

Bakır Stresi Altındaki Genç Patlıcan Bitkilerine Hümik Asit Uygulamalarının Etkisi

Sevinç Kıran¹, Şebnem Kuşvuran², Fatma Özkay¹, Ş. Şebnem Ellialtıoğlu³

¹Toprak Gübre ve Su Kaynakları Araştırma Enstitüsü, Ankara

²Çankırı Karatekin Üniversitesi, Kızılırmak Meslek Yüksekokulu, Çankırı

³Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Ankara

e-posta: sevinç.kıran@gthb.gov.tr

Özet

Ağır metal içeren ortamların bitkiler üzerindeki olumsuz etkilerini azaltmak için hümik asit uygulamaları kullanılabilmektedir. Bu çalışmada, yüksek bakır içeren koşullarda yetiştirilen, tuza ve kuraklığa tolerans düzeyleri daha önce belirlenmiş patlıcan genotiplerinin (Burdur Merkez, Burdur Bucak, Kemer ve Giresun) bazı morfolojik ve biyokimyasal özellikleri üzerine, hümik asitin etkileri incelenmiştir. Kontrollü sera koşullarında yürütülen çalışmada, patlıcan tohumları torf ve perlit karışımı ortamında çimlendirilmiş ve ekimden 20 gün sonra fideler, saksılara şaşırtılmıştır. Bitkiler 4-5 gerçek yapraklı olduklarında 3 farklı hümik asit dozu (0, 500, 1000 ppm) uygulanmış, hümik asit uygulamasından 7 gün sonra, içerisinde 200 µM Cu bulunan sulama suyu ile sulanmaya başlanmıştır. Bitkiler 40 gün boyunca sulandıktan sonra bu sürenin sonunda hasat edilmiş ve analizler için örnek alımı yapılmıştır. Çalışmada bitkiler, yeşil aksam ve kök yaş ağırlığı, yeşil aksam ve kök kuru ağırlığı, gövde ve kök boyu, yaprak alanı, klorofil ve MDA miktarı, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon redüktaz (GR) enzim aktiviteleri yönünden incelenmiştir. Cu uygulaması patlıcan genotiplerinin yeşil aksam ve köklerinin yaş ve kuru ağırlıklarında, kök ve gövde boyunda, yaprak alanı ve klorofil değerlerinde azalmaya neden olmuştur. MDA miktarı ve antioksidatif enzim aktiviteleri, Cu uygulaması ile birlikte bitkilerde artış göstermiştir. Tuza tolerant olan Burdur Merkez ve Burdur Bucak genotipleri, hassas olan Giresun ve Kemer genotiplerine oranla Cu uygulamasının oluşturduğu stres etkisine çok daha iyi bir dayanım sergilemiştir. Hümik asit uygulamaları, Cu stresinin büyüme ve gelişmeyi sınırladıcılığı etkisinin azaltılması üzerinde olumlu etki yapmıştır.

Anahtar kelimeler: *Solanum melongena* L., genotip, Cu, hümik asit, antioksidatif enzim

The Effects of Humic Acid Applications on Eggplants Grown Under Copper Stress

Abstract

Humic acid applications can be used to reduce the negative effects of the environment on plants that contain heavy metals. This study was carried out to determine the effects of humic acid on the eggplant genotypes (Burdur Merkez, Burdur Bucak, Kemer ve Giresun) treated by copper stress. Two of the eggplant genotypes are salt and drought tolerant, and the other two genotypes sensitive. The study conducted under the controlled greenhouse conditions. Eggplant seeds were germinated in the growth substrate a mixture of peat and perlite and the seedlings were transplanted into pots at 20 days after sowing. Plants when they are 4-5 true leaves, 3 different humic acid levels (0, 500, 1000 ppm) were applied and 7 days later after this application, the plants were irrigated with the 200 µM Cu solution. During 40 days, the plants were irrigated at the field capacity level with tap water, and then they were harvested, samples for analysis were performed. plants were investigated for shoot and root fresh weight, shoot and root dry weight, shoot and root length, leaf area, chlorophyll and MDA level of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR) enzyme activities All genotypes are adversely affected by Cu applications. In parallel to this Cu dose led to a reduction in values of fresh and dry weight of shoot and root, stem and root length, leaf area of eggplant genotypes. MDA amounts and antioxidative enzyme activities increased in plants irrigated with the solution contains heavy metal. The compared to tolerant genotypes Burdur Merkez and Burdur Bucak, salt sensitive Giresun and Kemer genotypes showed much better tolerance to abiotic stress factor which consists of Cu applications. Humic acid applications had a positive effect on reducing of the limiting effect of Cu stress on growth and development.

Keywords: *Solanum melongena* L., genotype, Cu, humic acid, antioxidative enzymes

Giriş

Ağır metallerin endüstriyel gelişime bağlı olarak hava ve su gibi ortamlarda birikiminin giderek artması, tüm organizmaların yaşamını

tehdit eden önemli bir çevre sorunu olarak dikkatleri üzerine çekmektedir. İçerisinde ağır metal bulunduran sulama sularının yetiştiricilikte kullanımıyla, bitki bünyesinde

ağır metaller birikmekte, bu durum bitkiler için yaşamsal sınırlama meydana getirdiği gibi, tüketici konumundaki canlılar açısından da risk oluşturmaktadır.

Ağır metallerin bitki dokularında birikiminin fazla olması strese neden olmakta; büyüme ve gelişme, mineral besin alımı, transpirasyon, fotosentez, enzim aktivitesi, klorofil biyosentezi ve çimlenme gibi çok sayıda morfolojik ve fizyolojik olayı olumsuz yönde etkilemektedir (Kennedy ve Gonsalves, 1987; Ouzounidou, 1994; Gür ve ark., 2004).

Bakır, bitki bünyesinde enzim aktivasyonu, karbonhidrat ve lipid metabolizmasında görev alması nedeniyle önemli bir elementtir (Kacar ve Katkat, 2006). Bakır kirliliği insan aktivitesi sonucu oluşan emisyon ve atmosferik depositler, pestisid kullanımı, kanalizasyon atıklarının gübre olarak değerlendirilmesi, kömür ve maden yataklarından kaynaklanmaktadır (Asri ve Sönmez, 2006). Bakır toksisitesi genellikle bitki kök sistemlerinde açığa çıkmakta ve bitki bünyesinde protein sentezi, fotosentez, solunum, iyon alımı ve hücre membran stabilitesi gibi bazı fizyolojik olayların bozulmasına neden olmaktadır (Sossé ve ark., 2004).

Hümkik asitler (HA), bitki büyümesi ve gelişimini teşvik eden, uygun konsantrasyonlarda uygulandığında gelişimi pozitif yönde etkileyen maddeler arasında yer almaktadır (Padem ve Öcal, 1999; Çimrin ve ark., 2001). Ayrıca hümkik maddelerin, sahip oldukları çok çeşitli fonksiyonel gruplar sayesinde metal iyonlarıyla stabil kompleks bileşikler oluşturarak bitkiler tarafından alınamaz formlara dönüştürdükleri de bilinmektedir (Livens, 1991; Stevenson, 1994).

Bitkilerde ağır metal stresinin etkileri, sadece elementin çeşidine ve dozuna bağlı olmayıp genetik esaslı fizyolojik davranışları ile de ilişkilidir (Haktanır ve Arcak, 1998). Bu nedenle bitkilerin ağır metal stresine tepkilerinin bilinmesi gerekmektedir. Araştırmacılar bazı bitki türlerinin metal konsantrasyonlarını tolere edebileceğini bildirmişlerdir (Raskin ve Ensley, 2000; Dahmani-Müller ve ark., 2000; Fariduddin ve ark., 2013).

Patlıcan (*Solanum melongena* L.) ülkemizde özellikle, kurak ve yarı kurak bölgelerde yetiştiriciliği en fazla tercih edilen

yazlık sebzeler arasında yer almaktadır. Tük verilerine göre Türkiye’de 2012 yılında 827 380 ton patlıcan üretimi gerçekleştirilmiştir (Anonymous, 2014). Açıkta sebze yetiştiriciliğinde önemli türlerden birisi olan patlıcanın sınırlandırıcı çevre koşullarında yetiştiriciliğinin yapılması önem taşımaktadır. Bakır içeriği yüksek sulama koşullarında veya topraklarda patlıcan yetiştiriciliği konusunda ve patlıcanın bakır stresine toleransı konusunda yeterli çalışma bulunmamaktadır. Sorunlu alanlarda bakır stresinin olumsuz etkisine toleransı yüksek bitkilere ve çeşitlere yer verilmesi, bünyesine istenmeyen maddeleri alma konusunda seçici davranabilen çeşitlerin geliştirilmesi ve toksik maddelerin bitki bünyesine alınmasını önleyecek doğal bileşiklerin kullanılması gerekli olabilecektir.

Bu çalışmada, bakır uygulamasının patlıcan genotiplerinde meydana getirdiği morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikleri ortaya koymak ve bakır stresinin olumsuz etkisi üzerine hümkik asit uygulamasının etkinliğini belirlemek amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Bitkisel Materyal ve Büyüme Koşulları

Çalışma, sıcaklık ve nem kontrolünün otomatik olarak sağlandığı sera koşullarında yürütülmüş, sera içi sıcaklığının 23-25°C ve nispi nemin %50-55 olması sağlanmıştır. Araştırmada, daha önce tuza ve kuraklığa tolerans seviyeleri belirlenmiş olan Burdur Bucak ve Burdur Merkez (BB ve BM: toleransı yüksek genotipler), Giresun ve Kemer (GRS ve KMR: duyarlı genotipler) patlıcan (*Solanum melongena* L.) genotipleri kullanılmıştır (Yaşar, 2003; Kıran ve ark., 2014). Tohumlar, içinde 2:1 oranında torf ve perlit karışımı bulunan vıyollere ekilmiştir. Patlıcan fideleri 20 günlük olduklarında, 1:1:1= kum: çiftlik gübresi: orta bünyeli toprak karışımından oluşan harç doldurulmuş olan 10 L hacmindeki plastik saksılara şaşırtılmıştır.

Bitkiler 4-5 gerçek yapraklı aşamaya ulaştıklarında uygulamalara geçilmiştir. Çalışmada hümkik asitin (HA) (%5 organik madde, %12 hümkik ve fulvik asit) 500 ve 1000 ppm’lik iki farklı dozu kullanılmıştır. Cu uygulamasına başlamadan önce HA, saksı toprağına bir defaya mahsus olmak üzere verilmiş, kontrol saksılarına HA verilmemiştir.

Bitkilere HA verildikten 1 hafta sonra bakır içerikli sulama suyu uygulamalarına geçilmiştir. Bakır dozu, 200 µM Cu final konsantrasyonu elde edilinceye kadar, günde 50 µM Cu olacak şekilde kademeli olarak artırılmıştır. Bitkilere uygulanan Cu çözeltisi, bakır sülfattan (CuSO₄) hazırlanmıştır.

Ölçüm ve Analizler

Bakır uygulaması yapılan bitkilerin 40 gün boyunca sera koşullarında gelişimi sağlandıktan sonra bitkiler hasat edilmiş, ölçüm ve analizler için örnek alınmıştır. Bitkilerde yeşil aksam ve kök kısımları birbirinden ayrılarak yaş ve kuru ağırlıkları, kök ve gövde boyları ve yaprak alanları ölçülmüştür. Ayrıca klorofil, lipid peroksidasyonunu belirlemek üzere MDA miktarı ve antioksidatif enzim (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon redüktaz ve askorbat peroksidaz) aktivitelerini tayin etmek için analizler yapılmıştır.

Her genotipten tesadüfi olarak seçilen 4'er bitki hassas teraziye tartılarak g olarak yaş ağırlıkları belirlenmiş, daha sonra 65°C'de etüvde 48 saat kurutulduktan sonra kuru ağırlıkları da gram olarak belirlenmiştir (Daşgan ve Koç, 2009; Kuşvuran, 2010).

Her tekrardan alınan bitkilerin kök ve gövde boyları milimetrik bir cetvel yardımıyla, yaprak alanları ise Licor LI-3000A model yaprak alan ölçer ile ölçülmüştür.

Klorofil analizleri için sürgün ucundan itibaren geriye doğru ilk iki yaprak alınmıştır. Örneklerden hazırlanan ve içinde klorofil bulunan çözeltilinin absorbans değerleri spektrofotometrik olarak okunmuş, klorofil miktarı µg/mg T.A. (taze ağırlık) olarak hesaplanmıştır (Luna ve ark., 2000).

Lipid peroksidasyonunun ölçümü (MDA) Lutts ve ark. (1996)'na göre yapılmıştır. MDA konsantrasyonu, 155 mMcm⁻¹ olan "extinction katsayısı" kullanılarak µmol/g T.A. olarak belirlenmiştir.

Enzim analizleri için 1 g taze yaprak ve doku örnekleri sıvı azot içerisinde porselen havanlarda ezildikten sonra, içinde 0.1 mM Na-EDTA bulunan 50 mM'lık 10 ml'lik fosfor tampon çözeltisi (pH:7.6) ile homojenize edilmiş, 15 dk 15000 g'de santrifüj edildikten sonra ölçüm yapılmaya kadar +4°C sıcaklıkta tutulmuştur. Ölçümler Analitik Jena 40 model spektrofotometrede gerçekleştirilmiştir. Enzim

ölçümünde son hacimler, tampon çözeltisiyle tamamlanmıştır. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi NBT'nin (nitro blue tetrazolium kloridin) ışık altında O₂ tarafından indirgenmesi yöntemine göre; katalaz aktivitesi (CAT) H₂O₂'nin 240 nm'de (E=39.4 mM cm⁻¹) parçalanma oranı esas alınarak ölçülmüştür (Çakmak ve Marschner, 1992). Glutatyon redüktaz (GR) aktivitesi Çakmak ve Marschner (1992)'a göre 340 nm'de (E=6.2 mM cm⁻¹) NADPH'nin oksidasyonu esas alınarak; askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitesi ise Çakmak ve Marschner (1992) ve Çakmak (1994)'a göre 290 nm'de (E=2.8 mM cm⁻¹) askorbatın oksidasyonu ölçülerek belirlenmiştir.

Tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme desenine göre kurulan denemelerden elde edilen sayısal değerler varyans analizine tabi tutulup, uygulamalar arasındaki farklılıkların istatistiksel açıdan önemlilik derecesi ortaya konulmuştur. Bunun için %0.5 düzeyinde Duncan çoklu karşılaştırma testi yapılmıştır. Bu amaçla MSTAT-C (Freed ve ark., 1989) paket programından yararlanılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Bakır stresine tolerans üzerine HA uygulamalarının etkisinin araştırıldığı bu çalışmada; incelenen her bir parametreye ait değerler 'Genotip x Cu x HA' uygulama kombinasyonları olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel olarak 'Genotip x Cu x HA' interaksyonu kök yaş ağırlığı, kök boyu, yaprak alanı, SOD, CAT, APX ve GR konuları bakımından istatistiksel olarak önemli düzeyde farklılık göstermiştir (p<0.05).

Cu uygulaması genotiplerin kök yaş ağırlık değerlerinde kontrol bitkilerine oranla önemli oranda azalmalara neden olmuştur (Şekil 1). En yüksek kök yaş ağırlığı 'Genotip^{BM} x Cu^{Kontrol} x HA^{1000 ppm}' kombinasyonunda tespit edilmiştir (70.03 g/bitki). En düşük kök yaş ağırlığı değerlerini ise 'Genotip^{BB} x Cu^{Kontrol} x HA^{1000ppm}' kombinasyonu vermiştir (26.67 g/bitki). Cu uygulamasına bağlı olarak kök yaş ağırlığı değerleri bakımından kontrol uygulamalarına oranla meydana gelen azalmalar genotipler arasında farklılık göstermiştir. Aynı zamanda tuz ve kuraklık stresine duyarlı olan Giresun ve Kemer patlıcanları Cu toksitesinden en fazla etkilenen genotipler olmuşlardır. Öte yandan tüm genotiplerde hümitik asit uygulamaları, Cu toksitesinin kök yaş ağırlığı

üzerindeki olumsuz etkisini azaltmada başarılı bulunmuştur. Özellikle meydana gelen bu etki Burdur Bucak ve Kemer genotiplerinde ve 1000 ppm dozunda ortaya çıkmıştır. Nitekim Sharma ve Dubey (2005), Fidalgo ve ark. (2013) bakır elementinin kökler tarafından tutulmasının kök gelişiminde azalmaya yol açtığını; Fariduddin ve ark. (2013), Cu stresine tolerans bakımından çeşitlerin farklılık gösterdiğini; Demir ve Çimrin (2011) ise, HA uygulamalarının kök yaş ağırlığını artırıcı yönde etki yaptığını bildirmişlerdir. Ayrıca mısırdaki da hümit asit ve fulvik asit kullanımının bakır ve vanadyum toksisitesi karşısında kök ve sürgün kuru biyomasını koruyucu etki meydana getirdiği kaydedilmiştir (Ullah ve Gerzabek, 1991).

Kök boyu bakımından elde edilen verilere Şekil 1'de yer verilmiştir. En yüksek kök boyu değeri 'Genotip^{BB} x Cu^{Kontrol} x HA^{1000 ppm}' kombinasyonunda tespit edilmiştir (26.33 cm). Cu toksisitesi tüm genotiplerde kök boyunda azalmaya yol açmış, Kemer çeşidi belirgin olarak kök boyu bakımından en fazla zarar gören genotip olmuştur. HA uygulamaları kök boyu parametresi açısından Cu uygulamasının olumsuz etkisini bir miktar önleyebilmiş, toksisiteyi azaltmada HA'nın 1000 ppm dozu en etkili doz olarak tespit edilmiştir. Özellikle Burdur Bucak genotipinde bu etki belirgin olarak öne çıkmıştır. Metal toksisitesine karşı kök büyümesinin oldukça duyarlı olduğu, kök boyunda azalmalara yol açtığı pek araştırmacı tarafından da vurgulanmıştır (Fargašová, 2001; Bekiaroglou ve Karatagtis, 2002; Kırbağ Zengin, 2002).

Cu stresi altında patlıcan genotipleri yaprak alanı bakımından en yüksek değeri; 'Genotip^{GRS} x Cu^{Kontrol} x HA^{1000 ppm}' kombinasyonunda vermiştir (450.04 cm²/bitki) (Şekil 1). Cu uygulaması tüm genotiplerin yaprak alanlarında azalmalara neden olmuştur. Hıyarda da bakır toksisitesinin yaprak alanında azalmaya yol açtığı bildirilmektedir (Dunand ve ark., 2002). Sossé ve ark. (2004), yüksek dozda bakırın stoma hareketlerini ve fotosentetik aktiviteyi olumsuz yönde etkilediğini dolayısıyla yaprak alanında azalmaya neden olduğunu ifade etmiştir. Giresun ve Kemer patlıcanları Cu toksisitesi karşısında diğer genotiplere göre daha fazla kayıplar vererek düşük bir performans sergilemiş, HA dozundaki artışa rağmen strese dayanım konusunda başarılı olamamışlardır.

Yeşil aksam yaş-kuru ağırlığı, kök kuru ağırlığı, gövde boyu, klorofil miktarı istatistiksel öneme sahip olmamıştır (p>0.05). Cu uygulaması tüm genotiplerin kontrol konularına göre yeşil aksam yaş ve kuru ağırlık değerlerinde azalmalara neden olmuştur. En yüksek yeşil aksam yaş ve kuru ağırlıkları sırasıyla 'Genotip^{BB} x Cu^{Kontrol} x HA^{Kontrol}', 'Genotip^{GRS} x Cu^{Kontrol} x HA^{1000 ppm}' uygulamalarından elde edilmiştir (276.67 ve 50.11 g/bitki) (Şekil 1). Yüksek dozda bakırın, klorofil biyosentezi, stomaların kapanması gibi bazı fizyolojik olayların bozulmasına neden olduğu, buna bağlı olarak bitki yaş ağırlıklarında azalma meydana geldiği araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir (Sossé ve ark. 2004; Vaillant ve ark., 2005; Bozkurt ve ark., 2010). Yeşil aksam yaş-kuru ağırlığı bakımından sırasıyla Kemer ve Giresun patlıcanları Cu uygulamalarından en fazla etkilenen genotipler olarak öne çıkarken, Burdur Merkez ve Burdur Bucak genotipleri Cu toksisitesine karşı daha fazla tolerans sergilemişlerdir. Yeşil aksam yaş ve kuru ağırlık değerleri üzerine Cu toksisitesinin olumsuz etkisini azaltmak amacıyla kullanılan HA, genotiplere göre değişim göstermiştir. 1000 ppm HA dozu en etkili doz olarak görülmüştür.

Cu ve HA uygulamaları, genotip bazında kök kuru ağırlık değerleri bakımından önemsiz düzeyde farklılıklar yaratmıştır. Elde edilen veriler Şekil 1'de gösterilmiştir. Kök kuru ağırlık değerleri bakımından en yüksek değerler genel olarak kontrol bitkilerinde ölçülmüş olmakla birlikte, en yüksek değere 'Genotip^{BM} x Cu^{Kontrol} x HA^{1000 ppm}' kombinasyonunda ulaşılmıştır (9.15 g/bitki). Kök kuru ağırlık değerleri incelendiğinde, HA uygulamalarının doz artışına paralel olarak Cu toksisitesinin olumsuz etkisini kısmen de olsa hafifletebildiği ortaya çıkmıştır. Bakırın normal bölünen hücre sayısını engelleyerek kök ve gövde gelişimini olumsuz yönde etkilediği, böylece kök ile gövdenin kuru ağırlıklarını azalttığı belirtilmiştir (Kıran ve Munzuroğlu, 2004; Pourakbar ve ark., 2007).

Cu stresine maruz bırakılan tüm genotiplerde stres etkisi ile kontrol bitkilerine oranla gövde boyunda azalma meydana gelmiştir (Şekil 1). En yüksek gövde boyu; 'Genotip^{BM} x Cu^{Kontrol} x HA^{500ppm}' kombinasyonunda ölçülmüştür (108.03 cm). HA uygulamaları gövde boyu bakımından genotiplere göre

değişmekle birlikte Cu stresinin etkisini azaltmada çok fazla etkin bulunamamıştır. Kemer ve Giresun genotiplerinde bu etki daha belirgin olmuştur. Çalışmadan elde ettiğimiz bulgular, Larbi ve ark. (2002), Ghani ve ark. (2010), Bozkurt ve ark. (2010), Yong ve ark. (2011)'nın bulgularıyla paralellik göstermektedir.

Patlıcan genotiplerinin klorofil içeriği üzerine Cu uygulamasının etkisi önemsiz bulunmuştur. Klorofil miktarı, Burdur Merkez ve Burdur Bucak genotiplerde kontrol konusuna yakın değerler verirken, Kemer ve Giresun genotiplerinde kontrol bitkilerine göre daha düşük değerler saptanmıştır (Şekil 1). En düşük klorofil içeriği; 'Genotip^{GRS} x Cu^{200µM} x HA^{Kontrol}' ile kombinasyonunda belirlenmiştir (0.21 µg/mg T.A.). Cu uygulamasına bağlı olarak HA dozundaki artışlar genotiplerin klorofil kayıplarını kısmen azaltabilmiş, Burdur Merkez ve Kemer genotiplerinde 500 ppm HA dozu, Burdur Bucak ve Giresun patlıcanlarında ise 1000 ppm HA dozu olumlu etki yapmıştır. Yüksek dozlardaki bakırın klorofil sentezini olumsuz yönde etkilediği önceki yıllarda yapılan çalışmalarda da ifade edilmektedir (Yürekli ve Porgali, 2006).

Genotip x Cu x HA interaksyonu SOD, CAT, APX ve GR aktiviteleri bakımından istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0.05). Cu stresi sonucunda oluşan ve yüksek düzeylere ulaşan ROS (Reactive oxygene species)'u zararsız bileşiklere dönüştüren antioksidant enzim aktiviteleri, bitkilerde oksidatif strese karşı etkili olan en önemli dayanım mekanizmaları olarak işlev görmektedir (Liu ve ark., 2007). SOD, APX, GR, CAT enzimleri, çeşitli stres faktörlerine karşı bitki hücrelerine koruyan etkin antioksidatif enzimler olarak bilinmektedir.

SOD, tüm aerobik organizmalarda bulunan ve reaktif oksijen türlerine karşı hücrel savunma mekanizmalarında anahtar bir rol oynayan enzimlerden biridir (Dinakar ve ark., 2008). Cu toksisitesi koşullarında SOD enzim aktivitesi uyarılmaktadır (Ahmed ve ark., 2010). Çalışmamızda SOD enzim aktivitesi bakımından en yüksek değer, 'Genotip^{BB} x Cu^{200 µM} x HA^{1000 ppm}' kombinasyonunda (601.44 U dak⁻¹ mg⁻¹ T.A.) uygulamasından elde edilmiştir. 'Genotip^{GRS} x Cu^{Kontrol} x HA^{Kontrol}' kombinasyonu ise en düşük SOD ölçümüne

sahip olmuştur (84.27 U dak⁻¹ mg⁻¹ T.A.) (Şekil 2). HA uygulamaları bitkilerin SOD enzim aktivitesindeki artışları olumlu yönde etkilemiş, Cu toksisitesinin olumsuz etkisini gidermede etkili olmuştur. Farooqui ve ark. (2011) ve Fariduddin ve ark. (2013), Cu toksisitesi süresince O₂ seviyesinin arttığını, enzim aktivitesindeki artış ile bitkilerin bu radikali yok etmeye çalıştıklarını ifade etmişlerdir.

CAT, oksidatif stres sonucu oluşan hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin suya ve moleküler oksijene dönüştürerek yok edilmesinde görevli bir enzim olarak rol almaktadır (Gupta ve ark., 2009). CAT enzim aktivitesi bakımından en yüksek değeri veren kombinasyon 'Genotip^{BM} x Cu^{200 µM} x HA^{1000 ppm}' (401.02 µmol dak⁻¹ mg⁻¹ T.A.), en düşük değeri veren kombinasyon ise 'Genotip^{KMR} x Cu^{Kontrol} x HA^{Kontrol}' (111.68 µmol dak⁻¹ mg⁻¹ T.A.) olmuştur (Şekil 2). Cu uygulaması karşısında genotiplerin CAT enzim aktivitesi bakımından ortaya koydukları değişimler farklılık göstermekle birlikte, genel olarak artış meydana gelmiştir. Stres koşulunda en fazla CAT aktivasyonunu Burdur Merkez ve Burdur Bucak genotipleri sağlamıştır. Kemer ve Giresun genotiplerinin enzim aktivasyonu düşük düzeyde kalmıştır. HA uygulamaları doz artışına paralel olarak CAT enzim aktivitesindeki artışı desteklemiştir. Fariduddin ve ark. (2013) hıyarda bakır; Saeed ve ark. (2013) domateste kadmiyum, bakır ve çinko toksisitesi üzerine yaptıkları çalışmalarda, ağır metal stresinin CAT enzim aktivitesinde artış meydana gelmesine yol açtığını kaydetmişlerdir.

GR, askorbat-glutatyon döngüsünün hız sınırlayıcı son basamağı katalizlemektedir (Foyer ve ark., 1997). Çalışmada GR enzim aktivitesi, en yüksek değerlerini istatistiksel bakımdan aynı grupta yer alacak şekilde 'Genotip^{BM} x Cu^{200 µM} x HA^{500 ppm}' (377.78 µmol dak⁻¹ mg⁻¹ T.A.) uygulaması vermiştir. 'Genotip^{BM} x Cu^{Kontrol} x HA^{Kontrol}' kombinasyonu en düşük değeri vermiştir (95.83 µmol dak⁻¹ mg⁻¹ T.A.) (Şekil 2). Ağır metal toksisitesi karşısında tüm genotiplerde GR aktivitelerinde artış belirlenirken, tuz stresine duyarlı Kemer ve Giresun patlıcanlarında bu artış daha düşük oranlarda meydana gelmiştir. Stres şartlarında en fazla GR aktivasyonunu Burdur Merkez ve Burdur Bucak genotipleri sağlamıştır. SOD ve CAT enzim aktivitetlerine

benzer şekilde HA uygulamaları GR aktivasyonunu da artırarak bitkilerin bakır toksisitesine toleransını olumlu yönde etkilemiştir. Nitekim El-Beltagi ve ark. (2010) turpta, Thounaojam ve ark. (2012) çeltikte Cu toksisitesinin GR enzim aktivasyonunu kontrole göre artırdığını ifade etmişlerdir.

Cu ve HA uygulamaları genotiplere göre değişmekle birlikte APX enzim aktivitesinde önemli seviyede artışlara yol açmıştır. En düşük değerler, aynı grupta yer alacak şekilde $786.80 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{T.A.}$ ile $812.18 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{T.A.}$ değeri ile 'Genotip^{BM} x Cu^{Kontrol} x HA^{500 ppm}' ve 'Genotip^{KMR} x Cu^{Kontrol} x HA^{500 ppm}' kombinasyonlarında tespit edilmiştir. APX aktivasyonu tüm genotiplerde HA uygulaması ile birlikte hız kazanırken en yüksek değerlere 'Genotip^{BM} x Cu^{200 μM} x HA^{1000 ppm}' ile 'Genotip^{BB} x Cu^{200 μM} x HA^{1000 ppm}' uygulamalarında ($5722.20 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{T.A.}$ ve $5583.76 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{T.A.}$) ulaşılmıştır (Şekil 2). Tuz stresine dayanıklı olarak önceki çalışmalar ile belirlenmiş olan Burdur Merkez ve Burdur Bucak genotiplerinin Cu stresi altında HA uygulamaları ile birlikte APX enzim aktivitesini artırdığı gözlemlenmiştir. Nitekim Cu uygulamalarının fasulyede (Gupta ve ark., 1999) ve tütünde Martins ve ark. (2014); kadmiyum uygulamalarının tütünde (Hegedus ve ark., 2001) ve yer fıstığında (Dinakar ve ark., 2008) APX enzim aktivasyonunda artışa yol açtığı bildirilmiştir.

İstatistiksel olarak 'Genotip x Cu x HA' interaksyonu, MDA miktarı bakımından istatistiksel olarak öneme sahip olmamıştır ($p>0.05$). Bununla birlikte Cu stresi, farklı HA koşullarında en yüksek MDA değerini 'Genotip^{GRS} x Cu^{200 μM} x HA^{Kontrol}' kombinasyonunda vermiştir ($8.16 \mu\text{mol/g T.A.}$) (Şekil 2). Cu stresinin olumsuz etkisi ile tüm genotiplerde MDA miktarları bakımından artışlar meydana gelmiş, HA uygulamalarına rağmen ağır metal stresinin olumsuz etkisi, diğer genotiplere göre belirgin bir şekilde diğer abiyotik stres faktörlerine de duyarlı olan Kemer ve Giresun patlıcanlarında ortaya çıkmıştır.

Sonuç

Bakır içeriği yüksek sulama suları ile sulanan, tuza ve kuraklığa dayanımı yüksek ve duyarlı toplam dört patlıcan genotipinin kullanıldığı çalışmada; yeşil aksam ve kök

dokularının yaş ve kuru ağırlıklarında, kök ve gövde boyunda, yaprak alanı, klorofil değerlerinde azalmalar meydana gelmiştir. Ayrıca Cu uygulamasının MDA miktarı ile antioksidatif enzim aktivitelere ait sayısal değerlerde artışa yol açtığı; artış gösteren SOD, CAT, APX ve GR aktivitelerinin Cu stresine karşı koruyucu rol oynadıkları gözlemlenmiştir. HA uygulamaları, incelenen parametrelere ait değerlerdeki artışı genel olarak güçlendirmiş ve Cu stresine bitkilerin gösterdiği toleransı desteklemiştir. Tuz ve kuraklık stresine tolerant Burdur Merkez ve Burdur Bucak genotipleri, Cu stresi altında duyarlı olan diğer iki genotipe göre daha yüksek dayanım performansı sergilemiş, bu durum 1000 ppm HA uygulaması ile olumlu bir şekilde artmıştır. Tuz ve kuraklık stresine duyarlı Kemer ve Giresun patlıcan genotipleri Cu uygulamalarında da en fazla etkilenen genotipler olmuştur.

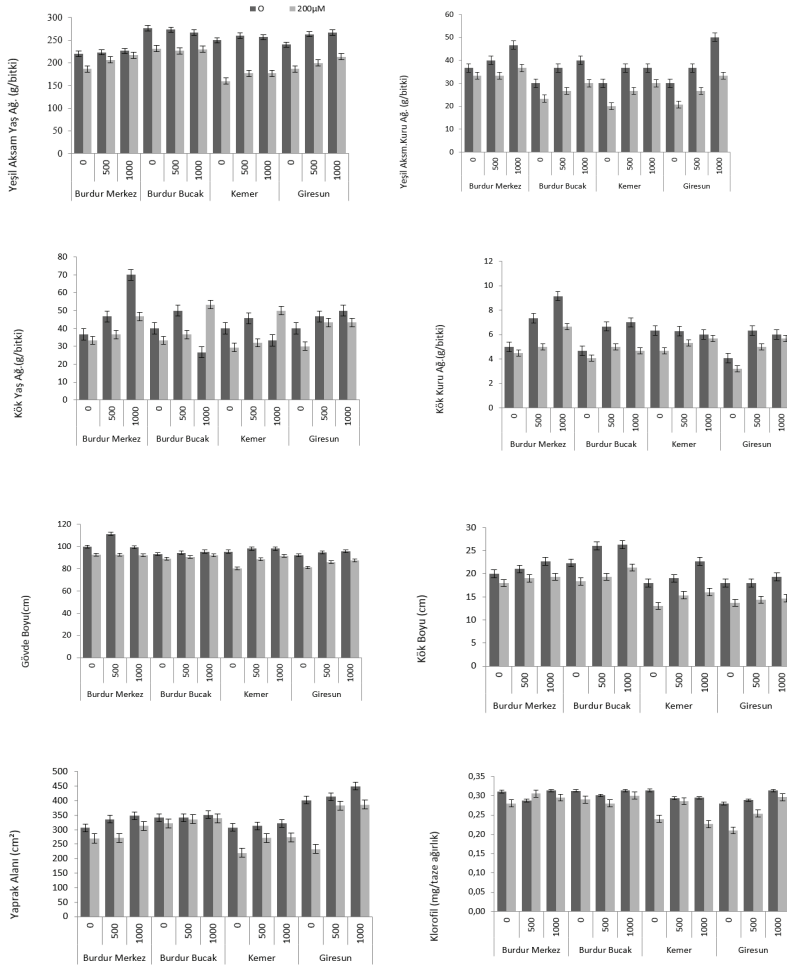
Bu sonuçlara göre; tuzluluk, kuraklık ve ağır metal stresi gibi abiyotik streslere dayanım için bitkilerin benzer stratejiler uyguladıkları, HA uygulamalarının yüksek dozda bakır uygulamasının yol açtığı olumsuz etkileri gidermede pozitif yönde rol oynayabildiği yönünde görüş oluşmuştur.

Kaynaklar

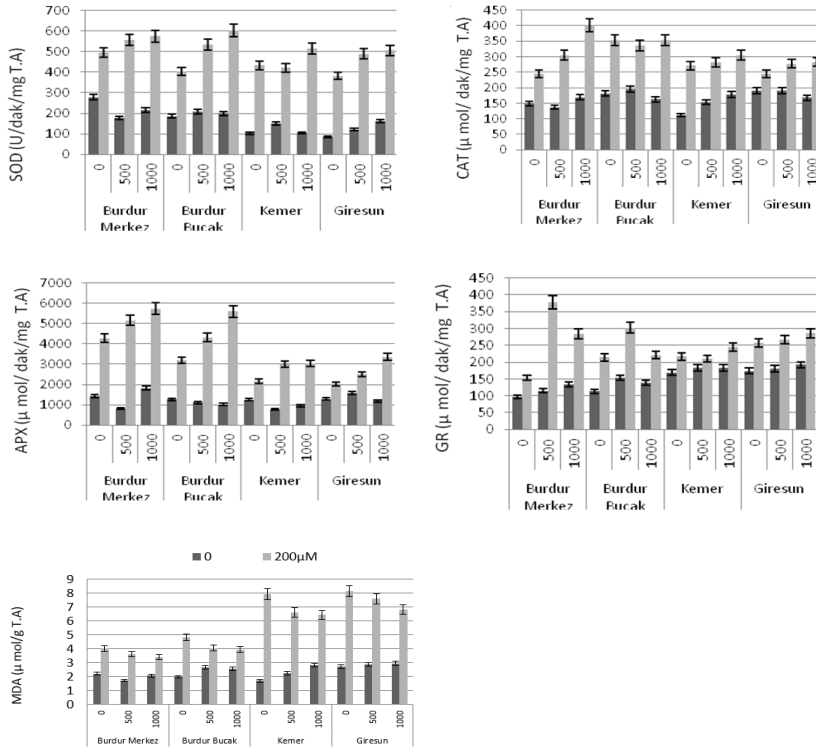
- Ahmed, A., Hasnain, A., Akhtar, S., Hussain, A., Ullah, A., Yasin, G., Wahid, A., Mahmood, S., 2010. Antioxidant enzymes as bio-markers for copper tolerance in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). African J. Biotech., 9(33): 5441-5444.
- Anonymous, 1985. Water Quality for Agriculture. FAO Irrigation and Drainage Paper. 29, Rev.1. Rome. Erişim: Mart 2014.
- Anonymous, 2012. Türkiye İstatistik Kurumu <http://tuikrapor.tuik.gov.tr/reports>. Erişim: Aralık 2014.
- Asri, F.Ö., Sönmez, S., 2006. Ağır metal toksisitesinin bitki metabolizması üzerine etkileri. Derim:36-45.
- Bekiaroglou, P., Karataglis, S., 2002. The effect of lead and zinc on *Mentha spicata*. J. Agronomy & Crop Science 188: 201-205.
- Bozkurt, M. A., Şensoy, S., Çelik, İ., Türkmen, Ö., Bitiktaş, A., 2010. Toxic effects of excess Cu²⁺ and Zn²⁺ on growth and some antioxidant enzymes of tomato. Fresenius Envir. Bull., 19(7): 1295-1299.
- Cakmak, I., Marschner, H., 1992. Magnesium deficiency and highlight intensity enhance

- activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol.*, 98: 1222-1226.
- Cakmak, I., 1994. Activity of ascorbate-dependent H₂O₂ scavenging enzymes and leaf chlorosis are enhanced in magnesium and potassium deficient leaves, but not in phosphorus deficient leaves. *J. Exp. Bot.* 45:1259-1266.
- Çimrin, K.M., Karaca, S., Bozkurt, M.A., 2001. Mısır bitkisinin gelişimi ve beslenmesi üzerine humik asit ve N P K uygulamalarının etkisi. *Tarım Bilimleri Dergisi* 7(2): 95-100.
- Dahmani-Müller, H., Oort, F., Gelie, B., Blabene, M., 2000. Strategies of heavy metal uptake by three plants species growing near a metal smelter. *Environ. Pollut.* 109: 231-238.
- Daşgan, H.Y., Koç, S., 2009. Evaluation of salt tolerance in common bean genotypes by ion regulation and searching for screening parameters. *J. Food Agric. Env.* 7(2):363-372.
- Demir, E., Çimrin, K.M., 2011. Arıtma çamuru ve humik asit uygulamalarının mısırın gelişimi, besin elementi ve ağır metal içerikleri ile bazı toprak özelliklerine etkileri. *J. Agric. Sci.*, 17: 204-216.
- Dinakar, N., Nagajyothi, P.C., Suresh, S., Udaykiran, Y., Damodharam, T., 2008. Phytotoxicity of cadmium on protein, proline and antioxidant enzyme activities in growing *A. hypogaea* L. seedlings. *J. Env. Sci.*, 20:199-206.
- Dunand, V.F., Epron, D., Sossé, A.B., Badot, P.M., 2002. Effects of copper on growth and on photosynthesis of mature and expanding leaves in cucumber plants. *Pl. Sci.*, 163:53-8.
- El-Beltagi, H.S., Mohamed, A.A., Rashed, M.M., 2010. Response of antioxidative enzymes to cadmium stress in leaves and roots of radish (*R. sativus* L.). *Not. Sci. Bio.* 2(4):76-82.
- Fariduddin, Q., Khalil, R.R.A.E., Mir, B.A., Yusuf, M., Ahmad, A., 2013. 24-Epibrassinolide regulates photosynthesis, antioxidant enzyme activities and proline content of *Cucumis sativus* under salt and/or copper stress. *Environ. Monit. Assess.* 185:7845-7856.
- Fargašová, A., 2001. Phytotoxic effects of Cd, Zn, Pb, Cu and Fe on *Sinapis alba* L. seedlings and their accumulation in roots and shoots. *Biologia Plantarum* 44(3): 471-473.
- Farooqui, A., Suhail, S., Arif, J.M., Zeeshan, M., 2011. Antioxidant enzymes activities, total phenols and proline content in *Nostoc muscorum* exposed to copper stress. *Biochem. Cell. Arch.*, 11(1): 71-77.
- Fidalgo, F., Azenha, M., Silva, A.F., Sous, A., Santiago, A., Ferraz, P., Teixeira, J., 2013. Copper-induced stress in *Solanum nigrum* L. and antioxidant defense system responses. *Food and Energy Security* 2(1): 70–80.
- Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F., Scott, I.M., 1997. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signaling. *Physiol. Plant.*, 100:241–254.
- Freed, R., Einensmith, S.P., Guets, S., Reicosky, D., Smail, V.W., Wolberg, P., 1989. User's guide to MSTAT-C, An Analysis of Agronomic Research Experiment. Mich. State Univ. USA.
- Gerzabek, M.H., Ullah, S.M., 1990. Influence of fulvic and humic acids on Cd and Ni-toxicity to *Zea mays* (L.). *Die Bodenkul.* 41:115-124.
- Ghani, A., Shah, A.U., Akhtar, U., 2010. Effect of lead toxicity on growth, chlorophyll and lead (Pb) content of two varieties of maize (*Zea mays* L.). *Pakistan J. Nutri.*, 9(9): 887-891.
- Gupta, M., Cuypers, A., Vangronsveld, J., Clijsters, H., 1999. Copper affects the enzymes of the ascorbate-glutathione cycle and its related metabolites in the roots of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.*, 106: 262–267.
- Gupta, D.K., Nicoloso, F.T., Schetinger, M.R.C., Rossato, L.V., Pereira, L.B., Castro, G.Y., Srivastava, S., Tripathi, R.D., 2009. Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown *Zea mays* seedlings under moderate lead stress. *Journal of Hazardous Materials* 172: 479-484.
- Gür, N., Topdemir, A., Munzuroğlu, Ö., Çobanoğlu, D., 2004. Ağır metal iyonlarının (Cu²⁺, Pb²⁺, Hg²⁺, Cd²⁺) *Clivia* sp. bitkisi polenlerinin çimlenmesi ve tüp büyümesi üzerine etkileri. *F.Ü. Fen ve Mat. Bil. Dergisi*, 16(2):177-182.
- Haktanır, K., Arcaç, S., 1998. Çevre Kirliliği. Ankara Üniv. Yay.No:1503, Ders Kitabı: 457, Ankara.
- Hegedus, A., Erdei, S., Horvath, G., 2001. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant. Sci.*, 16: 1085-1093.
- Kacar, B., İnal, A., 2008. Bitki Fizyolojisi. Nobel Yayın No:1241-477, Ankara.
- Kennedy, C.D., Gonsalves, F.A.N., 1987. The action of divalent zinc, cadmium, mercury, copper and lead on the trans-root potential and efflux of excised roots. *J. Exp. Bot.*, 38: 800-817.
- Kıran, S., Özkay, F., Ellialtıoğlu, Ş.Ş., Kuşvuran, Ş., 2014. Tuz stresine tolerans seviyeleri belirlenmiş bazı genotiplerin kuraklık stresine tepkilerinin belirlenmesi. TAGEM Proje Sonuç Raporu.

- Kıran, Y., Munzuroğlu, Ö., 2004. Mercimek tohumlarının çimlenmesi ve fide büyümesi üzerine kurşunun etkileri. F.Ü. Fen ve Mühendislik Dergisi 16(1):1-9.
- Kırbağ Zengin, F., 2002. Bazı ağır metallerin (Hg⁺⁺, Cd⁺⁺, Cu⁺⁺ ve Pb⁺⁺) fasulye fidelerinin gelişmesi üzerindeki etkilerinin biyokimyasal yünden araştırılması. Doktora Tezi, F.Ü. Fen Bil. Ens., Elazığ.
- Kuşvuran, Ş., 2010. Kavunlarda kuraklık ve tuzluluğa toleransın fizyolojik mekanizmaları arasındaki bağlantılar. Doktora Tezi Ç.Ü. Fen Bil. Enst., 355s., Adana.
- Larbi, A., Morales, F., Abadia, A., Gogorcena, Y., Lucena, J.J., Abadia, J., 2002. Effects of Cd and Pb in sugar beet plants grown in nutrient solution: induced Fe deficiency and growth inhibition. *Funct. Plant Biol.* 29: 1453-1464.
- Livens, F.R., 1991. Chemical reactions of metals with humic material. *Envir. Poll.*, 70(3): 183-208.
- Liu, Y., Wang, X., Zeng, G., Qu, D., Gu, J., Zhou, M., Chai, L., 2007. Cadmium-induced oxidative stress and response of the ascorbate-glutathione cycle in *Beckmeria nivea* L.Gaud. *Chemosphere* 69:99-107.
- Luna, C., Seffino, L.G., Arias, C., Taleisnik, E., 2000. Oxidative stress indicators as selection tools for salt tolerance in *Chloris gayana*. *Pl. Breed* 119:341-345.
- Lutts, S., Kinet, J.M., Bouharmont, J., 1996. NaCl-induced senescence in leaves of rice cultivars differing in salinity resistance. *Ann. Bot.* 78: 389-398.
- Martins, L.L., Mourato, M.P., Baptista, S., Reis, R., Carvalheiro, F., Almeida, A.M., Fevreiro, P., Cuypers, A., 2014. Response to oxidative stress induced by cadmium and copper in tobacco plants (*N. tabacum*) engineered with the trehalose-6-phosphate synthase gene (AtTPS1). *Acta Physiol. Plant.* 36(3):755-765.
- Ouzounidou, G., 1994. Copper induced changes on growth, metal content and photosynthetic functions of *Alyssum montanum* L. plants. *Envir. Exp. Botany* 34: 165-172.
- Padem, H., Öcal, A., 1999. Effect of humic acid applications on yield and some characteristics of processing tomato. *Acta Hort.*, 487:159-164.
- Pourakbar, L., Khayami, M., Khara, J., Farbodnia, T., 2007. Copper- induce change in antioxidative system in maize (*Zea mays* L.). *Pakistan J. Biol. Sci.*, 10(20): 3662-3667.
- Raskin, I., Ensley, B.D., 2000. *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean up The Enviroment*. John Wiley and Sons, NewYork, 304s.
- Saeed, A., Sohail, M., Rashi, N., Iqbal, N., 2013. Effects of heavy metals toxicity on the biochemical response in tomato plants grown in contaminated silt-soil. *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.*, 48(4): 229-236.
- Sharma, P., Dubey, R.S., 2005. Lead toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17(1): 35-52.
- Sossé, B.A., Genet, P., Dunand-Vinit, F., Toussaint, L.M., Epron, D., Badot, P.M., 2004. Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbonhydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Science*, 166: 1213-1218.
- Steffens, J.D., 1990. The heavy metal-binding peptides of plants. *Annual Review Plant Physiology Molecular Biology*, 41: 533-575.
- Stevenson, F.J., 1994. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*. 2nd Edition, John Wiley and Sons, Inc, New York, 285s.
- Thounaojam, T.C., Panda, P., Mazumdar, P., Kumar, D., Sharma, G.D., Sahoo, L., Panda, S.K., 2012. Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice. *Pl. Physiol. Biochem.*, 53:33-39.
- Ullah, M.S., Gerzabek, M.H. 1991. Influence of fulvic and humic acids on Cu- and V-toxicity to *Zea mays* (L.). *Die Bodenk.* 42(2): 123-134.
- Vaillant, N., Monnet, F., Hitmi, A., Sallanon, H., Coudret, A., 2005. Comparative study of responses in four *Datura* species to a zinc stress. *Chemosphere* 59: 1005-1013.
- Yaşar, F., 2003. Tuz stresi altındaki patlıcan genotiplerinde bazı antioksidant enzim aktiviterinin *in vitro* ve *in vivo* olarak incelenmesi. Doktora Tezi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Ens., 139s, Van.
- Yong, X., Zhang, Z., Yang, Q., 2011. Effect of lead stress on growth characteristic and physiological indexes of *Alternanthera philoxeroides*. *Agric. Sci. Tech.* 12(3):347-349.
- Yürekli, F., Porgalı, B., 2006. The effects of excessive exposure to copper in bean plants. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 48/2: 7-13.



Şekil 1. Cu stresi uygulanan farklı patlıcan genotiplerinde, farklı HA dozlarının yeşil aksam-kök yaş ağırlığı, yeşil aksam-kök kuru ağırlığı, yaprak alanı, gövde-kök boyu ve klorofil içeriği üzerindeki etkileri



Şekil 2. Cu stresi uygulanan farklı patlıcan genotiplerinde, farklı HA dozlarının MDA miktarı ve SOD, CAT, GR, APX enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri