



T.C.
MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KADMIYUM STRESİ ALTINDAKİ MİSİR
FİDELERİ ÜZERİNE ASETON O-(2-
NAFTİLSÜLFONİL)OKSİM
UYGULAMASININ ETKİLERİ**

Esin AHNEAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ocak-2023
MUŞ
Her Hakkı Saklıdır



T.C.
MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KADMIYUM STRESİ ALTINDAKİ MISIR
FİDELERİ ÜZERİNE ASETON O-(2-
NAFTİLSÜLFONİL)OKSİM
UYGULAMASININ ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Fuat YETİŞSİN

Ocak-2023
MUŞ
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL ve ONAYI

Esin AHNEAK tarafından hazırlanan “**Kadmiyum Stresi Altındaki Mısır Fideleri Üzerine Aseton O-(2-naftilsülfonil)oksim Uygulamasının Etkileri**” adlı tez çalışması 24/01/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü BİYOLOJİ Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Ercan BURSAL

Muş Alparslan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi,
Kadın Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği Bölümü

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Fuat YETİŞSİN

Muş Alparslan Üniversitesi, Teknik Bilimler MYO,
Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü

Üye

Doç. Dr. Yusuf ALAN

Bitlis Eren Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri MYO, Terapi
ve Rehabilitasyon Bölümü

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu/...../..... Tarih ve/..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

.....

FBE Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

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

DECLARATION PAGE

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

İmza

Esin AHNEAK

24/01/2023

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KADMIYUM STRESİ ALTINDAKİ MISIR FİDELERİ ÜZERİNE ASETON O-(2-NAFTİLSÜLFONİL)OKSİM UYGULAMASININ ETKİLERİ

Esin AHNEAK

**Muş Alparslan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Fuat YETİŞSİN

Kadmiyum stresörüne maruz bırakılan mısır (*Zea mays*) fidelerinde aseton O-(2-naftilsülfonil)oksim (ANSO)'in etkisini aydınlatmaya çalıştık. Çalışmamızda; kontrol için oluşturulan ve örneklerin 18 saat saf suda bekletildiği grup, ANSO uygulaması için oluşturulan ve örneklerin önce 6 saat 0,3 mM ANSO ardından 12 saat saf suda bekletildiği grup, Cd uygulaması için oluşturulan ve örneklerin önce 6 saat saf su ardından 12 saat 100 µM CdCl₂ içinde bekletildiği grup, ANSO+Cd uygulaması için oluşturulan ve örneklerin önce 6 saat 0,3 mM ANSO ardından 12 saat 100 µM CdCl₂ içinde bekletildiği grup olmak üzere 4 deney grubu oluşturduk. Bitkide tek başına Cd uygulamasının meydana getirdiği Cd birikiminin 7,8 katı kadar birikim ANSO+Cd uygulamasında gerçekleşmiştir. Bununla beraber ABA değerlerinde en çok artış tek başına Cd uygulamasında gözlemlenmiştir. Cd uygulaması NSİ ve klorofil değerlerini kontrol gruplarındaki değerlere kıyasla düşürmüştür. Bunun yanında Cd uygulaması ile kontrole göre artan karotenoid değeri ANSO+Cd ile daha fazla artış göstermiştir. H₂O₂ ve MDA değerleri Cd muamelesi ile artmış ANSO+Cd muamelesi ile düşmüştür. CAT, GPX ve APX aktiviteleri Cd muamelesi ile kontrole kıyasla artış göstermişlerdir. Fakat ANSO ön muamelesi ile GPX azalırken CAT ve APX daha da artmıştır. SOD aktivitesi ise Cd ve ANSO+Cd gruplarında eşit değerde kalmış fakat kontrol gruplarına kıyasla düşüş gerçekleşmiştir. Prolin içeriği Cd uygulaması ile artmış ANSO ön uygulaması ile düşmüştür. Askorbik asit ve katekolde Cd uygulaması ile kontrole kıyasla düşüş olmuş fakat ANSO+Cd uygulaması ile değerler nisbeten yükselmiştir. Sinamik asit ve trans P-kumarik asit ise Cd uygulaması ile kontrole kıyasla yükselmişlerdir. Sonuç olarak Cd stresine maruz kalan mısır bitkisinde ANSO ön uygulamasının, Cd'nin şelasyonunu sağlayarak, bitkinin korunmasına katkı sağladığı söylenebilir.

2022, 49 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Sülfonat türevi, Fenolik bileşikler, *Zea mays*, Absisik asit, Antioksidan sistem

ABSTRACT

MS THESIS

EFFECTS OF ACETON *O*-(2-NAPHTHYSULFONYL)OXIM APPLICATION ON MAIZE SEEDLINGS UNDER CADMIUM STRESS

Esin AHNEAK

**Muş Alparslan University
Natural and Applied Science
Department of Biology**

Advisor: Assistant Professor Dr. Fuat YETİŞİN

We tried to elucidate the effect of acetone *O*-(2-naphthylsulfonyl)oxime (ANSO) on maize (*Zea mays*) seedlings exposed to cadmium stressor. We created 4 experimental groups: the group formed for the control and in which the samples were kept in distilled water for 18 hours, the group formed for the ANSO application and the samples were first kept in 0.3 mM ANSO for 6 hours, followed by 12 hours in distilled water, the group formed for the Cd application and the samples were first kept in distilled water for 6 hours, followed by 100 µM for 12 hours, the group formed for the ANSO+Cd application and the samples were first kept in 0.3 mM ANSO for 6 hours and then in 100 µM CdCl₂ for 12 hours. 7.8 times of Cd accumulation caused by Cd application in the plant was realized in ANSO+Cd application. However, the highest increase in ABA values was observed in the Cd application alone. Cd application decreased RWC and chlorophyll values compared to the values in the control groups. In addition, the carotenoid value, which increased with Cd application compared to the control, increased more with ANSO+Cd. H₂O₂ and MDA values increased with Cd treatment and decreased with ANSO+Cd treatment. CAT, GPX and APX activities increased with Cd treatment compared to control. However, GPX decreased with ANSO pretreatment, while CAT and APX increased even more. SOD activity remained equal in the Cd and ANSO+Cd groups, but decreased compared to the control groups. Proline content increased with Cd application and decreased with ANSO pretreatment. There was a decrease in ascorbic acid and catechol compared to the control with Cd application, but the values increased relatively with ANSO+Cd application. Cinnamic acid and trans P-coumaric acid increased with Cd application compared to control. As a result, it can be said that ANSO pre-application in maize plant exposed to Cd stress contributes to the protection of the plant by providing chelation of Cd.

2022, 49 Pages

Keywords: Sulfonate derivative, Phenolic compounds, *Zea mays*, Abscisic acid, Antioxidant system

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında yönlendirici ve yardımcı olan, zorlandığım zamanlarda sabırlı ve anlayışlı yaklaşımları ile yola devam etmemi sağlayan ve geç saatlere kadar süren laboratuvar çalışmalarında beni yalnız bırakmayarak desteğini esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Fuat YETİŞSİN'e minnet ve saygı ile teşekkür ederim.

Aseton *O*-(2-naftilsülfonil)oksim maddesini sentezleyip çalışmamızda kullanmamız konusunda yardımcı olan Dr. Öğretim Üyesi Adem KORKMAZ'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca yanımda olan aileme özellikle de uyandıığım her gün güven ve desteğini yüreğimde hissettiğim kıymetli annem İslim AHNEAK'a sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Esin AHNEAK
MUŞ-2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
1.1 Ağır Metaller ve Bitkilerdeki Moleküler Mekanizması	2
1.1.1 Toprakтан ağır metal iyonlarının alımı ve taşınımı	4
1.1.2 Bitkilerde ağır metal stresinin etkileri ve bitki yanıtları.....	4
1.1.3 Kadmiyum stresi altında mısır bitkisi.....	5
1.2 Bitkilerin Abiyotik Stres Faktörlerine Moleküler Cevapları	5
1.2.1 Reaktif oksijen türlerinin oluşumu	5
1.2.1.1 Süperoksit radikali (O_2^-).....	6
1.2.1.2 Hidrojen peroksit (H_2O_2)	6
1.2.1.3 Hidroksil radikali (OH^-)	7
1.2.1.4 Singlet oksijen (1O_2)	7
1.2.2 Enzimatik antioksidan savunma sistemleri	8
1.2.2.1 Süperoksit dismutaz (SOD)	8
1.2.2.2 Askorbat peroksidaz (APX).....	9
1.2.2.3 Katalaz (CAT).....	9
1.2.2.4 Guaiakol peroksidaz (GPX).....	10
1.2.3 Enzimatik olmayan savunma sistemleri	10
1.2.3.1 Askorbik asit (AsA-C vitamini-Askorbat).....	10
1.2.3.2 Tokoferoller	11
1.2.3.3 Karotenoidler	12
1.2.3.4 Glutatyon	12
1.2.3.5 Fenolik bileşikler	13
1.2.4 Ozmolitlerin üretimi	13
1.2.5 Lipid preoksidasyonu.....	13
1.2.6 Absisik Asit (ABA)	14
1.3 Geçmişten Günümüze Mısır Bitkisi	15
1.4 Aseton <i>O</i> -(2-naftilsülfonil)oksim Maddesi.....	16
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	18
3. MATERYAL ve YÖNTEM	22
3.1 Materyal	22
3.2 Yöntem.....	22

3.2.1 Kadmiyum ve ANSO'nun optimum konsantrasyonunun tayini.....	22
3.2.2 Deney gruplarının hazırlanması.....	22
3.2.3 Bitki örneklerinde kadmiyum tayini.....	23
3.2.4 ABA içeriğinin belirlenmesi.....	23
3.2.5 Bağlı su içeriğinin belirlenmesi (NSİ).....	23
3.2.6 Fotosentetik pigmentlerin ölçümü.....	24
3.2.7 Malondialdehit (MDA) içeriğinin belirlenmesi.....	24
3.2.8 Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) içeriğinin belirlenmesi.....	24
3.2.9 Antioksidan enzim aktivitelerinin ölçümü.....	25
3.2.9.1 Guaiakol peroksidaz (GPX) aktivitesinin belirlenmesi.....	25
3.2.9.2 Katalaz (CAT) aktivitesinin belirlenmesi.....	25
3.2.9.3 Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin belirlenmesi.....	25
3.2.9.4 Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin belirlenmesi.....	25
3.2.10 Protein içeriğinin belirlenmesi.....	25
3.2.11 Prolin içeriğinin belirlenmesi.....	26
3.2.12 Fenolik bileşiklerin belirlenmesi.....	26
3.3 İstatistiksel Analizler.....	26
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA.....	27
4.1 Kadmiyum Stresi Altındaki Mısır Fidelerinde ANSO Ön Uygulamasının Bitki Parametreleri Üzerine Etkileri.....	27
4.1.1 Kadmiyum (Cd) içeriği üzerine etkisi.....	27
4.1.2 Absisik asit (ABA) içeriği üzerine etkisi.....	28
4.1.3 Nisbi su içeriği (NSİ) üzerine etkisi.....	28
4.1.4 Fotosentetik pigment içeriği üzerine etkisi.....	29
4.1.5 Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) içeriği üzerine etkisi.....	30
4.1.6 Malondialdehit (MDA) içeriği üzerine etkisi.....	31
4.1.7 Antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisi.....	31
4.1.7.1 Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi üzerine etkisi.....	31
4.1.7.2 Katalaz (CAT) aktivitesi üzerine etkisi.....	32
4.1.7.3 Guaiakol peroksidaz (GPX) aktivitesi üzerine etkisi.....	33
4.1.7.4 Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi üzerine etkisi.....	33
4.1.8 Prolin içeriği üzerine etkisi.....	34
4.1.9 Fenolik bileşikler üzerine etkisi.....	35
4.1.9.1 Askorbik asit içeriği üzerine etkisi.....	35
4.1.9.2 Katekol içeriği üzerine etkisi.....	36
4.1.9.3 Sinamik asit içeriği üzerine etkisi.....	36
4.1.9.4 Trans P-kumarik asit içeriği üzerine etkisi.....	37
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	38
5.1 Sonuçlar.....	38
5.2 Öneriler.....	39
KAYNAKLAR.....	40

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

CdCl₂ : Kadmiyum klorür

H₂O₂ : Hidrojen peroksit

H₂S : Hidrojen sülfür

OH[·] : Hidroksil radikali

O₂^{·-} : Süper oksit radikali

µl : Mikrolitre

mM : Milimolar

Kısaltmalar

ABA : Absisik asit

ANSO : Aseton *O*-(2-naftilsülfonil)oksim

APX : Askorbat peroksidaz

AsA : Askorbik asit

CAT : Katalaz

EDTA : Etilendiamin tetraasetik asit

GPX : Guaiakol peroksidaz

GR : Glutatyon redüktaz

MDA : Malondialdehit

ROS : Reaktif oksijen türleri

NSİ : Nispi su içeriği

SOD : Süperoksit dismutaz

TBA : Tiyobarbütrik asit

TCA : Trikloroasetik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1 Ağır metallerin ekosisteme geçiş yolları (Rether, 2002).....	3
Şekil 1. 2 Ağır metal stresinde ROS oluşumu (Benavides ve ark., 2005).....	6
Şekil 1. 3 Singlet oksijenin oluşumu (Edreva, 2005).....	7
Şekil 1. 4 Askorbik asit.....	11
Şekil 1. 5 Tokoferollerin genel yapısı.....	11
Şekil 1. 6 Glutatyon.....	12
Şekil 1. 7 Absisik asit.....	14
Şekil 1. 8 Teosinte (modern mısırın atası) ve evcilleştirilmiş mısırın dallanma ve çiçeklenme farkları (Piperno ve ark., 2015).....	16
Şekil 1. 9 ANSO'nun yapısı.....	17
Şekil 4. 1 Cd stresi koşullarında ANSO takviyesi ile Cd (A) ve ABA (B) değerlerindeki değişim.....	27
Şekil 4. 2 Cd stresi koşullarında ANSO takviyesi ile NSİ (A) ve fotosentetik pigment içeriği değişimi.....	29
Şekil 4. 3 Cd stresi koşullarında ANSO takviyesi ile H ₂ O ₂ (A) ve MDA (B) içerikleri değişimi.....	30
Şekil 4. 4 Cd stresi koşullarında ANSO takviyesi ile SOD (A), CAT (B), GPX (C) ve APX (D) aktiviteleri değişimi.....	32
Şekil 4. 5 Cd stresi koşullarında ANSO takviyesi ile prolin içeriği değişimi.....	35
Şekil 4. 6 Cd stresi koşullarında ANSO takviyesi ile Askorbik asit (A), katekol (B), sinnamik asit (C) ve trans P-kumarik asit içeriklerinin değişimi.....	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Bitkilerde enzimatik olmayan antioksidanlar.....	10
Çizelge 2. Deney grupları.....	23



1. GİRİŞ

Her canlının kendi habitatında optimum koşulların bulunması, homeostasisi için gereklidir. Bu koşullardaki olumsuz değişimler ise canlılarda stres oluşturur. Canlılar için stres oluşturan faktörler farklılık göstermekte ve elbette strese verilen yanıtlar da farklı olmaktadır. Bununla birlikte tüm canlılar için ortak bir takım stres faktörleri de mevcuttur. Küresel ısınmayı arttırıcı etmenler, endüstriyel atıklar ve ağır metal birikimleri tüm canlılarda olumsuz cevap oluşturan faktörlerdir.

Canlılar yapısal bütünlüklerini korumak için enerjiye ihtiyaç duyarlar. Dolayısıyla enerji kaynaklarını koruma ve devamlılığını sağlama hayati önem taşır. Bu anlamda, bitkiler, dünya üzerindeki yaşamın devamlılığında kilit öneme sahip organizmalardır. Güneş ile dünyaya ulaşan enerjinin canlılar için kullanılabilir bir forma dönüştürülmesinde en önemli araçlardan biri bitkilerdir. Dünya yüzeyinde yaşamın devamlılığı için bitkileri hayatta tutan optimum koşulları korumak bir zorunluluktur. Bitkiler için stres olan abiyotik ve biyotik stres faktörlerinin azaltılması ya da bitkilerin bu stres faktörlerine toleranslarının arttırılması, bitkilerin sürekliliğini sağlamaya yönelik çözüm yollarındandır. Bitkiler strese cevaplarını bir merkezileştirilmiş stres yanıt sistemi üzerinden oluştururlar (Chapin, 1991). Bitki hücreleri stresi algılayan hücresel sensörlere sahiptir ve alınan uyarılar uygun sinyal yolları ile cevap oluşumunun sağlanacağı merkeze iletilerek bitkinin biyokimyasal, moleküler ve fizyolojik cevap oluşturması sağlanır (Gull ve ark., 2019).

Sanayileşme ile başlayan, dünyadaki top yekûn değişim, olumlu etkiler kadar olumsuz sonuçlar da doğurmuştur. Bunlardan en önemlisi maalesef toprak kirlenmeleridir. Topraktaki kirlilik, ekolojik kirlenmenin temel sebeplerindendir ve elbette bitkilerin üretici görevi üstlendiği besin zincirlerinde yer alan tüm canlılar için birincil tehdittir. Bitkiler için stres oluşturan abiyotik etmenlerden birçoğu toprak kirliliği ile bağlantılıdır. Özellikle de yarılanma ömrü uzun olan toksik ağır metallerin kirlenici faktör olduğu topraklarda bitkilerin verimliliği kayda değer düşüş göstermektedir (Algan ve Bilen, 2005). Ağır metal kategorisine giren ortalama 40 kadar metal iyonu (Sharma ve Agrawal, 2005) bulunmakla birlikte; çinko, bakır ve demir gibi bazı ağır metaller bitkiler ve hayvanlar için iz miktarlarda yararlıdır (Asati ve ark., 2016). Cıva, kurşun, arsenik, kadmiyum gibi metal iyonları toksiktir ve etkili arıtma yolları kullanmayan fabrikaların atık sularında bol miktarda bulunmaktadır (Sağlam ve Cihangir, 1995). Toksik ağır

metaller bitkide fotosentez hızını düşürerek sürgün ve kök gelişimini inhibe ederler (Asati ve ark., 2016), ayrıca oksidatif strese neden olurlar (Fryzova ve ark., 2017). Toksik ağır metaller toprak mikroflorasında zararlı etkiler yaratarak dolaylı olarak bitki büyümesini olumsuz etkilerler (Asati ve ark., 2016).

Bu ağır metaller içinde bitkiler için en toksik olanlarından biri kadmiyumdur. Eser miktardaki Cd bile bitkiler için tehlikelidir. Bitkilerin CO₂ alım potansiyelini düşürerek organik madde üretimini sınırlar, bitki hücrelerde turgor kaybına neden olur, ROS üretimine yol açar ayrıca lipid peroksidasyonunda artış meydana getirir (Farid ve ark., 2013). Bu nedenle küresel ekinler olarak tanımlayabileceğimiz mahsullerde Cd stresi büyük sorundur. Bu ürünlerin Cd gibi ağır metallere tolerans geliştirmelerinin sağlanması ya da ürüne, Cd gibi ağır metallerin toksik etkilerini azaltıcı desteklerin verilmesi mahsul verimliliği açısından önemlidir.

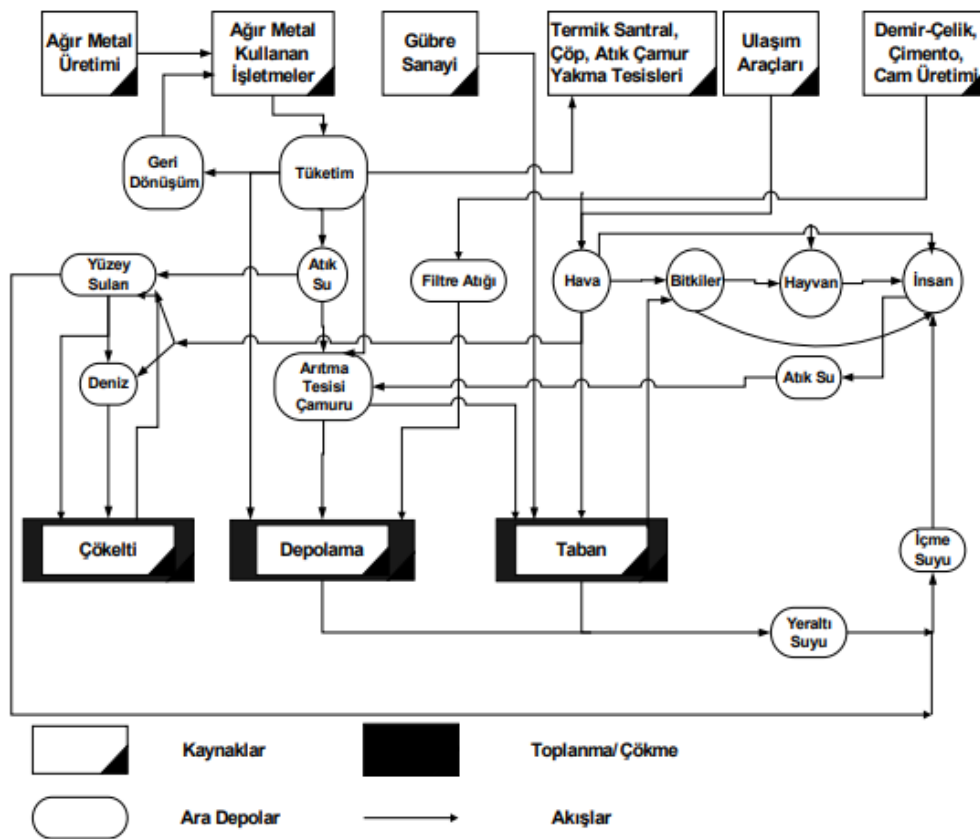
Küresel öneme sahip ekinlerden biri de mısırdır. Güney Meksika'nın dağlık bölgelerinde çeşitlendirildikten sonra dünyaya yayılan mısırmın, en eski türlerinin geçmişi yaklaşık 9000 yıl öncelere dayanmaktadır (Matsuoka ve ark., 2002). Dünyada yetiştirilme alanı en geniş 2. tahıl ürünü olan mısır; insan beslenmesinde, endüstriyel ve kimyasal birçok ürünün ham maddesi olarak sanayide, silajlık olarak hayvan beslenmesinde kullanılmaktadır (Turhal, 2021). Ayrıca endüstriyel alkol (Ranum ve ark., 2014) ve biyoenerji (Torres ve ark., 2016) üretiminde de kaynaktır. Hem besin hem de geniş spektrumlu ham madde olarak kullanımı nedeni ile dünya çapında ithalat ve ihracatı önemlidir. Bu nedenle; mevcut türlerinin biyotik ve abiyotik streslere dirençlerini arttırıcı uygulamaların geliştirilmesi küresel önem arz etmektedir.

Ekosistemin hızla kirlenme gösterdiği dünyamızda, mahsul değeri bu denli yüksek bir tahılın verimliliğinin arttırılması ve devamlılığının sağlanması amacı ile yaşam ortamındaki streslerin olumsuz etkilerini azaltıcı ya da ortadan kaldıracı tedbirlerin ve uygulamaların geliştirilmesi tüm ülkeler için gerekliliktir. Bu çalışmada Cd stresi altındaki mısır (*Zea mays* L.) bitkisinde aseton O-(2-naftilsülfonil)oksim (ANSO) maddesinin desteği ile Cd'nin yıkıcı etkilerinin azaltılıp azaltılmayacağı araştırılmıştır.

1.1 Ağır Metaller ve Bitkilerdeki Moleküler Mekanizması

Tam tanımlaması yapılamamış olmakla birlikte birim hacim ağırlığı 5g/cm³ üstü, atom numarası 20'den büyük metallere ağır metal denir (Yerli ve ark., 2020). Farklı karakteristik özelliklere sahip çok sayıda metal iyonu içeren ağır metaller, ekotoksosite

oluşturan elementler kategorisinde değerlendirilirler (Sharma ve Agrawal, 2005). Bununla birlikte; çinko, mangan, bakır ve demir gibi türleri bitkilerde mikrobesein elementi olarak kullanılmaktadır. İnsanlarda bakır elementi deri ve kemik yapısına katılır. Demir elementi hemoglobinin hem grubunun sentezi için gereklidir. Çinko elementi insanda bazı enzimlerin kofaktörü olarak çalışır. Fakat canlılar için gerekliliği olan ağır metal türü sayısı çok azdır. Eser miktarda alındığında, organizmaya faydası olabilen bu ağır metallerin bile eşik değerlerin üstündeki alımı toksik etki yaratır.



Şekil 1. 1 Ağır metallerin ekosisteme geçiş yolları (Rether, 2002)

Ağır metaller kayaçların jeolojik içeriğinden depremler, volkanik faaliyetler gibi doğal yollarla ekosisteme katılabildiği gibi endüstriyel faaliyetler gibi insan kaynaklı yollarla da ekosisteme dahil olmaktadır (Melih ve ark., 2009). Bunun yanında kadmiyum, civa, arsenik, krom ve kurşun gibi türleri bitkiler için mutlak zararlıdır (Dağhan ve ark., 2013). Özellikle ağır metaller ile kontamine olmuş topraklarda asit yağmurlarının etkisi ile su kaynaklarına yoğun miktarda ağır metal geçişi olmaktadır.

Toprak içeriğine adsorbe olmuş ağır metaller bitki köklerine ATP hidrolizi ile alınıp köklerden gövdeye ksilem ile taşınmaktadır (Terzi ve Yıldız, 2011).

1.1.1 Toprakta ağır metal iyonlarının alımı ve taşınımı

Ağır metallerin bitki köklerinden alımı, kök hücrelerinin çift katlı fosfolipid tabakasına gömülü transmembran iyon taşıyıcıları ve kanal proteinleri aracılığıyla ya da metal şelatlayıcılar gibi yollar ile gerçekleşmektedir. Metal taşıyıcıları ailesinde yer alan taşıyıcılara bakır metalinin taşınmasında görevli CTR/COPT; demir, kadmiyum ve çinko taşınımında görevli NRAMP (Doğal dirençle ilgili makrofaj proteini), çinko taşınımında kullanılan ZIP1 ile ZIP2 (DalCorso ve ark., 2013) ve ATP bağlayıcı kaset (ABC) süper ailesi (Martinoia ve ark., 2002) örnek olarak sayılabilir. Rizosferdeki mikroorganizmalar ve bitki kökleri, toprakta kolloidlere tutunmuş metal iyonlarının kökler tarafından alımını sağlamak amacıyla küçük moleküllü organik bileşikler (siderofor), karboksilatlar salgırlar (DalCorso ve ark., 2013). Böylelikle topraktaki metal formları bitki kökleri tarafından kolay alınabilir hale dönüştürülmüş olur. Ayrıca bitkiler salgıladıkları kimyasallar yardımıyla toprağın pH'nı düşürüp şelasyonu kolaylaştırırlar. Kökler yardımıyla alınan metal iyonları simplastik ve apoplastik yolu izleyerek (Thakur ve ark., 2016) ksileme geçiş yaparlar ve sürgünlere aktarılırlar.

1.1.2 Bitkilerde ağır metal stresinin etkileri ve bitki yanıtları

Ağır metallerin bitki metabolizması üzerindeki toksik etkileri ağır metallerin türüne, bitki için iz miktarda gerekli olup olmadığına, bitkinin ağır metale maruz kalma dozuna ve süresine bağlı olarak değişir (Asri ve Sönmez, 2006). Bitkilerin ağır metal streslerine yanıtları ise kaçınma, bitkinin belli organlarında biriktirme ve savunmaya geçme şeklindedir. En toksik ağır metallerden biri olan çinkonun bitkiler üzerindeki etkisi bitkilerin metabolik hızlarını düşürerek gelişim geriliği yaratmaktır. Çinko bitki yapraklarında klorofil sentezi için gerekli olan Mg ile yarışarak klorofil sentezini inhibe etmekte ve yaprakları kloroza götürmektedir (Asri ve Sönmez, 2006). Kurşun (Pb), kadmiyum (Cd) ve nikel (Ni) iyonlarının *Salvinia natans* (L.) All. (Su eğreltisi) ve *Lemna minor* L. (Su mercimeği) bitkileri üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada bitkilerin maruz bırakıldıkları ağır metallerin dozları arttıkça gelişimlerinin yavaşladığı, organik madde üretiminin azaldığı, lipid peroksidasyonuna bağlı membran hasarlarının arttığı ve bitkilerin muhtelif organlarında ağır metal birikimlerinin meydana geldiği gözlemlenmiştir (Yalçın ve Leblebici, 2014). Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkisi üzerinde yapılan bir araştırmaya göre kadmiyum ve civa stresinin kök üzerine olumsuz etkilerinin, sürgün sistemleri üzerindeki olumsuz etkilerinden daha yıkıcı olduğu ayrıca toksik etkileri açısından civanın kadmiyuma kıyasla daha ağır sonuçlar doğurduğu

gözlemlenmiştir (Zengin ve Munzuroğlu, 2003). *Zea mays* L. bitkisinde farklı derişimlerde Pb ve Cd uygulamaları sonucunda koleoptil ve kök büyümelerinde inhibisyon oluşmuştur (Ayhan ve ark., 2007).

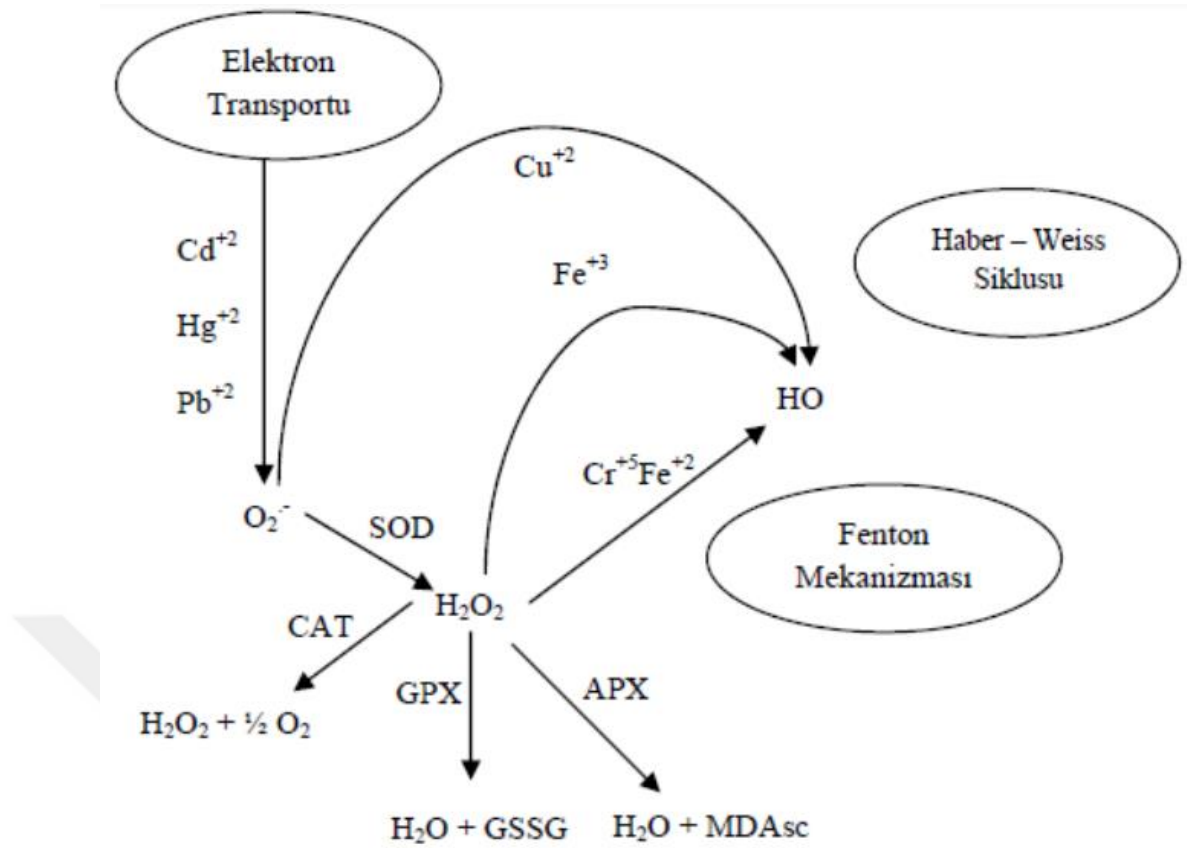
1.1.3 Kadmiyum stresi altında mısır bitkisi

Doğada çoğunlukla kadmiyum sülfür şeklinde bulunan kadmiyum geçiş metaline *Zea mays* L. yüksek tolerans gösterebilen bir bitki değildir. Yapılan bir çalışma göstermiştir ki; Cd muamelesi ile mısır bitkisinde enzim sistemleri olumsuz etkilenmiş, klorofil sentezi azaldığı için organik madde birikimi düşmüş ve dolayısıyla büyüme geriliği meydana gelmiştir (Lagriffoul ve ark., 1998). Başka bir çalışma ise, mısır bitkisinde, farklı konsantrasyonlarda Cd'ye maruz kalmanın Mn ve Zn birikimini azalttığını göstermiştir (Wang ve ark., 2007). Mısır bitkisinin kök hücrelerinin çeperlerinde lignin biriktirme potansiyelini artırarak çeperin sertleşmesine ve nihayetinde kök gelişiminin inhibisyonuna neden olur; ayrıca bitkinin mineral alımını azaltır, proteinleri etkileyerek enzim sentezini bozar ve lipid peroksidasyonu ile membran hasarı yaratır (Pál ve ark., 2006). İki çeşit mısır ile yapılan bir araştırma, Cd stresi ile mısırlarda ROS üretiminin arttığını, lipid peroksidasyonunun geliştiğini ve neticede her iki mısır çeşidinde de tane veriminin % 4-11 aralığında azalış gösterdiğini ortaya koymuştur (Anjum ve ark., 2015). Kadmiyum stresine maruz bırakılan mısır fidelerine aseton *O*-(4-klorofenilsülfonil) oksim ön uygulamasının fotosentetik parametreler üzerinde stresin olumsuz etkilerini hafiflettiği gösterilmiştir (Demiralay, 2022).

1.2 Bitkilerin Abiyotik Stres Faktörlerine Moleküler Cevapları

1.2.1 Reaktif oksijen türlerinin oluşumu

Bitkilerde özellikle ağır metaller, radyasyon, yaralanma, toprak tuzluluğu, yüksek ışık, kuraklık, sıcaklık değişimleri, ksenobiyotikler gibi abiyotik stres koşullarında reaktif oksijen türleri hemen hemen her hücrede oluşturulmakta fakat en yoğun olarak kloroplast, mitokondri ve peroksizomlarda üretilmektedir. Doğası gereği düşük reaktiviteye sahip O_2 'nin, stres koşullarında reaktivitesi monovalent indirgenme reaksiyonları ile artmakta ve ROS oluşumu ile sonuçlanan bir dizi reaksiyon meydana gelmektedir.



Şekil 1. 2 Ağır metal stresinde ROS oluşumu (Benavides ve ark., 2005)

1.2.1.1 Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Moleküler oksijenin bir e^- olarak kararsız bir yapıya indirgenmesi ile oluşur. H_2O_2 kaynağı olabildiği için zararlı bir radikaldir.

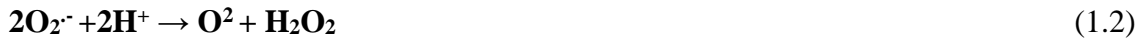


Triticum durum L. bitkisi üzerinde yapılan bir çalışma, kuraklığa dayanıklı (cv. Ofanto) çeşitinde susuzluk ile birlikte üretilen süperoksit radikalinin kontrol gruplarında üretilenden farklı olmadığını fakat kuraklığa duyarlı (cv. Adamello) çeşidinde süperoksit radikali üretiminin %40 oranında artış gösterdiğini ortaya koymuştur (Quartacci ve ark., 1994). *Morus alba* L. (cv. Kanva-2) bitkisi üzerinde yapılan bir çalışma da göstermektedir ki, Cu yetersizliği ve fazlalığı ile bitkinin abiyotik strese maruz bırakılması sonucunda H_2O_2 ile birlikte süperoksit radikali üretimi de artmaktadır (Tewari ve ark., 2006).

1.2.1.2 Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Süperoksit dismutasyonu ya da direkt moleküler oksijenin iki e^- olarak indirgenmesi ile meydana gelir. Bitkilerde sinyal iletim molekülü olarak görev almasının

yanı sıra (Saxena ve ark., 2016), biyotik ve abiyotik stres faktörlerine yanıtta da oluşan ilk cevaplardan biridir.



Bitkilerde abiyotik stres faktörleri, ABA gibi bazı hormonlar ve bitki yaralanmaları ile oluşan H_2O_2 'nin temel kaynakları; elektron akış hızı yüksek kloroplastlar, mitokondriler, peroksizomlar ve hücre zarında gerçekleşen tepkimelerdir (Öcal Özdamar ve ark., 2016). Tuz stresine maruz kalan *Cicer arietinum* L. bitkisinde (Sheokand ve ark., 2010), *Cucumis sativus* L. kalluslarında (Abu-Romman ve Suwwan, 2009) ve *Triticum aestivum* L.'nin üç ayrı kültüründe (Şen ve Alikamanoğlu, 2015) H_2O_2 üretiminin arttığı ortaya konulmuştur.

1.2.1.3 Hidroksil radikali (OH^{\cdot})

Temel oluşum kaynakları süperoksit radikali ve geçiş metallere aittir. Süperoksit radikali ile H_2O_2 'nin tepkimeye girmesi hidroksil radikalini verir (Haber-Weiss Reaksiyonu).



Geçiş metallere aittir ve H_2O_2 'den meydana gelebilir (Fenton Reaksiyonu).



Atriplex canescens L. bitkisinde alkali boksit kalıntısı ile oksidatif stres oluşturan reaktif oksijen türleri arasında en çok hasarın OH^{\cdot} ile meydana geldiği gözlemlenmiştir (Shi ve ark., 2017). Her ne kadar önceki yıllarda yapılan birçok çalışma OH^{\cdot} 'nin ağır reaktivitesine ve hücrelere verdiği hasara odaklansa da son yıllarda yapılan bazı çalışmalar ile OH^{\cdot} radikalinin oksidatif stres meydana getirmek dışında bitkinin çimlenmesi, bağışıklık cevabı ve strese tolerans geliştirmesi gibi metabolik faaliyetlerde görevli olduğu ayrıca bitki ölümünden sonra bitkinin ayrışmasında görev alarak düzenleyici bir molekül olabileceği yönünde kanıtlar mevcuttur (Richards ve ark., 2015).

1.2.1.4 Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)

Moleküler oksijenin elektronunun yüksek enerji ile spinine ters bir orbitale yer değiştirmesi ile oluşur.



Şekil 1. 3 Singlet oksijenin oluşumu (Edreva, 2005)

Singlet oksijen yarı kararlı, spin kısıtlaması olmayan, radikal olarak kabul edilmeyen ancak bitkide stres oluşturan koşullarda biyolojik makromolekülleri oksitleyebilen, lipid peroksidasyonuna neden olabilen bir moleküldür (Knox ve Dodge, 1985). DNA, lipidler ve proteinlere verdiği oksidatif hasarın yanı sıra kloroplasttan çekirdeğe bilgi iletiminde görevli bir sinyal molekülü olarak da çalışır (Dmitrieva ve ark., 2020)

1.2.2 Enzimatik antioksidan savunma sistemleri

Enzimatik ve non-enzimatik olarak ayrılan antioksidan sistemler hücrelerde DNA, protein, lipid gibi makromoleküllerin reaktif oksijen türleri ile oksidasyonunun önüne geçen ya da oksitlemeyi geciktirici olarak çalışan sistemlerdir. Aerobik canlılar hem normal hem de stresli koşullarda reaktif oksijen türleri üretirler. Bunların detoksifikasyonundan antioksidan sistemler sorumludur. Enzimatik antioksidan sistemler oksijen radikallerindeki elektron eksiklerini enzimatik reaksiyonlar ile tamamlayarak radikali zararsız hale getirip savunma oluştururlar.

Yüksek yapılı bitkiler strese maruz kaldıklarında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon peroksidaz (GPX), peroksiredoksin (Prx), tioredoksin (Trx), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), peroksidaz (PODs), glutatyon S-transferaz (GSTs), glutatyon redüktaz (GR) enzimatik antioksidanlarını meydana getirirler.

1.2.2.1 Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit radikalini substrat olarak kullanır ve hidrojen peroksit ile moleküler oksijene çevirerek süperoksit dismutasyonunu sağlar. Bu metalloenzimin bitkilerde farklı metalleri prostetik grup olarak kullanan üç grubu (bakır ve çinko içeren enzimler, manganez içeren enzimler ve demir içeren enzimler) mevcuttur (Gupta ve ark., 2018).

Yüksek sıcaklık stresine maruz bırakılan farklı genotiplerde beş buğday çeşidi ile yapılan bir çalışmada süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz ve katalaz aktivitelerinin bitkilerin gelişim aşamalarının tamamında stresin etkisi ile artış gösterdiği gözlemlenmiştir (Almeselmani ve ark., 2006). *Cucumis sativus* L. bitkileri 4°C'lik ortamda soğuk stresine maruz bırakılmış ve CAT aktiviteleri düşüş gösterirken SOD, APX, GR ve PODs aktiviteleri ise artış göstermiştir (Lee ve Lee, 2000). Yapılan bir başka çalışma ile *Oryza sativa* L. bitkisinde tuz stresi ile manganez içeren SOD'un iki izoformu,

bakır ve çinko içeren SOD'un beş izoformu ayrıca APX'in ve GR'nin de yedişer izoformu oluşmuştur (Lee ve ark., 2001).

1.2.2.2 Askorbat peroksidaz (APX)

Farklı izoformları bulunan askorbat peroksidaz enzimi hidrojen peroksitin askorbattan aldığı elektronlar sayesinde suya indirgenmesini sağlayan reaksiyonu katalizler. APX bitkilerde kloroplast, mitokondri, peroksizom ve sitozol gibi bölümlerde üretilmekle birlikte; kloroplastlardaki APX üretimi askorbat miktarına bağlıdır, askorbat azaldıkça APX üretimi azalır (Gupta ve ark., 2018). Katalaza kıyasla APX'in H_2O_2 'ye bağlanma ilgisi daha yüksektir (Kireççi, 2018).

Oryza sativa L. bitkisinde tuz stresörüne bağlı SOD üretimi H_2O_2 üretiminin artışına sebep olmuş, H_2O_2 ise strese bağlı sinyal yolu oluşturarak APX üretim artışını tetiklemiştir (Lee ve ark., 2001). Çöl bitkileri olan *Peganum harmala* ve *Halogeton glomeratus* Ni-Cu içeren üç ayrı konsantrasyonda solüsyonlar ile ağır metal stresine maruz bırakılmış ve *H. glomeratus*'da tüm konsantrasyonlarda APX değerleri kontrole kıyasla artış gösterirken, *P. harmala*'da 1HM solüsyon uygulaması kontrole kıyasla APX değerini kayda değer arttırmış fakat ilginç bir şekilde 10HM ve 20HM solüsyonlarda APX değeri kontrolün altına düşmüştür (Lu ve ark., 2010).

1.2.2.3 Katalaz (CAT)

Bitkilerde temel üretim yerleri peroksizomlar olan katalaz, H_2O_2 'nin detoksifiye edilmesinde ayrıca lignifikasyonda görev alan enzimdir (Kireççi, 2018). H_2O_2 'in parçalanarak H_2O ve O_2 şeklinde, biyolojik sistemlere zarar vermeyecek, forma dönüşmesini sağlar. Reaktif oksijen türlerindeki artışla beraber ağırlaşan stres koşullarına bitkiler peroksizom sayılarını ve böylelikle de katalaz üretim miktarlarını arttırarak cevap verirler (Bhaduri ve Fulekar, 2012). *Nicotiana tabacum* bitkilerinin farklı mutantları Cd ve Zn içeren topraklarda büyütüldüklerinde, ağır metal stresi meydana gelmekte ve buna bağlı olarak da SOD, CAT enzimleri artış gösterirken GST enziminin izoformları azalma göstermiştir (Lyubenova ve ark., 2009). Yapılan başka bir çalışma, kuraklık stresine maruz bırakılan 9 ekmeklik buğday çeşidinde CAT aktivitesinin artmış olduğunu fakat çiçeklenme süresinin uzamış, tane sayısının ve ağırlığının ise azalmış olduğunu göstermiş ve bu durumun CAT aktivitesindeki artış ile kuraklığa tolerans arasında pozitif korelasyondan kaynaklandığı düşünülmüştür (Kutlu ve ark., 2017).

1.2.2.4 Guaiakol peroksidaz (GPX)

Peroksidazlar ailesine ait sınıf III bitki peroksidazları birçok izoenzim içeren geniş bir gruptur ve guaiakol peroksidaz görevlerinden biri oksiredüksiyon olan bir peroksidaz çeşididir (Hiraga ve ark., 2001). H_2O_2 'nin detoksifikasyonunda görev alır. Guaiakol peroksidaz substrat olarak guaiakolü kullanır, sitoplazma ve hücre duvarında aktiftir (Tayefi-Nasrabadi ve ark., 2011). Bakır stresi altındaki *Beta vulgaris* L. bitkilerinde betasiyanin birikim miktarının ve guaiakol peroksidaz aktivitesinin gözlemlendiği bir çalışmaya göre, bakır ağır metaline maruziyetin 3. gününden itibaren genç yapraklarda enzim aktivitesi 3,3 kat artarken yaşlı yapraklarda artış 1,4 kat olmuştur (Morales ve ark., 2012).

1.2.3 Enzimatik olmayan savunma sistemleri

Düşük molekül ağırlıklı, çoğunlukla membranlarda aktif çalışan savunma sistemleridir (Waśkiewicz ve ark., 2014). Hücre bölünmelerinden hücre ölümüne kadar birçok yerde ve abiyotik stres cevabında görev alırlar (de Pinto ve De Gara, 2004).

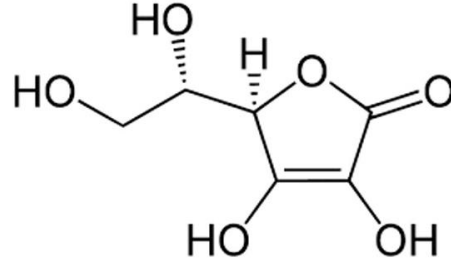
Çizelge 1.1 Bitkilerde enzimatik olmayan antioksidanlar

Enzimatik olmayan antioksidanlar	Rolü	Hücresel Lokasyonu
Askorbik asit	Direkt olarak O_2^- , OH^- ve H_2O_2 'yu temizler.	Kloroplast, apoplast, vakuol, sitozol
Tokoferoller	Lipid peroksidasyonunu kırar. Lipid peroksitlerini, O_2^- , OH^- 'i temizler.	Bitkilerin tüm kısımlarında bulunur. En çok kloroplast membranlarında bulunur.
Karotenoidler	Peroksi radikalleri ile O_2^- ve OH^- 'i temizler.	Sitozol, vakuol
Glutasyon	Redoks döngüsünün bir substratı olarak OH^- ile 1O_2 'nin direkt temizlenmesinde yararlıdır.	Sitozol, vakuol, endoplazmik retikulum, mitokondri
Fenolik Bileşikler	Antioksidan özelliklerini iyi birer hidrojen veya elektron vericisi olmaları, zincir kırıcı özellikleri ve geçiş metalleri ile şelat oluşturmaları sayesinde gösterirler.	Sitozol, vakuol

1.2.3.1 Askorbik asit (AsA-C vitamini-Askorbat)

Sentezi mitokondride gerçekleşen askorbik asit (Horemans ve ark., 2000) bitkide hücre bölünmesinden fotosenteze birçok metabolik faaliyette düzenleyicilik yapan, enzim kofaktörü olarak kullanılan ve bitkinin maruz kaldığı stres durumlarında ise oksidatif

dirençte serbest radikal yakalayıcı olarak rol oynayan önemli bir antioksidandır (Kireççi, 2018).

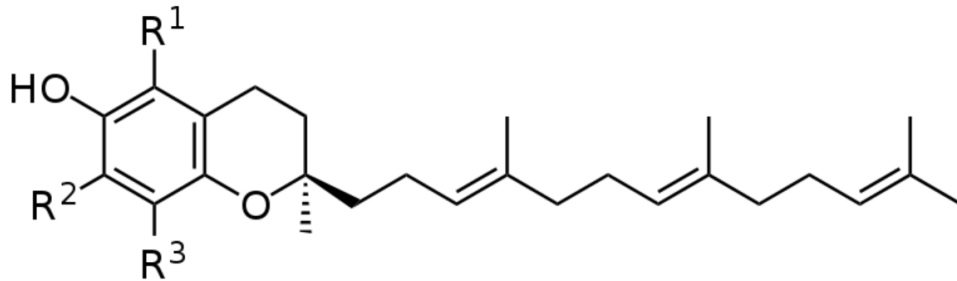


Şekil 1. 4 Askorbik asit

ABA, SA, GA gibi birçok bitkisel hormonun sentezinde kofaktör olarak bulunduğu için oksidatif stres bu hormonların sentez reaksiyonlarını da bozacaktır (Mazid ve ark., 2011). Tuz stresine maruz bırakılan *Zea mays* L. bitkilerinde, ekzojen askorbik asit uygulamasının bitkinin fotosentetik pigmentlerinin korunmasında ve bitkinin oksidatif direnç geliştirmesinde destek sağladığı gözlemlenmiştir (Doğru ve Torlak, 2020). Bir çalışma *Arabidopsis thaliana*'nın vtc-1 mutantında düşük miktarda AsA'nın kloroplastlarda malondialdehit üretimini artırıp α -tokoferol ve β -karoten seviyelerini ise düşürerek membran hasarının oluşumunu tetiklediğini göstermiştir (Munné-Bosch ve Alegre, 2002).

1.2.3.2 Tokoferoller

Bitkiler için vazgeçilmez redoks tamponlarıdır (Foyer ve Noctor, 2005). Reaktif oksijen türlerinin yanı sıra lipid oksidasyon ürünlerinin de süpürülmesinde görevlidir. Yağda çözünebilir tokoferollerin α , β , δ , γ olmak üzere çeşitleri mevcuttur (Waśkiewicz ve ark., 2014) ve oksidatif stres ile gen ekspresyonlarının arttığı gözlemlenmiştir (Kireççi, 2018).



Şekil 1. 5 Tokoferollerin genel yapısı

Bakla bitkisine spray şeklinde uygulanan α -tokoferol sonrası bitkide büyüme gelişme ve verim olumlu etkilenmiştir (El Bassiouny ve ark., 2005). *Oryza sativa* L.

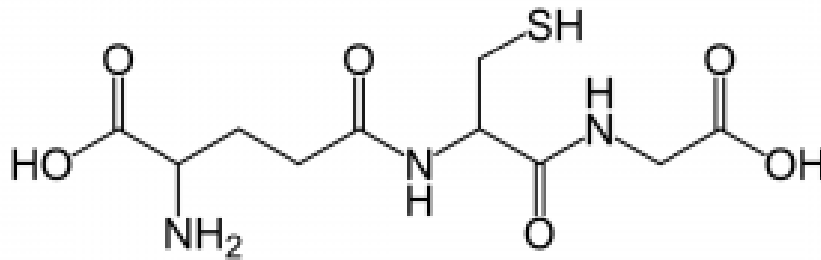
bitkisinin su stresine maruz bırakıldığında verdiği ilk savunma cevaplarından biri askorbat ve α -tokoferol üretimini arttırmak olmuştur (Boo ve Jung, 1999).

1.2.3.3 Karotenoidler

Bitkiler tarafından üretilen karotenoidlerin 600'den fazla çeşidi mevcuttur (Kireççi, 2018). Plastitlerde üretilirler ve singlet oksijenin detoksifikasyonunda diğer non-enzimatik antioksidanlar ile sinerjik olarak çalışarak strese savunma oluştururlar. İzoprenoid türevi olan karotenoidlerin kloroplastlarda bulunanları iç membranda görev alırken, kromoplastlardakiler ise, karotenoid-lipoprotein birlikteliklerini oluşturmak için polar lipidler ile iş birliği yaparlar (Waśkiewicz ve ark., 2014). *Lycopersicon esculentum* Mill. bitkisinde tuz ve azot içeren gübre bileşimi uygulamasının etkilerine bakılmış ve orta derecede tuzluluğun karotenoid seviyesini %40 arttırdığı fakat yüksek orandaki tuzluluğun karotenoidleri (özellikle likopen) olumsuz etkilediği sonucuna varılmıştır (Pascale ve ark., 2001).

1.2.3.4 Glutasyon

Sistein içeren tripeptit yapısındaki glutasyon bitki hücrelerinin neredeyse tüm hücre bölümlerinde yer alır ve ROS'ların temizlenmesinde görevlidir (Waśkiewicz ve ark., 2014). Ayrıca hücre döngüsünün devamlılığı ve meristem büyümesi gibi metabolik olaylarda da kullanılır (Foyer ve Noctor, 2005). Bitkiler indirgenmiş (GSH) ve oksitlenmiş disülfit formu (GSSG) olarak iki form halinde glutasyon bulundurur (Shu ve ark., 2011).



Şekil 1. 6 Glutasyon

Son veriler glutasyonun bitkilerdeki metilglioksal birikimi ve ağır metal stresine karşı önemli bir savunma sağlayan antioksidan olduğunu göstermektedir (Hossain ve ark., 2012). Tuz stresine maruz bırakılan *Cicer arietinum* L. bitkilerinde yapraklardan verilen glutasyon desteğinin reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonunda ve membran hasarının önlenmesinde yardımcı antioksidan olduğu gösterilmiştir (Sadak ve ark., 2017).

1.2.3.5 Fenolik bileşikler

Yapılarında hidroksil içeren fenol aromatik halka bulunduran bitkisel kaynaklı sekonder metabolitlerdir. Fenolik asitler ve flavonoidler olarak iki gruba ayrılırlar. Bitkilerde renk, tat, koku oluşumunda (Boudet, 2007), UV ışınlarına karşı korunmada, oksidatif strese neden olan serbest radikallerin temizlenmesinde (Laura ve ark., 2019) görevlidirler. Lignin gibi bitkisel yapıya katılan çeşitleri olduğu gibi sinyal iletim yolunda görevli çeşitleri de mevcuttur (Vermerris ve Nicholson, 2007). Fenolik bileşiklerin ağır metal stresi ile metalleri şelatlayarak baş ettikleri düşünülmektedir (Michalak, 2006). Sıcaklık stresine maruz bırakılan *Lycopersicon esculentum* L. ve *Citrullus lanatus* bitkilerinde meydana gelen reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu oksidatif stres bitkilerin fenolik bileşikleri sentezleme oranlarının artışına neden olmuştur (Rivero ve ark., 2001). Tuz stresinin, *Fagopyrum esculentum* M. bitkisinin besin kalitesine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada tuz konsantrasyonu arttıkça fenolik bileşiklerin ve karotenoidlerin üretim miktarının arttığı gözlemlenmiştir (Lim ve ark., 2012).

1.2.4 Ozmolitlerin üretimi

Bitkilerde suyun sitoplazma dışına çıkışını engelleyerek turgor homeostazisini sağlayan, ozmoprotektan olarak çalışan, çözünür maddelerdir (Büyük ve ark., 2012a). Prolin ve asparajin gibi amino asitler, amidler, imino asitler, betain, poliaminler, proteinler ve organik asitler bitkilerde en sık rastlanan ozmolitlerdir. Ozmotik strese cevap olarak sitoplazmada biriken ozmolitler dehidrasyonu engellemeye çalışırlar. Kuraklık stresinde bitkilerin ilk biriktirdiği ozmoprotektan prolindir (Büyük ve ark., 2012a). Mısır bitkisinin iki genotipi (Wandan 13 ve Runnong 35) kullanılarak yapılan bir çalışmada bitkiler farklı konsantrasyonlarda Cr çözeltisi ile muamele edilmiş ve bitki hücrelerinde Cr stresi ile serbest prolin, şeker, protein ve fenolik bileşiklerin birikim gösterdiği gözlemlenmiştir (Anjum ve ark., 2017). *Solanum lycopersicum* L. bitkisi üzerinde yapılan bir çalışma Cd stresinin prolin ve glisin betain ozmoprotektanlarını kontrole kıyasla sırayla 4,28 ve 2,04 kat arttırdığını fakat selenyum desteği ile bu artışın Cd'ye maruz kalan bitkilerdeki değerden (prolinde 1,31 kat ve glisin betainde 1,13 kat) daha fazla olduğunu ortaya koymuştur (Alyemeni ve ark., 2018).

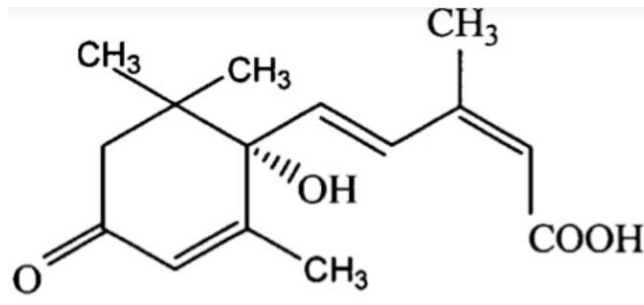
1.2.5 Lipid preoksidasyonu

Bitkilerde lipid peroksidasyonu, lipoksijenaz (LOX) katalizörlüğünde gerçekleşen enzimatik yolla ya da serbest yağ asitlerinin yükseltgenmesiyle başlayan non-

enzimatik yolla gerçekleşebilir (Skorzynska-Polit, 2007). Meydana gelen peroksit türevleri hücre membranlarına geri dönüşümü olmayan hasarlar verir (Yarsan, 1998). Lipid peroksidasyonunun tayini birtakım belirteçler ile yapılır. Reaksiyonlar sırasında üretilen malondialdehit, hidroksialkallenler gibi aldehit türevlerinin birikimi lipid peroksidasyonun kanıtı olduğu için analizlerde bu belirteçlere bakılır. Çoklu ağır metal (Pb, Cd ve Hg karışımı) çözeltisinin farklı yoğunluklarına maruz bırakılan *Kandelia candel* ve *Bruguiera gymnorrhiza* bitkileri ile yapılan bir çalışmada, *K. candel* bitkilerinin ağır metallere *B. gymnorrhiza* bitkilerine kıyasla tolerans geliştirmiş olduğu ve lipid peroksidasyonunun yalnızca strese daha az dayanıklı *B. gymnorrhiza*'da artış gösterdiği tespit edilmiştir (Zhang ve ark., 2007). Yamauchi ve ark. (2008) tarafından *Arabidopsis thaliana*, *Cucumis sativus* L. ve *Spinachia oleaceae* bitkileri kullanılarak yapılan bir çalışma yüksek sıcaklık stresine maruz kalan bitkilerde hücre membranlarındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu ile MDA gibi aldehitlerin oluştuğunu göstermiştir.

1.2.6 Absisik Asit (ABA)

Kimyasal yapısı 1963'de belirlenen ABA bitkinin kök, gövde, tohum, meyve, yaprak gibi hemen her parçasında bulunabilen bir seskiterpendir (Çetin, 2014). Öncülü mevalonik asit olan ABA yoğun olarak yapraklarda sentezlenip diğer organlara taşınan bir büyüme regülatörüdür ve yaprak dökümü, tomurcuk gelişiminin engellenmesi, dormansinin devamlılığının sağlanması, erken çimlenmenin önlenmesi ve stoma kapanmasının tetiklenmesi gibi birçok metabolik göreve sahiptir (Kumlay ve Eryiğit, 2011).



Şekil 1. 7 Absisik asit

ABA kuraklık stresinde bitkide birikim göstererek farklı sinyal yolları ile protein sentezini yavaşlatarak stoma kapanmasına neden olur (Postiglione ve Muday, 2020). Kuraklığa dayanıklı ve kuraklık hassasiyeti bulunan iki mısır hibriti ile yapılan bir çalışmada farklı konsantrasyonlarda ABA uygulanan bitkilerin kuraklık stresine

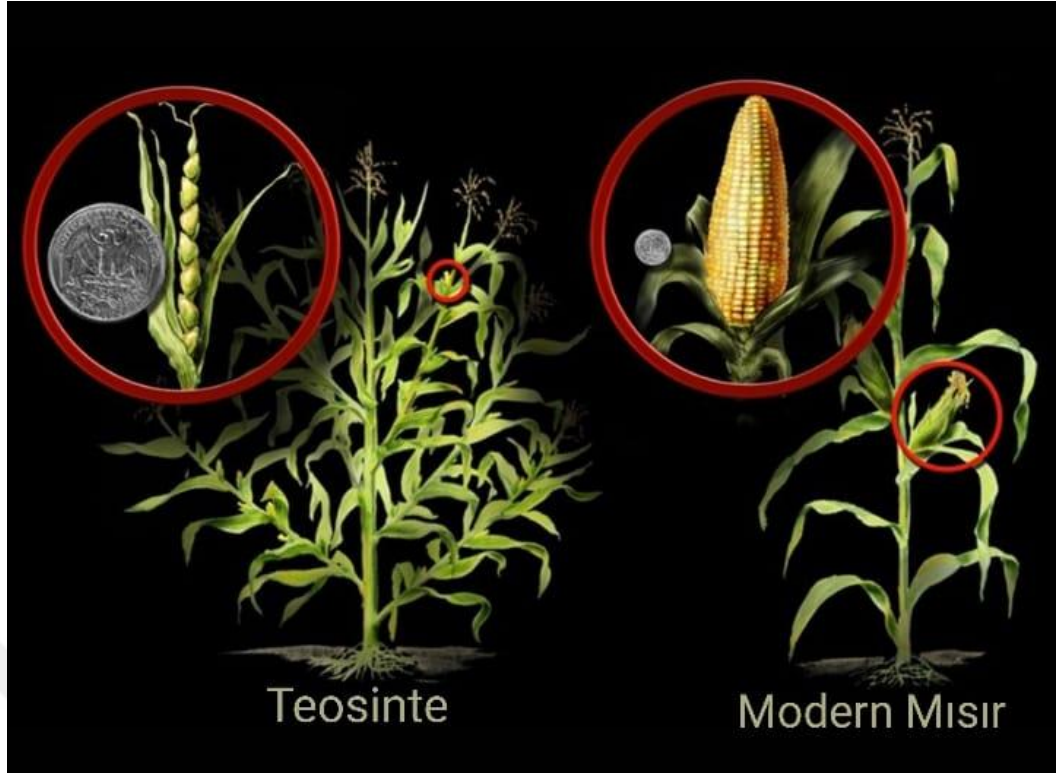
cevapları araştırılmış ve eksojen ABA desteğinin, bitkilerde kuraklığa dayanıklı hibritte daha etkili olmak üzere çimlenmeyi, bitki biyomasını, antioksidan enzim seviyelerini olumlu etkilediği bununla birlikte oksidatif stresi hafiflettiği , MDA içeriklerini düşürdüğü böylelikle de bitkilerin kuraklık stresine direnç geliştirmelerinde destek sağladığı gösterilmiştir (Yao ve ark., 2019).

1.3 Geçmişten Günümüze Mısır Bitkisi

Kökeni 55-70 milyon yıl öncesine dayanan mısır bitkisi (Scott ve Emery, 2016), bugünkü tüketim şekli olan modern mısıra, Meksika'nın Oaxaca ve Jalisco eyaletleri arasında çeşitlenmiş ve Amerika üzerinden tüm dünyaya yayılmıştır (Strable ve Scanlon, 2009). Şu anki doğal yayılım alanı Amerika'dır. Büyüme döneminde nemli toprağa gereksinim duyar. *Poaceae* ailesine ait bitki, stamenleri tepe püskülünde dişi pistili ise gövde üzerindeki düğümlerde yer alan tek evcikli yapıya sahiptir (Scott ve Emery, 2016). Diploid kromozom yapısına sahip tek yıllık bir bitkidir. Angiosperm yapılı mısırdaki polen dağılımı (bitki başına ortalama 1 milyar polen şeklinde) rüzgâr ile gerçekleşir ve çifte döllenme ile embriyo oluşumu sağlanır. Çekirdeği karyopsis yapılıdır, sertleşen perikarp tohum ile beraber büyür. C₄ metabolizmasına sahip bir bitki olan mısırın organik madde birikimi yüksektir.

Dünya tahıl tüketiminde önemli 6 tahıldan biri olan mısırın üretiminde başı çeken ülkeler ABD, Çin ve Brezilya'dır (Akkurt ve Demirbaş, 2021). Yaygın üretiminin nedeni kullanım alanının geniş olmasından kaynaklanır. İnsan beslenmesinde, hayvan beslenmesinde (kaliteli yem olarak), endüstrinin birçok kolunda hammadde olarak kullanımlarının yanı sıra biyoenerji ve etanol üretiminde ve bilimsel çalışmalarda model bitki olarak da kullanılmaktadır.

Son yıllarda mısır bitkisinin fitoremediasyonda kullanılabilirliği üzerine çalışmalar yürütülmektedir. Ağır metal ile kirlenmiş topraklar için ekonomik, uygulanabilir ve ekolojik olarak da güvenli bir yöntem olması açısından fitoremediasyon önemlidir.



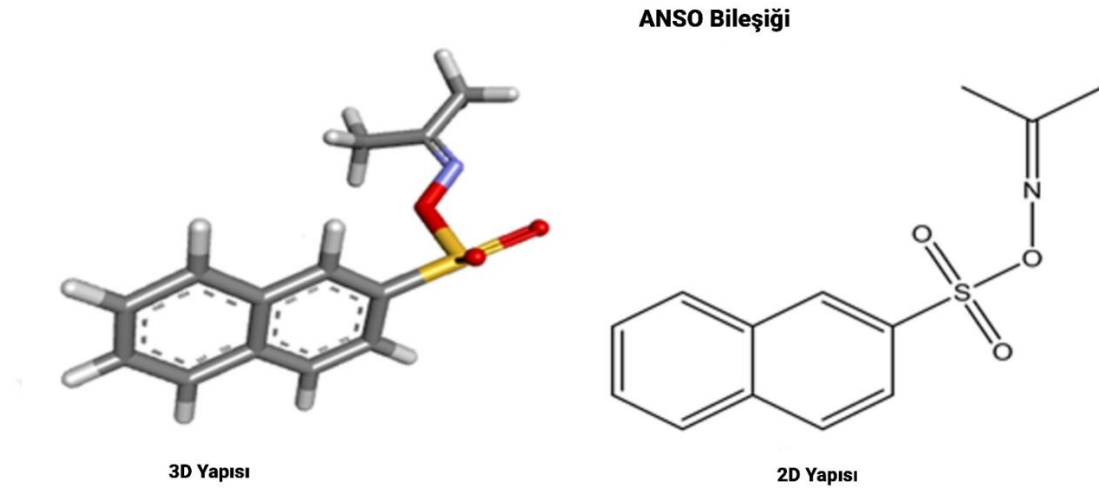
Şekil 1. 8 Teosinte (modern mısırın atası) ve evcilleştirilmiş mısırın dallanma ve çiçeklenme farkları (Piperno ve ark., 2015)

1.4 Aseton *O*-(2-naftilsülfonil)oksim Maddesi

Bitkilerde oksimler nitrojen içeren CYP79 enzim ailesinin katalizörlüğünde amino asitlerden sentezlenen biyoaktif kimyasal moleküllerdir (Sørensen ve ark., 2018). Tüm kimyasal fonksiyonları henüz tam netlik kazanmamış olan oksimlerin tespit edilen antioksidan özellik, inflamasyona karşı koruyuculuk, mikroorganizmalar ile savaşma ve kansere karşı koruyuculuk gibi görevleri mevcuttur (Surowiak ve ark., 2020). Amfoter özellik gösteren oksimler yapılarında bir ya da birden fazla $-C=NOH$ grubu içerirler.

ANSO bir ketoksim çeşitidir. Yapılan bir çalışmaya göre ANSO'da, aseton *O*-(4-klorofenilsülfonil)oksim'e kıyasla diarsenik kadmiyum reaktiflerinin bakır katalizörlü elektrofilik aminasyondaki etkinlikleri daha azdır (Korkmaz, 2021a). Fakat aril kadmiyum iyodürlerin ANSO ve aseton *O*-(4-klorofenilsülfonil) oksim ile elektrofilik aminasyonunun incelemesi yapıldığında ANSO'nun daha iyi verim oluşturan bir madde olduğu gösterilmiştir (Korkmaz, 2021b). Başka bir çalışmada aseton *O*-(4-klorofenilsülfonil) oksim ön uygulaması yapılan mısır bitkilerinde bakır stresörüne karşı direnç geliştiği yani antioksidan sistem enzimlerinin reaktif oksijen ürünlerinin süpürülmesini sağladığı gözlemlenmiştir (Yetişsin ve Kardeş, 2022). ANSO molekülünün bir türevi olan aseton *O*-(4-klorofenilsülfonil) oksim ile yapılan bir çalışmada, kadmiyum stresine maruz bırakılan mısır bitkisinde aseton *O*-(4-

klorofenilsülfolil) oksim ön uygulamasının, biyokimyasal parametreler üzerindeki iyileştirici etkisinin yanı sıra fotosentez oranı, transpirasyon ve stoma iletkenliği üzerinde de kadmiyum stresinin olumsuz etkilerini hafifletici etki gösterdiği kaydedilmiştir (Demiralay, 2022).



Şekil 1. 9 ANSO'nun yapısı

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Ağır metaller doğal ve antropojenik yollarla ekosisteme yayılan ekotoksisite yaratan heterojen bir element grubudur. Çinko, bakır, manganez, molibden, demir gibi eser miktarlarda canlılara faydalı olabilen bazı çeşitleri de yüksek konsantrasyonlarda tüm organizmalar için toksiktir. Bu elementlere örnek olarak verilebilecek olan bakır iz miktarda bitkinin metabolik faaliyetleri için gereklidir; karbonhidrat ve protein metabolizmasında, solunumda görev alır. Bununla birlikte bakır, bitki tarafından yeterinden fazla alındığında; ROS üretimine yol açmakta, organik madde birikimini ve kök gelişimini yavaşlatmakta, yapraklarda fizyolojik ve kimyasal deformasyonlara neden olmaktadır (Sağlam ve ark., 2016).

Toprakta ağır metal kirliliği besin zincirinin önemli bir parçası olan bitkileri etkilediği için küresel tehdit oluşturmaktadır. Özellikle de dünya beslenmesinde stratejik öneme sahip tahıl ürünleri için ciddi stres kaynağı olan ağır metaller yarılanma ömürleri uzun olduğundan eliminasyonları sorun yaratan elementlerdir.

Kadmiyum elementi bilinen yaşam formları içinde sadece bir deniz diatomu olan *Thalassiosira weissflogii* hariç tüm canlılar için iz miktarda bile toksik olan bir ağır metaldir. *Thalassiosira weissflogii*'de Zn eksikliğinde Cd, karbonik anhidraz enziminin kofaktörü olarak metabolizmanın devamını sağlayabilmektedir (Lee ve ark., 1995). Fakat Cd bitkiler için hem düşük hem de yüksek konsantrasyonlarda mutlak toksiktir.

Cd stresi bitkilerde klorofil sentezini inhibe ederek fotosentezi sınırlar (Farid ve ark., 2013); elektron taşıma sistemine ve redoks homeostazisine zarar vererek ROS oluşumuna dolayısıyla da oksidatif strese neden olur (Singh ve Prasad, 2014); bitki çimlenmesini, fide gelişimini, bağıl su miktarını azaltır (Kuriakose ve Prasad, 2008), stomal iletkenliği ve sinyal iletimini olumsuz etkiler. Reaktif oksijen türlerinin üretimine neden olan Cd, bitkinin DNA'sında gen mutasyonlarının oluşmasını tetikleyerek kromozomal bozuklukların önünü açar.

Pinus pinea L. ve *Pinus pinaster* Ait. bitkilerinin yüksek konsantrasyonda Cd (5 μM Cd^{2+}) ve düşük konsantrasyonda Cu ve Cd karışımı (1 μM Cd^{2+} + 1 μM Cu^{2+}) ile muamelesi sonucunda bitkilerin her ikisinde de, çözeltilerin tamamında, kazık kök gelişiminin inhibe olduğu görülmüştür (Arduini ve ark., 1994). *Medicago sativa* bitkisi ile yapılan bir çalışmada Cd veya Hg eklenerek hazırlanan kültürlerde 6-24 saat tutulan bitki fidelerinde, farklı yöntemler ile stres ölçümleri yapılmış ve analizlerin ortak

sonucuna göre ağır metal stresi bitkide belirgin olarak oksidatif stresi arttırmış ayrıca hücre nekrozunu tetiklemiştir (Ortega-Villasante ve ark., 2005).

Kadmiyum direnci yüksek *Koelreuteria paniculata* bitkisi, farklı konsantrasyonlarda Cd ile muamele edilmiş ve bitkinin 150-250 µM arası Cd'ye dayanabildiği, AsA (Askorbik asit) ile GSH (glutatyon) üretimini arttırarak duruma tepki verdiği görülmüştür fakat 250 µM üzeri yoğunluklarda Cd değerlerine dayanamayan bitkide IAA (oksin), GA (giberellin) ve ZT (zeatin) azalması görülmüş belirgin membran hasarları meydana gelmiştir (Yang ve ark., 2018).

Reaktif oksijen türleri (ROS) ile birlikte reaktif nitrojen türleri (RNS) de bitkilerin kadmiyum stresine maruz kaldıklarında oluşturdukları cevaplardandır. Yeterli miktarda üretildiklerinde sinyal yollarında çalışan bu moleküller yüksek miktarda üretildiklerinde oksidatif hasarın yolunu açmaktadırlar (Romero-Puertas ve ark., 2019).

Kadmiyum suda çözünebilir ve bitkilerde yüksek mobilite gösterebilen bir geçiş metali olduğu için çok tehlikelidir. Bitki için elzem olabilen bazı katyonların (Ca^{+2} , Fe^{+2} , Ca^{+2} , Mg^{+2} gibi katyonlar) hücre içine giriş yolu olan membran taşıyıcılarını kullanabilir (Sandalio ve ark., 2009). Hücre içinde ise Cd'nin tecridi için fitoşelatinler adında bir peptit grubu üretilir; görevleri Cd'u bağlayarak etkisiz hale getirip vakuole taşımaktır (Ahmad ve ark., 2019). Fitoşelatinler daha sonra vakuolün asidik ortamında Cd'den ayrılıp ya parçalanırlar ya da sitozole geri gönderilirler (Pál ve ark., 2006).

Singh ve Prasad (2014) tarafından yapılan bir çalışmada *Solanum melongena* L. bitkilerine farklı dozlarda uygulanan Cd ile oksijen radikalleri artmış, fotosentetik etkinlik azalmış ve fide gelişimi inhibe olmuştur; fakat bitki örneklerine bir sitokinin çeşidi olan kinetin desteği verildiğinde Cd stresinin neden olduğu olumsuz sonuçlar hafiflemiştir. *Trigonella foenum-graecum* bitkileri Cd stresine maruz kaldıklarında nisbi su içeriklerinin, CO₂ özümlemesinin ve stomal hareketliliğin azaldığı fakat bitkiye H₂S ile destek verildiğinde antioksidan enzimlerin sentezlerinin arttığı ayrıca H₂O₂ seviyesinin %38, elektrolit sızıntısının %51 oranında azaldığı gözlemlenmiştir (Javad ve ark., 2022). *Brassica oleracea* L. bitkileri üzerinde yapılan bir çalışmaya göre, Cd stresi altında bulunan bitkiye bütanoid uygulaması yapıldığında Cd varlığında bozulan hücre içi ozmotik denge ve membran geçirgenliği düzelmiş, ROS üretimi azalmış, fotosentetik potansiyel artmış, bitki büyüme gelişmesi olumlu etkilenmiştir (Shah ve ark., 2020). Bu çalışmalar bitkilerde ağır metal toksisitesi ile savaşta başka çözüm yollarının olabileceğini akla getirmektedir. Eğer bitkinin yetiştiği ortamda ağır metal kirlenmesi kaçınılmaz ise

bitkinin normal metabolik faaliyetlerinin devamı için ağır metal stresinin neden olduğu hasarı azaltacak ya da engelleyebilecek alternatif çözüm yolları aranabilir.

Bitkilere verilen fitohormon desteği ağır metal stresinin zararlı etkilerini hafifletecek yollarından biri olabilir. Öncülü karotenoid olan strigolaktonların ağır metal stresine maruz bırakılan bitkilere eksojen olarak verilmesinin ROS üretimini azaltarak bitkinin stresle baş etme kabiliyetini arttırdığı gözlemlenmiştir (Yavaş ve Yelda, 2021). Cd biriktirme eğilimi olan *Oryza sativa* L. bitkilerinde Lizin-Fe kompleksinin eksojen uygulaması bitkide Cd birikim seviyelerini düşürürken Fe birikimini arttırmış, antioksidan enzim sistemini aktifleştirerek stresin olumsuz etkilerini azaltmıştır (Bashir ve ark., 2018).

Kadmiyum kaynaklı bitki hassasiyetini hafifletmek için denenen uygulamalardan biri de ultrasonik tohum muamelesidir. *Brassica napus* L. bitkilerinde 20 KHz frekanslı ultrasonik dalgaların kullanıldığı tohum muamelesinde antioksidan sistemin aktifleştiği, lipid peroksidasyonunun engellendiği, mahsul veriminin arttığı ve bitkinin Cd biriktirme potansiyelinin düştüğü görülmüştür (Rao ve ark., 2019).

Cd stresine maruz kalan *Triticum aestivum* bitkisine, bitki kökünde endosimbiyoz yaşam oluşturan bir mantar çeşidi olan *Piriformospora indica* aşılması, bitkide reaktif oksijen türlerinin temizlenmesini kolaylaştırmış ve strese direnç gelişimini sağlamıştır (Aliloo ve Shahabivand, 2016).

Bitkiler Cd stresi ile baş edebilmek için kaçınma, biriktirme ve savunma şeklinde çeşitli stratejiler geliştirmişlerdir. Cd ile tetiklenen sinyal transdüksiyonu ile detoksifikasyon genleri eksprese olur. MAPK kaskadı, Ca/kalmodulin sistemi ve hormon sentez sinyal yolları ile çekirdeğe bilgi aktarımı gerçekleşir ve bitkilerde Cd stresine cevap oluşturacak genlerin ekspresyonu gerçekleşir (DalCorso ve ark., 2010). *Solanum lycopersicum* bitkileri üzerinde yapılan bir çalışmaya göre E3 ubikuitin ligaz genleri (S11, SIRHE1 ve SIRING1) arasından SIRING1 kadmiyum rejimi altındaki bitkide en etkili genlerdir ve susturulması durumunda oksidatif stres artmış, antioksidan sistem bozulmuş ve bitki gelişimi yavaşlamıştır (Qi ve ark., 2020).

Dünya nüfusu arttıkça ağır metal kirlenmesinin de her geçen gün artış göstereceği ve küresel bir soruna dönüşeceği geleceğe dair öngörülerin tamamında güçlü bir şekilde ifade edilmektedir. Cd toksisitesi yüksek bir ağır metaldir. Mısır gibi küresel öneme sahip bir tahıl ürününde Cd toksisitesi verimi etkileyen önemli bir sorundur. Stresörün yarattığı hasarı hafifletici ya da engelleyici uygulamalar, hatta stresöre rağmen mısır bitkisinin Cd'yi biyokimyasal faaliyetlerden uzak noktalarda biriktirerek bitkinin metabolik

devamlılığının sağlanması için yapılan çalışmalar önem arz etmektedir. Literatür taramalarında Cd rejimine maruz kalan mısır bitkilerinde ANSO ön uygulamasının etkilerini inceleyen herhangi bir çalışma mevcut değildir. Mevcut çalışma dünya genelinde ekimi bu denli geniş alanlarda yapılan bir tahılın verimliliğinin korunması ve devamlılığının sağlanması amacıyla ANSO ön uygulamasının Cd stresi altındaki mısır bitkileri üzerinde oluşturduğu yanıtların etkilerini gözlemlemeyi amaçlamaktadır.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

Çalışmamızda kullanılan *Zea mays* bitkilerine ait örnekler ADA 523 varyantındadır. Tohumlar Sakarya Mısır Enstitüsü'nden tedarik edilerek deneyler gerçekleştirilmiştir. ADA 523 ortalama %8,6 protein, %6 yağ ve %59,6 nişasta verimine sahiptir; FAO olum grubu ise 650-700 yani orta geççidir. Silindirik, orta uzunlukta ve 130-150 cm yükseklikte koçanlar verir. Yaprakları geniş taneleri ise sarı at dişidir.

ADA 523 çeşidinin maruz kaldığı kadmiyum stresine etkisi incelemek için ANSO ise ketoksim grubundan aseto oksimin bir sülfonat türevidir ve laboratuvar ortamında sentetik olarak üretilmiştir. ANSO molekülü kimyager Dr. Adem KORKMAZ tarafından taze olarak sentezlendikten sonra çalışmalarımızda kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

ADA 523 tohumları Muş Alparslan Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında 18°C gece/22 °C gündüz sıcaklığı, %65 ±5 bağıl nem ve 400 µmol m⁻²s⁻¹ ışık yoğunluğu koşulları sağlanarak oluşturulan büyüme ortamında düzenli sulama ile 25±3 günlük süre boyunca tutulmuşlardır. Süre sonunda bitkilerin toprak yüzeyinden 1 cm yukarıdan kesimleri gerçekleştirilip örnekler oluşturulmuştur.

3.2.1 Kadmiyum ve ANSO'nun optimum konsantrasyonunun tayini

Literatür taraması sonucu çalışmamızın ruhuna uygun Cd stresi şiddetinin 100 µM CdCl₂ olmasının uygun olduğuna karar verildi. Dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözdürülen ANSO'nun sekiz farklı derişimi oluşturulduktan sonra 100 µM CdCl₂ stresi altındaki mısır fidelerine uygulanarak stresin olumsuz etkilerini hafifleten doz MDA ve H₂O₂ içerikleri üzerinden belirlendi. Bu ön çalışma sonucunda 0,3 mM ANSO konsantrasyonunun sekiz derişim içerisinde en uygun derişim olduğuna karar verildikten sonra yeni bulgular ışığında ana çalışmalara başlandı.

3.2.2 Deney gruplarının hazırlanması

Aşağıdaki tabloda belirtilen deney grupları oluşturularak elde edilen mısır fideleri; Cd içeriği, ABA içeriği, Fotosentetik pigmentler, MDA, H₂O₂, antioksidan enzim aktiviteleri (GPX, CAT, SOD, APX), protein içeriği ve fenolik bileşikler (askorbik asit, trans P-kumarik asit, katekol, sinamik asit) parametrelerinin ölçümü için -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 2.1 Deney grupları

1-)	Kontrol (K)	18 saat saf su
2-)	ANSO	6 saat 0,3 mM ANSO, 12 saat saf su
3-)	Cd	6 saat saf su, 12 saat 100 µM CdCl ₂
4-)	ANSO+Cd	6 saat 0,3 mM ANSO, 12 saat 100 µM CdCl ₂

(K: kontrol, ANSO: Aseton *O*-(2-naftilsülfonil)oksim, Cd: kadmiyum)

3.2.3 Bitki örneklerinde kadmiyum tayini

Her örnek 0,1gr olacak şekilde önce mikrodalga destekli asitte sindirilmiş ardından ise Cd içerikleri IPC-MS (Agilent 7900, Agilent, USA) ile ölçülmüştür. Kullanılan asitler 1 mL of 35% (v/v) H₂O₂ ve 8 mL of 65% (v/v) HNO₃'tür. Asitle sindirimin ardından kullanılan mikrodalga sisteminde (Anton Paar, Mikrodalga Reaksiyon Sistemi) ilk 20 dakikalık sürede sıcaklık 185 °C'ye varacak şekilde yükseltilmiş ardından 15 dakika sabit tutulmuş ve son olarak da 21 dakika boyunca 60°C'ye düşecek şekilde soğutma ortamı sağlanmıştır. Sonrasında örnekler 50 mL distile su eklenerek seyreltilmiş ve son olarak Cd içerikleri ICP-MS (kuvars enjektör tüplü bir kuvars meşale, eş merkezli bir nebülizatör ve siklonik püskürtme odası içeren cihaz) ile ölçülmüştür.

3.2.4 ABA içeriğinin belirlenmesi

Liyofilizatörde 3 saat kalan 100 mg taze yaprak numuneleri 16 saat, 4°C sıcaklıkta MilliQ (Su/doku oranı 50:1, v/w) içinde ekstrakte edildi. Phytodetek ABA ELISA kiti ile kantitatif ABA analizleri (±) cis-trans ABA (Sigma, St. Louis) standardı kullanılarak analiz edildi. Ölçüm sonuçları gram taze ağırlık başına pmol olarak hesaplandı.

3.2.5 Bağlı su içeriğinin belirlenmesi (NSİ)

Çalışmada kadmiyum stresi altındaki fidelerde ANSO uygulamasının bitki su durumu üzerindeki etkilerini gözlemlemek için nisbi su içeriği ölçüldü. Bu amaçla yaş ağırlıklarının belirlenmesi için fidelerin yaprak kısımlarından 100 mg örnek alındı ve 16 saat saf suda 4 °C'de bekletildikten sonra turgit ağırlıkları tartıldı. Turgit örnekler 72 saat 65 °C'de bekletilerek tüm su içerikleri uzaklaştırıldı ve kuru ağırlık miktarları tartıldı. Elde edilen veriler (Barrs ve Weatherley, 1962) aşağıdaki denklemde kullanılarak deney gruplarında fidelerin nisbi su içerikleri belirlenmiş oldu. Denklem formülü aşağıda verildi. YA: Yaş ağırlığı, KA: Kuru ağırlığı ve TA: Turgit ağırlığı ifade etmektedir.

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

3.2.6 Fotosentetik pigmentlerin ölçümü

Arnon (1949) tarafından geliştirilen yönteme göre, 0,25 g mısır yaprağı önce %80'lik 5 ml asetonda homojenize edilmiş ardından meydana gelen homojenat 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan süpernatantın absorbansı 450, 645 ve 663 nm'de ölçülmüştür. Klorofil ve karotenoid değerleri Lichtenthaler (1987) tarafından oluşturulan denkleme göre hesaplanmıştır.

$$\text{Klorofil}_a \text{ (gL}^{-1}\text{)} = 12,7 A_{663} - 2,69 A_{645}$$

$$\text{Klorofil}_b \text{ (gL}^{-1}\text{)} = 22,9 A_{645} - 4,68 A_{663}$$

$$\text{Toplam Klorofil (gL}^{-1}\text{)} = 20,2 A_{645} + 8,02 A_{663}$$

$$\text{Toplam Karotenoid (gL}^{-1}\text{)} = 4,07 A_{450} - (0,0435 K_{1a} \text{ miktarı} + 0,3367 K_{1b} \text{ miktarı})$$

3.2.7 Malondialdehit (MDA) içeriğinin belirlenmesi

Kadmiyum stresi altındaki mısır fidelerinde ANSO ön uygulamasının hücre zarı düzeyindeki etkilerini analiz etmek amacıyla Heath ve Packer (1968)'e göre lipid peroksidasyonu tayini yapıldı. Çimlenen tohumlardan alınan 0,1 gr doku örnekleri, sıvı azot içerisinde homojenize edildi. Sonrasında homojenize edilen örnekler 1,8 ml %0,1 trikloro asetik asit (TCA) eklenerek homojenizasyon işlemi tekrarlandı. Homojenat 10 dakika süre boyunca +4 °C ve 15.000 g'de santrifüj işlemine tabi tutuldu. Süpernatanttan 1 ml alınıp içerisine %0,5 tiobarbiturik asit içeren %20 TCA solüsyonundan 4 ml eklendi. Bu karışım vortekslendikten sonra 95°C sıcaklıkta 30 dakika süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonunda reaksiyonun durdurmak için örnekler hızlı bir şekilde buz banyosuna transfer edildi. Örneklerin spektrofotometre ile 532 (spesifik) ve 600 (spesifik olmayan) nm dalga boylarında absorbansları ölçüldü. Delta absorbans (spesifik–spesifik olmayan absorbans) değerleri, $A = \epsilon \cdot c \cdot l$ formülünde yerine konularak TBARS konsantrasyonu hesaplandı ($\Delta = A_{532} - A_{600}$, ϵ : Absorbsiyon katsayısı, $155 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, c : konsantrasyon).

3.2.8 Hidrojen peroksit (H₂O₂) içeriğinin belirlenmesi

Velikova ve ark. (2000)'a göre yapılan ölçümler ile H₂O₂ içeriği bulunmuştur. 0.25 g yaprak ile hazırlanan homojenat 0,1 g aktif kömür ve %0,1'lik 5 ml TCA ile birlikte homojenize edilmiş ardından 15.000 g'de +4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan

süpernattan içine 1 M KI (1500 µl) ve fosfat tamponu (10mM, pH 7.0) ilave edilip absorbans okuması 390 nm'de yapılmıştır.

3.2.9 Antioksidan enzim aktivitelerinin ölçümü

3.2.9.1 Guaiakol peroksidaz (GPX) aktivitesinin belirlenmesi

Enzim (EC 1.11.1.7) ölçüm yönteminde Urbanek ve ark. (1991)'e ait yöntemle; 100 ml potasyum fosfat tamponu (PH 7.0), 0,1 mM EDTA, 5 mM guaiacol, 15 mM H₂O₂ ve 50 µL enzim ekstraktı karıştırılarak oluşturulan 2 mL'lik örneğin absorbansı 470 nm'de 1 dakikada ölçümleri yapılarak okunmuştur. Son olarak, ekstraksiyon katsayısı olarak $\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ değeri kullanılmış, GPX aktivitesi hesaplanmıştır.

3.2.9.2 Katalaz (CAT) aktivitesinin belirlenmesi

50 mM potasyum fosfat tamponu (PH 7,0), 30 mM H₂O₂ ve 20µl enzim ekstraktı ile oluşturulan 1mL'lik karışım 240 nm'de 5 dakika süreyle ölçülmüş (Aebi, 1983) elde edilen değerler $\epsilon=39,4 \text{ }\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ katsayısı kullanılarak enzim (CAT: EC 1.11.1.6) hesaplanmıştır.

3.2.9.3 Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin belirlenmesi

Enzim (SOD: EC 1.15.1.1) ölçüm yöntemi Beauchamp ve Fridovich (1971) tarafından geliştirilmiştir. Potasyum tampon (50 mM, pH 7.8), EDTA (0.1mM), metiyonin (13mM) , nitro blue tetrazolium (75 µM) ve 50 µl ekstrakt ile oluşturulan karışımdan alınan 1 ml numuneye 2 µM riboflavin eklenmiştir. Son karışımın 375 µmol m⁻²s⁻¹ yoğunluğundaki beyaz ışıpta 10 dakika bekletilmesinden sonra 560 nm'de absorbansı okunmuştur.

3.2.9.4 Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin belirlenmesi

50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0), 250 µM ASC (askorbat), 5 mM H₂O₂ ve 20µl enzim ekstraktı ile hazırlanan 1mL'lik örneklerin enzim (APX: EC 1.11.1.11) aktivitesi 290 nm'de absorbans okuması ile belirlenmiştir (Nakano ve Asada, 1981).

3.2.10 Protein içeriğinin belirlenmesi

Sığır serumundan elde edilen albümin standartları Coomassie Brilliant Blue G250 boyası ile 595 nm'de ölçülerek sonuçlar miligram olarak hesaplanmıştır. Bradford (1976) tarafından geliştirilen yöntem enzim aktivitesinin ifadesinde kullanılmıştır.

3.2.11 Prolin içeriğinin belirlenmesi

%3'lük 10mL sülfosalisilik asit içine 0,2 g kurutulmuş örnek ilave edilip homojenizasyonu sağlandı ve süzülerek oluşturulan filtrat 22°C'de 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Meydana gelen süpernatana 1 mL asetik asit ve ninhidrin (asetik asit ve orto-fosforik asit kullanılarak hazırlandı) katılıp elde edilen karışım tüplere konuldu. Örnekler önce 100°C'de 1 saat su banyosunda tutuldular sonra ise üzerlerine 3 mL toluen eklenerek vorteks yardımıyla karışımları sağlanıp buz banyosuna konuldular. En son olarak ise örneklerin 4000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjü yapıp, meydana gelen süpernatanın absorbansı 520 nm'de okundu. Elde edilen değerler gram taze ağırlık başına µg olarak ifade edildi (Bates ve ark., 1973).

3.2.12 Fenolik bileşiklerin belirlenmesi

Askorbik asit, trans p-kumarik asit, katekol ve sinnamik asit standartlarının en son konsantrasyonları kullanılarak 10 mg mL⁻¹ konsantrasyonlu çözeltiler oluşturuldu. Ardından %1'lik asetonitril ve asetik asit (sırasıyla 1/9 oranında) ve aynı oranda metanol eklenerek stok standartlar elde edildi. Stok standartları kalibrasyon eğrisinde kullanılmaları için 10, 25, 50, 75 ve 100 µg mL⁻¹ seyreltildiler (Seal, 2016). Mısır yapraklarından elde edilen ekstraktların konsantrasyonları standartta kullanılan çözeltiler yardımıyla 20 mg/mL olacak şekilde seyreltildi. En son olarak örneklerin 0,45 µm'lik membran filtre ile filtrasyonu yapıp, HPLC'ye yüklendiler. Agilent Technologies 1260 Infinity II HPLC (Agilent, ABD) ile analizler yapıldı. HPCL konfigürasyonu: bir G7130A kolon fırını (28°C), 1,0 mL/dakika akış hızına sahip bir 1260 Quat Pump VL pompası, bir 1260 DAD WR dedektörü (272, 280 ve 310 nm'de) ve 1260 Flakon örnekleyici (20 µL enjekte edilmiş). ACE 5 C18 (250 x 4.6 mm) analitik sütun olarak kullanılmıştır.

3.3 İstatistiksel Analizler

Sayısal veriler SPSS (v.17, SPSS Inc., ABD) yardımıyla analiz edildi. İstatistiksel önem Duncan'ın çoklu aralık testi kullanılarak ifade edilmiştir. Tüm analizlerde istatistiksel anlamlılık P < 0.05 olarak belirtilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA

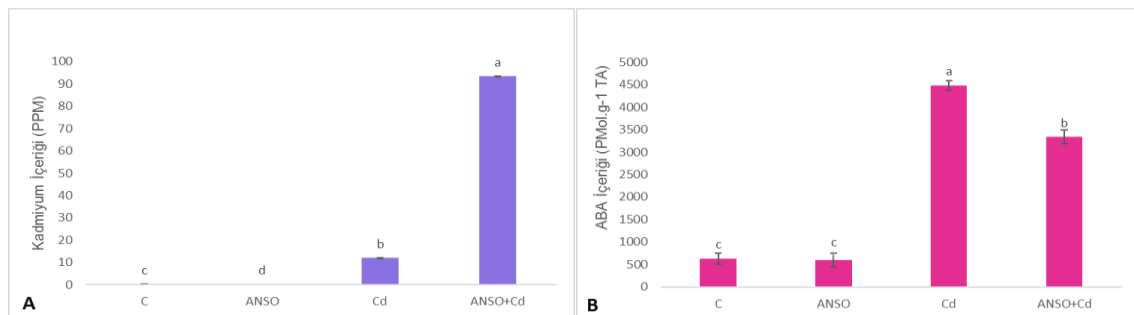
4.1 Kadmiyum Stresi Altındaki Mısır Fidelerinde ANSO Ön Uygulamasının Bitki Parametreleri Üzerine Etkileri

4.1.1 Kadmiyum (Cd) içeriği üzerine etkisi

Kadmiyum mısır bitkisinde, sürgünlere kıyasla köklerde daha fazla birikim gösterir (İşçioğlu, 2007) fakat kadmiyumun bir kısmı sürgünlere taşıyıcı sistemler tarafından taşınır. Şekil 4.1A'da mısır fidelerinde Cd değerleri verilmiştir. ANSO+Cd ile muamele edilen örneklerdeki Cd birikimi, yalnızca Cd ile muamele edilen örneklerdeki birikimden 7,8 kat daha fazla bulunmuştur.

Mısır bitkisinin kadmiyuma karşı geliştirdiği stres toleranslarından biri organik asitler, amino asitler ve fitoşelatinler ile Cd'nin sitozol metabolizmasından uzak bir noktada biriktirilmesidir (Wójcik ve Tukiendorf, 2005). Fitoşelatinler indirgenmiş glutatyondan sentezlenen metal bağlayıcı peptitlerdir. Fitoşelatinler ile kompleks oluşturan kadmiyum ABC (ATP-bağlı kaset) tipi taşıyıcı ile vakuollere taşınır ve Cd'nin immobilizasyonu sağlanmış olur (Ortiz ve ark., 1995). Cd'yi fitoşelatinler ile hareketsiz hale getirebilen bitkilerde ağır metal hasarı oluşmadan biyokimyasal faaliyetler devam edebildiği için bu yöntemle bitkilere hiperakümülatör özellik kazandırılması mümkün olabilir (Souza ve ark., 2013). ANSO ön muamelesi mısır bitkisinde fitoşelatinlerin üretim oranını artırıyor olabilir. Çünkü bitki biriken kadmiyuma rağmen hayati fonksiyonlarına devam edebilmiştir.

Bacopa monnieri L. bitkisi ile yapılan bir çalışma, Cd stresi altındaki bitkinin strese cevap olarak fitoşelatinler üreterek Cd birikimi yapmasına rağmen hayatta kalabildiğini göstermektedir (Mishra ve ark., 2006).



Şekil 4. 1 Cd stresi koşullarında ANSO takviyesi ile Cd (A) ve ABA (B) değerlerindeki değişim

4.1.2 Absisik asit (ABA) içeriği üzerine etkisi

Bitkilerde çeşitli biyolojik süreçlerde etkin rol oynayan ABA, ayrıca abiyotik strese cevap olarak bazı genlerin ekspresyonunu düzenlemekte ve bitkilerin strese direnç seviyelerini arttırmaktadır (Vishwakarma ve ark., 2017). *Oryza sativa* L.'nin iki çeşidi üzerinde yapılan bir çalışmada hem Cd'ye dirençli hem de Cd hassasiyeti bulunan çeşitte CdCl₂ uygulaması ile endojen ABA içeriklerinin arttığı ayrıca Cd hassasiyeti bulunan çeşide eksojen ABA ön uygulaması yapıldığında Cd hassasiyetinin azalarak bitkinin Cd'ye direnç geliştirdiği gösterilmiştir (Hsu ve Kao, 2003).

Mevcut çalışmada ANSO uygulaması yapılmış gruplar ile kontrol grupları arasında kayda değer bir ABA içeriği farkı oluşmamıştır. Bununla birlikte ANSO+Cd uygulamasında, tek başına Cd uygulaması yapılan örneklere kıyasla ABA içeriğinin belirgin olarak azaldığı görölmektedir (şekil 4.1B). ANSO ön uygulaması strese cevap olarak üretilen ABA miktarını azaltmış görönmektedir.

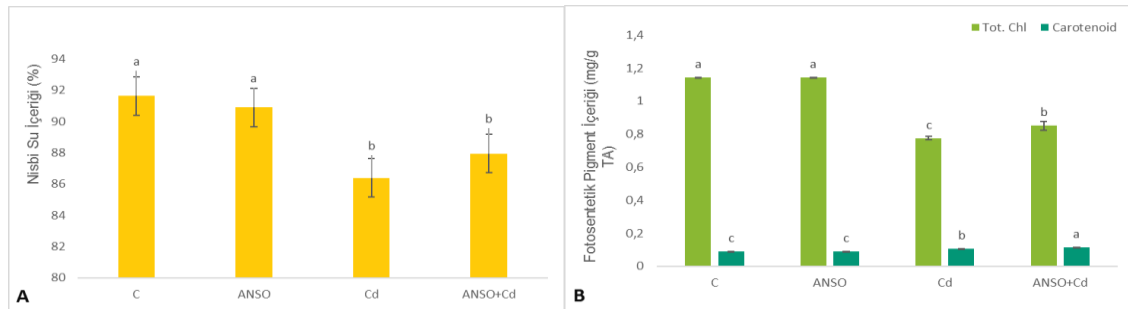
Solanum photeinocarpum bitkisine dışarıdan verilen ABA (ideal değer 20 µmol/L) desteğinin bitkinin Cd biriktirmesi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, bitkinin iki ekotipinde (madencilik ve tarım alanı) de Cd birikim potansiyelinin artış gösterdiği belirtilmiştir (Wang ve ark., 2016a). Bu durum eksojen verilen ABA'nın ağır metal stresini hafifleterek bitkiye, fitoremediasyonda kullanılabilme potansiyelini kazandırılabilceğinin göstergesi olabilir.

4.1.3 Nisbi su içeriği (NSİ) üzerine etkisi

şekil 4.2A mısır bitkisinde nisbi su içeriğini göstermektedir. Ölçüm sonuçları tek başına ANSO uygulamasının kontrole kıyasla NSİ değerlerinde bir fark yaratmadığını göstermektedir. Fakat Cd rejimi altında bitkinin NSİ değerleri dışmüştür. Bu durum Cd'nin yaprak osmotik potansiyelini dışürmesi sonucu meydana geliyor olabilir. Bunun yanında ANSO+Cd muamelesi ile tek başına Cd muamelesi kıyaslandığında elde edilen NSİ değerlerinin, istatistiksel bir fark oluşturmadığı görölmektedir.

İki semiz otu (*Portulaca oleracea* L.) çeşidi ile yapılan bir çalışmada, Cd stresinin NSİ değerlerini dışürdüğünü göstermiştir (Çıkılı ve Samet, 2018). *Eruca sativa* L. bitkisi ile yapılan bir çalışmada bitki, Cd ve Pb'nin farklı derişimleri ile muamele edildiğinde membran hasarı oluşmuş ve bu durum NSİ değerlerinin dışmesine neden olmuştur (Yıldırım ve ark., 2019). Bakır stresine maruz bırakılan mısır bitkilerinde aseton O- (4-klorofenilsülfonil) oksimin ön muamelesi ile stresörün etkilerindeki değişimin

gözlemlendiği başka bir çalışmaya göre, Cu mısır bitkilerinin NSİ değerlerini düşürmüştür fakat aseton *O*- (4-klorofenilsülfonil) oksim NSİ değerlerini arttırarak bitkiyi koruyucu etki göstermiştir (Yetişsin ve Kardeş, 2022).



Şekil 4. 2 Cd stresi koşullarında ANSO takviyesi ile NSİ (A) ve fotosentetik pigment içeriği değişimi

4.1.4 Fotosentetik pigment içeriği üzerine etkisi

Soya fasulyesi ile yapılan bir çalışma farklı konsantrasyonlarda Cd stresine maruz bırakılan bitkide CO₂ tutulumunun, klorofil sentezinin, organik madde üretiminin ve stomal geçirgenliğin olumsuz etkilendiğini göstermektedir (Xue ve ark., 2013). Çilek (*Fragaria x ananassa* Duch) üzerindeki bir çalışma Cd muamelesi ile klorofil içeriğinin azaldığını ve bitki gelişiminin %30 gerilediğini göstermiştir (Muradoglu ve ark., 2015). Cd'nin +2 değerlikli oluşu diğer +2 değerlikli Mg, Ca, Fe ve Cu gibi minerallerin topraktan alımında yarışmalı bir ortam yarattığı için ve ayrıca, bitki tarafından alındıktan sonra bu minerallerin yerine geçerek metabolik faaliyetlerin devamını engellediği için sıkıntı oluşturur (Naciri ve ark., 2021). Klorofil 4 pirol halkası ortasına oturmuş Mg atomundan oluşur. Fotosentezde ışığı yakalayıcı görevi dikkate alındığında Cd varlığında klorofilin sentezinin gerçekleşmemesi fotosentezi de engelleyecektir. Şekil 4.2B'de klorofil ve karotenoid değişimleri verilmiştir. ANSO tek başına toplam klorofil içeriğinde kontrole kıyasla bir değişim oluşturamamıştır. Fakat Cd stresi klorofil içeriğini düşürmüştür. ANSO+Cd muamelesi ise Cd stresi ile meydana gelen klorofil içerik miktarındaki azalışı yavaşlatmıştır. ANSO varlığında klorofil korunuyor gibi görünmektedir.

Cd stresi altındaki bitkilerde üretim miktarları değişkenlik gösteren karotenoidler (Parmar ve ark., 2013), 600'ün üzerinde çeşidi tespit edilmiş antioksidan özellik gösterebilen önemli pigment grubudur. Mevcut çalışmada kontrol ve ANSO gruplarındaki karotenoid değerleri arasında fark oluşmazken tek başına Cd muamelesi karotenoid değerlerini arttırmıştır. Bununla birlikte ANSO+Cd uygulamasından elde

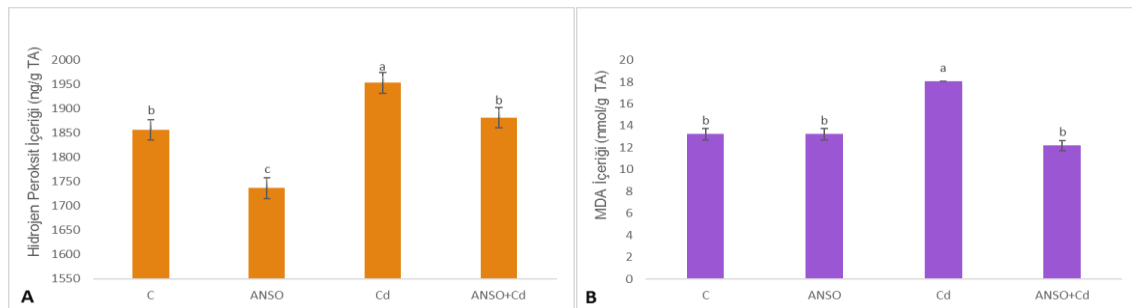
edilen karotenoid değeri ise Cd ile muameledeki değerden nispeten yüksektir. ANSO desteğinin karotenoidlerin antioksidan etkisini arttırdığı düşünülebilir.

4.1.5 Hidrojen peroksit (H₂O₂) içeriği üzerine etkisi

Reaktif oksijen türlerinden biri olan H₂O₂ fotosentez ve solunum gibi biyokimyasal tepkimelerde bir miktar üretilir ve antioksidan sistem tarafından temizlenir. Cd stresi gibi durumlar bitkinin tolere edebileceğinden çok H₂O₂ üretimini tetikler (Ahmad ve ark., 2012).

50 µM CdCl₂ ile muamele edilen bezelye (*Pisum sativum* L., cv. Lincoln) bitkisinde üretilen H₂O₂ miktarı kontrol gruplarına göre 6 kat daha fazla olmuştur (Romero-Puertas ve ark., 2004). Biri su eksikliğine dayanıklı diğeri ise dayanıksız olan iki mısır çeşidi üzerinde yapılan bir çalışmada, bitkilerin dışarıdan verilen H₂O₂ ile bakır stresine cevapları incelenmiş ve tek başına bakır stresinde artan H₂O₂ değerlerinin dışarıdan verilen H₂O₂ desteği ile azalma gösterdiği ortaya konulmuştur (Terzi ve ark., 2018). *Pleurochaete squarrosa* ve *Timmiella barbuloidea* bitkileri ile yapılan bir çalışmada; Ni, Pb, Cr ve Cu metalleri ile muamelenin sonuçları incelenmiş ve özellikle Cu ve Cr muamelelerine maruz kalan bitkilerin H₂O₂ üretimlerinin arttığı gözlemlenmiştir (Aydoğan ve ark., 2017).

Çalışmamızda yukarıdaki çalışmalara paralel sonuçlar elde edilmiştir. ANSO ile muamele edilen bitkilerde kontrol bitkilerine kıyasla H₂O₂ üretiminin miktarı azalmıştır. Bu durum ANSO uygulamasının H₂O₂ üretimini azalttığını göstermektedir. Fakat Cd stresi üretilen H₂O₂ miktarını kontrole kıyasla belirgin olarak arttırmıştır. Bununla birlikte ANSO+Cd gruplarında H₂O₂ miktarı sadece Cd ile muamele edilen gruplara göre bariz düşüş göstermiştir. ANSO'nun H₂O₂'nin temizlenmesinde etkili bir yardımcı olduğu düşünülebilir (Şekil 4.3A).



Şekil 4. 3 Cd stresi koşullarında ANSO takviyesi ile H₂O₂ (A) ve MDA (B) içerikleri değişimi

4.1.6 Malondialdehit (MDA) içeriği üzerine etkisi

Şekil 4.3B’de Cd stresörü etkisinde MDA değişimi ifade edilmektedir. Kontrol grupları ve sadece ANSO uygulanan gruplar kıyaslandığında, meydana gelen MDA miktarları arasında fark olmadığı görülmektedir. Fakat Cd muamelesi bitkide stres ortamı yaratarak lipid peroksidasyonunun yolunu açacak olan MDA üretimini belirgin bir şekilde arttırmıştır. ANSO+Cd gruplarında ise sadece Cd muamelesinin olduğu gruplara kıyasla MDA içeriğinin dikkat çekici şekilde azaldığı görülmüştür. ANSO, MDA üretimini azaltarak lipid peroksidasyonunun engellenmesinde bitkiyi destekliyor gibi görünmektedir.

Trigonella foenum-graecum L. bitkisinde farklı dozlarda Cd muamelesi ile yapılan başka bir çalışmada elde edilen sonuçlar, bizim çalışmamızı destekler şekilde MDA değerlerinin kayda değer artış gösterdiğini ortaya koymuştur (Tunçtürk ve ark., 2020). Farklı derişimlerde (100 mg/kg, 150 mg/kg ve 200 mg/kg) Pb ve Zn streslerine maruz bırakılan *Vigna subterranean* ve *Zea mays* bitkilerinin her ikisinde de ağır metallerin derişimleri arttıkça MDA seviyelerinin de yükseldiği tespit edilmiştir (Oladele ve ark., 2019). Cu, Pb ve Cd ağır metallerinin SOD, CAT, POD ve MDA üzerindeki etkilerinin 5 ayrı mangrove bitkisinde (*B. gymnorrhiza*, *R. stylosa*, *K. obovata*, *A. corniculatum* ve *A. Marina*) gözlemediği bir çalışmada; MDA seviyelerinin, türlerin tamamında arttığı fakat *A. marina*’da diğerlerine kıyasla daha yüksek bir artışın meydana geldiği rapor edilmiştir (Zhou ve ark., 2021).

4.1.7 Antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisi

Ağır metal stresine bağlı oluşan reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonunda görevli SOD, CAT, APX, GPX gibi antioksidan enzimlerin aktiviteleri; ağır metalin cinsine, bitkinin maruz kaldığı konsantrasyona ve bitkide etkili olduğu süreye göre değişmektedir (Ayhan ve ark., 2005).

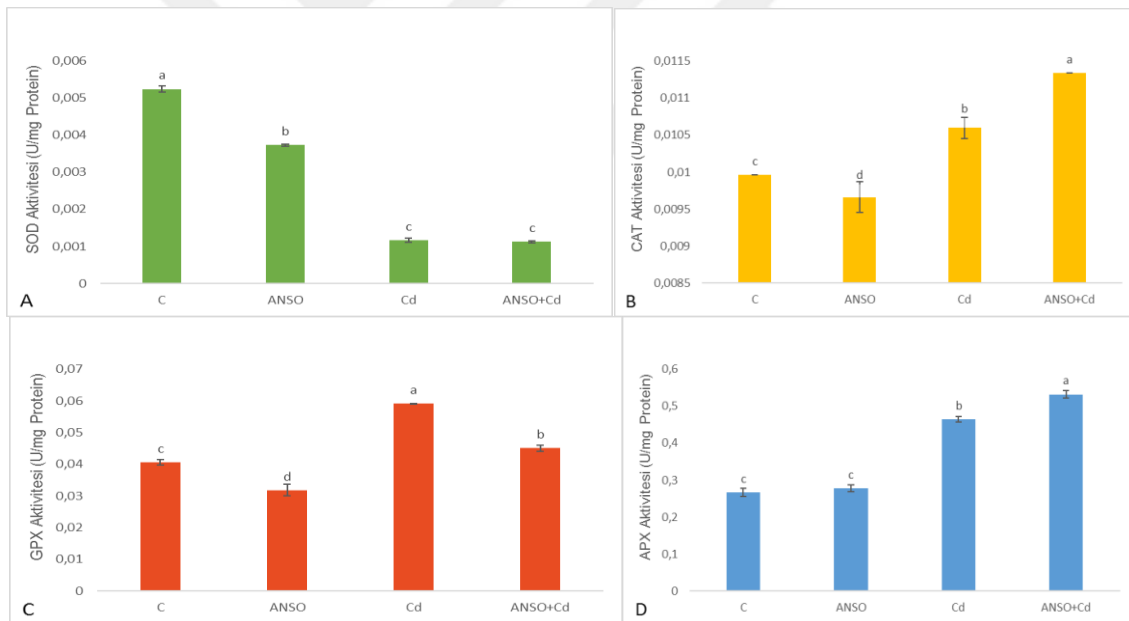
4.1.7.1 Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi üzerine etkisi

En yüksek SOD değerine kontrol grubunda rastlanmıştır. Kontrol ile kıyaslandığında ANSO ile muamelede elde edilen sonuç daha düşük SOD değeri göstermektedir. Bununla birlikte Cd muamelesi ve ANSO+Cd muamelesi arasında kayda değer bir fark oluşmamış fakat her iki değerinde ANSO muamelesinde elde edilen değer in altında kalmıştır (Şekil 4.4A). SOD enziminin bitkilerde Cu/ZnSOD, MnSOD ve FeSOD olmak üzere 3 izozimi mevcuttur (Bowler ve ark., 1994). SOD enziminin aktif

bölgesindeki +2 değerlikli metaller gibi Cd de +2 değerliklidir. Bu durum Cd ve ANSO+Cd uygulamalarında meydana gelen SOD değerlerindeki düşüklüğün nedenin enzimin elektriksel yük durumundaki dengesizlikten olabileceği fikrini doğurmaktadır. Hassan ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada iki çeşit pirinçte Cd muamelesinin etkileri incelenmiş ve SOD, POD, CAT değerlerinin azaldığı MDA değerinin ise arttığı gözlemlenmiştir.

4.1.7.2 Katalaz (CAT) aktivitesi üzerine etkisi

Demir porfirin içeren, kararsız yapıya sahip bir antioksidan enzim olan katalazın Cd stresi altındaki mısır bitkilerindeki değişimi şekil 4.4B’de gösterilmiştir. Tek başına ANSO muamelesi kontrole kıyasla CAT değerini düşürmüştür fakat Cd muamelesi ile CAT değeri kontroldeki ölçümün üstünde gerçekleşmiştir. Cd muamelesi ve ANSO+Cd muamelesi kıyaslandığında ise ANSO ön muamelesi ile CAT değeri artmış hatta diğer tüm değerlerden belirgin bir fark göstererek yükselmiştir.



Şekil 4. 4 Cd stresi koşullarında ANSO takviyesi ile SOD (A), CAT (B), GPX (C) ve APX (D) aktiviteleri değişimi

Cd stresörü etkisinde bulunan ayçiçeği bitkisinin NO (nitrik oksit) ön muamelesi ile strese cevabının değerlendirildiği bir çalışmada Cd stresi altındaki ayçiçeği bitkilerinde CAT aktivitesinin kontrol grubundaki değere göre %44 düşüş gösterdiği fakat NO ön uygulaması yapıp daha sonra bitki Cd ile strese maruz bırakıldığında CAT değerinin kontrole kıyasla %21 arttığı tespit edilmiştir (Laspina ve ark., 2005). *Sorghum bicolor L.* bitkisinde As, Ni, Cd, Pb ve Cu çoklu muamelesinin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada; her bir ağır metalin 100 ve 500 µM konsantrasyonları kullanılmış ve sonuçta

konsantrasyon artışına bağlı olarak CAT, SOD ve GR enzim aktivitelerinin de artış gösterdiği gözlemlenmiştir (Pandian ve ark., 2020). Cd veya Ni ile kirletilmiş toprakta büyütülen domates bitkilerinin endofitik bakterilerin (*Micrococcus luteus* ve *Enterobacter cloacae*) varlığında Cd veya Ni stresine cevaplarının araştırıldığı bir çalışmanın sonucu göstermektedir ki; endofitik bakterilerin varlığı CAT, SOD ve APX gibi enzimatik savunmayı ve prolin gibi ozmolitlerin birikimini arttırmış ayrıca strese cevap genlerinin aktifleşmesini sağlamıştır (Badawy ve ark., 2022).

4.1.7.3 Guaiakol peroksidaz (GPX) aktivitesi üzerine etkisi

Bitki hücre duvarında biyokimyasal görevlerinin yanında H₂O₂'nin oksidatif etkisinin azaltılmasında da çalışan oksidaz grubu bir enzimdir (Bişkin, 2012). Mevcut çalışmada Cd stresinin GPX aktivitesini kontrole kıyasla arttırdığı görülmüştür. ANSO+Cd grubunda ise GPX aktivitesi Cd muamele grubuna kıyasla azalmıştır. Fakat yine de en az GPX değeri sadece ANSO ile muamele edilmiş grupta elde edilmiştir (Şekil 4.4C). ANSO ön muamelesinin bitkinin Cd stresine tolerans geliştirmesinde etkisi olduğu düşünülebilir.

Bir su bitkisi olan *Fontinalis antipyretica* Hedw. ile yapılan bir çalışmada bitki; 0 ile 1000 µM arasında derişimlere sahip Cd, Cu, Pb ve Zn ağır metalleri ile 2-7 gün arası muamele edilmiş ve GPX, APX, SOD, CAT ve GRD antioksidan enzimlerinin artış gösterdiği saptanmıştır (Dazy ve ark., 2009).

Rhizobium leguminosarum biovar *viciae* bitkisinin Cd toleransı ve hassasiyeti olan iki çeşidi ile yapılan bir çalışmada Cd'nin sebep olduğu oksidatif stres, Cd hassasiyeti bulunan çeşitte daha fazla olmak üzere, GPX aktivitesini arttırmıştır. Ortama GSH (glutatyon) eklenmesi ise yine Cd hassasiyeti bulunan çeşitte daha fazla olmak üzere, GPX aktivite seviyelerini düşürmüştür (Corticeiro ve ark., 2006).

4.1.7.4 Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi üzerine etkisi

Cd stresi altındaki mısır bitkilerinde APX aktivitesi kontrole kıyasla artmıştır fakat tek başına ANSO uygulaması kontrole kıyasla bir fark meydana getirmezken ANSO+Cd uygulaması ile tüm deney gruplarındaki APX aktivitelerinden daha yüksek bir değerde APX aktivitesine ulaşılmıştır (Şekil 4.4D).

Alp (2021) tarafından yapılan bir çalışmada Cd stresörüne maruz bırakılan arpa (*Hordeum vulgare* L.) bitkilerine eksojen verilen NO (nitroprussit donördür) ile bitkilerin strese cevapları gözlemlenmiştir. Sonuçlar Cd varlığında APX aktivitelerinin artış

gösterdiğini fakat SNP (Sodyum nitroprussit) ile bu artışın, tek başına Cd ile muamele edilen örneklerdekinden daha fazla olduğunu göstermektedir.

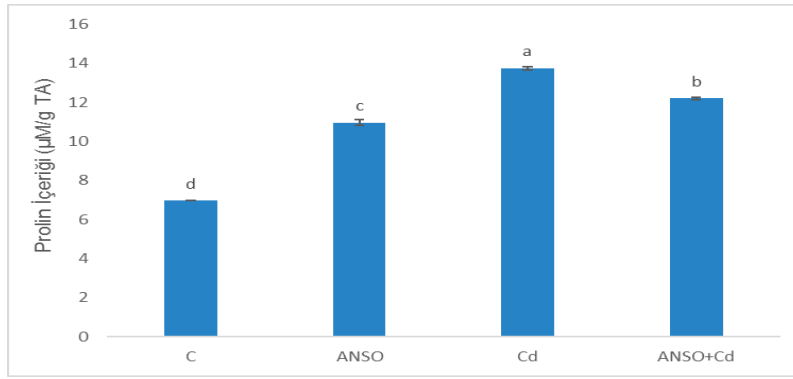
Kısa ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada Cd, Cu ve Pb ağır metallerinin 3 farklı konsantrasyonunun (10, 20 ve 50 ppm) uygulandığı *Solanum lycopersicum* bitkisinin yapraklarında APX, SOD ve POD değerleri artış gösterirken (50 ppm Pb uygulaması hariç) köklerde özellikle Cd uygulamasının tüm derişimlerinde APX değeri belirgin artmıştır. *Glycine max* (L.) Merr. ile yapılan bir çalışmada tek başına Cd uygulaması ile APX ve SOD aktiviteleri artmış fakat CAT, GR ve AsA azalmıştır bununla birlikte bir mikrobesein olan Zn ile birlikte Cd uygulandığında bitkide yine APX ve beraberinde ise GR, SOD ve CAT aktiviteleri artmıştır (Kapur ve Singh, 2019).

4.1.8 Prolin içeriğı üzerine etkisi

Bir ozmoprotektan çeşidi olan prolin, ornitin ya da glutamattan sentezlenir. *Groenlandia densa* bitkisi farklı konsantrasyonlarda Cd'ye maruz bırakılmış ve sonuçta Cd stresine cevap olarak prolin birikim seviyelerinin arttırdığı gözlemlenmiştir (Yılmaz ve Parlak, 2011).

Çalışmamızda en yüksek prolin içeriğinin Cd ile muamele edilen gruplarda meydana geldiğı görülmektedir. Tek başına ANSO muamelesi prolin içeriğini kontrol grubundaki örneklere kıyasla arttırmıştır. Bununla beraber ANSO+Cd muamelesi tek başına ANSO muamelesine kıyasla daha fazla prolin birikimine neden olurken, tek başına Cd muamelesi ile kıyaslandığında daha az prolin birikimine neden olmuştur (Şekil 4.5).

Çalışmamıza paralel bir çalışma çay (*Camellia sinensis*) bitkisi ile yapılan bir çalışmadır (Zhang ve ark., 2020). Çay bitkilerine dışarıdan verilen indol asetik asit (IAA) ile bitkilerin Cd stresi altındayken cevaplarına bakılmış ve tek başına IAA uygulamasında prolin miktarının kontrole göre artmış olduğu fakat tek başına Cd uygulaması ile prolin miktarının çok daha yüksek değerde artış meydana getirdiğı görülmüştür. Cd stresine IAA ile destek verildiğinde ise tek başına Cd uygulamasına kıyasla prolin içeriğinde belirgin düşüş kaydedilmiştir.



Şekil 4. 5 Cd stresi koşullarında ANSO takviyesi ile prolin içeriği değişimi

4.1.9 Fenolik bileşikler üzerine etkisi

İkincil metabolitler grubunda yer alan fenolik bileşikler ağır metallerin sebep olduğu oksidatif strese önemli savaşçılardandır (Büyük ve ark., 2012b). Bitkilerde stres oluşturan ağır metalin çeşidi, dozu ve bitkinin ağır metale maruziyet süresine bağlı olarak farklı bitkilerde farklı miktarlarda fenolik bileşikler oluşur. Fenolik bileşikler elektron verme kabiliyetine sahip olduklarından strese maruz kalan bitkide üretimlerinin artması bitkinin savunma sistemini güçlendirebilir (Michalak, 2006).

4.1.9.1 Askorbik asit içeriği üzerine etkisi

Şekil 4.6A'da Cd stresi altındaki mısır fidelerinde askorbik asit içeriğinin değişimi ifade edilmiştir. ANSO tek başına uygulandığında kontrole kıyasla askorbik asit üretimini arttırmıştır. Cd muamelesi ile askorbik asit içeriği belirgin olarak düşmüş tüm deney gruplarının gerisinde kalmıştır. ANSO+Cd muamelesi ile askorbik asit üretimi artmış fakat yine de kontrol ve ANSO gruplarının gerisinde kalmıştır. ANSO ön uygulamasının askorbik asitin üzerindeki Cd baskısını hafiflettiği düşünülebilir.

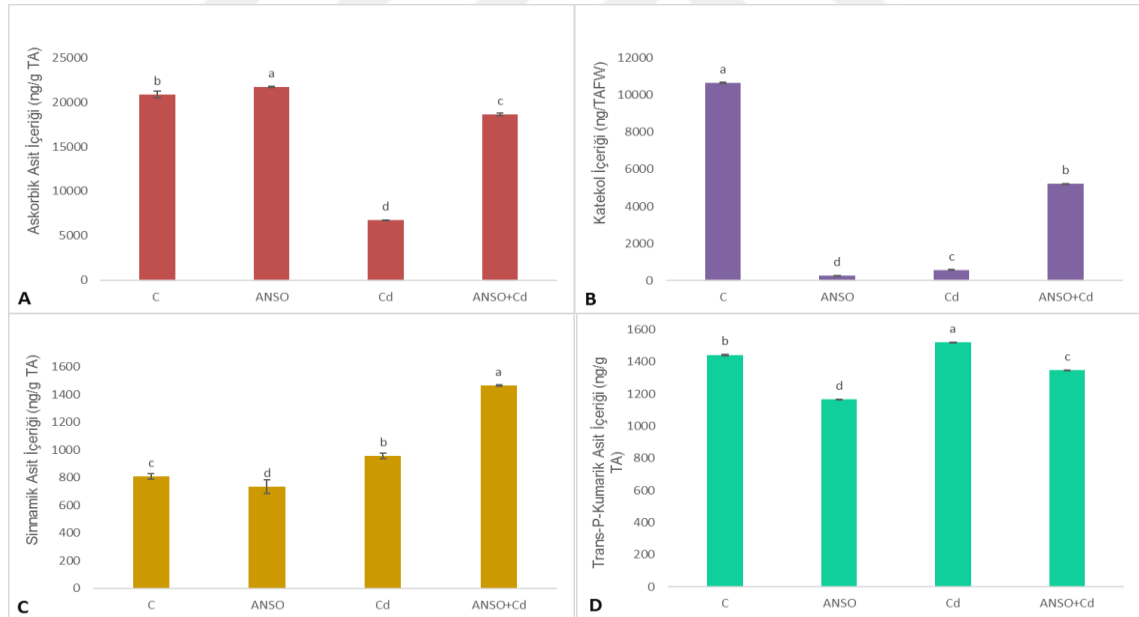
Çalışmamızda elde edilen sonuçlara benzer sonuçları olan çalışmalar mevcuttur. Cd stresi altındaki çavdar çimine (*Lolium perenne* L.) SNP şeklinde verilen NO ile bitkinin strese cevabının gözlemlendiği bir çalışmada tek başına Cd uygulamasının bitkinin Cd birikimini artırarak askorbik asit seviyelerini düşürdüğü fakat NO desteği ile bitkinin Cd birikiminin gerilediği ve askorbik asit seviyelerinin belirgin artış gösterdiği ortaya konulmuştur (Wang ve ark., 2016b).

Cd'ye duyarlı ve Cd toleranslı iki arpa çeşidi ile yapılan bir çalışmada, Cd konsantrasyonu arttıkça bitkilerin her ikisinde de (Cd'ye duyarlı tipte diğerine kıyasla yaklaşık 3 kat fazla) AsA değeri azalmış ve bitki gelişimi yavaşlamıştır (Wu ve ark., 2004). Çinko ve nikel streslerine maruz bırakılan *Cajanus cajan* bitkisinde uygulanan

ağır metallerin konsantrasyonları arttıkça askorbik asit değerlerinin düşüş gösterdiği saptanmıştır (Rao ve Sresty, 2000)

4.1.9.2 Katekol içeriği üzerine etkisi

En yüksek katekol değerine kontrol grubunda rastlanmıştır. Tek başına ANSO uygulamasının ve Cd uygulamasının katekol değerlerinde kontrole kıyasla kayda değer bir azalış meydana getirdiği açıktır. Fakat ANSO ön uygulaması sonrasında Cd muamelesi katekol değerlerini arttırmış bununla birlikte değerler yine de kontrol grubundan elde edilen değerlerin altında kalmıştır (Şekil 4.6B). Yetişsin ve Kardeş (2022)'de yaptıkları bir çalışmada bakır stresi altındaki mısır fidelerine bir sülfonat türevi olan aseton *O*-(4-klorofenilsülfonil)oksim ön uygulamasının bakır stresine göre katekol içeriğini azalttığını, tek başına aseton *O*-(4-klorofenilsülfonil)oksim uygulamasının da kontrole kıyasla katekol içeriğini azalttığını ifade etmişlerdir. Mevcut çalışmaya benzer olarak kadmiyum stresi altındaki mısır fidelerine aseton *O*-(4-klorofenilsülfonil)oksim ön uygulamasındaki katekol içeriğinin Cd uygulamasına göre önemli oranda arttığı kaydedilmiştir (Demiralay, 2022).



Şekil 4. 6 Cd stresi koşullarında ANSO takviyesi ile Askorbik asit (A), katekol (B), sinnamik asit (C) ve trans P-kumarik asit içeriklerinin değişimi

4.1.9.3 Sinnamik asit içeriği üzerine etkisi

Şikimik asit yolağından sentezlenen sinnamik asit, metabolik faaliyetlerdeki görevlerinin yanı sıra serbest radikalleri uzaklaştırarak antioksidan etki gösteren fenolik bileşiktir (Onat ve ark., 2021).

Çalışmamızda kontrol gruplarından elde edilen değerler ANSO ile muamele edilen gruptaki değerlerden bir miktar yüksek olmakla birlikte yakın değere sahiptir. Cd muamelesi ise sinnamik asit değerini kontrol ve ANSO gruplarına kıyasla arttırmıştır. Fakat en yüksek sinnamik asit değeri ANSO+Cd grubunda elde edilmiştir (Şekil 4.6C).

Mangrove ekosistemine ait bir bitki olan *Kandelia obovata*'da Cd stresörünün toksisitesine çinkonun etkisinin araştırıldığı bir çalışmada düşük dozlarda ZnSO₄ kullanımının bitkinin sinnamik asit ve 4-hidroksi benzoik asit üretimini tetiklediği ve böylelikle Cd stresi ile baş etmede bitkiye yardımcı olduğu gösterilmiştir (Shan, 2022). *Alpinia zerumbet* bitkisinde 24 saat bakır sülfat maruziyeti ile uçucu yağların, fenolik bileşiklerin, dihidro-5,6-dehidrokavain (DDK) seviyelerinin ve antioksidan aktivitenin araştırıldığı bir çalışmada bakır sülfat uygulaması ardından bitkinin kloroform ve etilasetat ekstratında sinnamik asit, dihidro-5,6-dehidrokavain ve vanilin değerleri dikkate değer yükselmiştir (Elzaawely ve ark., 2007).

4.1.9.4 Trans P-kumarik asit içeriği üzerine etkisi

Şekil 4.6D'de Cd stresi koşullarında ANSO ön uygulaması ile trans P-kumarik asit içerik değişimi verilmiştir. En yüksek trans P-kumarik asit değeri Cd ile muamele edilen örneklerde meydana gelmiştir. Kontrol gruplarındaki trans P-kumarik asit değeri Cd ile muamele edilen örneklerdekinden düşük fakat ANSO+Cd muamelesi gören örneklerden elde edilen değerden yüksektir. En düşük değer ise tek başına ANSO ile muamele edilen örneklerde gerçekleşmiştir.

Bakır stresi altındaki mısır fidelerine aseton *O*-(4-klorofenilsülfonil)oksim ön uygulaması bakır stresine göre trans P-kumarik asit içeriğini arttırmıştır (Yetişsin ve Kardeş, 2022). Cıva, bakır yüksek, sıcaklık (45°C) ve ultraviyole ışınların neden olduğu streslere maruz bırakılan *Bellis perennis* L. bitkisinin antioksidan sisteminde ve fenolik bileşik içeriklerinde meydana gelen değişiklikler gözlemlenmiş ve toplam fenolik bileşik düzeylerinin arttığı; hatta 45°C'de P-kumarik asitin 51,74 kat artış gösterdiği ortaya konulmuştur (Karakas ve ark., 2022).

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Mevcut çalışmada bitkinin Cd stresi altında yaşadığı olumsuzlukları hafifletmede ANSO ön uygulamasının etkisine bakılmıştır. Farklı parametreler üzerinden gerçekleştirdiğimiz değerlendirmeler ışığında ANSO ön uygulamasının bitkinin stres toleransına katkı sağladığı görülmüştür.

Tolerans konusunda en dikkat çekici sonuç, ANSO ön uygulamasının bitkinin biriktirdiği Cd miktarını 7,8 kat arttırmış olmasıdır. Mısır bitkisinin yüksek Cd birikimine rağmen hayatta kalmış olması ANSO'nun savunma sistemlerine sağladığı destekle mümkün olabilmektedir.

Cd varlığında artan ABA hormonu ANSO ön uygulaması ile azalmıştır. ABA artışının stoma kapanmasını ve dolayısıyla CO₂ yoksunluğunu tetiklediği düşünülürse ANSO ön uygulaması ile ABA üretiminin azalması bitki için olumlu olmuştur.

Cd, +2 değerlikli bir katyon olduğu için klorofil sentezini Mg⁺² ile yarışarak azaltıyor olabilir. Fotosentez için mutlak bir pigment olan klorofilin azalması organik madde birikimini inhibe edeceği için bitkide gelişim geriliğine neden olacaktır. Fakat ANSO ön uygulaması ile bu durum hafifletilebiliyor gibi görünmektedir.

H₂O₂ tehlikeli bir reaktif oksijen türüdür. Oksidatif stres ortamı oluşturarak bitki metabolizmasında yıkıcı etkiler yaratabilir. Cd stresi H₂O₂ üretimine neden olmasına rağmen, bitkinin antioksidan sistemi tarafından tolere edebilir. ANSO ön uygulaması strese rağmen H₂O₂ üretim miktarını azaltarak bitkiye oksidatif stresle savaşta avantaj sağlamıştır.

MDA, lipid peroksidasyonu hakkında bilgi veren bir parametredir. Cd stresi ile MDA artışı hücre zarı fosfolipitlerinin doymamış yağ asitlerinde bozunmanın göstergesidir. ANSO ön uygulaması MDA miktarını düşürerek membran sisteminin korunmasına önemli katkılar sağlıyor olabilir.

SOD kofaktör olarak +2 değerlikli metalleri (demir, manganez, bakır, çinko vb.) kullandığından Cd stresi SOD etkinliğini olumsuz etkilemiştir. Fakat ANSO ön uygulaması bu durumda etkisiz kalmıştır. ANSO varlığında CAT ve APX aktiviteleri belirgin bir artış göstererek reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonunda önemli savunma hattı oluşturmuşlardır.

Hücrede turgorun korunmasında katkısıyla dikkat çeken ve önemli bir osmoregülatör olan prolin Cd stresine cevap olarak artmış fakat ANSO ile birikimi

azalmıştır. Fenolik bileşikler ise elektron verici olarak strese cevapta rol alırlar. Askorbik asit, katekol ve sinnamik asit içerikleri ANSO+Cd uygulamasında, tek başına Cd uygulamasına göre artış sağlayarak ROS'ların süpürülmesine katkıda bulunmak suretiyle kadmiyum stresinin olumsuz etkilerine karşı savunmada görev almışlardır.

Tek başına ANSO uygulaması bitkide toksisiteye neden olmamıştır. Hatta H₂O₂ üretimi tek başına ANSO uygulamaları ile azalırken prolin içeriği artış göstermiştir.

Mısır bitkisi hiperakümülatör özelliği bulunan bir bitki değildir. Buna rağmen ANSO varlığında 7,8 kat Cd biriktirebilmiş ve metabolik faaliyetlerine devam edebilmiştir. Bu durumda, ANSO molekülünün mısır bitkisinin ağır metal şelatlama potansiyeline önemli katkılar sağladığı sonucuna varılabilir.

5.2 Öneriler

Mısır kullanım alanı geniş, küresel önem ihtiva eden, önemli bir tahıldır. Doğal ve antropojenik yollarla toprakta artan kadmiyum ağır metali mısırın ürün verimliliği için tehdit oluşturmaktadır. Çalışmamızın sonuçları ANSO ön uygulaması ile mısırın, kadmiyuma toleransının arttırılabileceğini göstermektedir. Değişen ve gelişen dünyada ağır metal kirlenmesinin önüne geçilmesi zor görünmektedir. Her geçen gün kadmiyum gibi ağır metallere kirlenen ekosistemlerin fitoremediasyon çalışmaları ile temizlenmesi mümkündür. Mısır hiperakümülatör bitkilerde aranan; hızlı gelişim ve yüksek biyokütle verimi özelliklerine sahip olmasına rağmen hiperakümülatör bitkiler sınıfına dahil değildir fakat ağır metallere kirlenmiş topraklarda, ANSO ön uygulaması yapılması durumunda, hiperakümülatör bitkiler ile birlikte fitoremediasyon çalışmalarında kullanılabilir. Ayrıca endüstrileşen dünyada kadmiyumun yeri dikkate alındığında, ANSO uygulaması ile kadmiyum biriktirme kabiliyeti arttırılmış, hiperakümülatör bitkilerin hasadı ile bitkilerden fitomining (bitki madenciliği) alanında da fayda sağlanabilir.

KAYNAKLAR

- Abu-Romman, S.M., Suwvan, M. 2009. Salt Stress-induced responses in cucumber callus, *Dirasat, Agricultural Science*, 36 (2), 100-106.
- Aebi, H. 1983. Catalase, *Methods of enzymatic analysis*.
- Ahmad, J., Ali, A.A., Baig, M.A., Iqbal, M., Haq, I., Qureshi, M.I. 2019. Role of phytochelatins in cadmium stress tolerance in plants, *Cadmium toxicity and tolerance in plants*, 185-212.
- Ahmad, P., Ozturk, M., Gucl, S. 2012. Oxidative damage and antioxidants induced by heavy metal stress in two cultivars of mustard (*Brassica juncea* L.) plants, *Fresenius Environ Bull*, 21 (10), 2953-2961.
- Akkurt, Z.M.E., Demirbaş, N. 2021. Türkiye'de Mısır Üretiminde Kendine Yeterliliğin Değerlendirilmesi.
- Algan, F.T.K., Bilen, S. 2005. Toprak kirlenmesi ve biyolojik çevre, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 36 (1), 83-88.
- Aliloo, A.A., Shahabivand, S. 2016. Piriformospora indica promotes growth and antioxidant activities of wheat plant under cadmium stress, *Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences*, 26 (3), 333-340.
- Almeselmani, M., Deshmukh, P., Sairam, R.K., Kushwaha, S., Singh, T. 2006. Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress, *Plant science*, 171 (3), 382-388.
- Alp, K. (2021), "Arpa (*hordeum vulgare* L.) fidelerinde nitrik oksit teşvikli kadmiyum toleransının araştırılması",
- Alyemeni, M.N., Ahanger, M.A., Wijaya, L., Alam, P., Bhardwaj, R., Ahmad, P. 2018. Selenium mitigates cadmium-induced oxidative stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants by modulating chlorophyll fluorescence, osmolyte accumulation, and antioxidant system, *Protoplasma*, 255 (2), 459-469.
- Anjum, S.A., Ashraf, U., Imran, K., Tanveer, M., Shahid, M., Shakoob, A., Longchang, W. 2017. Phyto-toxicity of chromium in maize: oxidative damage, osmolyte accumulation, anti-oxidative defense and chromium uptake, *Pedosphere*, 27 (2), 262-273.
- Anjum, S.A., Tanveer, M., Hussain, S., Bao, M., Wang, L., Khan, I., Ullah, E., Tung, S.A., Samad, R.A., Shahzad, B. 2015. Cadmium toxicity in Maize (*Zea mays* L.): consequences on antioxidative systems, reactive oxygen species and cadmium accumulation, *Environmental Science and Pollution Research*, 22 (21), 17022-17030.
- Arduini, I., Godbold, D.L., Onnis, A. 1994. Cadmium and copper change root growth and morphology of *Pinus pinea* and *Pinus pinaster* seedlings, *Physiologia plantarum*, 92 (4), 675-680.
- Arnon, D. 1949. Estimation of total chlorophyll, *Plant Physiology*, 24 (1), 1-15.
- Asati, A., Pichhode, M., Nikhil, K. 2016. Effect of heavy metals on plants: an overview, *International Journal of Application or Innovation in Engineering & Management*, 5 (3), 56-66.
- Asri, F.Ö., Sönmez, S. 2006. Ağır metal toksisitesinin bitki metabolizması üzerine etkileri, *Derim*, 23 (2), 36-45.
- Aydoğan, S., Erdağ, B., Aktaş, L. 2017. Bioaccumulation and oxidative stress impact of Pb, Ni, Cu, and Cr heavy metals in two bryophyte species, *Pleurochaete squarrosa* and *Timmiella barbuloidea*, *Turkish Journal of Botany*, 41 (5), 464-475.
- Ayhan, B., Ekmekçi, Y., Tanyolaç, D. 2007. Erken fide evresindeki bazı mısır çeşitlerinin ağır metal (kadmiyum ve kurşun) stresine karşı dayanıklılığının araştırılması.

- Ayhan, B., Ekmekçi, Y., Tanyolaç, D. 2005. Bitkilerde ağır metal zararları ve korunma mekanizmaları.
- Badawy, I.H., Hmed, A.A., Sofy, M.R., Al-Mokadem, A.Z. 2022. Alleviation of Cadmium and Nickel Toxicity and Phyto-Stimulation of Tomato Plant L. by Endophytic *Micrococcus luteus* and *Enterobacter cloacae*, *Plants*, 11 (15), 2018.
- Barrs, H., Weatherley, P. 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves, *Australian journal of biological sciences*, 15 (3), 413-428.
- Bashir, A., Rizwan, M., Ali, S., Zia ur Rehman, M., Ishaque, W., Atif Riaz, M., Maqbool, A. 2018. Effect of foliar-applied iron complexed with lysine on growth and cadmium (Cd) uptake in rice under Cd stress, *Environmental Science and Pollution Research*, 25 (21), 20691-20699.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies, *Plant and soil*, 39 (1), 205-207.
- Beauchamp, C., Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Analytical biochemistry*, 44 (1), 276-287.
- Benavides, M.P., Gallego, S.M., Tomaro, M.L. 2005. Cadmium toxicity in plants, *Brazilian journal of plant physiology*, 17, 21-34.
- Bhaduri, A.M., Fulekar, M. 2012. Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 11 (1), 55-69.
- Bişkin, N. (2012), "Aşırı bakır koşullarındaki mısır çeşitlerinde hidrojen peroksit ön muamelesinin fotosentetik aygıt ve antioksidan sistem üzerine etkisi", Karadeniz Teknik Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü,
- Boo, Y.C., Jung, J. 1999. Water deficit—induced oxidative stress and antioxidative defenses in rice plants, *Journal of Plant Physiology*, 155 (2), 255-261.
- Boudet, A.-M. 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds, *Phytochemistry*, 68 (22-24), 2722-2735.
- Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M., Inzé, D., Asada, K. 1994. Superoxide dismutase in plants, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13 (3), 199-218.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.
- Büyük, İ., Aydın, S.S., Sümer, A. 2012a. Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69 (2), 97-110.
- Büyük, İ., Soydam-Aydın, S., Aras, S. 2012b. Molecular responses of plants to stress conditions, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69 (2), 97-110.
- Chapin, F.S. 1991. Integrated responses of plants to stress, *BioScience*, 41 (1), 29-36.
- Corticeiro, S.C., Lima, A.I.G., Figueira, E.M.d.A.P. 2006. The importance of glutathione in oxidative status of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* under Cd exposure, *Enzyme and microbial technology*, 40 (1), 132-137.
- Çetin, V. 2014. Meyve ve sebzelerde kullanılan bitki gelişmeyi düzenleyiciler, *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi* (2).
- Çıkkılı, Y., Samet, H. 2018. Effects of Excess Cadmium on Growth, Tolerance and Physiological Characteristics of Purslane Varieties, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 28 (5), 7-18.
- Dağhan, H., Uygur, V., Köleli, N., Arslan, M., EREN, A. 2013. Transgenik ve transgenik olmayan tütün bitkilerinde ağır metal uygulamalarının azot, fosfor ve potasyum alımına etkisi.
- DalCorso, G., Farinati, S., Furini, A. 2010. Regulatory networks of cadmium stress in plants, *Plant signaling & behavior*, 5 (6), 663-667.

- DalCorso, G., Manara, A., Furini, A. 2013. An overview of heavy metal challenge in plants: from roots to shoots, *Metallomics*, 5 (9), 1117-1132.
- Dazy, M., Masfaraud, J.-F., Féraud, J.-F. 2009. Induction of oxidative stress biomarkers associated with heavy metal stress in *Fontinalis antipyretica* Hedw, *Chemosphere*, 75 (3), 297-302.
- de Pinto, M.C., De Gara, L. 2004. Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation, *Journal of experimental botany*, 55 (408), 2559-2569.
- Demiralay, M. 2022. Exogenous acetone O-(4-chlorophenylsulfonyl) oxime alleviates Cd stress-induced photosynthetic damage and oxidative stress by regulating the antioxidant defense mechanism in *Zea mays*, *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 1-15.
- Dmitrieva, V.A., Tyutereva, E.V., Voitsekhovskaja, O.V. 2020. Singlet oxygen in plants: Generation, detection, and signaling roles, *International journal of molecular sciences*, 21 (9), 3237.
- Doğru, A., Torlak, E. 2020. Tuz stresi altındaki mısır bitkilerinde eksojen askorbik asit uygulamasının etkileri, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 30 (Ek sayı (Additional issue)), 919-927.
- Edreva, A. 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach, *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 106 (2-3), 119-133.
- El Bassiouny, H.M., Gobarah, M.E., Ramadan, A.A. 2005. Effect of antioxidants on growth, yield and favism causative agents in seeds of *Vicia faba* L. plants grown under reclaimed sandy soil, *Journal of agronomy*.
- Elzaawely, A.A., Xuan, T.D., Tawata, S. 2007. Changes in essential oil, kava pyrones and total phenolics of *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burt. & RM Sm. leaves exposed to copper sulphate, *Environmental and experimental botany*, 59 (3), 347-353.
- Farid, M., Shakoor, M.B., Ehsan, S., Ali, S., Zubair, M., Hanif, M. 2013. Morphological, physiological and biochemical responses of different plant species to Cd stress, *Int J Chem Biochem Sci*, 3 (53.60).
- Foyer, C.H., Noctor, G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses, *The Plant Cell*, 17 (7), 1866-1875.
- Fryzova, R., Pohanka, M., Martinkova, P., Cihlarova, H., Brtnicky, M., Hladky, J., Kynicky, J. 2017. Oxidative stress and heavy metals in plants, *Reviews of environmental contamination and toxicology* volume 245, 129-156.
- Gull, A., Lone, A.A., Wani, N.U.I. 2019. Biotic and abiotic stresses in plants, *Abiotic and biotic stress in plants*, 1-19.
- Gupta, D.K., Palma, J.M., Corpas, F.J., 2018, *Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants*, *Springer*,
- Hassan, M.J., Shao, G., Zhang, G. 2005. Influence of cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activity in rice cultivars with different grain cadmium accumulation, *Journal of Plant Nutrition*, 28 (7), 1259-1270.
- Heath, R.L., Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation, *Archives of biochemistry and biophysics*, 125 (1), 189-198.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H. 2001. A large family of class III plant peroxidases, *Plant and Cell Physiology*, 42 (5), 462-468.

- Horemans, N., Foyer, C.H., Asard, H. 2000. Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane, *Trends in plant science*, 5 (6), 263-267.
- Hossain, M.A., Piyatida, P., da Silva, J.A.T., Fujita, M. 2012. Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation, *Journal of botany*, 2012.
- Hsu, Y., Kao, C. 2003. Role of abscisic acid in cadmium tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings, *Plant, cell & environment*, 26 (6), 867-874.
- İşçioğlu, P. (2007), "Fitoekstraksiyon ile ağır metallerin topraktan alınışı", Sakarya Üniversitesi,
- Javad, S., Shah, A., Ramzan, M., Sardar, R., Javed, T., Al-Huqail, A., Ali, H., Chaudhry, O., Yasin, N., Ahmed, S. 2022. Hydrogen sulphide alleviates cadmium stress in *Trigonella foenum-graecum* by modulating antioxidant enzymes and polyamine content, *Plant Biology*, 24 (4), 618-626.
- Kapur, D., Singh, K.J. 2019. Zinc alleviates cadmium induced heavy metal stress by stimulating antioxidative defense in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] crop, *Journal of Applied and Natural Science*, 11 (2), 338-345.
- Karakas, F.P., Sahin, G., Turker, A.U., Verma, S.K. 2022. Impacts of heavy metal, high temperature, and UV radiation exposures on *Bellis perennis* L.(common daisy): Comparison of phenolic constituents and antioxidant potential (enzymatic and non-enzymatic), *South African Journal of Botany*, 147, 370-379.
- Kireççi, O.A. 2018. Bitkilerde enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar, *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 7 (2), 473-483.
- Kısa, D., Elmastaş, M., Öztürk, L., Kayır, Ö. 2016. Responses of the phenolic compounds of *Zea mays* under heavy metal stress, *Applied Biological Chemistry*, 59 (6), 813-820.
- Knox, J.P., Dodge, A.D. 1985. Singlet oxygen and plants, *Phytochemistry*, 24 (5), 889-896.
- Korkmaz, A. 2021a. Copper-Catalyzed Electrophilic Amination of Diarylcadmium Reagents Utilizing Acetone O-(4-chlorophenylsulphonyl) oxime and Acetone O-(2-naphthylsulphonyl) oxime as Amination Agent, *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11 (3), 2102-2111.
- Korkmaz, A. 2021b. Room-temperature copper-catalyzed electrophilic amination of arylcadmium iodides with ketoximes, *Journal of the Iranian Chemical Society*, 18 (11), 3119-3125.
- Kumlay, A.M., Eryiğit, T. 2011. Bitkilerde büyüme ve gelişmeyi düzenleyici maddeler: bitki hormonları, *Journal of the Institute of Science and Technology*, 1 (2), 47-56.
- Kuriakose, S.V., Prasad, M. 2008. Cadmium stress affects seed germination and seedling growth in *Sorghum bicolor* (L.) Moench by changing the activities of hydrolyzing enzymes, *Plant growth regulation*, 54 (2), 143-156.
- Kutlu, İ., Turhan, E., Yorgancılar, Ö., Yorgancılar, A. 2017. Kuraklık stresinde buğday genotiplerinde verim komponentleri ve antioksidan enzim metabolizmasında değişimler, *KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi*, 20, 273-277.
- Lagriffoul, A., Mocquot, B., Mench, M., Vangronsveld, J. 1998. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.), *Plant and soil*, 200 (2), 241-250.
- Laspina, N., Groppa, M., Tomaro, M., Benavides, M. 2005. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress, *Plant science*, 169 (2), 323-330.

- Laura, A., Moreno-Escamilla, J.O., Rodrigo-García, J., Alvarez-Parrilla, E. 2019. Phenolic compounds. in: *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables*, Elsevier, pp. 253-271.
- Lee, D.H., Kim, Y.S., Lee, C.B. 2001. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.), *Journal of plant physiology*, 158 (6), 737-745.
- Lee, D.H., Lee, C.B. 2000. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays, *Plant science*, 159 (1), 75-85.
- Lee, J.G., Roberts, S.B., Morel, F.M. 1995. Cadmium: A nutrient for the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*, *Limnology and Oceanography*, 40 (6), 1056-1063.
- Lichtenthaler, H.K. 1987. [34] Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. in: *Methods in enzymology*, Vol. 148, Elsevier, pp. 350-382.
- Lim, J.-H., Park, K.-J., Kim, B.-K., Jeong, J.-W., Kim, H.-J. 2012. Effect of salinity stress on phenolic compounds and carotenoids in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.) sprout, *Food chemistry*, 135 (3), 1065-1070.
- Lu, Y., Li, X., He, M., Zhao, X., Liu, Y., Cui, Y., Pan, Y., Tan, H. 2010. Seedlings growth and antioxidative enzymes activities in leaves under heavy metal stress differ between two desert plants: a perennial (*Peganum harmala*) and an annual (*Halogeton glomeratus*) grass, *Acta Physiologiae Plantarum*, 32 (3), 583-590.
- Lyubenova, L., Nehnevajova, E., Herzig, R., Schröder, P. 2009. Response of antioxidant enzymes in *Nicotiana tabacum* clones during phytoextraction of heavy metals, *Environmental Science and Pollution Research*, 16 (5), 573-581.
- Martinoia, E., Klein, M., Geisler, M., Bovet, L., Forestier, C., Kolukisaoglu, Ü., Müller-Röber, B., Schulz, B. 2002. Multifunctionality of plant ABC transporters—more than just detoxifiers, *Planta*, 214 (3), 345-355.
- Matsuoka, Y., Vigouroux, Y., Goodman, M.M., Sanchez, J., Buckler, E., Doebley, J. 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (9), 6080-6084.
- Mazid, M., Khan, T.A., Khan, Z.H., Quddusi, S., Mohammad, F. 2011. Occurrence, biosynthesis and potentialities of ascorbic acid in plants, *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 1 (2), 167-184.
- Melih, O., Tozlu, E., metin Kumlay, A., Pehlivan, M. 2009. Ağır metallerin bitkiler üzerine etkileri, *Alinteri Journal of Agriculture Science*, 17 (2), 14-26.
- Michalak, A. 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress, *Polish journal of environmental studies*, 15 (4).
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R., Govindarajan, R., Kuriakose, S., Prasad, M. 2006. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L., *Plant physiology and biochemistry*, 44 (1), 25-37.
- Morales, J.M.L., Rodríguez-Monroy, M., Sepúlveda-Jiménez, G. 2012. Betacyanin accumulation and guaiacol peroxidase activity in *Beta vulgaris* L. leaves following copper stress, *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 81 (3).
- Munné-Bosch, S., Alegre, L. 2002. Interplay between ascorbic acid and lipophilic antioxidant defences in chloroplasts of water-stressed *Arabidopsis* plants, *FEBS letters*, 524 (1-3), 145-148.
- Muradoglu, F., Gundogdu, M., Ercisli, S., Encu, T., Balta, F., Jaafar, H.Z., Zia-Ul-Haq, M. 2015. Cadmium toxicity affects chlorophyll a and b content, antioxidant enzyme activities and mineral nutrient accumulation in strawberry, *Biological research*, 48 (1), 1-7.

- Naciri, R., Lahrir, M., Benadis, C., Chtouki, M., Oukarroum, A. 2021. Interactive effect of potassium and cadmium on growth, root morphology and chlorophyll a fluorescence in tomato plant, *Scientific Reports*, 11 (1), 1-10.
- Nakano, Y., Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant and cell physiology*, 22 (5), 867-880.
- Oladele, E., Adewumi, O., Yahaya, T., Taiwo, I. 2019. Response of Bambara groundnut (*Vigna subterranean* L.) and Maize (*Zea mays* L.) to heavy metal stress, *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 8 (1), 1-9.
- Onat, K.A., Sezer, M., Bekir, Ç. 2021. Fenolik Bileşiklerden Sinnamik Asit, Kafeik Asit ve p-kumarik Asit'in Bazı Biyolojik Aktiviteleri, *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11 (4), 2587-2598.
- Ortega-Villasante, C., Rellán-Alvarez, R., Del Campo, F.F., Carpena-Ruiz, R.O., Hernández, L.E. 2005. Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*, *Journal of experimental botany*, 56 (418), 2239-2251.
- Ortiz, D.F., Ruscitti, T., McCue, K.F., Ow, D.W. 1995. Transport of Metal-binding Peptides by HMT1, A Fission Yeast ABC-type Vacuolar Membrane Protein (*), *Journal of Biological Chemistry*, 270 (9), 4721-4728.
- Öcal Özdamar, F., Baysal Furtana, G., Ellialtıoğlu, Ş., Tıpırdamaz, R. 2016. Hidrojen peroksit ve nitrik oksit ilişkisinin bitkilerde abiyotik stres toleransındaki rolü, *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 25 (1).
- Pál, M., Horváth, E., Janda, T., Páldi, E., Szalai, G. 2006. Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 169 (2), 239-246.
- Pandian, S., Rakkammal, K., Rathinapriya, P., Rency, A.S., Satish, L., Ramesh, M. 2020. Physiological and biochemical changes in sorghum under combined heavy metal stress: An adaptive defence against oxidative stress, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101830.
- Parmar, P., Kumari, N., Sharma, V. 2013. Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus of plants under cadmium stress, *Botanical Studies*, 54 (1), 1-6.
- Pascale, S.D., Maggio, A., Fogliano, V., Ambrosino, P., Ritieni, A. 2001. Irrigation with saline water improves carotenoids content and antioxidant activity of tomato, *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 76 (4), 447-453.
- Piperno, D.R., Holst, I., Winter, K., McMillan, O. 2015. Teosinte before domestication: Experimental study of growth and phenotypic variability in Late Pleistocene and early Holocene environments, *Quaternary International*, 363, 65-77.
- Postiglione, A.E., Muday, G.K. 2020. The role of ROS homeostasis in ABA-induced guard cell signaling, *Frontiers in plant science*, 11, 968.
- Qi, Z.-Y., Ahammed, G.J., Jiang, C.-Y., Li, C.-X., Zhou, J. 2020. The E3 ubiquitin ligase gene *SIRING1* is essential for plant tolerance to cadmium stress in *Solanum lycopersicum*, *Journal of Biotechnology*, 324, 239-247.
- Quartacci, M.F., Sgherri, C.L., Pinzino, C., Navari-Izzo, F. 1994. Superoxide radical production in wheat plants differently sensitive to drought, *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, Section B: Biological Sciences*, 102, 287-290.
- Ranum, P., Peña-Rosas, J.P., Garcia-Casal, M.N. 2014. Global maize production, utilization, and consumption, *Annals of the new York academy of sciences*, 1312 (1), 105-112.
- Rao, G., Huang, S., Ashraf, U., Mo, Z., Duan, M., Pan, S., Tang, X. 2019. Ultrasonic seed treatment improved cadmium (Cd) tolerance in *Brassica napus* L, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 185, 109659.

- 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 (1), 113-128.
- Rether, A. (2002), "Entwicklung und Charaktisierung wasserlöslicher Benzoylthioharnstoff-funktionalisierter Polymere zur selektiven Abtrennung von Schwermetallionen aus Abwässern und Prozesslösungen", Technische Universität München,
- Richards, S.L., Wilkins, K.A., Swarbreck, S.M., Anderson, A.A., Habib, N., Smith, A.G., McAinsh, M., Davies, J.M. 2015. The hydroxyl radical in plants: from seed to seed, *Journal of experimental botany*, 66 (1), 37-46.
- Rivero, R.M., Ruiz, J.M., Garcia, P.C., Lopez-Lefebvre, L.R., Sánchez, E., Romero, L. 2001. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants, *Plant science*, 160 (2), 315-321.
- Romero-Puertas, M.C., Terron-Camero, L.C., Peláez-Vico, M.Á., Olmedilla, A., Sandalio, L.M. 2019. Reactive oxygen and nitrogen species as key indicators of plant responses to Cd stress, *Environmental and Experimental Botany*, 161, 107-119.
- Romero-Puertas, M., Rodríguez-Serrano, M., Corpas, F., Gomez, M.d., Del Rio, L., Sandalio, L. 2004. Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂⁻ and H₂O₂ in pea leaves, *Plant, Cell & Environment*, 27 (9), 1122-1134.
- Sadak, M., Abd Elhamid, E., Mahmoud, M. 2017. Glutathione induced antioxidant protection against salinity stress in chickpea (*Cicer arietinum* L.) plant, *Egyptian Journal of Botany*, 57 (2), 293-302.
- Sağlam, A., Yetişsin, F., Demiralay, M., Terzi, R. 2016. Copper stress and responses in plants. in: *Plant metal interaction*, Elsevier, pp. 21-40.
- Sağlam, N., Cihangir, N. 1995. Ağır metallerin biyolojik süreçlerle biyosorbisyonu çalışmaları, *Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 11 (11).
- Sandalio, L.M., Rodríguez-Serrano, M., Río, L.A.d., Romero-Puertas, M.C. 2009. Reactive oxygen species and signaling in cadmium toxicity. in: *Reactive oxygen species in plant signaling*, Springer, pp. 175-189.
- Saxena, I., Srikanth, S., Chen, Z. 2016. Cross talk between H₂O₂ and interacting signal molecules under plant stress response, *Frontiers in Plant Science*, 7, 570.
- Scott, M., Emery, M. 2016. Maize: overview, *Encyclopedia of food grains*, 99-104.
- Seal, T. 2016. Quantitative HPLC analysis of phenolic acids, flavonoids and ascorbic acid in four different solvent extracts of two wild edible leaves, *Sonchus arvensis* and *Oenanthe linearis* of North-Eastern region in India, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6 (2), 157-166.
- Shah, A.A., Khan, W.U., Yasin, N.A., Akram, W., Ahmad, A., Abbas, M., Ali, A., Safdar, M.N. 2020. Butanolide alleviated cadmium stress by improving plant growth, photosynthetic parameters and antioxidant defense system of Brassica oleracea, *Chemosphere*, 261, 127728.
- Shan, C. 2022. Mechanism of zinc alleviating cadmium toxicity in mangrove plant (*Kandelia obovata*).
- Sharma, R.K., Agrawal, M. 2005. Biological effects of heavy metals: an overview, *Journal of environmental Biology*, 26 (2), 301-313.
- Sheokand, S., Bhankar, V., Sawhney, V. 2010. Ameliorative effect of exogenous nitric oxide on oxidative metabolism in NaCl treated chickpea plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22, 81-90.

- Shi, B., Qu, Y., Li, H. 2017. Gypsum alleviated hydroxyl radical-mediated oxidative damages caused by alkaline bauxite residue in leaves of *Atriplex canescens*, *Ecological Engineering*, 98, 166-171.
- Shu, D.-F., Wang, L.-Y., Duan, M., Deng, Y.-S., Meng, Q.-W. 2011. Antisense-mediated depletion of tomato chloroplast glutathione reductase enhances susceptibility to chilling stress, *Plant Physiology and Biochemistry*, 49 (10), 1228-1237.
- Singh, S., Prasad, S.M. 2014. Growth, photosynthesis and oxidative responses of *Solanum melongena* L. seedlings to cadmium stress: mechanism of toxicity amelioration by kinetin, *Scientia Horticulturae*, 176, 1-10.
- Skorzynska-Polit, E. 2007. Lipid peroxidation in plant cells, its physiological role and changes under heavy metal stress, *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 76 (1).
- Sørensen, M., Neilson, E.H., Møller, B.L. 2018. Oximes: unrecognized chameleons in general and specialized plant metabolism, *Molecular Plant*, 11 (1), 95-117.
- Souza, L.A., Piotto, F.A., Nogueirol, R.C., Azevedo, R.A. 2013. Use of non-hyperaccumulator plant species for the phytoextraction of heavy metals using chelating agents, *Scientia Agricola*, 70, 290-295.
- Strable, J., Scanlon, M.J. 2009. Maize (*Zea mays*): a model organism for basic and applied research in plant biology, *Cold spring harbor protocols*, 2009 (10), pdb. emo132.
- Surowiak, A.K., Lochyński, S., Strub, D.J. 2020. Unsubstituted oximes as potential therapeutic agents, *Symmetry*, 12 (4), 575.
- Şen, A., Alikamanoğlu, S. 2015. Üç buğday çeşidinin NaCl uygulamasına cevapları: Lipit peroksidasyonunda, hücre canlılığında, hidrojen peroksit içeriğinde ve antioksidan savunma parametrelerinde değişiklikler, *IUFS Journal of Biology*, 74 (1), 13-23.
- Tayefi-Nasrabadi, H., Dehghan, G., Daeihassani, B., Movafegi, A., Samadi, A. 2011. Some biochemical properties of guaiacol peroxidases as modified by salt stress in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive safflower (*Carthamus tinctorius* L. cv.) cultivars, *African Journal of Biotechnology*, 10 (5), 751-763.
- Terzi, H., Yıldız, M. 2011. Ağır metaller ve fitoremediasyon: fizyolojik ve moleküler mekanizmalar, *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 11 (1), 1-22.
- Terzi, R., Saruhan-Guler, N., Biskin, N., Kadioglu, A. 2018. Exogenous Hydrogen Peroxide Alleviates Copper Toxicity by Stimulating Antioxidant System and Increases Photosynthesis Efficiency in Maize Seedlings, *FEB-Fresenius Environmental Bulletin*, 996.
- Tewari, R.K., Kumar, P., Sharma, P.N. 2006. Antioxidant responses to enhanced generation of superoxide anion radical and hydrogen peroxide in the copper-stressed mulberry plants, *Planta*, 223 (6), 1145-1153.
- Thakur, S., Singh, L., Wahid, Z.A., Siddiqui, M.F., Atnaw, S.M., Din, M.F.M. 2016. Plant-driven removal of heavy metals from soil: uptake, translocation, tolerance mechanism, challenges, and future perspectives, *Environmental monitoring and assessment*, 188 (4), 1-11.
- Torres, A.F., Slegers, P.M., Noordam-Boot, C.M., Dolstra, O., Vlaswinkel, L., van Boxtel, A.J., Visser, R.G., Trindade, L.M. 2016. Maize feedstocks with improved digestibility reduce the costs and environmental impacts of biomass pretreatment and saccharification, *Biotechnology for biofuels*, 9 (1), 1-15.
- Tunçtürk, R., Tunçtürk, M., Nohutçu, L. 2020. Ağır Metal Stresi (Cd) Altında Yetiştirilen *Trigonella foenum-graecum* L. Bitkisinin Bazı Büyüme ve Fizyolojik Parametrelerinin İncelenmesi, *ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 8 (2), 455-464.

- Turhal, K. 2021. Türkiye'de Yıllara Göre Mısır (*Zea mays* L.) Ekim Alanları İle Verimin Mısır Üretimine Olan Etkileri, *ISPEC Journal of Agricultural Sciences*, 5 (2), 418-425.
- Urbanek, H., Kuzniak-Gebarowska, E., Herka, K. 1991. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase, *Acta Physiologiae Plantarum*, 13 (1).
- Velikova, V., Yordanov, I., Adreva, A. 2000. Some antioxidant systems in acid rain treated bean plants; protective role of exogenous polyamines, *Plant. Sci*, 151, 59-66.
- Vermerris, W., Nicholson, R., 2007, Phenolic compound biochemistry, *Springer Science & Business Media*,
- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R.K., Kumar, V., Verma, R., Upadhyay, R., Pandey, M. 2017. Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects, *Frontiers in plant science*, 8, 161.
- Wang, J., Lin, L., Luo, L., Liao, M.a., Lv, X., Wang, Z., Liang, D., Xia, H., Wang, X., Lai, Y. 2016a. The effects of abscisic acid (ABA) addition on cadmium accumulation of two ecotypes of *Solanum photeinocarpum*, *Environmental monitoring and assessment*, 188 (3), 1-8.
- Wang, M., Zou, J., Duan, X., Jiang, W., Liu, D. 2007. Cadmium accumulation and its effects on metal uptake in maize (*Zea mays* L.), *Bioresource Technology*, 98 (1), 82-88.
- Wang, W., Bai, X., Dong, Y., Chen, W., Song, Y., Tian, X. 2016b. Effects of application of exogenous NO on the physiological characteristics of perennial ryegrass grown in Cd-contaminated soil, *Journal of soil science and plant nutrition*, 16 (3), 731-744.
- Waśkiewicz, A., Beszterda, M., Goliński, P. 2014. Nonenzymatic antioxidants in plants. in: *Oxidative damage to plants*, Elsevier, pp. 201-234.
- Wójcik, M., Tukiendorf, A. 2005. Cadmium uptake, localization and detoxification in *Zea mays*, *Biologia plantarum*, 49 (2), 237-245.
- Wu, F.-B., Chen, F., Wei, K., Zhang, G.-P. 2004. Effect of cadmium on free amino acid, glutathione and ascorbic acid concentrations in two barley genotypes (*Hordeum vulgare* L.) differing in cadmium tolerance, *Chemosphere*, 57 (6), 447-454.
- Xue, Z.-C., Gao, H.-Y., Zhang, L.-T. 2013. Effects of cadmium on growth, photosynthetic rate and chlorophyll content in leaves of soybean seedlings, *Biologia Plantarum*, 57 (3), 587-590.
- Yalçın, V., Leblebici, Z. (2014), "Bazı ağır metallerin (Pb, Cd, Ni) sucül bitkiler (*Salvinia natans* (L.) All., *Lemna minor* L.) üzerinde yaptığı stres ve biyolojik yanıtlar", Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi,
- Yamauchi, Y., Furutera, A., Seki, K., Toyoda, Y., Tanaka, K., Sugimoto, Y. 2008. Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification in heat-stressed plants, *Plant physiology and biochemistry*, 46 (8-9), 786-793.
- Yang, L.P., Zhu, J., Wang, P., Zeng, J., Tan, R., Yang, Y.Z., Liu, Z.M. 2018. Effect of Cd on growth, physiological response, Cd subcellular distribution and chemical forms of *Koeleria paniculata*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 160, 10-18.
- Yao, C., Zhang, F., Sun, X., Shang, D., He, F., Li, X., Zhang, J., Jiang, X. 2019. Effects of S-Abscisic acid (S-ABA) on seed germination, seedling growth, and *Asr1* gene

- expression under drought stress in maize, *Journal of Plant Growth Regulation*, 38 (4), 1300-1313.
- Yarsan, E. 1998. Lipid peroksidasyon olayı ve önlenmesine yönelik uygulamalar, *Yüzüncü yıl üniversitesi veteriner fakültesi dergisi*, 9 (1), 89-95.
- Yavaş, İ., Yelda, E. 2021. Bitkilerin Abiyotik Stres Koşullarıyla Başa Çıkmasına Yardımcı Strigolaktonlar, *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi* (31), 686-690.
- Yerli, C., Çakmakçı, T., Sahin, U., Tüfenkçi, Ş. 2020. Ağır metallerin toprak, bitki, su ve insan sağlığına etkileri, *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 9 (Özel Sayı), 103-114.
- Yetişsin, F., Kardeş, İ. 2022. Could acetone O-(4-chlorophenylsulfonyl) oxime be a copper chelating and antioxidative molecule on maize seedlings?, *International Journal of Phytoremediation*, 24 (7), 721-729.
- Yıldırım, E., Ekinci, M., Turan, M., Güleray, A., Selda, Ö., Dursun, A., Raziye, K., Balci, T. 2019. Impact of cadmium and lead heavy metal stress on plant growth and physiology of rocket (*Eruca sativa* L.), *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 22 (6), 843-850.
- Yılmaz, D.D., Parlak, K.U. 2011. Changes in proline accumulation and antioxidative enzyme activities in *Groenlandia densa* under cadmium stress, *Ecological Indicators*, 11 (2), 417-423.
- Zengin, K., Munzuroğlu, Ö. 2003. Fasulye fidelerinin (*Phaseolus vulgaris* L.) kök, gövde ve yaprak büyümesi üzerine kadmiyum (Cd⁺⁺) ve Civa (Hg⁺⁺)'nın etkileri, *Fen Bilimleri Dergisi*, 24 (1), 64-75.
- Zhang, C., He, Q., Wang, M., Gao, X., Chen, J., Shen, C. 2020. Exogenous indole acetic acid alleviates Cd toxicity in tea (*Camellia sinensis*), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190, 110090.
- Zhang, F.-Q., Wang, Y.-S., Lou, Z.-P., Dong, J.-D. 2007. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*), *Chemosphere*, 67 (1), 44-50.
- Zhou, Y.-Y., Wang, Y.-S., Inyang, A.I. 2021. Ecophysiological differences between five mangrove seedlings under heavy metal stress, *Marine Pollution Bulletin*, 172, 112900.