parametreler, 0. gün ve 3. gün (d) olarak alınmış ve birimi $mg\ mg^{-1}\ d^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Bu formül aşağıda gösterilmiştir:

$$RGR = [\ln (KA_2) - \ln (KA_1)] / (t_2 - t_1)$$

2.4. Bağlı Su içeriğinin (RWC) saptanması

3 gün uygulama yapıldıktan alınan yaprak örnekleri önce yaş ağırlıklarını (YA) belirleyebilmek için tartılmıştır. Örnekleme sayısı her bir gruptan 5 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Kısmi su içeriği formülünde yer alan turgorlu ağırlıkları (TA) ölçmek için 50 ml de-iyonize su içeren petri kaplarında bekletilmiş ve yaprak örnekleri tartılmıştır. Kuru ağırlıkları (KA) gözlemlemek için ise aynı örnekleri sonrasında 72 saat süresince 70°C’de tutulmuştur. Kısmi su içeriğinin (RWC) hesaplamasında Smart ve Bingham (1974) tarafından verilen formül kullanılmış ve birimi % olarak hesaplanmıştır. Formül aşağıda gösterilmiştir:

$$RWC (\%) = [(YA - KA) / (TA - KA)] \times 100$$

2.5. Enzim ve izozim aktivitelerinin saptanması için kloroplast izolasyonu

Çalışmamızda hasat sonrası elde edilen örnekler, bekletilmeden Tris-HCl, sorbitol, $MgCl_2$, NaCl, bovin serum albumin (BSA) içeren izolasyon tampon içerisinde belandır kullanılarak homojenize edilmiştir. Homojenat dört katlı temiz bir bez yardımıyla süzölmüş ve 1000 g’de 6 dakika süresince santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant elimine edilmiş ve pellet üzerine yeniden izolasyon tamponu eklenmiştir. Solüsyonun üzerine %40 percol solüsyonu ilave edilerek 1700 g’de 7 dakika süresince santrifüj edilmiştir. Kloroplastların izolasyon sağlamlığı ferrisiyanid indirgenme testine

göre (Lilley ve ark., 1975) yapılmıştır. İzole edilen kloroplastlar enzim ve izozim aktivite analizlerinde kullanılmıştır.

2.5.1. Süperoksit dismutaz (SOD) izozim/enzim aktivitesinin saptanması

SOD aktivitesinin hem elektroforetik hem de spektrofotometrik olarak aktivite tayinleri yapılmıştır. SOD izozim analizleri densiyometrik olarak yapılmış ve Laemmli (1970) tarafından verilen metotla tamamlanmıştır. SOD izozim tayininde kök örnekleri, 9 mM Tris HCl (pH 6.8) ve %13.6 gliserol ile homojenizasyon yapılmış ve 14.000 g'de 5 dakika süresince santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantların protein miktarı belirlenmiştir. Protein miktarının belirlenmesi, bovin serum albüminin standart olarak kullanılmasıyla Bradford (1976) tarafından verilen metot temel alınarak yapılmıştır. Protein miktarına bağlı olarak her bir gruptan eşit miktarda protein (30 µg) yüklemesi yapılarak SOD izozim tayini belirlenmiştir. İzozimlerin bant yoğunlukları Bio-1D yazılım programı kullanılarak densiyometrik olarak yapılmıştır. Ayrıca total SOD aktivite tayini, daha önce verilen ekstrakt üzerinden tamamlanmıştır. Bu tayin için Beauchamp ve Fridovich (1971) ile gösterilen yöntem izlenmiştir.

2.5.2. Katalaz (CAT) izozim/enzim aktivitesinin saptanması

Katalaz (CAT) izozim tayinleri Woodbury ve ark., (1971) ile tanımlanan metotla yapılmıştır. Her bir gruptan 30 µg protein olacak şekilde yükleme yapılmıştır. Total CAT enzim aktivitesi için Bergmeyer (1970) tarafından tanımlana yöntem kullanılmış ve 50 mM Na-fosfat tamponu (pH 7.0), %0,3 H₂O₂, EDTA ve enzim örneği kuvartz küvetlere eklenmiştir. Örneklerin aktivite analizleri, 240 nm dalga boyundaki H₂O₂'nin üç dakika süresince tüketilmesi temel alınarak tamamlanmıştır.

2.5.3. Peroksidaz (POX) izozim/enzim aktivitesinin saptanması

Peroksidaz (POX) izozim bant yoğunlarının belirlenmesi amacıyla elektroforetik olarak Seevers ve ark., (1971) tarafından verilen metot kullanılmıştır. Total POX aktivitesinde Herzog ve Fahimi (1973) tarafından tanımlanan metottan yararlanılmıştır. 3'-3'-diaminobenzidin tetrahidroklorit (DAB), H₂O₂ varlığında okside olmaktadır ve bunun 465 nm'de absorbans artışı temel alınarak total POX aktivite hesaplanmıştır.

2.5.4. Askorbat peroksidaz enzim aktivitesinin saptanması

Askorbat peroksidaz (APX) izozim tayininde, Mittler ve Zilinkas (1993) belirlediği prosedür kullanılmıştır. Her bir gruptan 30 µg protein yüklemesi ile elektroforez işlemi tamamlanmıştır. Total APX enzim tayini için Nakano ve Asada (1981) ile belirlenen protokol kullanılmış olup bu enzimin substratı olan askorbatın yükseltgenmesi temel alınmıştır. Yükseltgenmeye bağlı olarak absorbansta azalma üç dakika süresince izlenmiştir.

2.6. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarının saptanması

2.6.1. Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarının saptanması

Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarının belirlenmesi amacıyla Liu ve ark., (2010) tarafından verilen yöntem kullanılmıştır. Bu yöntem 0.5 gr kök örnekleri sıvı azotta parçalanmış ve aseton ile homojenize edilmiştir. Süzüntü, 3.000 g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant ayrılmış ve titantum tetraklorid içeren solüsyon ilave edilmiştir. Amonyum hidroksit eklenerek 16.000 g'de santrifüj edilmiştir. Pellet kısmı aseton ile yıkanarak elde edilen pellet H₂SO₄ solüsyonuyla çözülmüştür. Oluşan solüsyonun 410 nm'de absorbansı izlenmiştir. Bilinen H₂O₂ miktarına bağlı standart eğri temel alınarak H₂O₂ miktarı hesaplanmıştır.

2.7. Lipit peroksidasyonun saptanması

Malondialdehit (TBARS -tiobarbiturik asit reaktif maddeler- miktarı) birikimi lipid peroksidasyonun bir göstergesidir. Stres koşulunda yaprakların hasar düzeyini veya fulerenin bu hasar üzerine olumlu rollerini belirleyebilmek için TBARS miktarı tayin edilmiştir. Bu nedenle Rao ve Sresty (2000) tarafından gösterilen yöntemle göre 0.1 gr yaprak örnekleri tiokloroasetik asit (TCA) ile homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sonrasında karışım 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında, süpernatant ayrılmış ve 2-Tiobarbitürik asit (TBA) ve triokloroasetik asit (TCA) karışımı eklenmiştir. Karışım tüplere alınmış ve sıcak su banyosunda yarım saat tutulmuştur. Miktar tayini için 532 nm ve 600 nm iki farklı aralıktaki absorbans değişimleri değerlendirilmiştir.

2.8. Prolin miktarının saptanması

Örnekleme yapılan yapraklardaki prolin miktarının izlenmesi Bates ve ark., (1973) tarafından yöntem temel alınmıştır. Her bir gruptan 0.1 gr yaprak örnekleri alınmış ve sülfosalisilik asit eklenerek homojenize edilmiştir. Elde edilen karışım filtre kağıdından süzülüp asit ninhidrin ve glasiyal asetik asit eklenmiştir. Oluşan solüsyon sıcak su banyosunda bir saat bekletilmiş ve sonrasında buz banyosuna alınmıştır. Soğutmadan sonra karışıma toluen eklenmiş ve üst kısım alınarak 520 nm’de absorbansı kaydedilmiştir.

2.9. Total protein miktarının saptanması

Elektroforetik olarak yapılan izozim belirlenmesi ve enzim aktivitelerinin saptanması amacıyla protein miktarı izlenmiştir. Bu nedenle Bradford (1976) ile gösterilen protein tayin yöntemi kullanılmıştır. Bovin serum albumin (BSA) içeren ve belirlenen miktar aralığında standartlara göre örneklerin protein miktarı hesaplanmıştır. Hazırlanan örnekler ve kör, spektrofotometrik olarak 595 nm’de absorbansı ölçülmüştür.

2.10. Azot metabolizması ile ilgili enzim aktiviteleri

2.10.1. Nitrat redüktaz (NR) enzim aktivitesinin saptanması

Nitrat redüktaz (NR) enzim aktivitesini belirleyebilmek için Barro ve ark., (1996) tarafından gösterilen metot kullanılmıştır. Reaksiyonu başlatabilmek için 50 mM sodyum-fosfat tamponu (pH 7.5), EDTA, KNO₃ ve NADH karışımı hazırlanmıştır. Karışım içindeki yaprak örnekleri önce oda sıcaklığında bekletilmiş ve çinko asetat eklenmiştir. Karışım sonrasında santrifüjlenerak ayırım yapılmıştır. Spektrofotometrik olarak absorbansı okunup aktivitesi hesaplanmıştır.

2.10.2. Nitrit redüktaz (NiR) enzim aktivitesinin saptanması

Nitrit redüktaz (NiR) enzim aktivitesi, Ida ve Morita (1073) tarafından izlenen protokole göre yapılmıştır. Yaprak örnekleri 50 mM sodyum-fosfat tamponu, NaNO₂ ve metil viologen karışımına maruz bırakılmıştır. Sonrasında reaksiyon NaHCO₃ ve sodyum

dithionat eklenerek başlatılmıştır. Oda sıcaklığında biraz tutulduktan sonra sıcak su banyosuna alınmıştır. Absorbanstaki değişim izlenerek yaş ağırlıktaki $\mu\text{mol mg}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

2.10.3. Glutamin sentetaz (GS) enzim aktivitesinin saptanması

Glutamin sentetaz (GS) aktivitesinde Oneal ve Joy (1973) tarafından verilen metot izlenmiştir. Bu protokol, tris-HCl tamponu, ATP, glutamat, hidroksilamin ve sodyum asetat içeren karışıma 0.1 ml örnek ekstraktı eklenerek başlatılmaktadır. Öncesinde yarım saat inkübasyon sonrasında ise FeCl_3 ve trikloroasetik asit eklenmiştir. Santrifüj edildikten sonra 540 nm’de süpernatant kısmının absorbansı izlenmiştir.

2.10.4. Glutamat sentaz (GOGAT) enzim aktivitesinin saptanması

Glutamat sentaz (GOGAT) enzim aktivitesinin belirlenmesinde Rachina ve Nicholas (1985) tarafından açıklanan metot kullanılmıştır. 50 mM sodyum-fosfat tamponu içerisine α -oksanotarik asit, glutamin ve NADH eklendikten sonra örnek ekstraktı konulmuştur. Karışım santrifüjlendikten sonra 340 nm’deki absorbansı takip edilmiştir.

2.10.5. Glutamat dehidrogenaz (GDH) enzim aktivitesinin saptanması

Glutamat dehidrogenaz (GDH) enzim aktivitesinde, bu enzimin hem aminasyon (NADH-GDH) hem de deaminasyon (NAD-GDH) aktivitesi belirlenmiştir. Bu amaçla Groat ve Vance (1981) tarafından izlenen yöntem kullanılmıştır. 50 mM tris-HCl tamponu içerisine, α -oksanotarik asit, NH_4Cl , NADH ve enzim ekstraktı eklenmiştir. Aktivitelerin hesaplanmasında 450 nm ve 340 nm’de gözlenen absorbans değerleri kullanılmıştır.

2.11. İstatistiksel Analizler

Fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerdeki elde edilen veriler her bir gruptan beş tekrar yapılarak değerlendirilmiştir. Bulgular one-way ANOVA analiziyle (tek yönlü varyans analizi) yorumlanmıştır. Uygulama grupları arasındaki karşılaştırma TUKEY

post-test (SPSS yazılımı, versiyon 23.0) uygulanmıştır. Karşılaştırma sonunda değer $P<0.05$ bulunuyorsa gruplar arasındaki değişimde istatistiksel olarak farklı olarak yorumlanmıştır. Çalışmamızdaki grafik olarak verilen tüm sonuçlarımızdaki hata çubukları standart hata temel alınarak yapılmıştır.

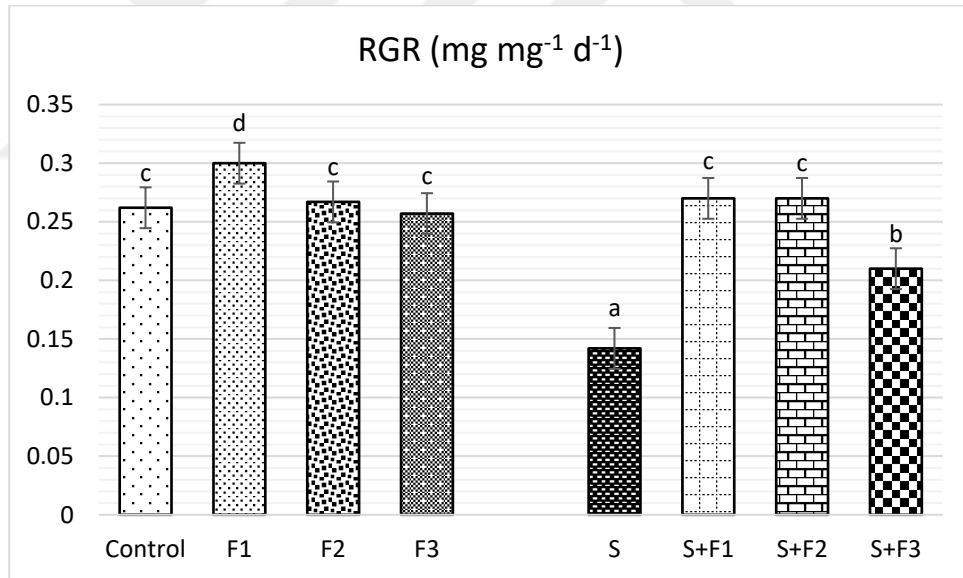


3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Tez çalışmasında kobalt stresi uygulanan mısır yapraklarında fuleren uygulamasının, büyüme, su içeriği, antioksidan savunma sistemi, lipid peroksidasyonu ve azot metabolizması üzerine etkileri fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerle desteklenerek gösterilmeye çalışılmıştır. Tezde elde edilen verilerin sonuçları ve yorumlanması aşağıda verilmiştir.

3.1. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının kısmi büyüme oranı üzerine etkisi

Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının büyüme üzerine etkisini belirleyebilmek için uygulama gruplarında kısmi büyüme oranları (RGR) (Şekil 3.1) analiz edilmiştir.



Şekil 3.1. 300 μ M kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L⁻¹) uygulamasının kısmi büyüme oranları (RGR) üzerine etkisi

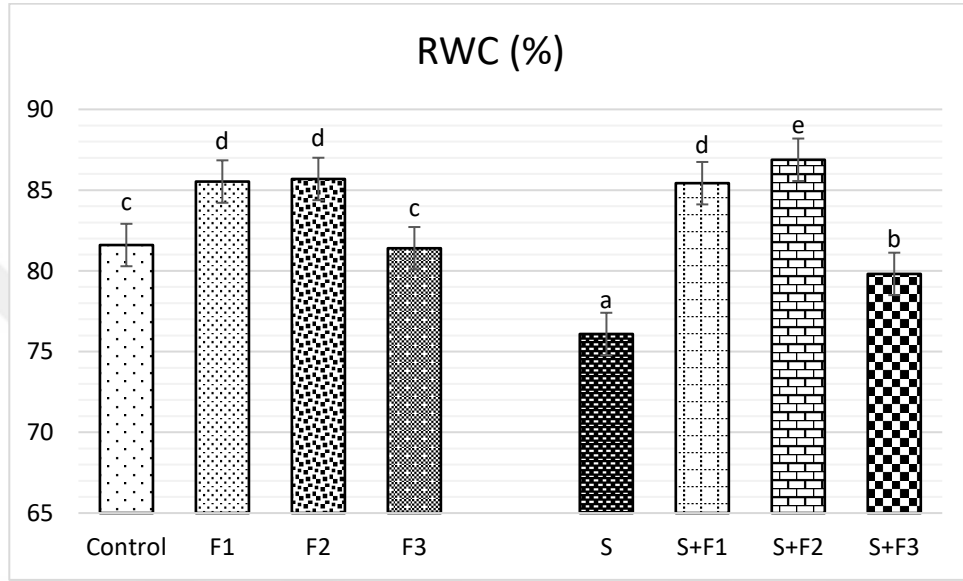
Mısır yapraklarında kobalt stresi beklendiği gibi büyüme oranlarında ciddi bir azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.1). Diğer yandan, fuleren uygulaması hem stres hem de kontrol koşulları altında (F2 ve F3 dışında) uygulandığında stresin oluşturduğu büyümedeki inhibisyonu azaltmıştır. Sadece fuleren uygulamasında en düşük konsantrasyonda (F1) RGR’de artış izlenmiştir. Ayrıca kontrol koşulunda uyguladığımız

farklı F miktarları (F1 dışında) kontrole göre yaklaşık aynı etki cevabını oluşturmuştur. Büyümede gözlenen iyileşmedeki en iyi oran sadece stres uygulanan gruba göre S+F1 grubunda izlenmiştir.

Kobalt stresinin bitki büyüme ve gelişmesinde olumsuz rolleri rapor edilmiştir (Ali ve ark., 2018; Yildiztugay ve ark., 2019). Yapılan bu çalışmalarda kobalt stresi uygulanan buğday yapraklarında RGR düzeyleri ciddi olarak azalmıştır. Çalışmamızda stresle birlikte büyümedeki (RGR) azalmayla ilişki olarak, yaprak uçlarındaki uzama bölgesinde olan bozulma ya da yaprak hücrelerinin mitoz aktivitesindeki azalma söylenebilir. Ayrıca kobaltın farklı besleyici elementlerle olan ilişkisi nedeniyle mısır fideleri için gerekli olan elementlerin de köklere girişi engellenebilir ve bu durum büyümedeki azalmayı oluşturabilir. Kobalt ve bitki arasındaki bu etkileşimler Akeel ve Jahan (2020) tarafından da gösterilmiştir. Kobalt stresi, bitkide yer alan ve enerji metabolizmasında görev alan enzimlerin aktivitesini azaltmış ve ATP oluşumunu sınırlamış olabilir. Bu etkiyle stres, hücrelerde yeterli düzeyde enerji üretilemediğinden hücrelerin büyüme ve gelişmesinin azalmaya neden olmuş olabilir. Ancak fuleren uygulaması büyümedeki tüm bu olumsuz değişimi tersine çevirmiştir. Fuleren stres uygulanan koşullarda RGR'deki uyarılmayı K^+ , Mn^{+2} , B^{+3} , Mo^{-2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Mg^{+2} ve Ca^{+2} gibi elementlerin miktarını (yayınlanmamış data) alımının ve taşınım mekanizmalarını etkileyerek yapmış olabilir. Bu elementler özellikle asimilasyon, klorofil biyosentezinde veya fotosentetik kapasitede etkili olduğu için büyümeyi bu yolla uyarılmış olabilir. Böylece, fuleren uygulamasıyla mısır bitkilerinde kobalt stresine karşı fotosentetik süreçlerde veya pigment sentezinde iyileşme sağlanıp karbon metabolizmasında artışlarla büyümede artış sağlanmış olabilir. Singh ve ark., (2021) nanopartiküllerin besleyici alımını üzerine pozitif etkilerini rapor etmişlerdir. Gelişen büyüme ayrıca giberellin, oksin ya da brasinosteroid gibi bitki büyüme düzenleyicilere ait gen ifadelerinin artışına bağlanabilir (Banerjee ve Roychoudhury, 2022). Bu hormonlardan bazıları hücre bölünmesinde, uzamasında, yaprak genişlemesinde ve gövde uzamasında rol almaktadır.

3.2. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının kısmi su içeriği üzerine etkisi

Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının su miktarı üzerine etkisini belirleyebilmek için uygulama gruplarında kısmi su içeriği (RWC) (Şekil 3.2) analiz edilmiştir.



Şekil 3.2. 300 μM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L^{-1}) uygulamasının kısmi su içeriği (RWC) üzerine etkisi

Büyüme parametresinde olduğu gibi kobalt stresi, mısır yapraklarının su içeriğinde azalmaya neden olmuştur. Bu azalmanın oranı %6.7 oranındadır. Diğer yandan stres ile birlikte fuleren uygulaması su içeriğinde bir iyileşme sağlamış olup özellikle F1-2 konsantrasyonları, RWC değerlerini kontrol düzeylerinin üzerine kadar çıkarmıştır. Stres uygulanmadan yapılan fuleren uygulamasıyla RWC değerlerinde sadece F1-2 uygulamalarında önemli bir değişim izlenmiştir.

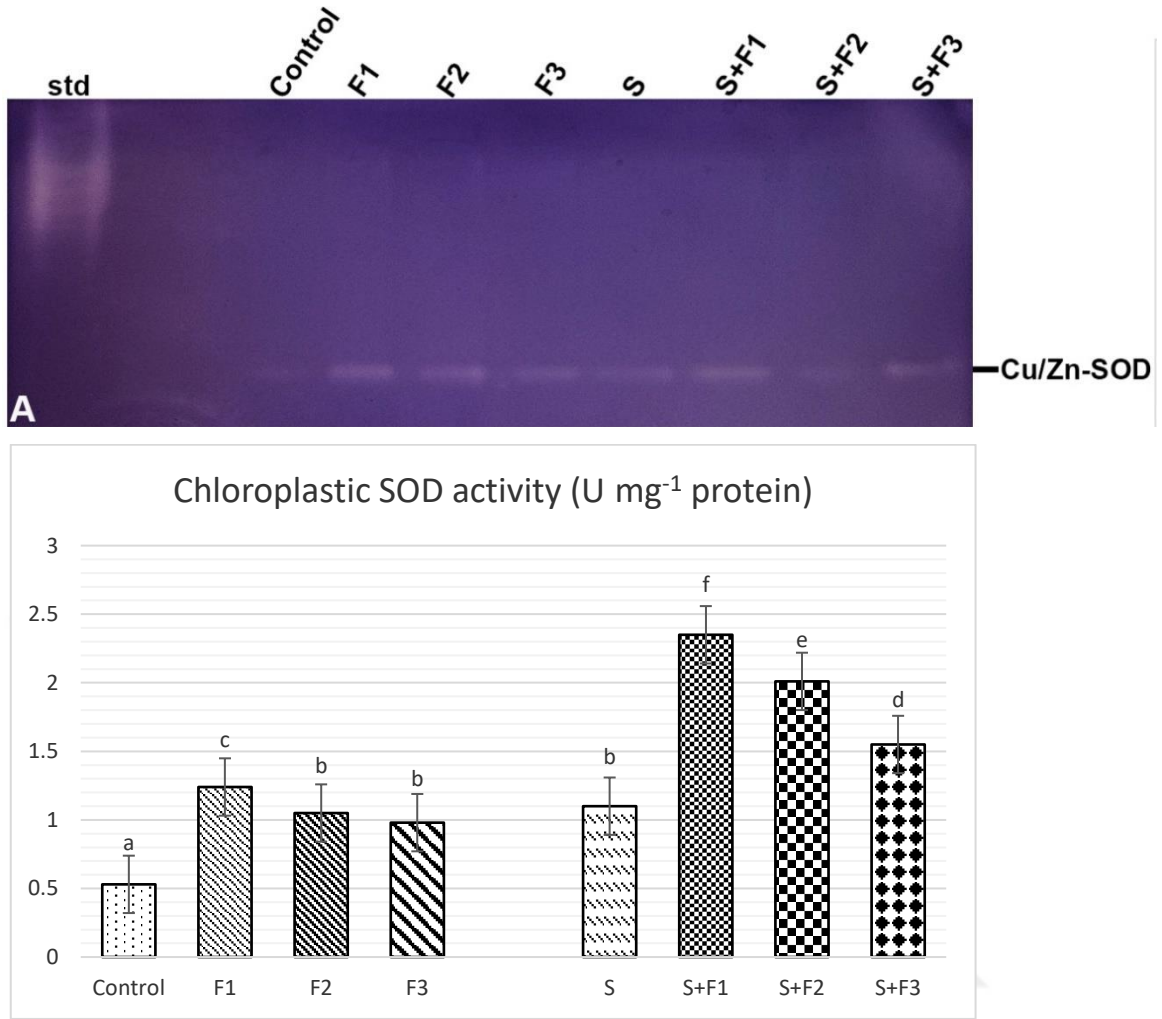
Metal iyonları bitki yaşama ortamlarına eklendiği takdirde toprakta su alınması ve devamında bitkide su içeriği azalmaktadır (Malecka ve ark., 2008). Çalışmamızda kobaltın toksik etkileri arasında sayılan yaprak büyümesi ve sınırlı su alınımları nedeniyle RWC değerleri azalma eğilimindedir. Su miktarında gözlenen sınırlamalar nedeniyle yaprak hücrelerinde oksidatif hasar tetiklenmektedir. Metal iyonu uygulanmasıyla birlikte bitkilerde akuaporin iletkenliğini değiştirmekte ve bunun devamında zarlardaki su geçirgenliği azalmaktadır. Kurşun uygulaması yapılan *Allium cepa* bitkisinde yapısı bozulan akuaporinler nedeniyle su akışı sınırlanmaktadır (Przedpelska-Wasowicz ve

Wierzbicka, 2011). Bu sonuç tezimizde gözlediğimiz kobalt stresindeki düşük RWC değerlerinin nedeni olabilir. Kobalt mısır bitkisinde bulunan su kanallarının geçirgenliğini bozmuş olabilir. Ayrıca Rucinska-Sobkowiak (2016) da belirttiği gibi toksik düzeydeki metal stresine maruz kalan bitkilerde hücre çeperlerinin iletkenliğinde de azalmalar gözlenmiş ve devamında su alınımları azalmıştır. Pirslova ve Matusikova (2013) tarafından kobalt toksisitesinin, bitkilerin karakteristik kalloz depolarının oluşumunu tetiklediğini bildirmişlerdir. Stresin bu olumsuz etkilerine karşı dışarıdan fuleren uygulayarak iyileşme sağlanabilir. Grafikte de görüldüğü gibi fuleren kobalt stresine karşı hücrelerin su durumunu (RWC) koruyabilmiştir. Bu durum, artan prolin miktarları sonuçlarımızla da örtüşmektedir.

3.3. Kobalt stresi ve fuleren uygulama gruplarında antioksidan enzim/izozim profillemesinde oluşan değişimler

3.3.1. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının kloroplastik SOD enzim/izozim aktivitesi üzerine etkisi

Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının antioksidan savunma sistemi üzerine etkisini belirleyebilmek için uygulama gruplarında kloroplastik süperoksit dizmutaz (SOD) aktivitesi analiz edilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. 300 μ M kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L⁻¹) uygulamasının kloroplastik SOD aktivitesi ve SOD izozimlerinin band yoğunluğu üzerine etkisi

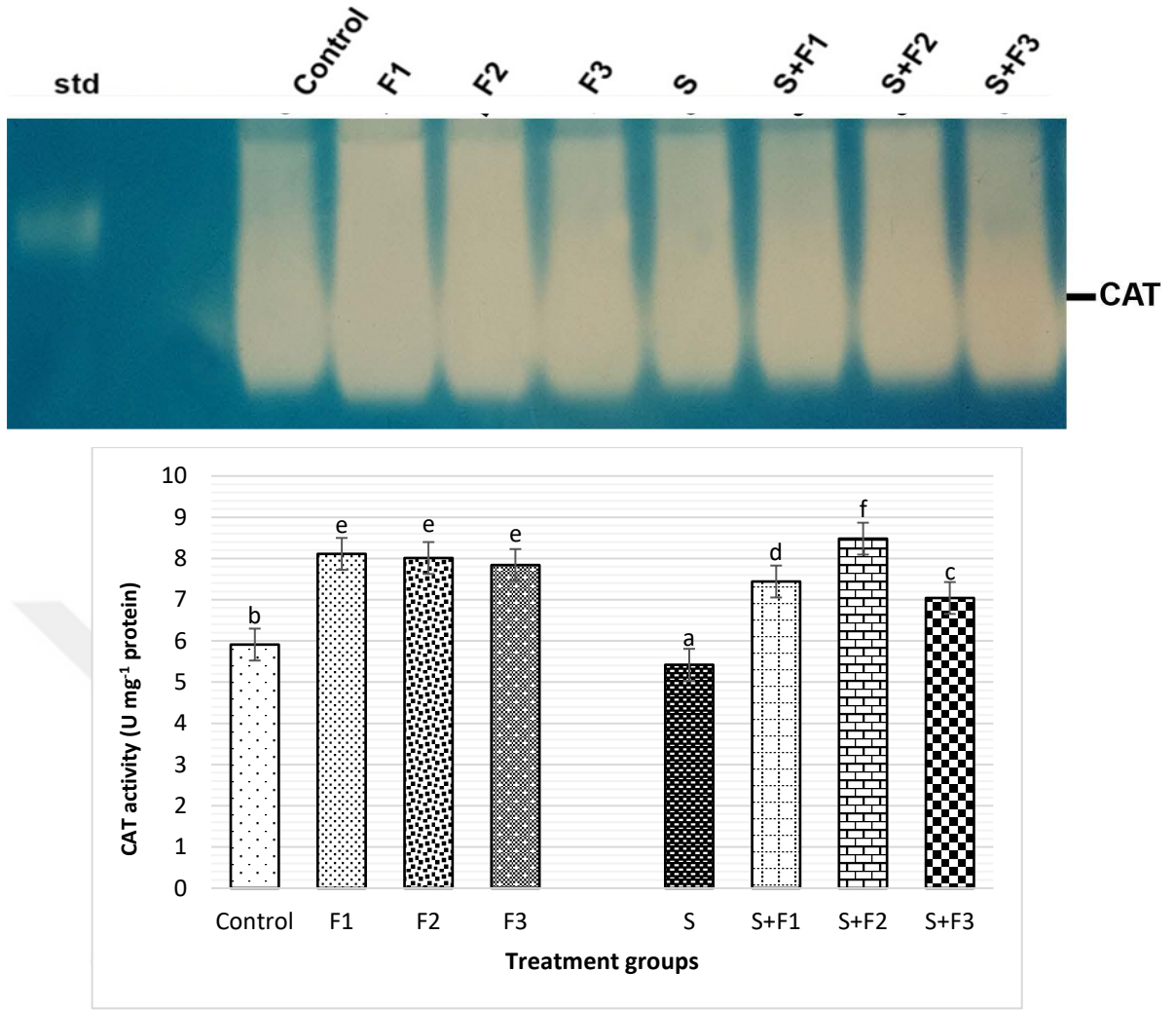
Kloroplastik SOD aktivitesi kobalt toksitesine bağlı olarak artmıştır. Bu artış, SOD izozim bant yoğunluğunu gösteren densiyometrik analizlerle de desteklenmiştir. Tüm uygulama gruplarında sadece bir tane bant gözlenmiş olup izozim analizlerinde bunun Cu/Zn-SOD olduğu belirlenmiştir. Stres uygulanan mısır yapraklarına fuleren uygulaması eş zamanlı olarak yapıldığında kloroplastik SOD aktivitesi daha da artmıştır. Bu değişim SOD izozim analiziyle de desteklenmiş ve stres altında Cu/Zn-SOD izozimindeki artan bant yoğunluğu gösterilmiştir. Kontrol koşullarında fuleren uygulandığı takdirde kloroplastik SOD aktivitesi, stresli gruplarda olduğu gibi artmıştır. Bu artışta Cu/Zn-SOD bant yoğunluğundaki değişim paralellik göstermektedir.

SOD aktivitesi stres altında bitkilerin ilk savunma cevaplarından birisidir. Fotosentez ya da solunum süreçleri içinde oksijenin indirgenmesi ya da bazı enzimatik reaksiyonlarla oluşan süperoksit anyon radikali, bitkiler için toksiktir ve SOD enziminin

katalizlemesiyle H_2O_2 'ye dönüşür (Gill ve Tuteja, 2010). Çalışmamızda SOD aktivitesinde kobalt stresi uygulanan mısır yapraklarında artış gözlenmiş ve üretilen H_2O_2 miktarında artış saptanmıştır. Benzer olarak nikel toksisitesinde yetişen mısır bitkilerinde de SOD aktivitesinde artış sağlanmıştır (Fiala ve ark., 2021). Çalışmamızda fuleren uygulaması, stresten olumsuz etkilenen mısır kloroplastlarında antioksidan sistemini uyarması açısından önemlidir. Nanopartikül sınıfına ait olan fulerenollerin de ROS türlerini nötralize etmede önemli olduğu rapor edilmiştir (Sachkova ve ark., 2019). Bazı çalışmalarda fuleren ile yakın benzerlik gösteren fullerol ya fullerollerin SOD aktivitesine benzer bir aktivite gösterip süperoksit anyon radikallerini ortadan kaldırdığı izlenmiştir (Rico ve ark., 2015). Daha önce yapılan çalışmalarda kuraklık ve ozmotik stres altında yetiştirilen *Brassica napus* and *Zea mays* bitkilerinde fullerol uygulamasının SOD aktivitesini artırdığı rapor edilmiştir.

3.3.2. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının total CAT enzim/izozim aktivitesi üzerine etkisi

Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının antioksidan savunma sistemi üzerine etkisini belirleyebilmek için uygulama gruplarında total katalaz (CAT) aktivitesi analiz edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 3.4. 300 µM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L⁻¹) uygulamasının total CAT aktivitesi ve CAT izozimlerinin band yoğunluğu üzerine etkisi

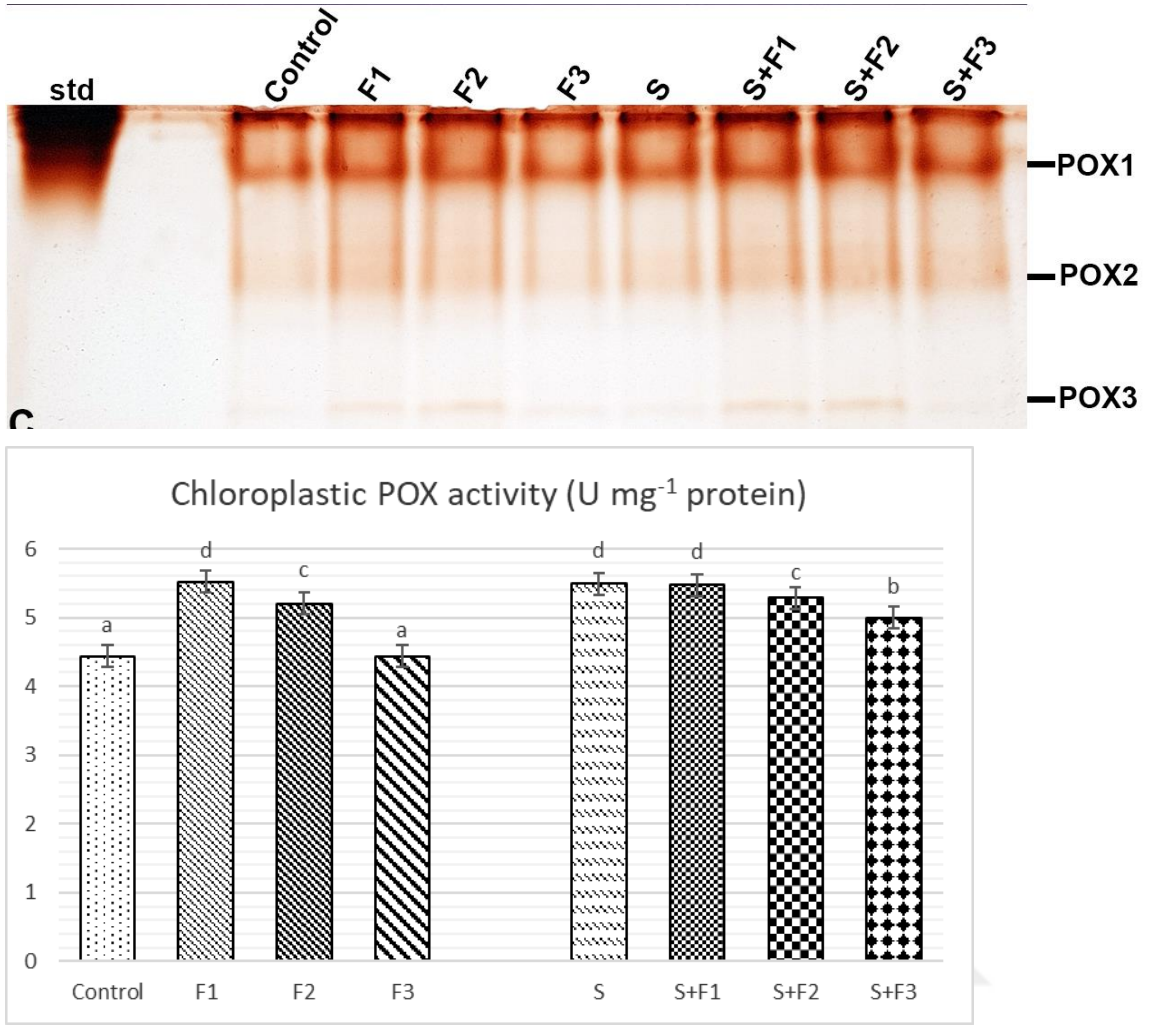
Deneme süresince mısır yapraklarında uygulama gruplarında sadece bir tane CAT bandı (CAT) gözlenmiştir. Bant yoğunluğu total CAT aktivitesi paralellik göstermekle birlikte kobalt stresi mısırdaki CAT aktivitesini azaltmıştır. Bu total aktivitedeki azalmanın oranı yaklaşık %8 düzeyindedir. Stres grubunda, CAT izozim bandının yoğunluğunun kontrole göre azalması dikkat çekmektedir. Ancak fuleren, stres uygulanan gruplara eklendiği takdirde CAT aktivitesini, sadece stres uygulanan gruplara göre önemli düzeyde artırmıştır. Bu artış S+F2 grubunda oldukça belirgin olup yaklaşık 1.6 katlık bir artışa neden olmuştur. Aynı şekilde sadece fuleren uygulanan mısır yapraklarında deneme süresince CAT aktivitesinde artış sağlanmıştır.

Katalaz enzimi, POX ya da askorbat-glutasyon döngüsünde yer alan enzimler gibi H₂O₂ süpürülmesinde görev alır. APX enziminden farklı olarak H₂O₂ süpürülmesinde ayrıca substrat olarak askorbata ihtiyaç duymamaktadır. CAT enziminin katalizlemesiyle

birlikte H_2O_2 , toksik olmayan suya dönüşmektedir. Çalışmamızda kobalt stresi CAT azaltmaktadır. Bu azalma sonucunda CAT, H_2O_2 süpürülmesine katkı sağlayamamaktadır. CAT aktivitesindeki bu azalmanın nedeni olarak toksik kobalt düzeylerinin bu enzimin aktif bölgelerinde oluşturduğu hasarlanmalar ve enzimin katalizleme özelliğini kaybetmesi söylenebilir. Stres altındaki mısır yapraklarına fuleren uygulaması yapıldığı durumda konsantrasyondan bağımsız olarak CAT aktivitesi ciddi şekilde uyarılabilmektedir. Fuleren, kobalt stresiyle oluşan toksik H_2O_2 düzeylerini elimine edebilmiştir. Daha önce yayınlanan bir raporda fulerenin kimyasal yapısında bulunan yeniden lokalize olan çift bağların varlığı nedeniyle ROS süpürme kapasitesi bildirilmiştir (Injac ve ark., 2013).

3.3.3. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının kloroplastik POX enzim/izozim aktivitesi üzerine etkisi

Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının antioksidan savunma sistemi üzerine etkisini belirleyebilmek için uygulama gruplarında kloroplastik peroksidaz (POX) aktivitesi analiz edilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. 300 µM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L⁻¹) uygulamasının kloroplastik POX aktivitesi ve POX izozimlerinin band yoğunluğu üzerine etkisi

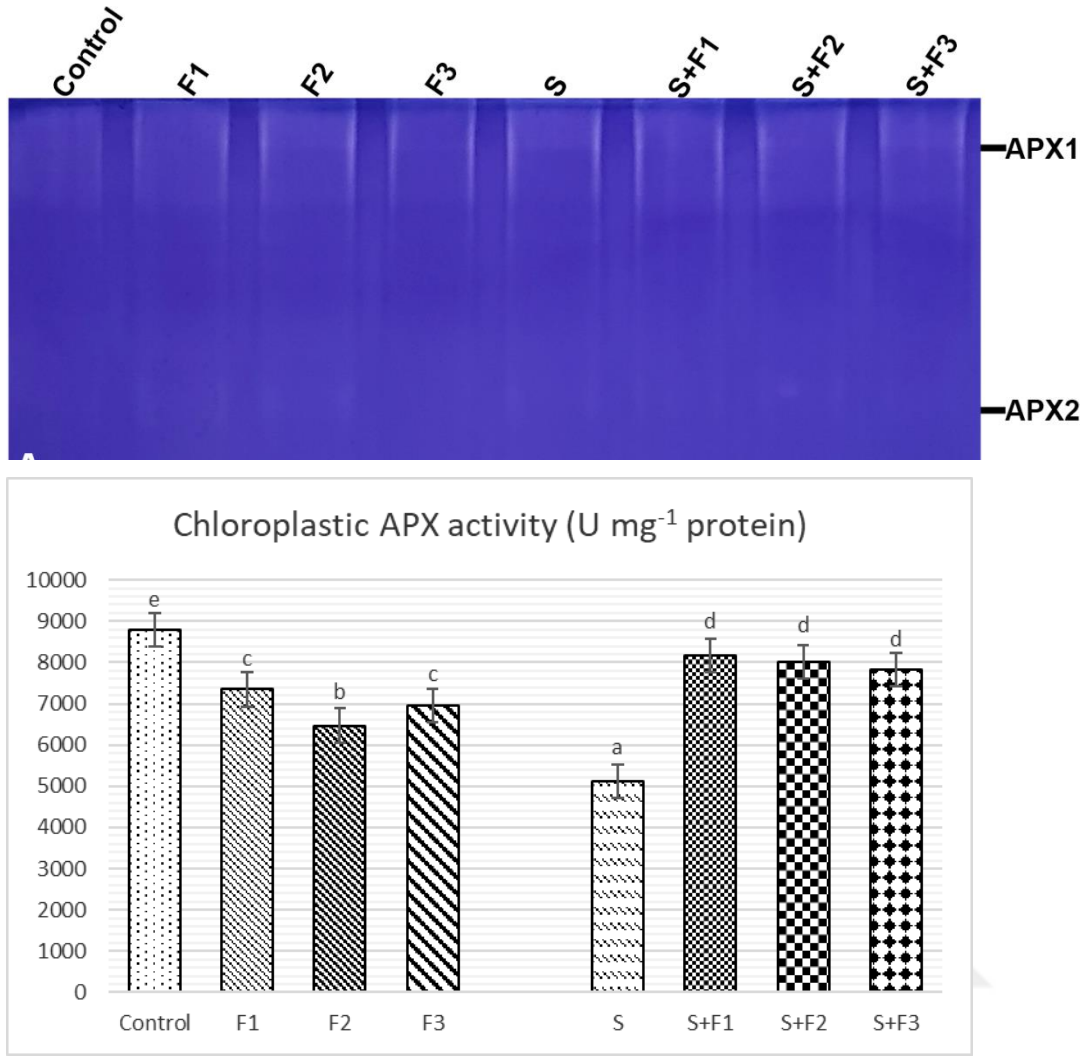
Kloroplastik POX aktivitesindeki değişimi izleyebilmek amacıyla mısır yapraklarında uygulama sonrasında yaprak hücrelerinin hem spektrofotometrik hem de elektroforetik analiz yardımıyla POX izozim değişimleri tespit edilmiştir. Analiz sonucunda örneklerde üç tane POX bantları (POX1-2-3) gözlenmiştir (Şekil 4.5). Densiyometik analizden de izlendiği gibi stresle birlikte kloroplastik POX aktivitesinde kontrol grubuna göre önemli bir artış izlenmiştir. Bu durumu, özellikle POX1 ve POX2 bantlarının yoğunluk artışı da desteklemiştir. Ancak fuleren uygulandığında stresin bu etkisi tersine çevrilmiş ve kloroplastik POX aktivitesinde azalma (S+F1 dışında) gözlenmiştir. İlginç olarak kontrol koşulunda uygulanan fuleren, kloroplastik POX aktivitesinde artışa sadece F1 ve F2 uygulamalarında neden olmuş ancak en yüksek

fuleren uygulamasında (F3) herhangi bir değişim sağlanmamıştır. Bu etki, POX izozimlerindeki değişim ile benzerdir.

Başka bir radikal süpüren enzim de POX enzimidir (Ahammed ve ark., 2020). Stres antioksidan enzim sistemindeki enzim yapısı ve fonksiyonunu bozabilmektedir. Bakır stresi uygulanan çeltik bitkilerinde POX aktivitesinde azalma gözlenmiştir (Tahjib-Ul-Arif ve ark., 2020). Bu raporlara zıt olarak, çalışmamızda POX aktivitesinde kobalt stresi altında bir artış izlenmiştir. Artan SOD aktivitesi sonucunda oluşan H_2O_2 süpürülmesinde, kobalt stresi uygulanan bitkiler POX aktivitesini de kullanarak toksiteyi azaltmaya çalışmıştır. Diğer yandan, fuleren kobalt toksitesine karşı radikalleri ortadan kaldırmada POX aktivitesini uyaramamıştır.

3.3.4. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının kloroplastik APX enzim/izozim aktivitesi üzerine etkisi

Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının antioksidan savunma sistemi üzerine etkisini belirleyebilmek için uygulama gruplarında kloroplastik askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi analiz edilmiştir (Şekil 3.6).



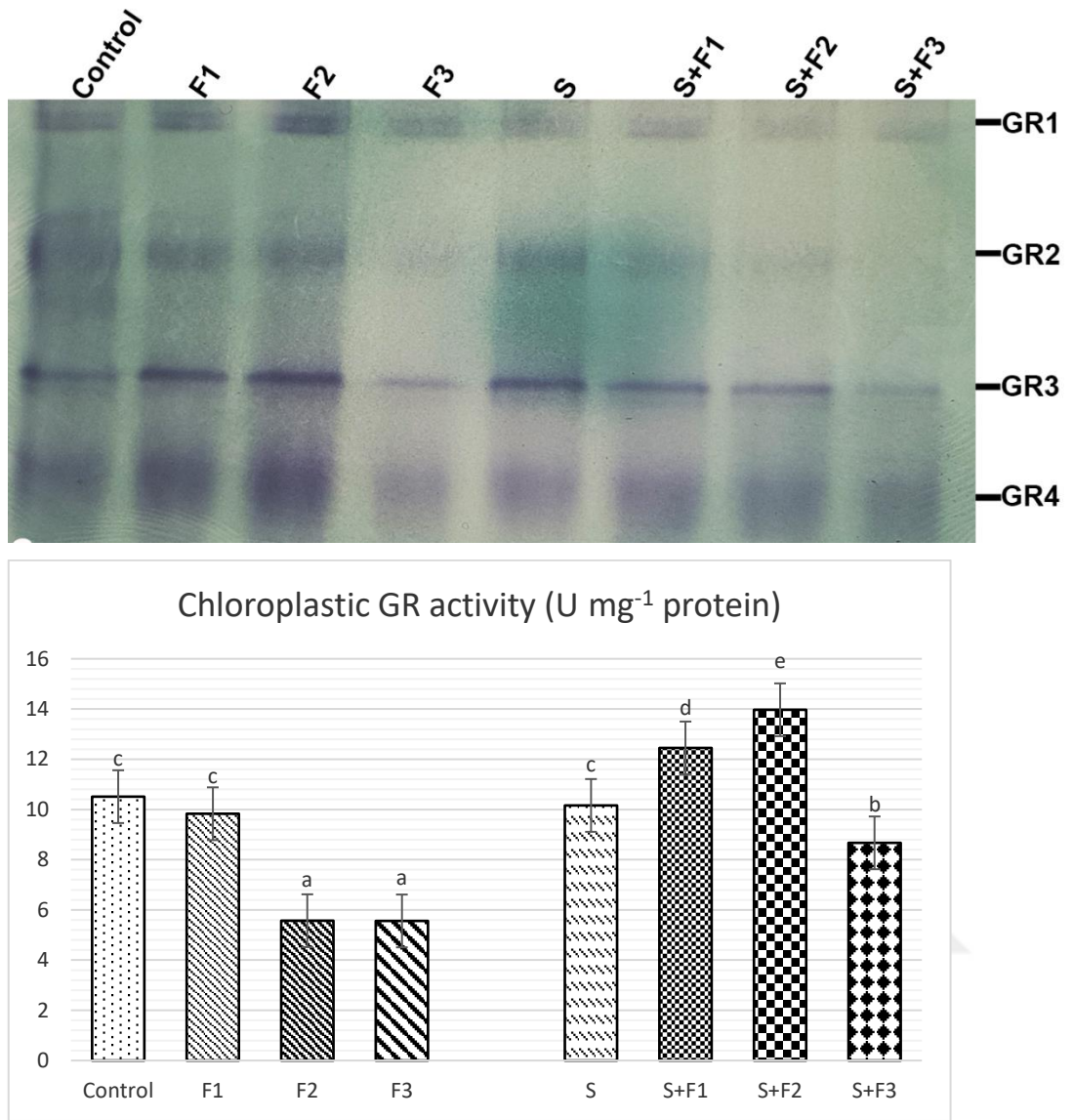
Şekil 3.6. 300 μ M kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L⁻¹) uygulamasının kloroplastik APX aktivitesi ve APX izozimlerinin band yoğunluğu üzerine etkisi

Mısır bitkilerine uygulanan stresin ve fulerenin kloroplastik APX aktivitesinde oluşturduğu değişim şekil 4.6'da gösterilmiştir. Uygulama gruplarında iki tane APX izozimi (APX1-2) izlenmiştir. Kobalt stresine maruz kalan mısır kloroplastlarında APX aktivitesi ciddi şekilde azalma (1.7 kat) göstermiştir. Bu azalma, özellikle APX1 izoziminin bant yoğunluğunda oldukça belirgindir. Sadece stres grubuyla kıyaslandığında fuleren ve stres uygulamaları yapılan mısır yapraklarında kloroplastik APX aktivitesi artmıştır. APX aktivitesinde oluşan bu cevap, tüm APX izozimleriyle desteklenirken, özellikle APX1 izoziminin bu gruptaki değişimi dikkat çekicidir. Sadece fuleren uygulanan grupta ise APX aktivitesi kontrol grubuna göre ciddi olarak azalma göstermiştir.

Askorbat-Glutatyon (AsA-GSH) döngüsü, mitokondri ve kloroplast gibi redoks aktif organellerde önemli bir radikal süpürme yoludur. Askorbat peroksidaz (APX) ortamda H_2O_2 'in toksik düzeyde bulunduğu durumlarda askorbat ile reaksiyonu katalizleyerek, monodehidroaskorbat ve dehidroaskorbatı oluşturur. Bu iki ürün kendiliğinden ya da enzimler tarafından (monodehidroaskorbat redüktaz ve dehidroaskorbat redüktaz) yeniden askorbata dönüştürülür (van Doorn and Ketsa, 2014). Bu durum bitkilerde stres durumunda askorbat havuzunun korunmasında ve yenilenmesinde rol oynar. Çalışmamızda APX aktivitesi kobalt stresıyla birlikte azalma göstermiş olup bu değişimin sonucunda APX ile H_2O_2 ortadan kaldırılamamıştır. Stres askorbat havuzunun da azalmasına neden olmuştur. Stres koşulunda gözlediğimiz H_2O_2 miktarındaki değişim bu sonucu desteklemektedir. Bu sonuç diğer çalışmalarda da rapor edilmiştir (Chrysargyris ve ark., 2019). Diğer yandan, fuleren, stresle artan H_2O_2 miktarını elimine etmekte askorbatı elektron donorü olarak kullanan APX aktivitesini uyarabilmiştir. Buna benzer olarak Xiong ve ark., (2018) tarafından yapılan çalışmada kuraklık stresine maruz kalan *Brassica napus* bitkisinde dışarıdan fullerol uygulaması yapılmış ve bu nanopartikül ile askorbat havuzu strese karşı korunabilmiştir.

3.3.5. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının kloroplastik GR enzim/izozim aktivitesi üzerine etkisi

Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının antioksidan savunma sistemi üzerine etkisini belirleyebilmek için uygulama gruplarında kloroplastik glutatyon redüktaz (GR) aktivitesi analiz edilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. 300 μ M kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L⁻¹) uygulamasının kloroplastik GR aktivitesi ve GR izozimlerinin band yoğunluğu üzerine etkisi

Kobalt stresine bağlı olarak oluşan oksidatif stres mısır yapraklarının kloroplastik GR aktivitesinde herhangi bir değişime neden olmamıştır. Native page ile elektroforetik analizlerde uygulama gruplarında dört GR (GR1-4) izozim bandı izlenmiştir. Kobalt stresi altında oluşan GR aktivitesindeki değişim, GR1-2-4 izozim bant yoğunluklarıyla da açıklanabilmektedir. Fuleren ve stresin birlikte uygulandığı gruplarda (S+F1 ve S+F2) GR aktivitesinde bir artış gözlenmiştir. Bu GR aktivitesindeki artış en fazla oranda S+F2 grubunda izlenmiştir. Kontrol koşulları altında uygulanan fuleren GR aktivitesinde azalmaya neden olmuş ya da herhangi bir değişim oluşturmamıştır.

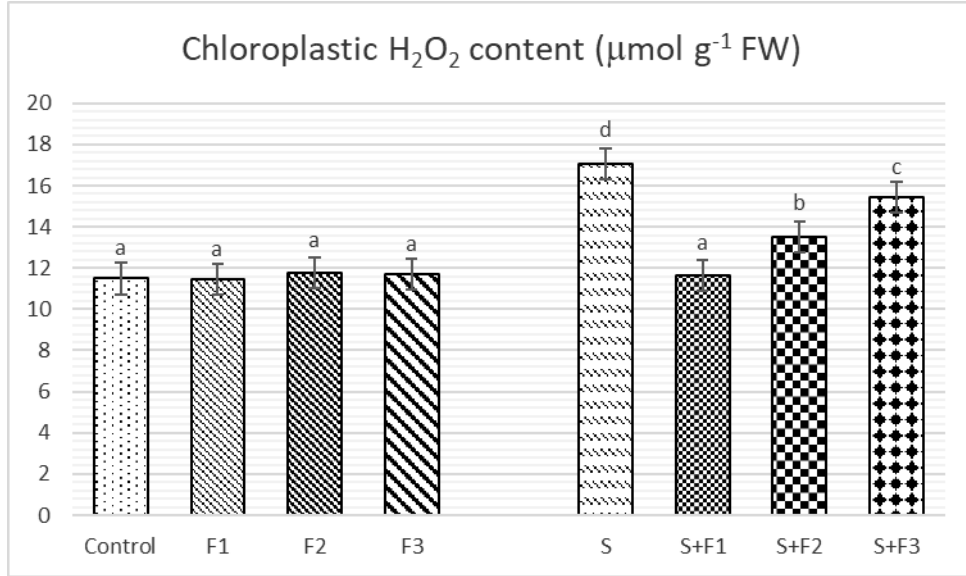
Çalışmamızda mısır yapraklarında APX aktivitesine benzer olarak GR aktivitesinde de herhangi bir artışın gözlenmemesi, stres gruplarında askorbat-glutasyon

(AsA-GSH) döngüsünün çalışmamasına ve GR'nin H_2O_2 süpürülmesinde etkin rol almadığına işaret etmektedir. Stres altında GR aktivitesindeki değişimler önceden yapılan çalışmalarla da desteklenmiştir. Jin ve ark., (2019) tuz stresi altında azalan GR aktivitesini göstermişlerdir. Fuleren uygulanan mısır kloroplastlarının GR aktivitesinde artışın izlenmesi (S+F1 ve S+F2 gruplarında) H_2O_2 süpürülmesinde GR'nin katkı sağladığını göstermektedir. Transgenik ve mutant bitkilerin kullanımıyla stres altında içsel askorbat düzeylerinin önemli olduğu ve toleransı artırdığı rapor edilmiştir (Yeung et al., 2019). APX aktivitesiyle oluşan dehidroaskorbat, indirgeyici enzim (dehidroaskorbat redüktaz, DHAR) ile yeniden askorbata dönüşmektedir. Glutasyon (GSH), DHAR aktivitesinin izlenmesinde glutasyonun okside olan formuna (GSSG) dönüşür. Askorbat gibi glutasyonun da stres altında yenilenmesi ve GSH havuzunun korunması gerekmektedir. Bu nedenle glutasyon redüktaz (GR) enzimi, glutasyonun yeniden oluşumunda görevlidir. Çalışmamızda fuleren (F1-F2) uygulamasıyla artan GR aktivitesi, kobalt stresinin bozduğu GSH redoks dengesinin korunmasında etkili olduğu söylenebilir. Tezde verileri yayınlanmayan GSH ve GSSG miktarı da göz önüne alındığında fulerenin miktarına bağlı olarak kobalt stresi üzerinde etki oluşturduğu, ancak en yüksek fuleren miktarının kobalt stresinde GSH havuzunun korunmasında ve redoks dengesinde yer almadığı söylenebilir.

3.4. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarının belirlenmesi

3.4.1. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarı üzerine etkisi

Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının ROS birikimi üzerine etkisini belirleyebilmek için uygulama gruplarında hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarı analiz edilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. 300 μM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L^{-1}) uygulamasının kloroplastik H_2O_2 miktarı üzerine etkisi

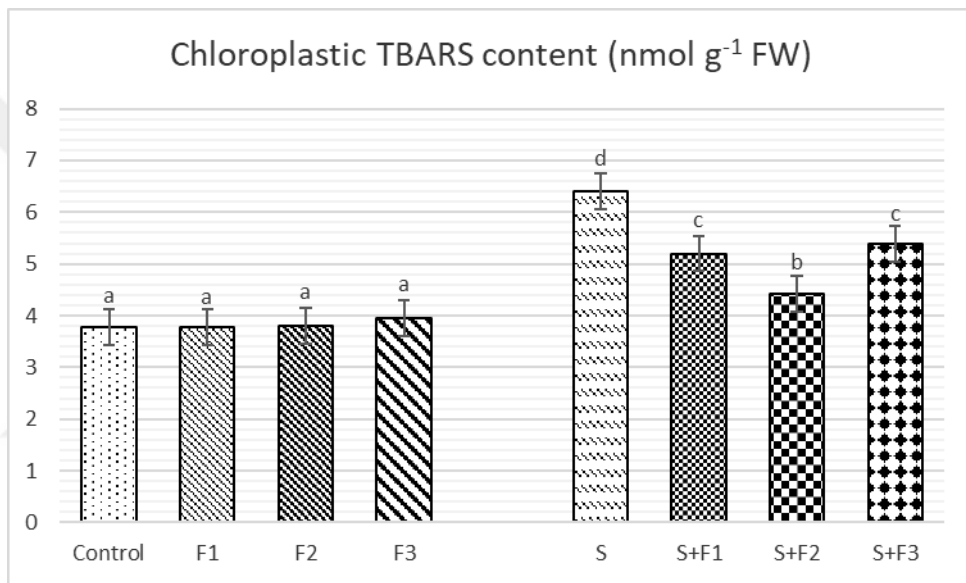
Stres, mısır kloroplastlarının H_2O_2 miktarında %49 oranında artışa neden olmuştur. Fuleren uygulamasıyla deneme sonunda bu toksik düzeydeki H_2O_2 miktarı, sadece stres grubuna göre azaltılmıştır. En etkin düşüş (1,5 kat azalma ile) S+F1 grubunda sağlanmıştır. Diğer yandan kontrol koşullarında uygulanan fuleren dozları mısır yapraklarında herhangi bir H_2O_2 artışı oluşturmamıştır.

Stresin önemli ve ortak bir etkisi de radikal birikimidir. ROS sınıfı içerisinde yer alan H_2O_2 birikim düzeyine göre toksik ya da sinyal özelliği taşımaktadır. Normal koşullar altında belli ve düşük miktarda H_2O_2 oluşturulurken, stres uygulamalarında ise H_2O_2 'nin yüksek düzeylerde birikimi gözlenmektedir. Stres altında yüksek miktarda birikim olduğunda H_2O_2 hücredeki önemli bileşenler için oksidatif stresi de tetiklemektedir. Ancak normal metabolizma ile oluşabilen H_2O_2 uygun ve düşük miktarda birikim gösterdiğinde kalsiyum ve hormon gibi farklı sinyal molekülleriyle etkileşim haline geçerek sinyalleme yollarını uyarabilmektedir. Çalışmamızda kobalt stresi mısır yaprak kloroplastlarında yüksek miktarda H_2O_2 birikimine neden olmuştur. Bu molekülün süpürülmesinde görev alan enzim aktivitelerini düşünecek olursak (sadece POX aktivitesi) mısır yapraklarında yetersiz bir H_2O_2 süpürülme durumu bulunmaktadır. Bu etki, stres altında H_2O_2 miktarının artışını açıklamaktadır. Diğer yandan, fuleren uygulaması yaptığımız gruplarda, stresin H_2O_2 miktarı üzerine bu etkisi, başarılı şekilde ortadan kaldırılabilmiştir. Benzer şekilde Liu ve ark., (2016) yaptıkları çalışmada fullerenol uygulamasının mısırdaki ROS miktarında azalmayı teşvik ettiği gösterilmiştir.

3.5. Lipit Peroksidasyonun Belirlenmesi

3.5.1. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının TBARS miktarı üzerine etkisi

Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının lipid peroksidasyonu üzerine etkisini belirleyebilmek için uygulama gruplarında TBARS miktarı analiz edilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 3.9. 300 µM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L⁻¹) uygulamasının kloroplastik TBARS (Tiobarbiturik asit maddeleri) miktarı üzerine etkisi

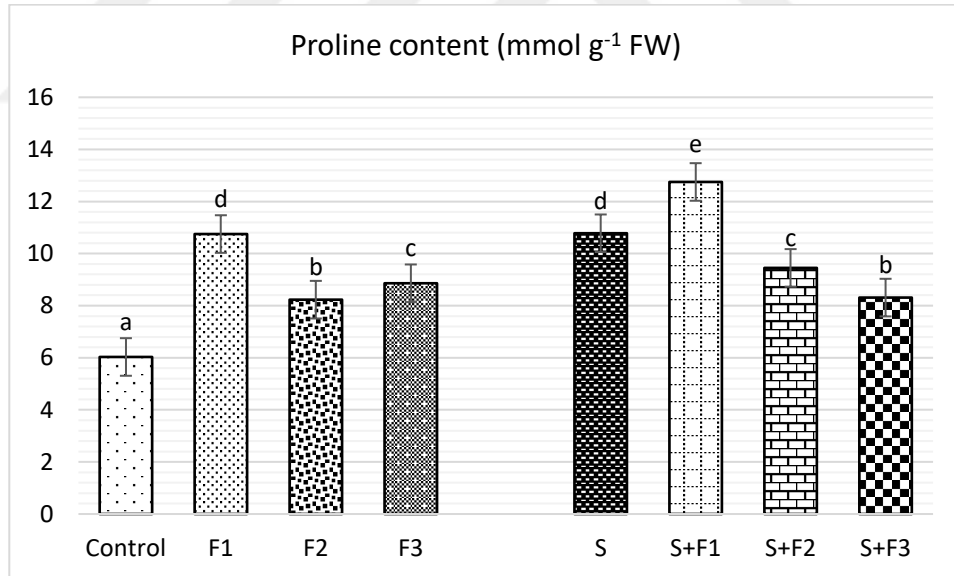
Kobalt stresine maruz kalan bitkilerde yaygın cevaplardan birisi de lipid peroksidasyonudur. Bu durumun en etkili göstergelerinden birisi de TBARS miktarının belirlenmesidir. Kobalt stresıyla birlikte mısır yaprak kloroplastlarında %69 oranında TBARS miktarında artış izlenmiştir. Yaprak hücre zarlarında stresle birlikte gelişen oksidasyon fuleren uygulamasıyla azaltılmıştır. TBARS'daki en düşük düzeyler sadece stres grubuna göre kıyaslandığında S+F2 grubunda gösterilmiştir. Diğer yandan H₂O₂ miktarında olduğu gibi, fuleren uygulanan mısır yapraklarında TBARS düzeyleri kontrol grubundakilerle benzerdir.

Kobalt stresi uyguladığımız mısır yapraklarındaki TBARS miktarındaki artışlarını, strese bağlı olarak oluşan ve ortadan kaldırılamayan radikallerin

membranlardaki ve hücre için önemli bileşenler üzerindeki olumsuz etkilerine bağlayabiliriz. Bu etki birçok çalışmada kobalt stres altında rapor edilmiştir (Zeid ve ark., 2013). Stresle birlikte fuleren uygulandığı takdirde lipid peroksidasyon düzeyleri (TBARS miktarı) fulerenin miktarından bağımsız olarak süpürülmüştür. Bu iyileşmede stresle oluşan ROS'ların ortadan kaldırılması da etkilidir. S+F gruplarında antioksidan sistemin devreye girmesi sonucunda, H_2O_2 miktarında azalmalar ile TBARS miktarındaki düşüşler birbirine paraleldir. Benzer sonuçlar, farklı çalışmalarla da gösterilmiştir. Xiong ve ark., (2018) tarafından yayınlanan raporda, su stresinin lipid peroksidasyonu üzerindeki artışları fullerol uygulaması ile elime edildiği sunulmuştur.

3.6. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının prolin miktarı üzerine etkisi

Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının osmoregülasyon üzerine etkisini belirleyebilmek için uygulama gruplarında prolin miktarı analiz edilmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. 300 μ M kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L⁻¹) uygulamasının kloroplastik prolin miktarı üzerine etkisi

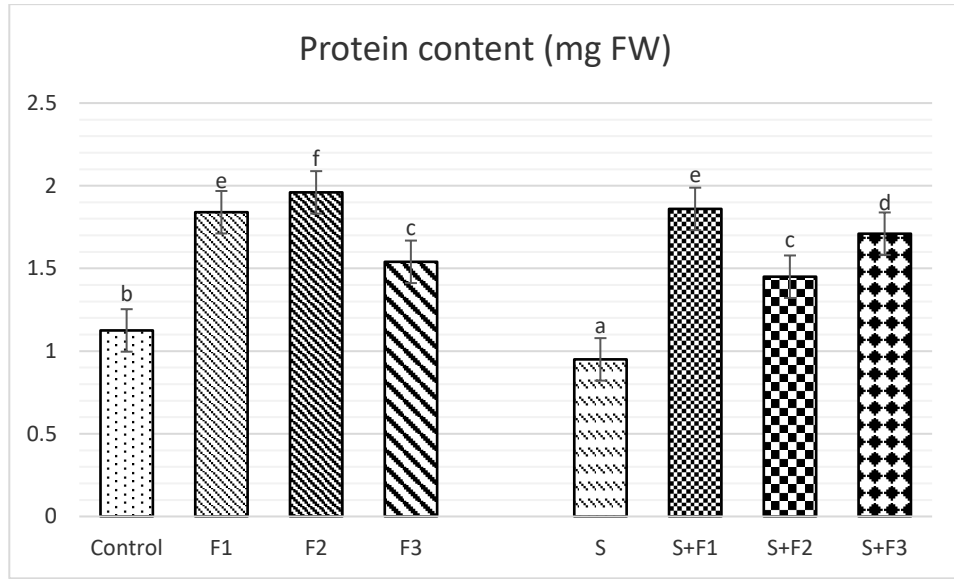
Kobalt stresi yapraklarındaki prolin miktarında önemli düzeyde artışa neden olmuştur. Bu değişimin oranı 1.8 katlık bir artıştır. İlginç olarak fuleren uygulama miktarına bağlı olarak prolin miktarında farklı sonuçlar izlenmiştir. En düşük dozdaki

fuleren miktarı (100 mg L^{-1}), prolin içeriğini önemli düzeyde artırırken (1,2 kat), diğer fuleren konsantrasyonları (F2 ve F3) ise prolin birikiminde strese göre artış sağlayamamıştır. Ancak fuleren, stressiz koşullarda uygulandığında (fulerenin tüm uygulama gruplarında) prolin miktarında artışa neden olmuştur. En yüksek artış F1 grubunda 1.8'lik artışla izlenmiştir.

Bitkilerde osmoregülasyon olarak adlandırılan bir olgu, sınırlı olan ortamlarda bitkilerin su almasına yardımcıdır. Osmoregülasyon olayında görev alan bileşiklerden bazıları çözünebilen şekerler, glisin betain, poliaminler ve prolindir (Suprasanna ve ark., 2016). Prolin sitoplazmadaki osmotik potansiyeli düşürmekte, olumlu yönde membran kararlılığını sağlamakta ve radikal süpürmede rol oynamaktadır (Abd-Allah ve ark., 2019). Ağır metal stresi olduğu durumlarda toprakta osmotik potansiyel, kökte hücrelerin potansiyelinden daha düşük düzeye iner. Bu şartlar altında bitkilerce suyun alınıp oranları ciddi şekilde sınırlanır. Bu ifade sonuçlarımızdaki yaprak RWC değerleriyle de uyumludur. Prolin birikimiyle hücrelerde ozmotik basıncı artırılır ve su alınma kolaylaşır. Çalışmamızda stres altında Pro miktarı azaldığı halde, başka çalışmalarda bunun tersine stres uygulamasıyla artan Pro miktarı izlenmiştir (Abd-Allah ve ark., 2019). Mısır yapraklarında kobalt uygulamasında azalan Pro miktarı, bu grupta gözlediğimiz düşük RWC değerleriyle de uyumludur. Diğer yandan fuleren uygulaması stres altında Pro miktarı açısından olumlu sonuçlar oluşturmuştur. Buna paralel bir data Chahardoli ve ark., (2022) tarafından *Nigella arvensis* bitkisine titanyum dioksit nanopartikülleri uygulaması sonucunda izlenen prolin artışında gösterilmiştir. Çalışmamızda, bu etki uyguladığımız fuleren konsantrasyonuna bağlı olarak en düşük dozda (100 mg L^{-1} fuleren) izlenmiştir. Diğer gruplarda (F2 ve F3), prolin miktarında artışın olmamasına karşın, bu gruplarda su içeriği, büyüme ve radikal süpürmede olumlu sonuçlar alınmasını, Pro dışında farklı ozmotik düzenleyicilerin sentezlendiği şeklinde yorumlayabiliriz.

3.7. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının protein miktarı üzerine etkisi

Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının protein miktarı üzerine etkisi incelenmiş ve deneme sonucunda elde edilen verilen Şekil 3.11'de verilmiştir.



Şekil 3.11. 300 μ M kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L^{-1}) uygulamasının kloroplastik protein miktarı üzerine etkisi

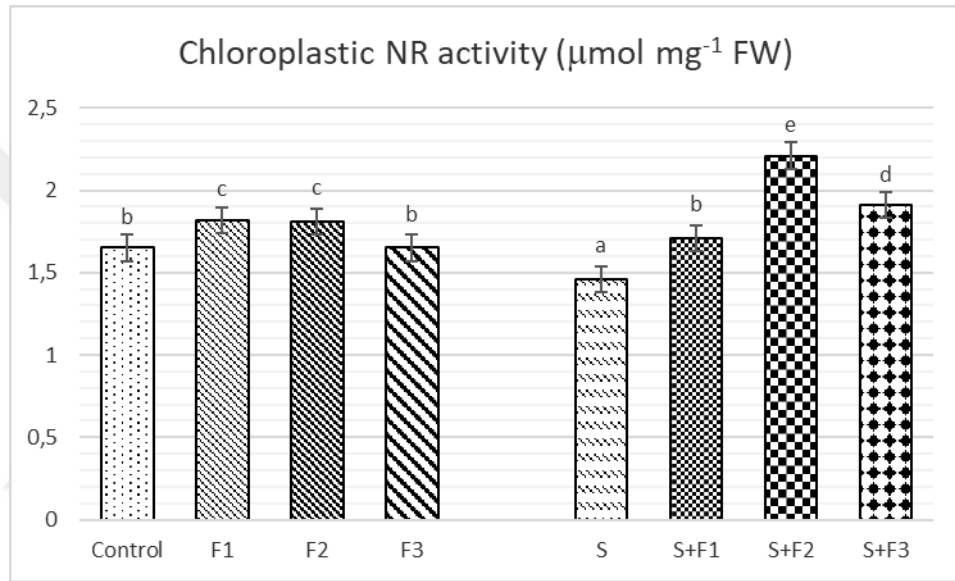
Kobalt stresi beklendiği gibi protein miktarında azalmaya neden olurken, fuleren uygulaması stres altında protein miktarını artırmıştır. Bu artışın oranı stres grubuyla karşılaştırıldığında düşük dozdaki fuleren konsantrasyonun protein miktarını daha fazla oranda arttırdığı gözlenmiştir. Fuleren stres olmadan uygulandığında ise mısır yapraklarında protein miktarını aynı şekilde artırmıştır.

Kobalt stresine maruz kalan mısır yapraklarında izlediğimiz protein miktarındaki azalmalar analizlerini tamamladığımız azot metabolizmasındaki sınırlamalar ile paralellik göstermektedir. Kobalt stresi mısırdaki protein sentez basamaklarında azalmalara ve protein yıkımında yer alan enzimlerin uyarılmasında rol almış olabilir. Benzer şekilde Al-Aghabary ve ark., (2005) tarafından tuz stresi altında yetiştirilen domates bitkilerinde azalan protein miktarı rapor edilmiştir. Ancak fuleren uygulaması kobalt stresinin neden olduğu protein miktarındaki azalmaları önlemiş ve değerleri kontrol düzeylerinin de üstüne yükseltebilmiştir. Bu, büyümede (RGR) izlediğimiz sonuçlarla da paralellik göstermektedir.

3.8. Azot metabolizmasına ait enzim aktiviteleri

3.8.1. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının nitrat redüktaz aktivitesi üzerine etkisi

Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının azot metabolizmasında yer alan enzim aktivite değişimleri üzerine etkisini belirleyebilmek için uygulama gruplarında nitrat redüktaz aktivitesi analiz edilmiştir (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. 300 μM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L^{-1}) uygulamasının kloroplastik NR aktivitesi üzerine etkisi

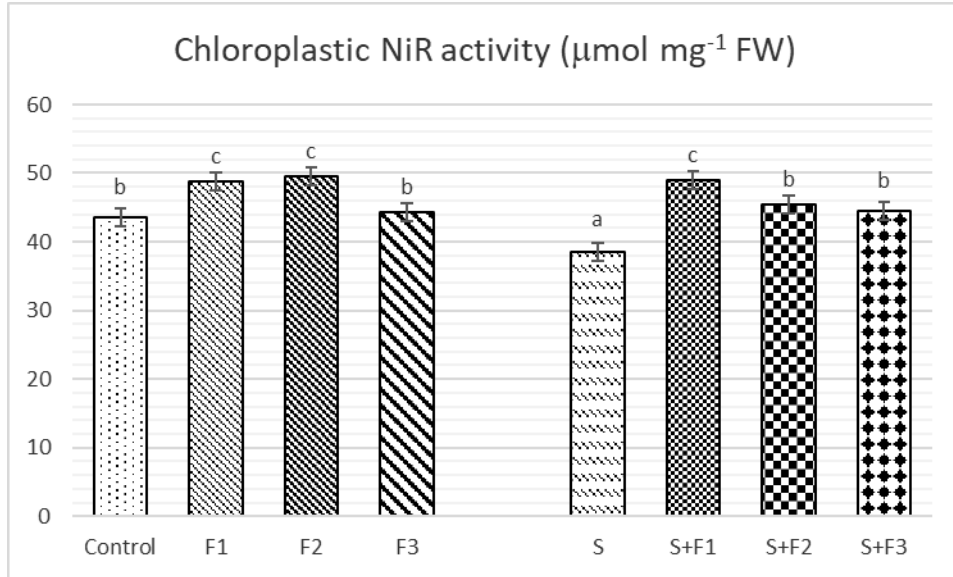
Nitrat redüktaz aktivitesi kobalt stresi altında mısır yapraklarında azalmıştır. Bu azalma stres altında fuleren uygulamalarıyla önlenmiştir. Stres ile birlikte aynı zamanda uygulanan F2 (S+F2) en yüksek NR aktivitesine neden olmuştur. Aynı şekilde fuleren kontrol koşulları altında mısır yapraklarında nitrat redüktaz aktivitesindeki artışı sadece F1 ve F2 uygulamalarında sağlamıştır. Bu artış, F3 grubunda izlenmemiştir.

Azot metabolizması bitkilerde stres altında kontrol edilmesi gereken bir mekanizmadır. Bu metabolizma ile dışarıdan alınan uygun formdaki azotun (nitrat ya da amonyum) bazı enzimlerin vasıtasıyla hücre içinde aminoasitlere kadar dönüşümü söz konusudur (Chen ve ark., 2017). Nitrat redüktaz (NR) enzimi taşıyıcılar vasıtasıyla alınan nitratin nitrite dönüşümünü katalizlemektedir. Çalışmamızdaki NR aktivitesindeki

azalmanın nedeni, NR enziminin substratı olan nitrat alınımındaki azalmalar (yayınlanmamış bilgi) ya da NR enzimin kobalt stresine bağlı aktivitesindeki bozulmalar olabilir. Diğer çalışmalarda stres altında nitrat alınımında ve taşınımında azalmalar rapor edilmiştir (Wang ve ark., 2018). Fuleren uygulamasıyla mısır yapraklarında NR aktivitesinde, strese göre artış izlenmiştir. Aynı şekilde fuleren nitrat miktarında artış sağladyorsa artan NR aktivitesiyle nitratin nitrit haline dönüşümünü uyarmıştır. Bu durumda bu enzim aktivitesi sonucunda oluşan nitritin ortamda biriktiği söylenebilir. Bu nitrit artışıyla birlikte, bu molekülün NiR enzimi tarafından katalizlenmesi sağlanabilmiştir. Çinko oksit veya silikon oksit nanopartiküllerine stresle birlikte maruz kalan bitkilerde NR aktivitesi artmıştır (Elsakhawy ve ark., 2018).

3.8.2. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının nitrit redüktaz aktivitesi üzerine etkisi

Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının azot metabolizmasında yer alan enzim aktivite değişimleri üzerine etkisini belirleyebilmek için uygulama gruplarında nitrit redüktaz aktivitesi analiz edilmiştir (Şekil 3.13).



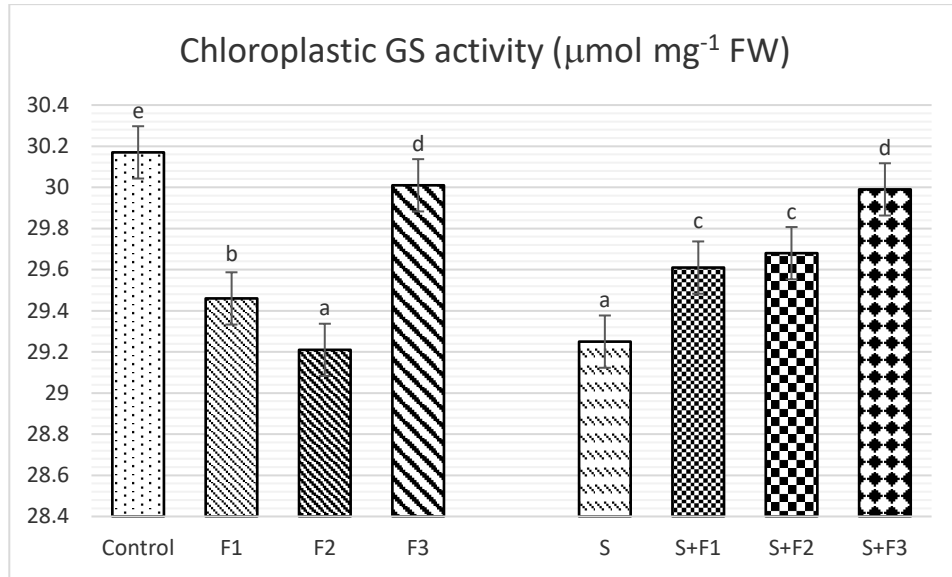
Şekil 3.13. 300 μ M kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L^{-1}) uygulamasının kloroplastik NiR aktivitesi üzerine etkisi

NR aktivitesinde oluşturduğu etkiye benzer olarak kobalt stresi nitrit redüktaz aktivitesini azaltmıştır. Strese maruz kalan mısır bitkilerine fuleren eklendiği takdirde nitrit redüktaz (NiR) aktivitesi artmıştır. Bu değişim, stres uygulanmayan bitkilere fuleren uygulamasında da sadece F1 ve F2 uygulama gruplarında devam ettirilmiştir.

Çalışmamızda kobalt stresi altında azalan NR aktivitesiyle ortamda nitrit artışının sağlanamamasına neden olmuş ve devamında NiR aktivitesinin azalması nedeniyle de azot metabolizması etkin olarak işlememiştir. NiR, nitritten amonyum dönüşümünü sağlar ve oluşan amonyum da yine enzimlerin katalizlemesiyle aminoasitlere kadar dönüşür (Jiang ve ark., 2017). Çalışmamızda kobalt stresi, azot fiksasyonu sürecini bozmuştur. Bu durum hücrelerdeki aminoasit metabolizmasında azalmaları uyarmış olabilir. Azot metabolizması ve azotun aminoasit yapısına katılması hücrelerde büyüme ile ilişkili olarak değerlendirildiğinde, stres altında izlenen RGR değerlerindeki düşüşler de açıklanabilir. Diğer yandan, bitkiler için önemli olan nitrat-nitrit dönüşümü, stres altında mısır yapraklarında fuleren uygulamasıyla korunmuştur. Çünkü fuleren kobalt stresine karşı hem NR hem de NiR enzim aktivitelerinin artışını sağlayabilmiştir. Bu sonuç S+F gruplarında izlediğimiz artan protein analizi değerlerimizi de desteklemektedir.

3.8.3. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının glutamin sentetaz aktivitesi üzerine etkisi

Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının azot metabolizmasında yer alan enzim aktivite değişimleri üzerine etkisini belirleyebilmek için uygulama gruplarında glutamin sentetaz (GS) aktivitesi analiz edilmiştir (Şekil 3.14).



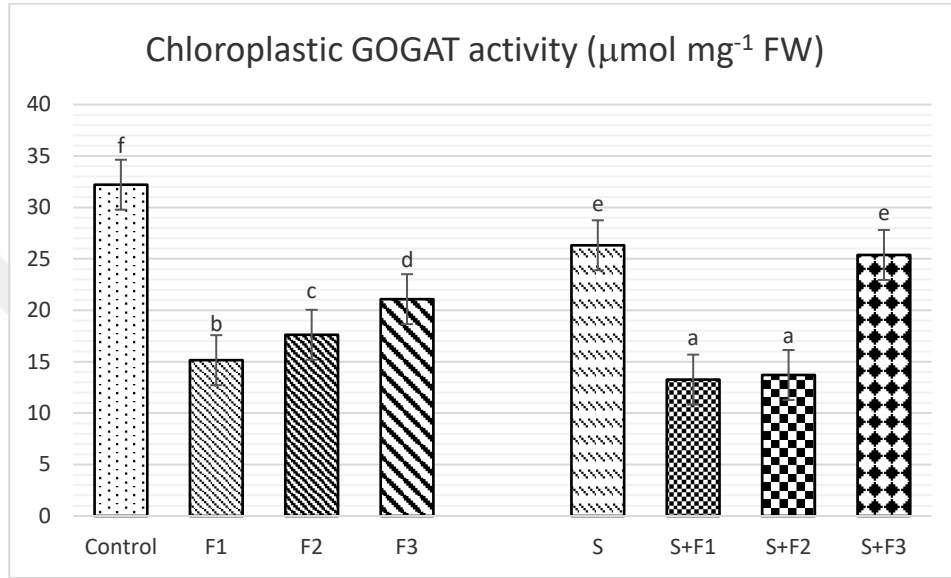
Şekil 3.14. 300 μM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L^{-1}) uygulamasının kloroplastik GS aktivitesi üzerine etkisi

Kobalt stresi GS aktivitesinde azalmaya neden olmuş ve bu azalmanın oranı %3 olarak hesaplanmıştır. Stresle birlikte uygulaması yapılan fuleren nanopartikülü, GS aktivitesinde bir artışa neden olmuştur. Ancak bu durum kontrol koşullarına göre stressiz ortamda uygulanan fuleren gruplarında izlenmemiştir. Bu uygulamada en düşük GS aktivitesi F2 grubunda gösterilmiştir.

NiR aktivitesiyle oluşan amonyum, proton oluşturabilen bir süreç olup pH dengesinin korunmasında rol oynar (Jiang ve ark., 2017). Amonyum doğrudan glutamin ve glutamik asit gibi aminoasitlerin yapısına katılabilir ancak bu dönüşüm glutamin sentetaz (GS) ve glutamat sentaz (GOGAT) aktivitesiyle sağlanır (Lopez-Delacalle ve ark., 2020). Amonyumun toksik özelliği nedeniyle ortamdaki uzaklaştırılması için yapılan bu dönüşüme ayrıca glutamat dehidrogenaz (GDH) enziminin aminasyon ve deaminasyon aktiviteleri de katkıda bulunabilir. Stres altında bu reaksiyonlardaki sınırlamalar, hücrede kloroplastlarda yüksek enerjili elektronların birikimine neden olabilir (Araujo ve ark., 2014). Çalışmamızda GS aktivitesinde artış izlenmediğinden dolayı amonyum toksik miktarları ortamdaki kaldırılamamıştır. Diğer yandan, fuleren uygulamasında amonyumun toksik etkilerini ortadan kaldıran GS-GOGAT yolundaki GS aktivitesi etkin olarak rol almıştır. Bu olguyu S+F3 gruplarında gözlediğimiz en yüksek GS aktivitesiyle net olarak söylemek mümkündür.

3.8.4. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının glutamat sentaz aktivitesi üzerine etkisi

Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının azot metabolizmasında yer alan enzim aktivite değişimleri üzerine etkisini belirleyebilmek için uygulama gruplarında glutamat sentaz (GOGAT) aktivitesi analiz edilmiştir (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. 300 μM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L⁻¹) uygulamasının kloroplastik GOGAT aktivitesi üzerine etkisi

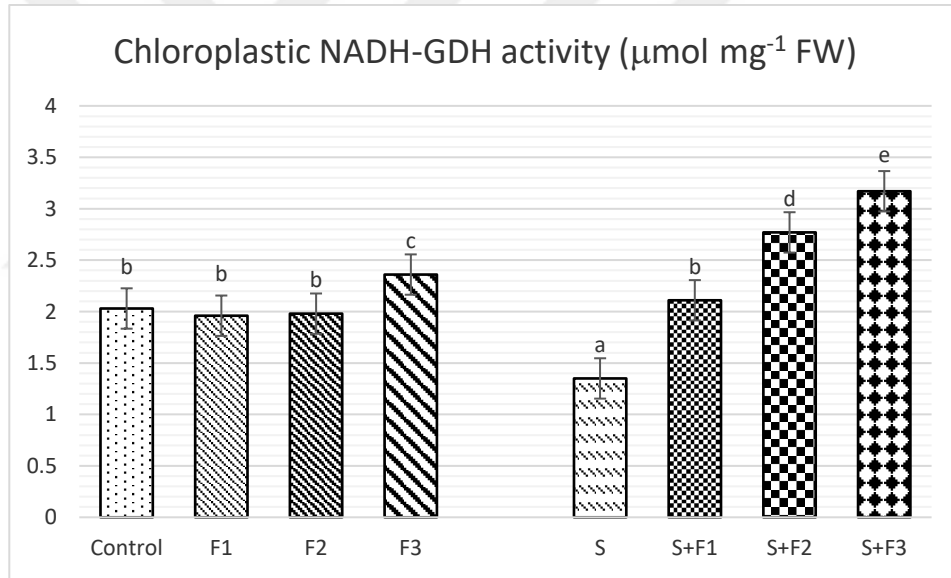
Mısır yapraklarına uygulanan kobalt stresi glutamat sentaz aktivitesinde herhangi bir artışa neden olmamıştır. Benzer olarak, fuleren stres ile birlikte uygulandığında, sadece stres grubuna göre GOGAT aktivitesi (S+F3 dışında) önemli düzeyde azalmıştır. Bu gözlenen azalma stres olmadan uygulanan fulerenin tüm dozlarında da izlenmiştir.

Amonyum toksisitesini GS aktivitesiyle birlikte çalışarak ortadan kaldıran GOGAT enziminde hem stres hem de S+F gruplarında gözlediğimiz azalmalar ya da değişmeyen aktivite sonucunda GS-GOGAT yolunun mısır yapraklarında kısmen etkili olduğunu söyleyebiliriz. Daha öncede açıklandığı gibi NiR aktivitesiyle oluşan toksik amonyum düzeyleri GS ile etkili olarak ortadan kaldırılmıştır. S+F gruplarında, GS'deki artışın nedeni, stresle uyarılan enzimdeki bozulan aktivitenin iyileştirilmesi ya da glutamatın ortamda tekrardan yenilenmesi olarak söylenebilir. Ancak GS-GOGAT yolunun bir bileşeni olan GOGAT yüksek aktivitesinin sağlanamamasından dolayı kısmen amonyum toksitesi ortadan kaldırılmaya çalışılmıştır. Bu toksitenin ortadan

kaldırılmasında bu yolak tek başına çalışmayıp GDH sistemi de etkin olarak rol alabilmektedir. Bu analizler ışığında fulerenin kobalt stresine maruz kalan mısır yapraklarında inorganik azot ve organik azot dönüşümlerini etkili olarak yönettiğini düşünebiliriz.

3.8.5. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının glutamat dehidrogenaz-aminasyon aktivitesi üzerine etkisi

Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının azot metabolizmasında yer alan enzim aktivite değişimleri üzerine etkisini belirleyebilmek için uygulama gruplarında glutamat dehidrogenaz (GDH-aminasyon) aktivitesi analiz edilmiştir (Şekil 3.16).



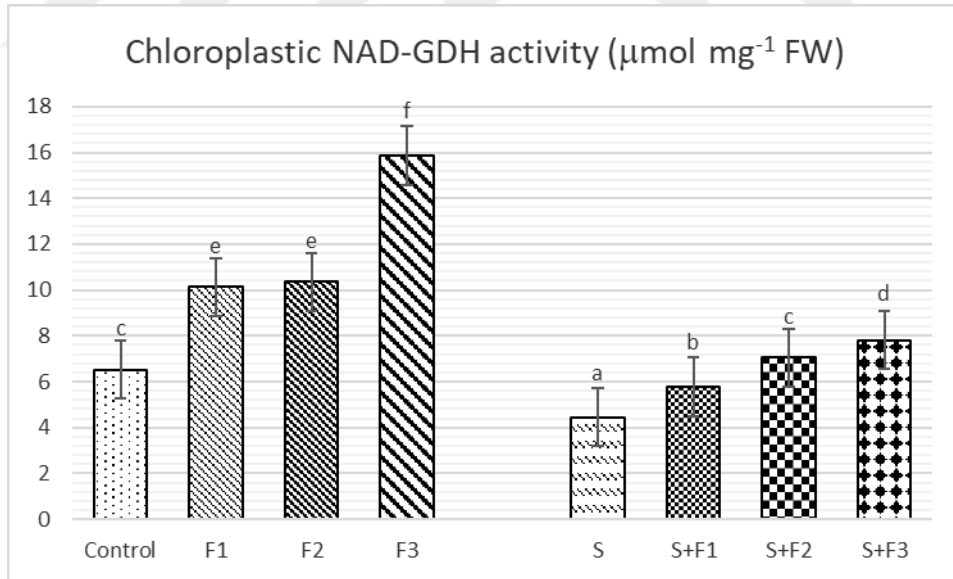
Şekil 3.16. 300 μM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L⁻¹) uygulamasının kloroplastik NADH-GDH aktivitesi üzerine etkisi

GDH'nin aminasyon aktivitesinde, kobalt stresi altında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında azalma izlenmiştir. Bu değişim stres altında fuleren uygulamalarıyla tersine çevrilmiş olup, NADH-GDH aktivitesi stres ve fuleren birlikte uygulanan grupların tümünde artmıştır. En yüksek NADH-GDH aktivitesi de S+F3 grubunda gözlenmiştir. Sadece fuleren uygulamasında F1 ve F2 grupları, NADH-GDH aktivitesinde herhangi bir değişime neden olmazken, en yüksek fuleren uygulamasıyla (F3) NADH-GDH aktivitesinde artış sağlanmıştır.

Amonyumu aminoasitlere dönüştüren GDH, kobalt stresi altında mısır yapraklarında aktivite göstermeyip amonyumun toksik etkilerinin daha da fazla olmasına neden olmuştur. Diğer yandan, bu toksiteyi ortadan kaldıran GS-GOGAT yolunun stres altında fuleren gruplarında kısmen çalışmasına rağmen (sadece GS artışıyla), GDH enziminin hem aminasyon hem de deaminasyon aktivitelerinin artışı nedeniyle amonyum aminoasitlere dönüşmüş ve stresin toksitesi fuleren ile aracılı olarak azaltılabilmektedir. Artan GDH aktivitesi, sitrik asit döngüsüne aracı ürün sağlamada ve aminoasit metabolizmasında pozitif olarak etkili olduğu bilinmektedir (Nunes-Nesi ve ark., 2013).

3.8.6. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının glutamat dehidrogenaz-deaminasyon aktivitesi üzerine etkisi

Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının azot metabolizmasında yer alan enzim aktivite değişimleri üzerine etkisini belirleyebilmek için uygulama gruplarında glutamat dehidrogenaz (GDH-deaminasyon) aktivitesi analiz edilmiştir (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. 300 μM kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L^{-1}) uygulamasının kloroplastik NAD-GDH aktivitesi üzerine etkisi

Mısır yapraklarına kobalt stresi uygulandığı zaman NAD-GDH aktivitesi azalmıştır. Ancak fuleren bu azalmayı ortadan kaldırmış ve tüm fuleren uygulama

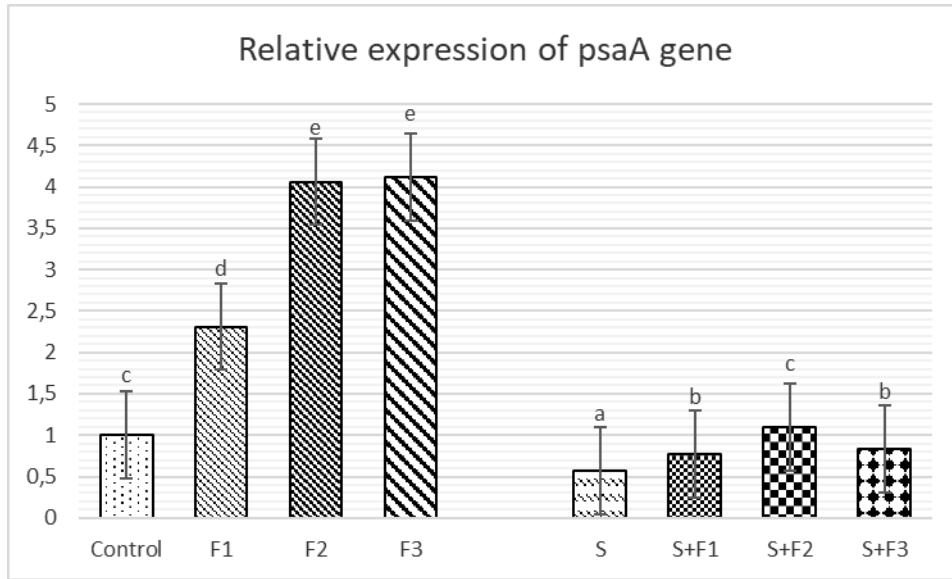
miktarında NAD-GDH aktivitesinde artışa neden olmuştur. Aynı şekilde bu aktivitedeki artış kontrole göre sadece fuleren uygulanan gruplarda da izlenmiş ve bu aktivite en yüksek konsantrasyonda uygulanan fuleren grubunda (F3) maksimum düzeye ulaşmıştır.

NAD'a bağlı olarak aktivite gösteren NAD-GDH, glutamatın deaminasyonunu katalizler ve bu etkide glutamat havuzunun yenilenmesini sağlar (Tercé-Laforgue ve ark., 2015). NAD-GDH ve NADH-GDH aktiviteleri oksijenli solunumda hayati rol alan sitrik asit döngüsüne 2-okzoglutaratın sağlanmasına aracılık eder. Glutamat bileşeni, polipeptit, protein ya da prolin, histidin ve arjinin gibi organik moleküllerin sentezinde prekürsör olarak yer alır. Bu moleküller strese cevap mekanizmasında ve karbon-azot durumunda önemli katkılar sağlamaktadır. Ayrıca glutamat, kalsiyum ve ROS'larla etkileşim gösterdiği için yeni bir sinyal molekülü olarak düşünülmektedir. Bu anlamda fulerenin kobalt stresi altında mısır yapraklarındaki kloroplastlarda sinyal mekanizmasını uyararak da korunmayı sağlamış olabileceğini söyleyebiliriz.

3.9. Fotosistemlerle ilişkili bazı proteinleri kodlayan genlerin ekspresyon değişimleri

3.9.1. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının psaA gen ekspresyonu üzerine etkisi

Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının PSI ile ilişkili fotosentetik proteinlerin değişimleri üzerine etkisini belirleyebilmek için uygulama gruplarında psaA geninin transkript düzeyinde gen ekspresyon analizleri yapılmıştır (Şekil 3.18).

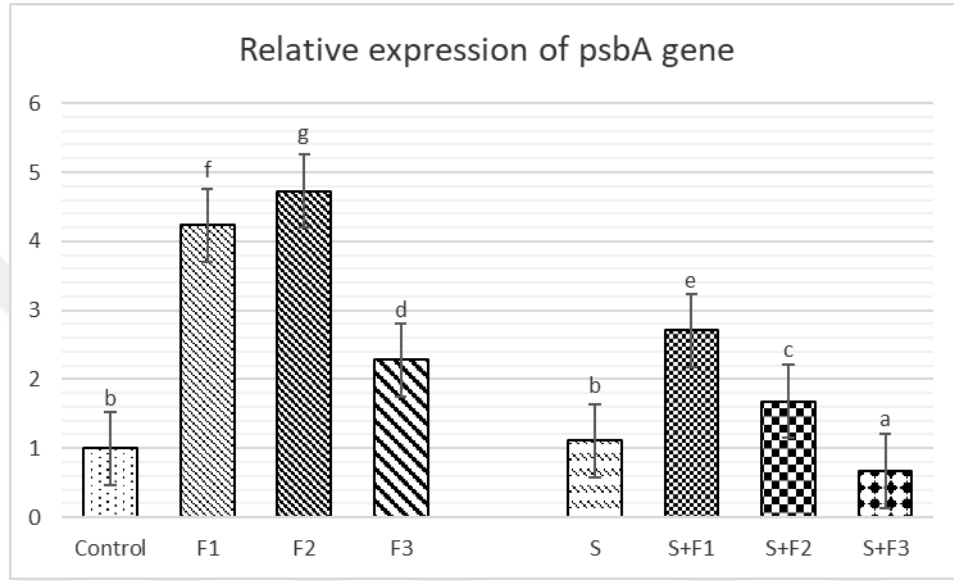


Şekil 3.18. 300 μ M kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L⁻¹) uygulamasının psaA gen ekspresyonu üzerine etkisi

Mısır yapraklarında kobalt stresi altında PSI sistemindeki reaksiyon merkezi proteinlerini kodlayan psaA genlerin ekspresyon düzeyleri azalma göstermiştir. Ekspresyon analizleri stres altında fuleren uygulamalarının tüm konsantrasyonlarında psaA geninin transkriptlerinde artışa neden olmuştur. Bu artış fulerenin stressiz ortamlarda uygulanan gruplarında daha belirgindir. Bu genin ekspresyonundaki en yüksek artışlar F2 ve F3 gruplarında izlenmiştir. PSI sistemindeki P700 klorofil A apoprotein A1'i kodlayan psaA geni stres koşullarında hassasiyet göstermektedir (Ooi ve ark., 2016). Bu genin ekspresyonundaki stresle gözlenen azalma mısır kloroplastlarının fotosentezinde ciddi olarak negatif etkilenmeye işaret etmektedir. Kobalt stresine bağlı fotosentezdeki bu azalma büyümedeki (RGR) azalmalarla da paraleldir. Ancak fuleren uygulaması, stresin uyardığı PSI'deki bu olumsuz durumu tersine çevirip stresle tetiklenen PSI-aracılı ROS birikimini de azaltmaktadır. Bu etkiyi oluştururken, fuleren PSI'in elektron kabul etme kabiliyetini iyileştirerek yapabilmektedir. Böylece fotosentetik aparatları kobalt toksisitesinden korumuş olmaktadır. Benzer olarak Tombuloglu ve ark., (2020) tarafından magnetit nanopartiküllerinin arpada psaA genlerini upregüle ettiği raporlanmıştır.

3.9.2. Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının psbA gen ekspresyonu üzerine etkisi

Kobalt stresi altındaki mısırdaki fuleren uygulamasının PSII ile ilişkili fotosentetik proteinlerin değişimleri üzerine etkisini belirleyebilmek için uygulama gruplarında psbA geninin transkript düzeyinde gen ekspresyon analizleri yapılmıştır (Şekil 3.19).



Şekil 3.19. 300 μ M kobalt toksisitesine maruz kalan mısır yapraklarında fuleren (FLN, 100-250-500 mg L⁻¹) uygulamasının psbA gen ekspresyonu üzerine etkisi

Mısır yapraklarında PSII sistemindeki D1 proteinlerini kodlayan psbA genlerinin mRNA transkriptlerinde, kobalt stresi altında kontrole göre herhangi bir değişim göstermemiştir. Ancak strese maruz kalan mısır yapraklarında F1 ve F2 uygulamalarında (S+F1 ve S+F2) psbA genlerinin ekspresyonlarında artışa neden olmuştur. Bu gen ifadesindeki artışlar, S+F3 grubunda izlenmemiştir, hatta önemli düzeyde azalma saptanmıştır. Stres uygulanmayan mısır bitkilerinde fuleren, psbA genlerinin kısmi ekspresyonlarında artışa neden olmuştur.

Stres PSI sistemi yanı sıra PSII sisteminde de hasarlar oluşturabilir (Ooi ve ark., 2016). Çalışmamızda kobalt stresi psbA geninin ekspresyon düzeyinde herhangi bir değişim oluşturmamıştır. Ancak fuleren uygulamalarında (F1 ve F2) bu gen ifadesinde artışlar izlenmiştir. Bu sonucu fulerenin stres altında PSII sistem üzerinde koruma sağlayabildiği şeklinde yorumlayabiliriz. Daha önceki bilgiler fonksiyonlanmış (değiştirilmiş) nanopartiküllerin kloroplast genleri üzerinde çeşitli düzenlemeler

yapabildiğini ortaya koymaktadır (Pagano ve ark., 2018). Fotosistemde yer alan D1 ve D2 proteinleri stres altında hasarlanma gösterebilir, aktivitesini kaybedebilir ya da gen düzeyinde oluşan bozulmalarla biyosentezinde aksamalar oluşabilir. Ancak fuleren PSII üzerindeki korumayı proteinlerin biyosentez yollarını iyileştirerek yapmış olabilir. F1 ve F2 uygulamalarında bu gen ifadesinde artışın sağlanmasına rağmen, S+F3 grubunda artışın sağlanmaması bize bu grupta bu sistem ile ilişkili proteinlerin sentezinden sorumlu psbB, psbC, psbD ve psbE genlerinin de rol aldığını gösterebilir. Bu bilgi Tam ve ark., (2019) tarafından da teyit edilmiştir. Çalışmamızda, bu grupta (S+F3) büyüme, su içeriği, azot metabolizması ve antioksidan sistem açısından iyileşme de görülmektedir.



4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

4.1 Sonuçlar

Kobalt bitkiler için temel elementlerden birisidir. Ancak yüksek miktarlarda ortamda biriktiği takdirde bitkiler için toksik etkiler oluşturabilmektedir. Hücresel bölmeler önemli işlevlere sahip kloroplast organeli üzerinde de kobalt toksisitesinin etkileri mevcuttur. Bu nedenle kloroplast organelinde bu strese karşı çalışan bileşenlerin aktiviteleri incelenmiştir. Kobalt stresinin mısır bitkilerinde büyüme ve su içeriğinde olumsuz etkilere neden olduğu söylenebilir. Bu stresin kök hücrelerinde besleyici olan elementlerin alınımını, bölünme indekslerini ya da su kanallarını olumsuz etkilemiş olabilir. Fakat bu olumsuz durum, fuleren uygulamalarıyla ortadan kaldırılmıştır. Gen ekspresyon analizleri de dikkate alındığında, PSI ve PSII sisteminin kobalt stresinden etkilendiği ve sistemlerde dolaşan elektronun yüksek enerjili olarak oksijeni indirgemesi sonucunda radikal birikimi uyarılmıştır. Tezimizde ROS türleri arasında sayılan H_2O_2 miktarının stres altında artış gösterdiği bulunmuştur. Bu H_2O_2 'nin kaynağı temel olarak SOD aktivitesi yoluyla. Ancak farklı bir enzimatik yollarla da H_2O_2 oluşturulabilmektedir. Stres uygulanan mısır yapraklarında artan SOD aktivitesiyle birlikte H_2O_2 miktarı artış göstermiştir. Stresle artan H_2O_2 miktarı sadece POX aktivitesiyle (CAT, APX ve GR aktivitelerinde artış izlenmemiştir) süpürülmeye çalışılmış ancak mısır kloroplastlarında bu enzim başarılı olamamıştır. Organel zarları üzerindeki lipidlerde peroksidasyon (TBARS) ve oksidasyon olaylarının tetiklendiği düşünülebilir. Bu durumdan dolayı kloroplastların kobalt stresinden olumsuz yönde etkilendiğini söyleyebiliriz. Diğer yandan kloroplast organeli içinde aminoasit sentezi önemli bir dönüşümdür. Bu sentez basamakları nitrat alınımı ve nitratin nitrite dönüşümüyle başlar. Bu dönüşümde NR aktivitesi rol alır. Nitritten amonyak oluşumu da NiR enzimiyle katalizlenir. Hem NR hem de NiR aktivitelerinin azalması sonucunda aminoasit sentez basamakları uyarılamamaktadır. GS, GOGAT ve GDH enzimlerindeki azalmalarla da amonyak toksisitesi ortadan kaldırılamamaktadır.

Nanopartiküllerin uygulaması üzerine çalışmalar iki yönlü olarak değerlendirilmektedir. Bir yönü uygulama dozuna bağlı olarak toksisite oluşturmaları, diğer yönü de toleransta etkili sinyal yollarıyla birlikte çalışıp bitki için uygun cevapları uyarabilmesidir. Bu cevaplar uygulama konsantrasyonlarına ek olarak uygulama süresi, bitkinin gelişme dönemi ve bitki türüne göre değişmektedir. Elde ettiğimiz veriler

değerlendirildiğinde fuleren kobalt stresine karşı fotosentetik birimleri koruyabilmektedir. Özellikle F1 ve F2 konsantrasyonları kobalt stresıyla birlikte uygulandığında PSI ve PSII ile ilişkili proteinlerin genlerin ekspresyonları (psaA ve psbA) artmıştır. Ancak en yüksek F konsantrasyonu (F3) özellikle PSII ile bağlantılı proteinlerin ekspresyonunu (psbA) azaltmıştır. Bu grupta (S+F3) bu proteinlerin ekspresyonu azalmasına rağmen büyüme ve koruma herhangi bir eksiklik olmaması nedeniyle bu proteinin sentezinden sorumlu diğer genlerin ekspresyonlarının arttığını düşünebiliriz. Çalışmamızda stresin belirteci olan TBARS düzeyleri, sadece fuleren ve fuleren+stres uygulama gruplarında herhangi bir artışa neden olmamıştır. Bu durum mısır bitkilerine uyguladığımız fuleren miktarlarının kloroplastları üzerine herhangi bir toksisite oluşturmamıştır. Radikalleri ortadan kaldıran SOD, CAT, APX ve GR aktiviteleri fuleren uygulamasıyla birlikte önemli artışlarla strese karşı koruma sağlamıştır. Bu korumada fulerenin farklı konsantrasyonları farklı cevaplar oluşturmuştur. Tüm fuleren miktarı, stres altında CAT aktivitesini artırırken, F1 ve F2 fuleren uygulama konsantrasyonları AsA-GSH döngüsü içinde yer alan APX ve GR enzim aktivitelerini artırmıştır. Bu fuleren konsantrasyonlarının kobalt stresine karşı korumada askorbat ve glutatyon havuzlarını yenilebildiği söylenebilir. Stresin uyardığı amonyum toksisitesinin azaltılmasında hem GS-GOGAT yolunun özellikle GS aktiviteleri kullanıldığı hem de GDH aktivitelerinin etkili olduğu düşünülebilir.

Stresin olumsuz varlığına rağmen azot metabolizmasının devamlılığı bitki için önemlidir. Azot bitkilerde uygun süreçlerle asimile edildikten sonra hücre için önemli olan genetik materyal, aminoasit ya da enerji molekülü olarak kullanılan bileşiklerin yapısına katılmaktadır. Azot fiksasyonunda bitkiler tarafından alınma formları nitrat ya da amonyum şeklinde olmaktadır. Nitrat özel taşıyıcılar tarafından hücreye alındıktan sonra nitrat redüktaz (NR) enziminin katalizlemesiyle nitrit formuna dönüşmektedir. Nitrit, diğer bir enzim olan nitrit redüktaz (NiR) yoluyla amonyumu oluşturur. Glutamin sentetaz (GS) enzimi aracılığıyla ve reaksiyona glutamatın da katılmasıyla amonyum glutamine dönüştürülür. Glutamin de asparajin sentetaz enzimiyle asparajine dönüşür. Glutamattan glutamin dönüşümünün olduğu bu reaksiyonun devamlılığı açısından, glutamat sentaz (GOGAT) enzimi yeniden glutamatın oluşturulmasını sağlar. Bu nedenle GS ve GOGAT enzimleri, amonyumun farklı aminoasitlere dönüşümünü tetikleyerek hücrelerde uzaklaştırılmasını sağlayan bir sistemdir. Bu sistemin yanı sıra glutamat dehidrogenaz (GDH) enzimi de GOGAT enzimi için gerekli olan glutamattan 2-okzoglutarat dönüşümünü sağlayarak amonyumun uzaklaştırılmasına katkı sağlar.

Çalışmamızda kobalt stresi, NR enzimini artırarak nitrit oluşumunu sağlamış olabilir. Ancak mısır bitkilerinde NiR enziminde artış sağlanamadığı için amonyum üzerinden aminoasit oluşumları azalmış olabilir. Bu durum stres altındaki RGR değerlerinde izlediğimiz azalmaların nedeni olabilir. Ancak fuleren uygulaması kobalt stresi altındaki mısır bitkilerinde azot metabolizmasını olumlu yönde etkilemiştir. Fuleren ve stres uygulaması yapılan bitkilerde artan NR aktivitesiyle nitrat-nitrit dönüşümü sağlanmış, devamında NiR aktivitesinin artışıyla amonyum oluşumu ve aminoasitlere dönüşüm uyarılmıştır. İlginç olarak amonyumu sistemden uzaklaştıran GS-GOGAT döngüsünden (kısmi olarak) çok fuleren GDH enziminin hem aminasyon hem de deaminasyon aktivitelerini artırarak amonyum toksisitesinden bitkilerin kloroplastlarını korumuştur.

4.2 Öneriler

Yetiştirme ortamlarında uygun miktarlarda bulunduğu takdirde kobalt bitkiler için temel elementlerden birisidir. Ancak, kobalt yanlış tarımsal uygulamalar veya insan aktivitesi temelli olaylardan dolayı toksik olarak sayılan miktarlara ulaşabilmektedir. Bu konsantrasyonlarda bitkilerde ürün verimliliğine ve devamlılığına etki etmektedir. Başta kobalt olmak üzere stres koşullarına dayanıklı mısır gibi ülkemiz için ekonomik değeri yüksek olan tahılların yetiştirilmesi önemlidir. Ayrıca, savunma mekanizması yüksek olan bitkilerin araştırılması ve bu bitkilerin sahip olduğu moleküler yapının detaylandırılması ileriki çalışmaların konusu olmalıdır.

Fuleren uygulaması stres ortamı oluşturmadan yapılarak bitkiler üzerinde cevapları incelenmiştir. Ancak fulerenin kloroplast organelindeki süreçleri stres altından nasıl etkilediğine dair çalışmalar çok azdır. Bu durum tezimizin önemini oluşturmaktadır. Konsantrasyona bağlı olarak kobalt stresine verdiği cevaplar değişmektedir. Bu tez verileri bitkilerde organel bazında (kloroplast) fuleren ve stres savunma mekanizmaları arasındaki etkileşime önemli katkılar sağlayacaktır. Bu yöndeki çalışmaların devam ettirilip özellikle moleküler düzeydeki cevaplarının da ortaya konulması gerekmektedir. Özellikle fotosentetik birimlerin stres altında fuleren uygulamasıyla nasıl etkilendiği ve korunabildiği detaylandırılmalıdır. Bu tez konusuna ait yapılan analizlerin bir kısmı değerlendirilip uluslararası alanda önemli bir yere sahip dergide araştırma makalesi olarak yayınlanmıştır.

5. KAYNAKLAR

- Abd-Allah, E.F., Hashem, A., Alam, P., Ahmad, P., 2019, Silicon alleviates nickel-induced oxidative stress by regulating antioxidant defense and glyoxalase systems in mustard plants, *Journal of Plant Growth Regulation*, 38, 1260-1273.
- Ahammed, G.J., Li, X., Wan, H., Zhou, G., Cheng, Y. (2020) SIWRKY81 reduces drought tolerance by attenuating proline biosynthesis in tomato. *Scientia Horticulturae*, 270, 109444.
- Ahmadi, S.Z., Ghorbanpour, M., Aghaee, A., Hadian, J., 2020, Deciphering morpho-physiological and phytochemical attributes of *Tanacetum parthenium* L. plants exposed to C60 fullerene and salicylic acid, *Chemosphere*, 259, 127406.
- Akeel, A., Jahan, A., 2020, Role of cobalt in plants: its stress and alleviation, *Contaminants in Agriculture*, 339–357.
- Akhtar, M.J., Ahamed, M., Alhadlaq, H.A., Alshamsan, A., 2017. Mechanism of ROS scavenging and antioxidant signalling by redox metallic and fullerene nanomaterials: potential implications in ROS associated degenerative disorders. *Biochim. Biophys. Acta*. 1851, 802–813.
- Al-aghabary, K., Zhu, Z., Shi, Q., 2005, Influence of Silicon Supply on Chlorophyll Content, Chlorophyll Fluorescence, and Antioxidative Enzyme Activities in Tomato Plants Under Salt Stress, *Journal of Plant Nutrition*, 27(12), 2101-2115.
- Ali, S., Gill, R.A., Mwamba, T.M., Zhang, N., Lv, M.T., ul Hassan, Z., 2018, Differential cobalt-induced effects on plant growth, ultrastructural modifications, and antioxidative response among four *Brassica napus* (L.) cultivars. *International journal of Environmental Science and Technology*, 15(12), 2685-2700.
- Alscher, R.G., Ertürk, N. ve Heath, L.S., 2002. Role of Superoxide Dismutases (SODs) in Controlling Oxidative Stress in Plants, *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1331- 1341.
- Apel, K. ve Hirt, H., 2004. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress and Signal Transduction, *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.
- Araújo, J.E., Madeira, D., Vitorino, R., Repolho, T., Rosa, R., Diniz, M., 2018, Negative synergistic impacts of ocean warming and acidification on the survival and proteome of the commercial sea bream, *Sparus aurata*, *Journal of Sea Research* 139, 50-61.
- Arruda, S.C.C., Silva, A.L.D., Galazzi, R.M., Azevedo, R.A., Arruda, M.A.Z., 2015. Nanoparticles applied to plant science: a review. *Talanta* 131, 693–705.
- Asada, K., 1999. The Water–Water Cycle in Chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 601-39.

- Austin, R. B., Rossi, L. and Blaekwell, R. D. (1978) *Ann. Botany* 42, 429.
- Bakardjieva, N., and Christov, K., 1996. Effect of calcium and zinc ions on the sensitivity of peroxidase from mosses (*Mnium* sp.) and ferns (*Polydium vulgare*) to high temperature. *Can. J. Bot.*, (74), 1665-1670.
- Balcı H (2006). Akıllı (Fonksiyonel) Tekstiller, Seçilmiş Kumaşlarda Antibakteriyel Apre ve Performans Özellikleri. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Banerjee, A., Roychoudhury, A., 2022, Explicating the cross-talks between nanoparticles, signaling pathways and nutrient homeostasis during environmental stresses and xenobiotic toxicity for sustainable cultivation of cereals, *Chemosphere*, 286, Article 131827.
- Barro, F., Fontes, A., Maldonado, J., 1991, Organic nitrogen content and nitrate and nitrite reductase activities in tritordeum and wheat grown under nitrate or ammonium, *Plant and Soil* 135 (2), 251-256.
- Bates, L., Waldren, R., Teare, I., 1973, Rapid determination of free proline for water-stress studies, *Plant Soil*, 39, 205-207.
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971, Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Analítica Biochemistry*, 44, 276-287.
- Bergmeyer, H.U., 1970, *Methoden der enzymatischen Analyse*, 2, Verlag Chemie.
- Bohnert, H.J., Su, H. ve Shen, B., 1999. *Molecular Mechanisms of Salinity Tolerance, Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants*, Published by R.G. Landes Co., ISBN 157-059-563-1,170p.
- Bohnert, H.J., Su, H. ve Shen, B., 1999. *Molecular Mechanisms of Salinity Tolerance, Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants*, Published by R.G. Landes Co., ISBN 157-059-563-1,170p.
- Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Analítica Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brock DA, Douglas TE, Queller DC, Strassmann JE (2011) Primitive agriculture in a social amoeba. *Nature* 469:393–396.
- Campbell, W. H., 1999, Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology, *Annual Review of Plant Biology*, 50 (1), 277-303. Hageman, R. H., Leng, E. R. and Dudley, J. W. (1967) *Adv. Avon*. 19, 45.
- Chahardoli, A., Sharifan, H., Karimi, N., Kakavand, S.N., 2022, Uptake, translocation, phytotoxicity, and hormetic effects of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂NPs) in *Nigella arvensis* L., *Science of Total Environmental*, 806, Article 151222.

- Chen, J., Nolan, T.M., Ye, H., Zhang, M., Tong, H., Xin, P., Chu, J., Chu, C., Li, Z., Yin, Y., 2017, Arabidopsis WRKY46, WRKY54, and WRKY70 transcription factors are involved in brassinosteroid-regulated plant growth and drought responses, *The Plant Cell* 29 (6), 1425-1439.
- Chrysargyris, A., Papakyriakou, E., Petropoulos, S.A., Tzortzakisa, N., 2019, The combined and single effect of salinity and copper stress on growth and quality of *Mentha spicata* plants, *Journal of Hazardous Materials*, 368, 584-593.
- Cinisli K. T., Uçar S., Dikbaş N., 2019. Nanomateriyallerin Tarımda Kullanımı. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi Cilt 29, Sayı 4.59.
- Dirilgen N, Inel Y (1994) Cobalt-copper and cobalt-zinc effects on duckweed growth and metal accumulation. *J Environ Sci Health, Part A, Environ Sci Eng* 29: 63–81.
- Duhan, J.S., Kumar, R., Kumar, N., Kaur, P., Nehra, K., Duhan, S., 2017. Nanotechnology: the new perspective in precision agriculture. *Biotechnol. Rep.* 15, 11–23.
- Durucan, C. Biyomedikal ve Biyoteknolojik Uygulamalar. *Bilim ve Teknik*, 465: 43, 2006.
- E. Bakkaus, B. Gouget, J. P. Gallien, H. Khodja, F. Carrot, J. L. Morel, and R. Collins, *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B.* 231, 350 (2005).
- Elçi, Ş., Kolsarıcı, Ö., Geçit, H.H., 1987, *Tarla Bitkileri*, A.Ü. Ziraat Fak Yay., 1008, Ofset Basım: 30, 238.
- Elsakhawy, T., Omara, A.E.D., Alshaal, T., El-Ramady, H., 2018, Nanomaterials and plant abiotic stress in agroecosystems. *Environment, Biodiversity and Soil Security*, 2, 73-94.
- FAOSTAT. Available online: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> (accessed on 12 June 2020).
- Fiala, R., Fialová, I., Vaculík, M., Luxová, M., 2021, Effect of silicon on the young maize plants exposed to nickel stress, *Plant Physiology and Biochemistry*, 166, 645-656
- Gebauer, G. and Schulze, E.-D. (1997). Nitrate nutrition of Central European forest trees. *Trees-Contributions to Modern Tree Physiology*. Eds.: H. Rennenberg, W. Eschrich, H. Ziegler, ss.273-291.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010, Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909-930.
- Gouia, H., Ghorbal, M. H. ve Meyer, C., 2000, Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean, *Plant Physiology and Biochemistry*, 38 (7-8), 629-638.

- Groat, R.G., Vance, C.P., 1981, Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.): developmental patterns and response to applied nitrogen. *Plant Physiology*, 67 (6), 1198-1203.
- Haynes, R.J. (1986). Uptake and assimilation of mineral nitrogen by plants. *Physiological Ecology. A series of Monographs, Texts and Treatises. Mineral Nitrogen in the plant-soil system*. Ed.: R.J. Haynes, ss.303-362, Academic Press. London and Orlando.
- Heldt, H.-W., Piechulla, B., 2011. *Plant Biochemistry*, Translation of the 4th German edition, Academic Press is an imprint of Elsevier, 32 Jamestown Road, London NW1 7BY, UK.
- Herzog, V., Fahimi, H., 1973, Determination of the activity of peroxidase, *Analytica Biochemistry*, 55 Article e62.
- Hunt, R., Causton, D.R., Shipley, B., Askew, A.P., 2002, A modern tool for classical plant growth analysis *Annals of botany*, 90, 485-488.
- Husen A (2017) Gold nanoparticles from plant system: synthesis, characterization and application. In: Ghorbanpourn M, Manika K, Varma A (eds) *Nanoscience and plant-soil systems*, vol 48. Springer International Publication, Switzerland, pp 455–479.
- Husen A, Siddiqi KS (2014) Phytosynthesis of nanoparticles: concept, controversy and application. *Nano Res Lett* 9:229.
- Husen, A., Siddiqi, K.S., 2014. Carbon and fullerene nanomaterials in plant system. *J. Nanobiotechnol.* 12, 16.
- Ida, S., Morita, Y., 1973, Purification and general properties of spinach leaf nitrite reductase. *Plant and Cell Physiology* 14 (4), 661-671.
- Injac, R., Prijatelj, M., Strukelj, B., 2013, Fullerenol nanoparticles: toxicity and antioxidant activity, *Oxidative Stress and Nanotechnology*, 75-100.
- Jamei, R., Heidari, R., Khara, J. ve Zare, S., 2009. Hypoxia Induced Changes in the Lipid Peroxidation, Membrane Permeability, Reactive Oxygen Species Generation, and Antioxidative Response Systems in *Zea mays* Leaves, *Turkish Journal of Biology*, 33, 4552.
- Jiang, S., Sun, J., Tian, Z., Hu, H., Michel, E.J., Gao, J., Jiang, D., Cao, W., Dai, T., 2017, Root extension and nitrate transporter up-regulation induced by nitrogen deficiency improves nitrogen status and plant growth at the seedling stage of winter wheat (*Triticum aestivum* L.), *Environmental and Experimental Botany*, 141, 28-40.
- Jin, X., Liu, T., Xu, J., 2019, Exogenous GABA enhances muskmelon tolerance to salinity-alkalinity stress by regulating redox balance and chlorophyll biosynthesis. *BMC Plant Biology*, 19, 48.

- K. Jayakumar, P. Vijayarangan, Zhao Chang-Xing, and C.A. Jaleel, *Colloids Surf. B: Biointerf.* 67, 272 (2008).
- Kaiser, W., Weiner, H. ve Huber, S. C., 1999, Nitrate reductase in higher plants: A case study for transduction of environmental stimuli into control of catalytic activity, *Physiologia Plantarum*, 105 (2), 384-389.
- Khan MN, Mobin M, Abbas ZK, Almutairi KA, Siddiqui ZH (2016) Role of nanomaterials in plants under challenging environments. *Plant Physiol Biochem* 110:194–2019.
- Khan, M.N., Mobin, M., Abbas, Z.K., AlMutairi, K.A., Siddiqui, Z.H., 2017. Role of nanomaterials in plants under challenging environments. *Plant Physiol. Biochem.* 110, 194–209.
- Kün, E., 1997, Sıcak İklim Tahılları, A.Ü. Ziraat Fak., Yayın No: 1452, Ders Kitabı:432, IV-Basım, Ankara, 317.
- Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685.
- Lam, H.-H., Coschigano, K.T., Oliveira, I.C., Melo-Oliveira, R., and Coruzzi, G.M. (1996) The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiology Plant Mol.Biol.* 47: 569-593.
- Lea, R.I., Blackwell, R.O. and Joy, K.W (1992). Ammonia assimilation in higher plants. *Nitrogen Metabolism of Plants*. Eds.: K. Mengel, D.J. Pilbeam, ss.153-186, Oxford Univ. Press Oxford.
- Lilley, R.M., Fitzgerald, M., Rienits, K., Walker, D., 1975, Criteria of intactness and the photosynthetic activity of spinach chloroplast preparations. *The New Phytologist*, 75(1), 1-10.
- Liu R, Lal R (2015) Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Sci Total Environ* 514:131–139.
- Liu, F.Y., Xiong, F.X., Fan, Y.K., Li, J., Wang, H.Z., Xing, G.M., 2016, Facile and scalable fabrication engineering of fullereneol nanoparticles by improved alkaline-oxidation approach and its antioxidant potential in maize, *Journal of Nanoparticle Research*, 18(11), 1-13.
- Liu, Q.L., Zhao, Y.Y., Wan, Y.L., Zheng, J.P., Zhang, X.J., Wang, C.R., Fang, X.H., Lin, J.X., 2010. Study of the inhibitory effect of water-soluble fullerenes on plant growth at the cellular level. *ACS Nano* 4, 5734–5748.
- Liu, Z.J., Guo, Y.K., Bai, J.G., 2010, Exogenous hydrogen peroxide changes antioxidant enzyme activity and protects ultrastructure in leaves of two cucumber ecotypes under osmotic stress, *Journal of Plant Growth Regulation*, 29, 171-183.

- Lopez-Delacalle, M., Camejo, D.M., García-Martí, M., Nortes, P.A., Nieves-Cordones, M., Martínez, V., Rubio, F., Mittler, R., Rivero, R.M., 2020, Using tomato recombinant lines to improve plant tolerance to stress combination through a more efficient nitrogen metabolism, *Front Plant Science*, 10, 1702.
- Lutz C, Steevens JA (2009) *Nanomaterials: risks and benefits*. Springer, Dordrecht
- Ma H, Wallis L, Diamond S, Li S, Canas J, Cano A (2014) Impact of solar UV radiation on toxicity of ZnO nanoparticles through photocatalytic reactive oxygen species (ROS) generation and photo-induced dissolution. *Environ Pollut* 193:165–172.
- M. M. El-Sheekh, A. H. El-Naggar, M. E. H. Osman, and E. El-Mazaly, *Braz. J. Plant Physiol.* 15, 159 (2003).
- Malecka, A., Piechalak, A., Morkunas, I., Tomaszewska, B., 2008, Accumulation of lead in root cells of *Pisum sativum*, *Acta Physiologiae Plantarum*, 30, 629–637.
- Marschner, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants*. 2nd Print, Academic Press. London.
- Meloni, D.A., Oliva, M.A., Martinez, C.A. ve Cambraia, J., 2003. Photosynthesis and Activity of Superoxide Dismutase, Peroxidase and Glutathione Reductase in Cotton Under Salt Stress, *Environmental and Experimental Botany*, 49, 69-76.
- Miller, A.J. and Cramer, M.D. 2004. Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant Soil* 274: 1- 36.
- Minkov, I.N., Jahoubjan, G.T., Denev, I.D. ve Toneva, V.T., 1999. Photooxidative Stress in Higher Plants, *Handbook of Plant Crop Stress*, ISBN 0-8247-1948-4, New York, 1198p.
- Mittler, R. Zilinskas, B.A., 1993, Detection of ascorbate peroxidase-activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium, *Analitica Biochemistry*, 212, 540-546.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. ve Breusegem, F.V., 2004. Reactive Oxygen Gene Network of Plants, *Trends in Plant Science*, 9(10), 490-498.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. ve Breusegem, F.V., 2004. Reactive Oxygen Gene Network of Plants, *Trends in Plant Science*, 9(10), 490-498.
- Nakano, Y., Asada, K., 1981, Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant Cell Physiology*, 22, 867-880.
- Noctor, G. ve Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 249-279.
- Nunes-Nesi, A., Araújo, W.L., Obata, T., Fernie, A.R., 2013, Regulation of the mitochondrial tricarboxylic acid cycle, *Current Opinion in Plant Biology* 16 (3), 335-343.

- O'neal, D., Joy, K., 1973, Glutamine synthetase of pea leaves. I. Purification, stabilization, and pH optima. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 159 (1), 113-122.
- Ooi, A., Wong, A., Ng, T.K., Marondedze, C., Gehring, C., Ooi, B.S., 2016, Growth and development of *Arabidopsis thaliana* under single-wavelength red and blue laser light. *Scientific Reports-UK*, 6(1), 1-13.
- Öktüren-Asri, F. , Sönmez, S. (2007). Ağır Metal Toksisitesinin Bitki Metabolizması Üzerine Etkileri, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü, Antalya.
- Özdoğan E, Demir A, Seventekin N (2006). Nanoteknoloji ve Tekstil Uygulamaları. *Tekstil ve Konfeksiyon*, 16:159-163.
- Pagano, L., Maestri, E., Caldara, M., White, J.C., Marmioli, N., Marmioli, M., 2018, Engineered nanomaterial activity at the organelle level: impacts on the chloroplasts and mitochondria. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 6(10), 12562-12579.
- Pilbeam, DJ. ve Jan, A.U. (1999). Root absorption and assimilation of inorganic nitrogen. *Nitrogen Nutrition and Plant Growth*. Eds. RS. Srivastava RP. Singh, ss.23-43, Science Publishers, Inc.
- Piršelová, B., Matušíková, I., 2013, Callose: the plant cell wall polysaccharide with multiple biological functions. *Acta Physiologia Plantarum*, 35, 635–644.
- Polisetty, R and Hageman, RH. (1983). Variation in nitrate accumulation, nitrate reductase activity and nitrite reductase activity along primary and nodal roots of com (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Cell Physiol.* 24, 1163-1168.
- Przedpelska-Wasowicz, E., Wasowicz, P., 2013, Does zinc concentration in the substrate influence the onset of flowering in *Arabidopsis arenosa* (Brassicaceae)?, *Plant Growth Regulation*, 69, 87–97.
- Rachina, M.A., Nicholas, D.J.D., 1985, Glutamine synthetase and glutamate synthase from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytochemistry*, 24(11), 2451–2548.
- Ranilla L. G., 2020. The Application of Metabolomics for the Study of Cereal Corn (*Zea mays* L.). *Metabolites* 2020, 10, 300.
- Rao, K.M., Sresty, T., 2000, Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses, *Plant Science*, 157, 113-128.
- Rico, C.M., Barrios, A.C., Tan, W., Rubenecia, R., Lee, S.C., Varela-Ramirez, A., 2015, Physiological and biochemical response of soil-grown barley (*Hordeum vulgare* L.) to cerium oxide nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(14), 10551-10558.

- Rizhsky, L., Hallak-Herr, E., Breusegem, F.V., Rachmilevitch, S., Barr, J.E., Rodermel, S., Inzé, D. ve Mittler, R., 2002. Double Antisense Plants Lacking Ascorbate Peroxidase and Catalase are Less Sensitive to Oxidative Stress than Single Antisense Plants Lacking Ascorbate Peroxidase or Catalase, *The Plant Journal*, 32, 329-342.
- Rucińska-Sobkowiak, R., 2016, Water relations in plants subjected to heavy metal stresses, *Acta Physiol Plantarum*, 38, 257.
- Sairam, R.K. ve Tyagi, A., 2004. Physiology and Molecular Biology of Salinity Stress Tolerance in Plants, *Current Science*, 86(3), 407-421.
- Salam, A., Khan, A.R., Liu, L., Yang, S., Azhar, W., Ulhassan, Z., Zaeshan, M., Wu, J., Fan, X., Gan, Y., 2022, Seed priming with zinc oxide nanoparticles downplayed ultrastructural damage and improved photosynthetic apparatus in maize under cobalt stress, *Journal of Hazardous Materials*, 423, Part A, 127021.
- Secenji, M., Bebes, A., Hideg, É. ve Györgyey, J., 2008. Transcriptional Changes in Ascorbate-Glutathione Cycle under Drought Conditions, *Acta Biologica Szegediensis*, 52(1), 93-94.
- Seevers, P., Daly, J., Catedral F., 1971, The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust disease, *Plant Physiologia*, 48, 353-360.
- Shafiq, F., 2019a. Induction of Salt Tolerance in Wheat (*Triticum aestivum* L.) through Exogenous Application of Polyhydroxy Fullerene Nanoparticles (Ph.D. Dissertation).
- Siddiqi KS, Husen A (2016) Engineered gold nanoparticles and plant adaptation potential. *Nano Res Lett* 11:400.
- Siddiqi KS, Husen A (2017) Plant response to engineered metal oxide nanoparticles. *Nanoscale Res Lett* 12:92.
- Singh, N., Naik, B., Kumar, V., Kumar, V., Gupta, S., 2021, Actinobacterial pigment assisted synthesis of nanoparticles and its biological activity: nanoparticles and its biological activity, *Journal of Microbiological Biotechnologic Food Science*, 10, 604-608.
- Smart, R. E., Bingham, G. E., 1974, Rapid estimates of relative water content, *Plant Physiologia*, 53, 258-260.
- Smirnoff, N., 2005. Ascorbate, Tocopherol and Carotenoids: Metabolism, Pathway Engineering and Functions, *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*, Publishing by Blacwell, ISBN 978-14051-2529-1, Oxford, 302p.
- Solomonson, L.P., Barber, M.J. 1990. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology*, 41: 225- 253.
- Spencer, D. (1958) *Handb. lffflanzenphysiol.* 8, 201.

- Suprasanna, P., Nikalje, G.C., Rai, A.N., 2016, Osmolyte accumulation and implications in plant abiotic stress tolerance N. Iqbal, R. Nazar, N.A. Khan (Eds.), *Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies*, Springer, India, pp 1-12.
- Tahjib-Ul-Arif, M., Sohag, A. A. M., Mostofa, M. G., Polash, M. A. S., Mahamud, A. G. M. S. U., Afrin, S., Hossain, M. A., Hossain, M. A., Murata, Y., Tran, L.-S. P., 2020, Comparative effects of ascobin and glutathione on copper homeostasis and oxidative stress metabolism in mitigation of copper toxicity in rice, *Plant Biology*, 23, 162-169.
- Tam, L.T., Hien, H.T.M., Anh, H.T.L., Tuan, P.H., Hong, D.D., 2019, The impact of zerovalent cobalt nanoparticle on photosynthesis-related genes expression in soybean leaves *Glycine max* (L.) Merr.(Dt26), *Academia Journal of Biology*, 41, 1.
- Tarafdar JC, Sharma S, Raliya R (2013) Nanotechnology: interdisciplinary science of applications. *Afr J Biotechnol* 12:219–226.
- Tercé-Laforgue, T., Clément, G., Marchi, L., Restivo, F.M., Lea, P.J., Hirel, B., 2015, Resolving the role of plant NAD-glutamate dehydrogenase: III. Overexpressing individually or simultaneously the two enzyme subunits under salt stress induces changes in the leaf metabolic profile and increases plant biomass production. *Plant and Cell Physiology*, 56(10), 1918– 1929.
- Tischner, R. 2000. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant, Cell and Environment*, 23: 1005- 1024.
- Tombuloglu, H., Slimani, Y., Tombuloglu, G., Alshammari, T., Almessiere, M., Korkmaz, A.D., 2020, Engineered magnetic nanoparticles enhance chlorophyll content and growth of barley through the induction of photosystem genes. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(27), 34311-34321.
- Trpkovic, A., Todorovic-Markovic, B., Trajkovic, V., 2012. Toxicity of pristine versus functionalized fullerenes: mechanisms of cell damage and the role of oxidative stress. *Arch. Toxicol.* 86, 1809–1827.
- Tulinski M, Jurczyk M (2017) Nanomaterials synthesis methods. In: Mansfield E, Kaiser DL, Fujita D, Van de Voorde M (eds) *Metrology and standardization of nanotechnology: protocols and industrial innovations*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim, pp 75–98.
- Van Doorn, W.G., Ketsa, S., 2014, Cross reactivity between ascorbate peroxidase and phenol (guaiacol) peroxidase, *Postharvest Biol. Technol.* 95, 64-69.
- Vithanage, M., Seneviratne, M., Ahmad, M., Sarkar, B., Ok, Y.S., 2017. Contrasting effects of 699 engineered carbon nanotubes on plants: a review. *Environ. Geochem. Health* 39, 1421–1439.

- Wallace A, Abou-Zamzam AM (1989) Low levels but excess, of five different trace elements, singly and in combination, on interactions in bush beans grown in solution culture. *Soil Sci* 147: 439–441.
- Wang LJ, Guo ZM, Li TJ, Li M (2001) The nano structure SiO₂ in the plants. *Chin Sci Bull* 46:625–631.
- Wang, B.L., Shi, L., Li, Y.X., Zhang, W.H., 2010, Boron toxicity is alleviated by hydrogen sulfide in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings, *Planta*, 231 (6), 1301-1309.
- Wang, X., Cai, X., Xu, C., Wang, S., Dai, S., Wang, Q., 2018, Nitrate accumulation and expression patterns of genes involved in nitrate transport and assimilation in spinach. *Molecules*, 23(9), 2231.
- Wei, H., Wang, E., 2013. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes. *Chem. Soc. Rev.* 42, 6060–6093.
- Woodbury, W., Spencer, A., Stahmann, M., 1971, An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes, *Analitica Biochemistry*, 44, 301-305.
- Xiong, J.L., Li, J., Wang, H.-C., Zhang, C.L., Naeem, M.S., 2018, Fullerol improves seed germination, biomass accumulation, photosynthesis and antioxidant system in *Brassica napus* L. under water stress, *Plant Physiology and Biochemistry*, 129, 130-140.
- Yeung, A.W.K., Tzvetkov, N.T., El-Tawil, O.S., 2019, Antioxidants: scientific literature landscape analysis. In: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2019/8278454/>.
- Yildiztugay, A., Ozfidan-Konakci, C., Yildiztugay, E., Kucukoduk, M., 2019, Biochar triggers systemic tolerance against cobalt stress in wheat leaves through regulation of water status and antioxidant metabolism *Journal of Soil Science Plant Nutrition*, 19, 935-947.
- Zeid, I, Ghazi, S, Nabawy, D., 2013, Alleviation of Co and Cr toxic effects on alfalfa. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4(5), 984–993.

YAYINLAR

- C. Ozfidan-Konakci, F. N. Alp, B. Arikan, M. Balci, **Z. Parmaksizoglu**, E. Yildiztugay, H. Cavusoglu, (2022). The effects of fullerene on photosynthetic apparatus, chloroplast-encoded gene expression, and nitrogen assimilation in Zea mays under cobalt stress, *Physiologia Plantarum*, 174:e13720 doi.org/10.1111/ppl.13720

