

T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ABSİSİK ASİTİN KADMIYUM TOKSİSİTESİNE MARUZ BIRAKILAN
Arabidopsis thaliana sos5 MUTANTI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS

Aylin KARAKURT

EYLÜL-2022
GÜMÜŞHANE



**T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**ABSİSİK ASİTİN KADMIYUM TOKSİSİTESİNE MARUZ BIRAKILAN
Arabidopsis thaliana sos5 MUTANTI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF ABSCISIC ACID ON *Arabidopsis thaliana sos5* MUTANT EXPOSED TO CADMIUM TOXICITY

YÜKSEK LİSANS

Aylin KARAKURT

**EYLÜL-2022
GÜMÜŞHANE**



T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ABSİSİK ASİTİN KADMIYUM TOKSİSİTESİNE MARUZ BIRAKILAN
Arabidopsis thaliana sos5 MUTANTI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF ABSCISIC ACID ON *Arabidopsis*
thaliana sos5 MUTANT EXPOSED TO CADMIUM TOXICITY

YÜKSEK LİSANS

Aylin KARAKURT

Danışman: Doç. Dr. Tuba ACET

EYLÜL-2022
GÜMÜŞHANE

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlamış olduğum “**Absisik Asitin Kadmiyum Toksisitesine Maruz Bırakılan *Arabidopsis thaliana* sos5 Mutantı Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması**” isimli bu tezimin, tamamen kendi çalışmam olduğunu, her alıntıya kaynak gösterdiğimi, alıntı yaptığım tüm çalışmaları kaynakçada belirttiğimi ve Gümüşhane Üniversitesi’nin lisanslı kullanıcısı olduğu intihal yazılım programı ile Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlediği kıstaslara uygun olarak raporladığımı taahhüt ederim. Tezimin kâğıt ve elektronik kopyalarının Gümüşhane Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü arşivinde saklanmasına izin verdiğimi onaylarım.

Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

29/09/2022

.....
Aylin KARAKURT

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Gümüşhane Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır. Bu yüksek lisans tezi 20.E3108.07.01 no'lu GÜBAP 2907: Lisansüstü Öğrenci Destek Programı tarafından desteklenmiştir.

Lisansüstü öğrenimim ve çalışmalarım boyuncaengin bilgisi ve tecrübelerini benden esirgemeyip bana her konuda sonsuz destekte ve yardımda bulunan danışman hocam Doç. Dr. Tuba ACET'e tezime ve gelecekteki hayatıma sunduğu katkılarından dolayı minnetlerimi ileterek, teşekkür ederim.

Araştırmanın uygulama sürecinde yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Buğra BOZKIR'a, Biyolog Osman AKMEŞE'ye, sayın Gümüşhane İl Tarım ve Orman Müdürü İbrahim KOÇ'a ve tez yazım sürecinde bana yardımını esirgemeyen sevgili meslektaşlarım Biyoinformatik Uzmanı Ebru ŞİMŞEK ve Uzman Biyolog Selen ÇAKER'e teşekkürü bir borç bilirim.

Her anımda yanımda olan, bana her türlü manevi desteği veren ve tez yazım süresince bana yardımını esirgemeyen yol arkadaşım Burak Can ŞENAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bana olan inancını ve güvenini her zaman hissettiğim Dostlarım; Merve ÖZYÜREK, Funda OKUMUŞ ve Funda Pınar AKKUŞ'a vermiş oldukları desteklerden ötürü çok teşekkür ederim.

Öğrenim yaşamım boyunca beni her yönden destekleyen, hep arkamda olan, bana inanan, girdiğim hiçbir yolda beni yalnız bırakmayan ve bana her türlü imkanı sunan annem, babam ve sevgili kardeşime çok teşekkür ederim.

Aylin KARAKURT
GÜMÜŞHANE – 2022

ÖZET

SOS5 lokusu (FLA4), bitkilerin tuz stresi koşullarında hücre yüzeyi yapışma proteinini kodlar ve normal hücre genişlemesi, hücre çeperi bütünlüğü, yapısını devam ettirmede gereklidir. Bu genin mutasyonu ile oluşan sos5 (fla4) mutanı, tuz stresi altında, anormal kök genişlemesiyle kısa ve şişman kök fenotipi sergilemektedir. ABA'nın bu fenotipi baskıladığı bilinmektedir. Çalışmamızda, *Arabidopsis thaliana* mutant bitki Cd stresi altında benzer bir kök fenotipi sergilemiştir. Bu durumun Absisik asit (ABA) hormonuyla ilişkili olarak, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeydeki etkileri bilinmemektedir. Bu amaçla, çalışmada 50 µM Cd stresi altında dıştan 5 µM ABA muamelesi ile mutant sos5 bitkisinin büyüme ve gelişmesi, içsel Cd miktarları, lipid peroksidasyonu, prolin, hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarları, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve askorbat peroksidaz (APX) enzimlerinin aktiviteleri belirlendi. Stres uygulamasının ardından, RNA izolasyonu yapıldı ve cDNA'lar sentezlendi. ABA1, CYP707A3, RD29A ve RD29B genleri ters transkriptaz enzimi ile analiz edildi. Elde edilen bulgulara göre, Cd stresi altındaki sos5 mutant bitkilere dıştan ABA uygulamasıyla yalnız Cd stresi altındakilere göre, mevcut hücresel hasar ortadan kalkmış, içsel H₂O₂ değeri azalmış, prolin miktarı artmış ve antioksidan enzim aktiviteleri indüklenmiştir. Bu değişimlere bağlı olarak, mutant bitki fenotipik olarak yabancı tipe oldukça benzerlik göstermiştir. Cd stresi altında mutant bitkilerdeki ABA ilişkili gen ifadelerinin yabancı tipe göre düşük olduğu belirlenmiştir. Cd stresi altında dışarıdan ABA uygulamasının bitkilerdeki içsel Cd miktarını, sadece stres uygulanan gruplara kıyasla, önemli ölçüde düşürdüğü görülmüştür. Çalışmamızda SOS5 gen lokusunun sadece tuz stresiyle ilişkili olmadığını, aynı zamanda Cd stresi koşullarında da hücre duvarı bütünlüğünü sağladığını göstermesi bakımından önemlidir. Elde edilen bulguların, literatürde önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Cd stresi, Absisik asit, *Arabidopsis thaliana*, sos5 mutant, Antioksidan enzim

SUMMARY

The SOS5 locus (FLA4) is required for normal cell expansion, wall integrity, and maintenance of structure. The *sos5* (*fla4*) mutant exhibits a short and fat root phenotype with abnormal root expansion under salt stress. Absciscic acid (ABA) is known to suppress this phenotype. The physiological, biochemical and molecular effects of this situation in relation to the ABA are not fully known. In this study, growth and development of mutant *sos5* *Arabidopsis thaliana* with abnormal root phenotype were treated with 50 μ M Cd and 5 μ M ABA. Cd stress, internal Cd amounts, lipid peroxidation, proline, antioxidant enzyme activities were determined. After the stress application, RNA was isolated and cDNAs were synthesized. ABA1, CYP707A3, RD29A and RD29B genes were analyzed by reverse transcriptase enzyme. According to the findings, the existing cellular damage was eliminated, the intrinsic hydrogen peroxide (H_2O_2) value decreased, the amount of proline increased, and antioxidant enzyme activities were induced by external ABA application to *sos5* mutant plants under Cd stress compared to those under Cd stress alone. Due to these changes, the mutant plant was phenotypically very similar to the wild type. It was determined that ABA-related gene expressions in mutant plants under Cd stress were lower than wild type. The external application of ABA under Cd stress significantly reduced the amount of internal Cd in plants compared to the stress-only groups. Our study shows that the SOS5 gene locus is not only associated with salt stress, but also provides cell wall integrity under Cd stress.

Keywords: Cd stress, Absciscic acid, *Arabidopsis thaliana*, *sos5* mutant, Antioxidant enzyme

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	III
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	IV
TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XIII
EKLER DİZİNİ	XVI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XVII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Stres Ve Çeşitleri	5
1.2.1. Ağır Metal Stresi Ve Toksisitesi	6
1.2.1.1. Cd Stresi	8
1.2.2. Ağır Metal Stresinin (Cd) Bitkilerin Fizyolojisi Üzerine Etkileri	8
1.2.3. Cd Stresinin Hücresel Düzeyde Etkileri	9
1.2.3.1. Cd'un Hücre Zarı Ve Hücre Duvarı Üzerine Etkisi.....	9
1.2.3.2. Cd Stresinin Organeller Üzerine Etkisi.....	9
1.2.3.3. Cd Stresinin Su İçeriği, Fotosentez Ve Protein Üzerine Etkisi.....	10
1.2.3.4. Cd'un Reaktif Oksijen Türlerinin Sentezi Ve Antioksidanlar Üzerine Etkisi ..	11
1.2.3.4.1. Serbest Radikaller	13
1.2.3.4.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet-}$)	13
1.2.3.4.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	14
1.2.3.4.1.3. Hidroksil Radikali ($OH^{\bullet}$)	14
1.2.3.4.1.4. Singlet Oksijen ($^1O_2$)	15
1.3. Bitkilerin Cd Stresine Karşı Geliştirdikleri Tolerans Mekanizmaları	15
1.3.1. SOS Sinyal İletim Yolu.....	17
1.3.2. Bitkilerin Reaktif Oksijen Türlerine Karşı Gösterdiği Antioksidan Yanıtlar	18
1.3.2.1. Antioksidan Enzimler.....	18
1.3.2.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	19
1.3.2.1.2. Katalaz (CAT).....	20
1.3.2.1.3. Askorbat Peroksidaz (APX).....	21

1.3.3. Ağır Metal Stresi Ve Absisik Asit Arasındaki İlişki	21
1.3.4. ABA'nın Moleküler Yapısı	22
1.3.4.1. ABA Biyosentezi Ve Katabolizması	22
1.3.4.2. ABA Ve Sinyal İletimi	24
1.4. SOS5 Geninin Hücre Çeperi İle İlişkisi	26
1.5. <i>Arabidopsis thaliana</i> Bitkisinin Önemi	29
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	30
2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi Ve Uygulanan Stres Yöntemleri	30
2.1.1. Tohumların Eldesi	30
2.1.2. Tohum Sterilizasyonu	30
2.1.3. <i>Arabidopsis thaliana</i> Bitki Materyali Ve Büyüme Koşulları	30
2.1.4. Bitkilere Cd Stresi Ve ABA Uygulaması	31
2.2. Stres Altında Bitkilerde Meydana Gelen Morfolojik Değişimlerin Belirlenmesi ...	31
2.3. Bağlı Su İçeriğinin (RWC) Belirlenmesi	32
2.4. Fotosentetik Pigment Analizi	32
2.5. Antosiyanin Miktarının Belirlenmesi	33
2.6. Prolin Miktarının Belirlenmesi	33
2.7. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Tayini	33
2.7.1. Enzimler İçin Ekstrakt Hazırlanması	34
2.7.2. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Tayini	34
2.7.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini	34
2.7.4. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesinin Tayini	35
2.8. İçsel Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Tayini	35
2.9. Lipit Peroksidasyonu (MDA) Miktarının Belirlenmesi	36
2.10. Cd Analizi	36
2.11. Total RNA İzolasyonu Ve cDNA Sentezi	36
2.11.1. Reverse Transkriptaz PCR	37
2.11.2. Agaroz Jel Elektrophorezi	37
3. BULGULAR	38
3.1. ABA'nın Cd Stresine Maruz Kalan sos5 Mutant Bitkileri Üzerine Etkisi	38
3.2. ABA'nın Cd Stresine Maruz Kalan sos5 Mutant Bitkilerindeki Hidrojen Peroksit İçeriğine Etkisi	39
3.3. ABA'nın Cd Stresine Maruz Kalan sos5 Mutant Bitkilerindeki MDA Miktarına Etkisi	41
3.4. ABA'nın Cd Stresine Maruz Kalan sos5 Mutant Bitkilerindeki Antosiyanin İçeriğine Etkisi	42

3.5. ABA'nın Cd Stresine Maruz Kalan sos5 Mutant Bitkilerindeki Prolin Miktarına Etkisi.....	43
3.6. ABA'nın Cd Stresine Maruz Kalan sos5 Mutant Bitkilerindeki Klorofil Ve Karotenoid İçeriğine Etkisi.....	44
3.7. ABA'nın Cd Stresine Maruz Kalan sos5 Mutant Bitkilerindeki %RWC Değerine Etkisi.....	46
3.8. ABA'nın Cd Stresine Maruz Kalan sos5 Mutant Bitkilerindeki CAT Aktivitesine Etkisi.....	48
3.9. ABA'nın Cd Stresine Maruz Kalan sos5 Mutantındaki SOD Aktivitesine Etkisi ..	49
3.10. ABA'nın Cd Stresine Maruz Kalan sos5 Mutant Bitkilerindeki APX Aktivitesine Etkisi.....	50
3.11. sos5 (<i>fla4</i>) Mutant Ve Yabani Bitkilerde Cd Miktarı	51
3.12. Cd Stresi Altındaki Yabani Tip Ve sos5 Mutant Bitkilerin Gen İfade Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	52
4. TARTIŞMA	53
5. SONUÇ VE DEĞERLENDİRME.....	60
KAYNAKÇA	61
EKLER.....	83
ÖZGEÇMİŞ.....	84

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Ağır metal stresine yanıt olarak belirlenmiş olan proteinler ve fonksiyonları (Ahsan vd., 2009).....	18
Tablo 2. Mutant isimlerinin kısaltmaları.....	30
Tablo 3. PCR prosedürü için gereken bileşenler	37
Tablo 4. PCR’da kullanılan primerlerin baz dizilimleri (URL-1, 2022).....	37
Tablo 5. Cd stresi altında mutant ve yabancı tip bitkilerde ABA etkisiyle hidrojen peroksit değişim miktarları ($\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir ($p<0.05$)).....	40
Tablo 6. Cd stresi altında mutant ve yabancı tip bitkilerde ABA etkisiyle MDA değişim miktarları ($\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir ($p<0.05$))	42
Tablo 7. Cd stresi altında mutant ve yabancı tip bitkilerde ABA etkisiyle antosiyanin değişim miktarları ($\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir ($p<0.05$)).....	43
Tablo 8. Cd stresi altında mutant ve yabancı tip bitkilerde ABA etkisiyle prolin değişim miktarları ($\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir ($p<0.05$))	44
Tablo 9. Cd stresi altında mutant ve yabancı tip bitkilerde ABA etkisiyle klorofil ve karotenoid değişim miktarları ($\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir ($p<0.05$)).....	46
Tablo 10. Cd stresi altında mutant ve yabancı tip bitkilerde ABA etkisiyle bağıl su değişim miktarları ($\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir ($p<0.05$))	47
Tablo 11. Cd stresi altında mutant ve yabancı tip bitkilerde ABA etkisiyle CAT aktivitesi değişim miktarları ($\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir ($p<0.05$)).....	49
Tablo 12. Cd stresi altında mutant ve yabancı tip bitkilerde ABA etkisiyle SOD aktivitesi değişim miktarları ($\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir ($p<0.05$)).....	50
Tablo 13. Cd stresi altında mutant ve yabancı tip bitkilerde ABA etkisiyle APX aktivitesi değişim miktarları ($\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir ($p<0.05$)).....	51

Tablo 14. <i>sos5 (fla4)</i> mutant ve yabani tip bitkilerde Cd miktarları ($\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir ($p<0.05$))	51
Tablo 15. Protein Standart Eğrisi (BSA) tablosu.....	83



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Ağır metallere sebep olan faktörler ve çevreye yayılımları (Ghori vd., 2019)....	2
Şekil 2. Abiyotik stresler, bitkilerde sinyal entegrasyonu ve uyarlayıcı tepkiler (Paes de Melo vd., 2022).	5
Şekil 3. Bitkilerin ağır metal stresine karşı verdikleri cevaplar (Saini vd., 2021).	7
Şekil 4. Organeller tarafından dağılmış stres algılama modeli (Zhu, 2016).	10
Şekil 5. Ağır metallerin farklı mekanizmalarla oksidatif strese neden olması (Ghori vd., 2019).....	12
Şekil 6. Moleküler oksijenin indirgenmesi ile farklı ROS üretimi (Apel ve Hirt, 2004).	13
Şekil 7. Kadmiyum stresi ve detoksifikasyon şeması (El Rasafi vd., 2020).	17
Şekil 8. Bitki antioksidan savunma sistemine genel bakış (Hasanuzzaman vd., 2020).	19
Şekil 9. Absisik asitin (ABA) moleküler yapısı (Cutler vd., 2010).	22
Şekil 10. ABA sinyal yolunun bir şeması (Yoon vd., 2020).	23
Şekil 11. Absisik asit (ABA) Biyosentez Yolu (Vishwakarma vd., 2017).	24
Şekil 12. ABA sinyal iletim yolundaki ana bileşenler (Dilukshi Fernando ve Schroeder, 2016).....	26
Şekil 13. Kromozom Üzerinde SOS5 Geninin Konumu (Shi vd., 2003).....	27
Şekil 14. AGP benzeri etki alanları ve fasiklin benzeri etki alanları içeren SOS5 geninin yapısı (Shi vd., 2003).	27
Şekil 15. Tuz stresine maruz kalan WT ve mutant bitkilerde ABA etkisiyle kök fenotiplerindeki değişikliklerin karşılaştırılması (Acet ve Kadioğlu, 2020)....	28
Şekil 16. <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisi (Arslan, 2019).	29
Şekil 17. Petrilerde büyütülen bitkilerin kabin içerisindeki görünümü	31
Şekil 18. MS0, 50 µM Cd ve 50 µM Cd + 5 µM ABA içeren besi ortamlarındaki bitkilerin naylon mesh üzerindeki görünümleri.	38
Şekil 19. MS0, 50 µM Cd ve 50 µM Cd + 5 µM ABA içeren besi ortamlarının kök uzunluklarına etkisi.	38
Şekil 20. MS0, Cd ve Cd+ABA ortamlarında yabani tip ve sos5 mutant bitki köklerinin genel görünümü	39
Şekil 21. Cd stresi altında mutant ve yabani tip bitkilerde ABA etkisiyle hidrojen peroksit miktarındaki değişimler (^a , ^b , ^c , ^d , ^e ifadeleri istatistiksel bir biçimde, sonuçların birbirinden anlamlı olarak farklı olduğuna işaret etmektedir (p<0.05). ± standart	

- sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir)..... 40
- Şekil 22. Cd stresi altında mutant ve yabancı tip bitkilerde ABA etkisiyle MDA miktarındaki değişimler (^{a, b, c, d, e, f} ifadeleri istatistiksel bir biçimde, sonuçların birbirinden anlamlı olarak farklı olduğuna işaret etmektedir ($p<0.05$). $\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir)..... 42
- Şekil 23. Cd stresi altında mutant ve yabancı tip bitkilerde ABA etkisiyle antosiyanin miktarındaki değişimler (^{a, b, c, d, e, f} ifadeleri istatistiksel bir biçimde, sonuçların birbirinden anlamlı olarak farklı olduğuna işaret etmektedir ($p<0.05$). $\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir)..... 43
- Şekil 24. Cd stresi altında mutant ve yabancı tip bitkilerde ABA etkisiyle prolin miktarındaki değişimler (^{a, b, c, d, e, f} ifadeleri istatistiksel bir biçimde, sonuçların birbirinden anlamlı olarak farklı olduğuna işaret etmektedir ($p<0.05$). $\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir)..... 44
- Şekil 25. Cd stresi altında mutant ve yabancı tip bitkilerde ABA etkisiyle klorofil ve karotenoid miktarlarındaki değişimler (^{a, b, c, d, e, f} ifadeleri istatistiksel bir biçimde, sonuçların birbirinden anlamlı olarak farklı olduğuna işaret etmektedir ($p<0.05$). $\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir) 46
- Şekil 26. Cd stresi altında mutant ve yabancı tip bitkilerde ABA etkisiyle bağıl su miktarındaki değişimler (^{a, b, c, d, e, f} ifadeleri istatistiksel bir biçimde, sonuçların birbirinden anlamlı olarak farklı olduğuna işaret etmektedir ($p<0.05$). $\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir)..... 47
- Şekil 27. Cd stresi altında mutant ve yabancı tip bitkilerde ABA etkisiyle CAT aktivitesi değişimleri (^{a, b, c, d, e, f} ifadeleri istatistiksel bir biçimde, sonuçların birbirinden anlamlı olarak farklı olduğuna işaret etmektedir ($p<0.05$). $\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir) 48
- Şekil 28. Cd stresi altında mutant ve yabancı tip bitkilerde ABA etkisiyle SOD aktivitesi değişimleri (^{a, b, c, d, e, f} ifadeleri istatistiksel bir biçimde, sonuçların birbirinden anlamlı olarak farklı olduğuna işaret etmektedir ($p<0.05$). $\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir) 49

Şekil 29. Cd stresi altında mutant ve yabani tip bitkilerde ABA etkisiyle APX aktivitesi değişimleri (^{a, b, c, d, e} ifadeleri istatistiksel bir biçimde, sonuçların birbirinden anlamlı olarak farklı olduğuna işaret etmektedir ($p<0.05$). $\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir)	50
Şekil 30. <i>sos5 (fla4)</i> mutant ve yabani tip bitkilerde Cd miktar analizi (^{a, b, c, d, e, f} ifadeleri istatistiksel bir biçimde, sonuçların birbirinden anlamlı olarak farklı olduğuna işaret etmektedir ($p<0.05$). $\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir).....	51
Şekil 31. MS0 ve Cd stresi ortamlarında yabani tip ve mutant bitkilerdeki gen ifade oranlarının değişimi	52
Şekil 32. Protein Standart Eğrisi (BSA).....	83

EKLER DİZİNİ

Ek 1. Protein Tayini.....	83
---------------------------	----



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µl	: Mikrolitre
µM	: Mikro Molar
AAO3	: Arabidopsis aldehit oksidaz 3
ABA	: Absisik Asit
ABF	: Absisik asite duyarlı eleman bağlayıcı faktörler
ABRE	: Absisik asite duyarlı elemanlar
AGP	: Arabinogalaktan proteinler
Al	: Alüminyum
APX	: Askorbat peroksidaz
CAT	: Katalaz
Cd	: Kadmiyum
Col-gl	: Yabani tip Arabidopsis thaliana
Cr	: Krom
Cu	: Bakır
DHAR	: Dehidroaskorbat redüktaz
Dk	: Dakika
ER	: Endoplazmik Retikulum
EXT	: Ekstensinler
Fe	: Demir
FLA	: Fasiklin benzeri arabinogalaktan proteinler
FLA	: Fasiklin Benzeri Arabinogalaktan Proteinleri
GPX	: Guaiacol peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Azaltılmış Glutasyon
GST	: Glutasyon-s-transferaz
H	: Hidrojen
Hg	: Cıva
HRGP	: Hidroksiprolin bakımından zengin glikoproteinler
LEA	: Late embriyogenezisine bağlı proteinler
MAPK	: Mitojenle aktive edilen protein kinaz
MDHAR	: Monodehidroaskorbat redüktaz
mg	: Miligram

ml	: Mililitre
MS	: Murashige-Skoog
NECD	: 9-cis-epoksikarotenoid-dioksijenaz
Ni	: Nikel
nm	: Nanometre
O	: Oksijen
OH•	: Hidroksil Radikali
Pb	: Kurşun
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PP2C	: Protein fosfataz 2C
PPO	: Polifenoloksidaz
PRP	: Prolin açısından zengin proteinler
PRX	: Peroksiredoksin
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RWC	: Bağlı su içeriği
SNF1	: Sükroz-Fermente olmayan Kinaz1
SOD	: Süperoksit dismutaz
sos5	: Mutant tip Arabidopsis thaliana (Salt Overly Sensitive)
SOS5	: Tuza Aşırı Duyarlı 5
Std Sapma	: Standart Sapma
TRX	: Tiorredoksin redüktaz
v.d.	: Ve diğerleri ve devamı
Zn	: Çinko

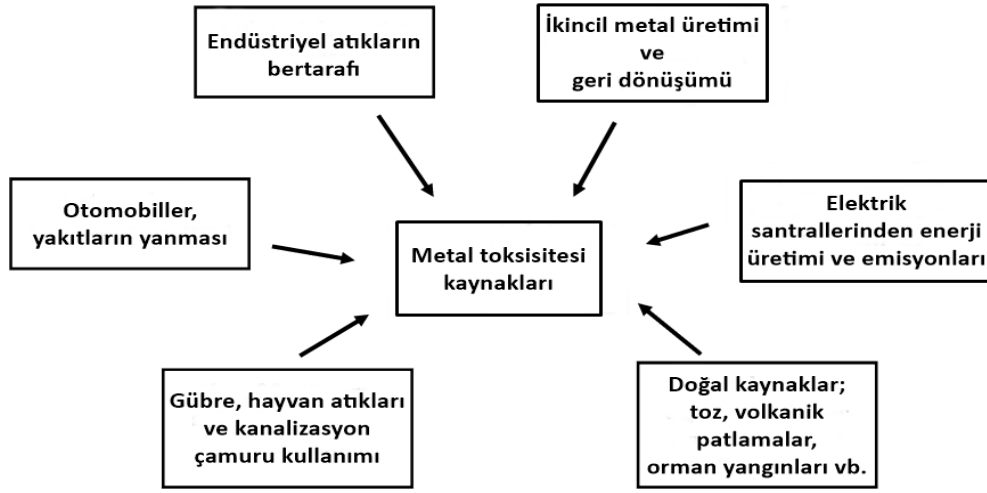
1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Bitkiler hareketsiz organizmalardır ve yaşamları boyunca abiyotik ve biyotik pek çok strese maruz kalmaktadırlar. Özellikle, günümüzde küresel ısınma ve iklim değişikliği, kuraklık, ani sıcak veya soğuk hava dalgaları ve sel gibi farklı abiyotik streslerin sıklığı ve yoğunluğunda endişe verici bir artışa neden olmaktadır. Değişen bu iklim koşulları sıklıkla, besin eksikliği, toprak tuzluluğu, aşırı pH ve yüksek seviyelerde farklı çevresel kirleticiler (ağır metaller, mikroplastikler, herbisitler, pestisitler, antibiyotikler ve kalıcı organik kirleticiler) dahil olmak üzere pek çok ağır koşulların bir araya gelmesine neden olabilir (Rivero vd., 2022). Bu yüzden bitkilerin farklı streslere veya bunların kombinasyonlarına verdikleri yanıtların bilinmesi oldukça önemlidir (Zandalinas vd., 2021).

Abiyotik stres faktörlerinden biri olan ağır metal stresi, günümüzde sanayi ve teknolojinin gelişmesine bağlı olarak dünya genelinde artmıştır ve beraberinde pek çok çevresel sorunları getirmiştir. Bahsedilen çevre sorunlarının başında da ağır metaller tarafından toprak ve su kaynaklarının kirletilmesi gelmektedir (Batır, 2014). Özellikle bitkiler hareket kabiliyetleri olmadığı için bu değişimlerden en fazla etkilenen organizmalar olmuştur. Toksik metaller, verim kaybının başlıca nedenleri olup, coğrafi bölge ve ürün tipine bağlı olarak tarımsal üretimi %50-80 oranında azaltmaktadırlar (Naqqash vd., 2022).

Ağır metaller, yoğunluğu oldukça fazla olan ve düşük yoğunlukta olsa bile öldürücü veya zehirleyici etkiye sahip olan metaller olarak tanımlanmaktadır. Asıl ağır metal tanımı, fiziksel nitelik olarak yoğunluğu 5 g/cm^3 'ten daha fazla bulunan metaller için kullanılmaktadır. Dünyada endüstrileşmenin, trafik yoğunluğunun, atmosferdeki çeşitli gaz ve parçacıkların, tarımda kullanılan ilaçların ve diğer kirleticilerin artmasıyla birlikte ağır metallerin de çevredeki oranları artış göstermektedir (Ghori vd., 2019). Toprakta ve suda ağır metal birikim kaynakları Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Ağır metallere sebep olan faktörler ve çevreye yayılımları (Ghori vd., 2019).

Ağır metaller (Cd, Al, Pb, Zn, Hg, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni), zehirli etkilerinden dolayı bitkilerde transpirasyon, su alımı, fotosentez, çimlenme ve protein sentezi azalması, stoma hareketleri ve enzim aktivitesinin bozulması, membran stabilitesinde hasar oluşumu ve hormon dengesinin bozulması gibi pek çok olumsuz etkiye neden olmaktadır (Öktüren Asri ve Sönmez, 2006). Ağır metaller içerisinde özellikle Cd, tüm topraklarda eser element olarak bulunan toksik bir metaldir. Bu metalin, çinko eritme, nikel-Cd pil üretimi, fosil yakıt yakma veya fosfatlı gübrelerin uygulanması gibi bazı antropojenik faaliyetler nedeniyle, toprakta ve suda konsantrasyonu artmıştır. Cd, canlı organizmalar için gerekli olmayan bir metaldir ve bitki kökleri tarafından kolayca alınmakta ve toprak üstü kısımlarına taşınmaktadır. Böylece, fotosentez, solunum veya terleme gibi çeşitli fizyolojik süreçlerle etkileşime girmektedir. Cd'nin toksik konsantrasyonlarına maruz kalan bitkilerde büyüme inhibisyonu, kök hasarı veya klorozis gibi gözle görülür semptomlar oluşabilmektedir (Semane vd., 2007; Andersen ve Küpper, 2013).

Ayrıca, Cd'un bitkilere geçişi, besin zinciri yoluyla tüm canlıların bünyesine sirayet etmesine neden olabilir. Bu yüzden, hem ürün kayıplarını en aza indirebilmek hem de Cd'un fitoremediasyonla topraktan temizlenmesi için bitkilerin sergilediği tolerans mekanizmalarını anlamak oldukça önemlidir (Panda vd., 2009; Yaashikaa vd., 2022).

Bitkiler, ağır metaller gibi toksik maddelere karşı çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir (Özyürek, 2016). Bitkilerin yaşamaya devam etmeleri, büyümeleri, farklılaşmaları ve bununla birlikte biyotik ve abiyotik stres koşullarına karşı dirençli olabilmeleri için, onların selüloz, hemiselüloz ve pektin gibi yapılardan meydana gelmiş olan hücre duvarı fonksiyonunu ve bütünlüğünü kontrol altında tutmaları oldukça önemlidir (Somerville vd., 2004). Bununla birlikte, hücre duvarına gömülü halde

bulunan; sinyal iletiminde ve çeperinin yeniden yapılandırılmasında oldukça önemli rol oynayan hücre çeperi yapısal proteinleri bulunmaktadır (Shi vd., 2003). Bitki hücre çeperi, hidroksiprolin bakımından zengin olan glikoprotein grubunu oluşturan, prolince zengin proteinler, ekstensinler ve arabinogalaktan proteinlerini (AGP'ler) içermektedir (Seifert, Xue ve Acet, 2014). AGP'ler, hücre büyümesi ve bitki gelişimi ile ilgili çeşitli rollerde yer almaktadırlar (Shi vd., 2003). Fasiklin benzeri arabinogalaktan proteinleri (FLA'lar) de, arabinogalaktan proteinlerinin alt sınıfına girmektedir (Johnson vd., 2003).

Örneğin, *Arabidopsis thaliana* bitkisinin hücre duvarındaki At-FLA11 ve At-FLA12 proteinlerinin, transkript bolluğunun Arabidopsis köklerindeki sekonder hücre duvarı selüloz sentezlerinin ekspresyonunun başlangıcı ile arasında bir ilişki olduğu ileri sürülmüştür (MacMillan vd., 2010; Brown vd., 2005; Wei vd., 2005). SOS5 (Salt Overly Sensitive 5) gen lokusu FLA'lara ait bir bölgedir ve SOS5 gen bölgesi, Arabidopsis'te hücre genişlemesinde, çeper bütünlüğünün sağlanmasında ve bitkilerin tuz stresine karşı gösterdikleri tolerans gibi birçok önemli rolde yer almaktadır. Bununla birlikte, son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda, ağır metal stresinden doğrudan etkilenen birçok fizyolojik hedefin tuzluluk stresinden de etkilendiği öne sürülmektedir. Bu yüzden, bitkilerin tuz stresine karşı verdiği cevapların, ağır metal stresine verilen cevaplarla yakın olduğu ileri sürülmüştür. Ağır metalle kirlenmiş toprakların verimli bir şekilde bitkisel olarak yönetilmesi için uygun bitki türlerinin seçilmesi gerekmektedir. Bu durum, halofit bitki türlerinin spesifik ağır metalle kirlenmiş toprakları iyileştirmek için olası adaylar arasında gösterilmektedir ve bu alandaki çalışmalar artan bir ilgi görmektedir (Gall vd., 2015; Lutts ve Lefevre, 2015).

Bitkilerin stresi tolere etmek için kullandıkları bir diğer mekanizma da içsel hormonal dengeyi ayarlamaktır. Bitki hormonları, büyüme, gelişme ve çevresel stres tepkilerinin önemli yönlerini düzenleyen sinyal bileşikleridir. Çeşitli abiyotik streslere uyum ve tolerans, karmaşık algılama, sinyalleme ve stres tepki mekanizmaları gerektirir ve hormonlar, bitkilerde pek çok stres cevabının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar (Alazem vd., 2020; Waadt vd., 2022). Özellikle, ABA çeşitli abiyotik streslere cevapta anahtar rol oynayan başlıca hormondur ve ABA'nın de novo biyosentezi, ZEP, ABAs, NCED ve AAO3 gibi bir dizi enzimle katalize edilirken, ABA degradasyonu esas olarak CYP707As tarafından düzenlenmektedir (Finkelstein, 2013; Ma vd., 2018). Bitki tohumlarında meydana gelen dormansi, çimlenme, olgunlaşma, çiçeklenme ve vejetatif gelişme gibi çeşitli biyolojik süreçlere katılan ABA, sinyal bir molekül gibi davranarak, stres altında antioksidan sistemi ve stres ilişkili genlerin ifadelerini uyararak, bununla birlikte farklı ozmoprotektan moleküllerin birikimine sebep

olarak ROS'ların uzaklaştırılmasına yardımcı olmaktadır (Lu vd., 2009; Ozfidan vd., 2013; Brunetti vd., 2019; Qi vd., 2020).

Bunun yanı sıra bitkilerin, stres koşullarında hayatta kalmak için Absisik asit biriktirdikleri bilinmektedir (Borsani vd., 2003). Yapraklardaki ABA konsantrasyonu, bitkilerde birden fazla stres faktörlerinde 50 kat artış gösterebilmektedir. Bitkide su kaybını en aza indirmek için yapraklardaki ABA birikerek stomaların kapanmasını sağlamaktadır. Aynı zamanda ABA, sinyal transdüksiyon yollarında rol alan komponentlerden biri olarak bilinmektedir. Günümüze kadar yapılan deneylerde, stresle alakalı genlerin aktive olması için ABA'ya bağlı ve ABA'dan bağımsız yollar tespit edilmiştir (Yılmaz vd., 2011). Bu bağımsız yollar mevcut olsa bile, ABA bitkilerde birçok stres ile ilişkili gen bölgelerinin ekspresyon seviyelerine uyarıda bulunur (Chen vd., 2005). Bununla birlikte ağır metal stresi altında verilen cevaplarda görev alan genlerin, bitki korumasını iyileştirmeye yönelik biyoteknolojik yaklaşımların geliştirilmesinde uygulanabileceği düşünülmektedir (Ovecka ve Takac, 2014). Literatürdeki bilgiler doğrultusunda, tuz stresi şartlarında ABA sinyal iletimi ve hücre çeperi sentezi ile ilişkili olan SOS5 geninin ağır metal stresine karşı da aynı etkide bir cevap vereceği düşünülmektedir. Bundan dolayı çalışmamızda, SOS5 gen fonksiyonunu susturduğumuz sos5 mutant bitkilerinde, yabancı tip ile karşılaştırmalı olarak ABA ile ilişkili genlerin ifade düzeylerine bakılması amaçlanmıştır.

Bunlar haricinde ABA'nın, antioksidan enzim aktivitesini artırarak oksidatif hasarı hafiflettiği belirlenmiştir (Lu vd., 2009). Burada bahsedildiği gibi ABA, stres toleransı ile ilgili birçok olayda yer almaktadır. Fakat, literatürde Cd stresi altındaki Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS), ROS süpüren enzim ve antioksidan bileşiklerin değişimi ile "SOS5 gen lokusu" ve "ABA" arasındaki ilişki hakkında yapılan bir çalışma ile karşılaşılmamıştır. Bundan dolayı, çalışmamızda Cd stresi koşullarında ROS, ABA sinyal iletimi, SOS5 gen lokusunun fonksiyonu ve antioksidan sistem arasındaki etkileşimlerin araştırılması amaçlanmıştır. Bununla birlikte, ağır metal stresi altında ABA sinyal taşınımının nasıl düzenlendiği hakkında çok az şey bilinmektedir.

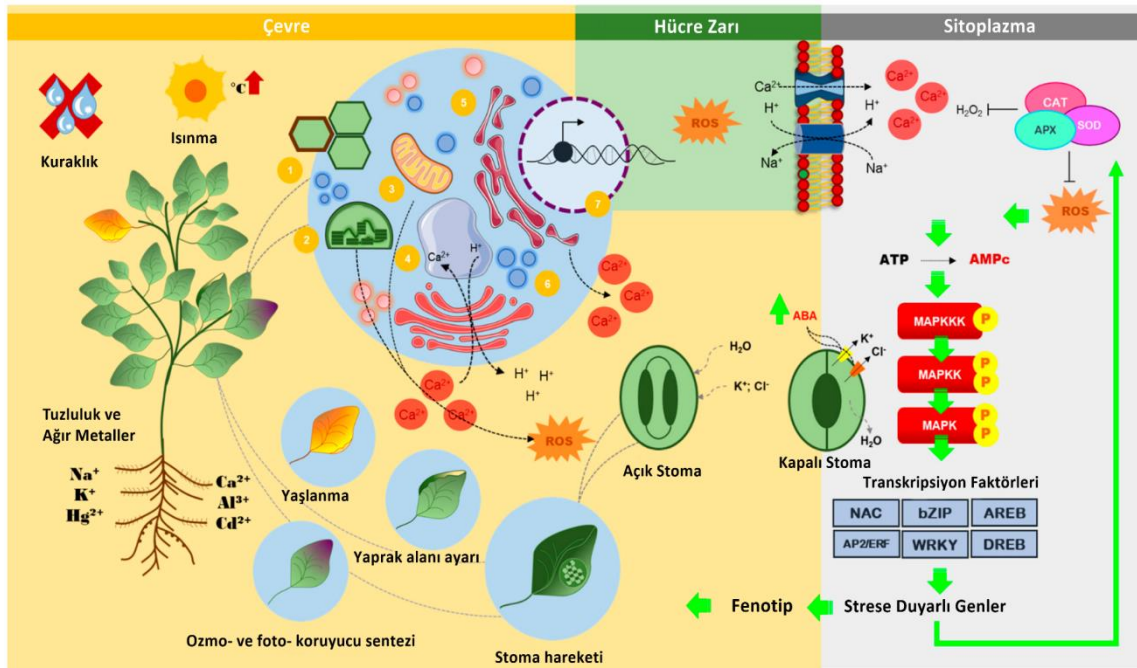
Literatürde bu konudaki eksikliği gidermek amacıyla, bitkideki kadmiyum stresine yanıtın ABA ile bağlantılı olarak sinyalizasyon ve metabolik mekanizmalarının nasıl uyarıldığını göstermek için ROS oluşumu (H_2O_2), lipid peroksidasyonu, SOD, CAT ve APX gibi detoksifikasyon enzimlerinin aktivasyonu, antosiyanin ve prolin miktarları ölçülmüştür. Son olarak, SOS5 geninin ABA metabolizması ile arasındaki ilişkiyi moleküler düzeyde açıklamak için Cd stresine karşı geliştirilen cevap mekanizmasında ABA'ya bağımlı olan, ABA biyosentezi ve katabolizmasında görev alan ABA1,

CYP707A-3 RD29A, RD29B genlerinin ifade düzeyleri ters transkriptaz PCR yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

1.2. Stres Ve Çeşitleri

Çevre şartlarının bitkinin metabolizmasını, büyüme ve gelişimini olumsuz yönde etkileme durumu stres olarak adlandırılmaktadır (Büyük vd., 2012). Doğadaki bitkiler sürekli olarak abiyotik ve biyotik streslerle karşı karşıya kalmaktadır. Cd, Fe, Mn, Cu, Ni, Co, Zn, Hg ve arsenik gibi ağır metaller uzun süredir endüstriyel atıklar, gübre uygulamaları, eritme ve kanalizasyon bertarafı gibi antropojenik faaliyetler yoluyla topraklarda birikmektedir (Ghori vd., 2019).

Bitkilerin çevresel stresleri algıladıkları, sinyallerini ilettikleri ve karmaşık ve iyi koordine edilmiş bir tepki boyunca stres sinyallerini, hormonal metabolizmayı ve toleransa yol açan adaptif tepkileri bütünleştirdikleri genel mekanizmaları Şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2. Abiyotik stresler, bitkilerde sinyal entegrasyonu ve uyarlayıcı tepkiler (Paes de Melo vd., 2022).

Bitkiler, farklı stres sinyallerini plazma zarlarında bulunabilen ve hücre duvarından (1) çıkan birincil reseptörler vasıtasıyla algılamaktadır. Bu sinyallerin aktivasyonu, membran boyunca bir iyon akışıyla sonuçlanmaktadır. Abiyotik stresler, kloroplastlardaki (2) fotosistemlerin ve mitokondrilerdeki (3) elektron taşıma zincirinin enerji dengesinin bozulmasına, endoplazmik retikulumda protein katlanma yolunun (4)

doygunluğuna ve peroksizomlardaki peroksidaz ve oksidazların (5) aktivasyonuna sebep olarak ROS üretimini artırmasına yol açmaktadır. Genel olarak bu sinyaller, ROS ve Ca^{2+} 'ya yanıt olarak siklik AMP (adenozin monofosfat) gibi diğer ikincil haberciler tarafından entegre edilir ve güçlendirilir. Bununla birlikte, protein kinazların ve ABA gibi hormon biyosentez yollarını aktive eden MAP-kinaz kaskadlarının aktivasyonuna sebep olur. Son olarak, bitki fizyolojisinin yeniden şekillenmesine ve stres altındaki bitkilerin karakteristik fenotiplerine sebep olan uyarlayıcı tepkilere yol açmaktadır (Paes de Melo vd., 2022).

1.2.1. Ağır Metal Stresi Ve Toksisitesi

Bitkiler sesil doğaları gereği büyüme ve gelişmelerine zarar verebilecek değişikliklerden kaçamazlar ve bu yüzden bitki ontogenisi sırasında ortaya çıkan zorluklara yanıt vermek için birçok konuda kendilerini geliştirmişlerdir (Knudsen vd., 2018). Bu gibi değişiklikler arasında bulunan ve abiyotik stres faktörlerinden biri olan ağır metaller, diğer organik kimyasallar gibi daha toksik bileşenlere dönüşemedikleri için bitkilerin sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. Bu ortamlarda aşırı ağır metal varlığı, eritme ve madencilik süreçleri, kömür yakma kalıntılarının bertarafı, endüstriyel ve evsel atık su arıtma ve çiftçilik dahil olmak üzere insan faaliyetlerinden kaynaklı olabilmektedir (Nguyen vd., 2021).

Ağır metaller genellikle esansiyel ve esansiyel olmayan metaller olarak sınıflandırılmaktadır. Ayrıca ağır metaller, bitkilerde antioksidan aktivitesini azaltmaya, metabolik dengeyi bozmaya ve bununla birlikte ROS üretimini arttırmaya sebep olmaktadır (Kosakivska vd., 2020). Aynı zamanda ağır metaller, bitki doku ve organlarında yüksek oranda biriktiğinde vejetatif ve generatif organların gelişimine zarar vermektedirler (Gür vd., 2004).

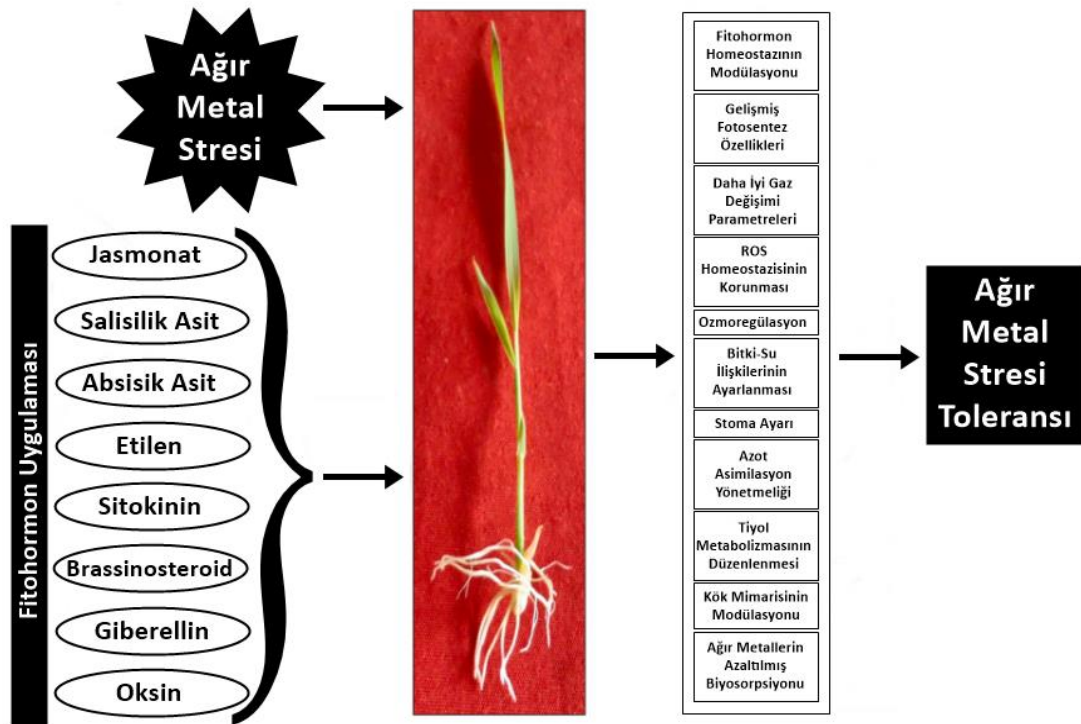
Ağır metaller, bitki genotoksik etkileri indükleyerek birçok fizyolojik olayın olumsuz yönde etkilenmesine sebep olmaktadır. Bunun sonucunda, membran stabilitesinin bozulması, fotosentetik verimin azalması, bozulmuş pigment üretimi, besin ve hormonal dengesizlik, DNA replikasyonunun inhibisyonu, gen ekspresyonu ve hücre bölünmesi ile fizyolojik ve biyokimyasal seviyelerde olumsuz etkileri meydana getirmektedir (Dutta vd., 2018).

Bitkiler bu olumsuz etkilere karşı toksik metalleri tolere etmek için yanıt mekanizmaları geliştirmişlerdir. Ağır metallere karşı geliştirdikleri bu direnç iki şekilde elde edilebilmektedir. Bitkiler, metal alımını kısıtladığında “kaçınma” ile ya da yüksek

metal konsantrasyonu muamelesinde hayatta kaldığında “tolerans” ile yanıt verebilmektedirler (Viehweger, 2014).

Bu savunma mekanizmalarından biri olan kaçınma, hücre dışı çökelme, hücre duvarlarına biyosorpsiyon, azaltılmış alım veya artan akış yoluyla hücreye giren metal konsantrasyonunun azaltılmasını içerir. Tolerans ise aminoasitler, organik asitler, glutatyon veya ağır metal bağlayıcı ligandların sentezi yoluyla ağır metallerin hücre içi şelasyonunu önermektedir. Sonuç olarak metabolik ürünler vakuollerde konsantre edilir ve bitkiler, antioksidan savunma sistemleri ile ROS’un meydana getirdiği zararlı etkilere karşı koyabilmektedirler (Hossain vd., 2012; Viehweger, 2014).

Bitkilerde ağır metal stres toleransına fitohormonlar aracılık etmektedir. Çeşitli fitohormonların eksojen uygulaması, bitkilerde ağır metal toksisitesinin zararlı etkileriyle başa çıkmak için kullanılmaktadır. Bu hormonlar ağır metallere maruz kalan bitkilerde antioksidan savunma mekanizmasının güçlendirilmesine yardımcı olmaktadır. Fitohormon uygulamasıyla bitkilerin ağır metal stresine karşı verdikleri yanıtlar Şekil 3’te gösterilmiştir.



Şekil 3. Bitkilerin ağır metal stresine karşı verdikleri cevaplar (Saini vd., 2021).

Ağır metaller, bitkilerde kökler aracılığıyla alınarak yapraklara geçiş yapar. Bitkide ağır metallerin taşınması, ksilem yükleme ve translokasyonu, detoksifikasyon ve metallerin birikimi dahil olmak üzere birkaç adımdan meydana gelmektedir (Lombi vd.,

2002). Yağışla birlikte ağır metaller toprağa ulaşarak bitki, hayvan ve insanlar üzerinde olumsuz etkiye sebep olmaktadır (Kocaman, 2016).

1.2.1.1. Cd Stresi

Ağır metal stresi, bitkilerin büyümesini, gelişmesini ve üretkenliğini ciddi şekilde etkileyen başlıca çevresel kısıtlamalardan biridir. Bununla birlikte, ağır metaller daha yüksek konsantrasyonlarda, bitkinin büyümesi ve hayatta kalması üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olmaktadır (Dhalaria vd., 2020; Khan vd., 2021).

Ağır metallerden biri olan Cd, bitkiler için oldukça toksik ve çevrede bulunan bitkilerde esansiyel olmayan bir eser elementtir. Bitkilerde, Cd toksisitesi besinlerin ve suyun alımını azaltmaktadır. Aynı zamanda, oksidatif hasarın artmasına, bitki metabolizmasının bozulmasına, bitki morfolojisi ve fizyolojisinin engellenmesine sebep olmaktadır. Bitkilerde Cd toksisitesine karşı savunma mekanizması olarak, büyüme düzenleyiciler, hormonların kullanımı, potansiyel iyileştirme stratejileri ve fitoremediasyon, biyoremediasyon ve kimyasal yöntemlerin uygulanması da ayrıca vurgulanmıştır (Haider vd., 2021).

1.2.2. Ağır Metal Stresinin (Cd) Bitkilerin Fizyolojisi Üzerine Etkileri

Cd toksisitesi, bitkilerde kloroz, bitki nekrozu ve yetersiz büyüme gibi semptomlara neden olmaktadır (Jali vd., 2016; Hermans vd., 2011). Aynı zamanda, Cd ile kirlenmiş topraklarda yetişen bitkilerde Cd birikimi, hayvan ve insan sağlığını da olumsuz yönde etkilemektedir (Chen vd., 2016). Cd toksisitesi, karbon fiksasyonunu engelleyerek, klorofil içeriğini ve fotosentetik aktiviteyi azaltarak bitkilerde ciddi problemlere sebep olmaktadır (Gallego vd., 2012).

Toprakta Cd'a maruz kalma, yaprak nispi su içeriğini, stoma iletkenliğini ve terlemeyi en aza indirerek bitkilerde ozmotik stresi indüklemektedir ve böylece bitki fizyolojik hasarını ortaya çıkarmaktadır (Rizwan vd., 2016). Cd toksisitesi, ROS aşırı üretimine, bitki hücre zarında hasara, hücre biyomoleküllerinin ve organellerinin tahrip olmasına neden olmaktadır (Abbas vd., 2017). Kadmiyum ayrıca, bitkinin Fe ve Zn alımını azaltarak yaprak klorozuna yol açmaktadır (Xu vd., 2017).

1.2.3. Cd Stresinin Hücresel Düzeyde Etkileri

1.2.3.1. Cd'un Hücre Zarı Ve Hücre Duvarı Üzerine Etkisi

Bitkilerin Cd stresi ile başa çıkmak için geliştirmiş olduğu önemli stratejilerden biri de hücre çeperini “fiziksel bir bariyer gibi” kullanarak, ağır metallerin hücrenin simplastik alanına girişini engellemektir (Gall vd., 2015). Hücre genişlemesinin düzgün bir şekilde düzenlenmesi, bitkinin büyümesi ve gelişmesi için oldukça önemlidir. Hücre genişlemesinin kontrolü hücre duvarı mimarisine, hücre iskeletine, duvar-zar etkileşimlerine ve komşu hücreler arasındaki ilişkilere bağlı olarak sağlanmaktadır (Shi vd., 2003).

Bitki hücre duvarı, mekanik destek ve sertlik sağlayan polisakkaritler ve proteinlerden oluşan karmaşık bir yapıdır. Hücrenin içi ve dışı arasındaki arayüzde, bitki hücrelerine yönelik biyotik ve abiyotik tehditlere karşı savunma için önemli olan koruyucu bir bariyer oluşturur. Cd'a maruz kalan bitkiler, hücre duvarı yapısında konsantrasyona bağlı değişiklikler gösterir (Gutsch vd., 2018).

Hücre duvarının, proteinler, polisakkaritler ve diğer fenolik bileşiklerle karakterize edilen bileşimi, işlevsel gruplar aracılığıyla ağır metalleri bağlama yeteneğini birleştirir. Kadmiyum, fitotoksiktir ve köklerden sürgünlere kadar bitki fizyolojik süreçlerini etkilemektedir. Cd'un neden olduğu olumsuz etkiler tüm bitkiler için oldukça önemlidir. Ayrıca, tarımsal açıdan Cd, mahsul verimliliğini etkileyen toksik bir çevresel kirletici olarak bilinmektedir (Du vd., 2012). Cd, bitki hücreleri için aşırı derecede toksiktir ve bu nedenle hücre duvarı bir bariyer görevi görerek Cd'un sitoplazmaya girmesini engellemektedir. Sonuç olarak, farklı hücre duvarı yapıları ve dokuları Cd'u farklı şekilde bağlayabilir ve böylece farklı koruma seviyeleri sağlayabilir (Parrotta vd., 2015).

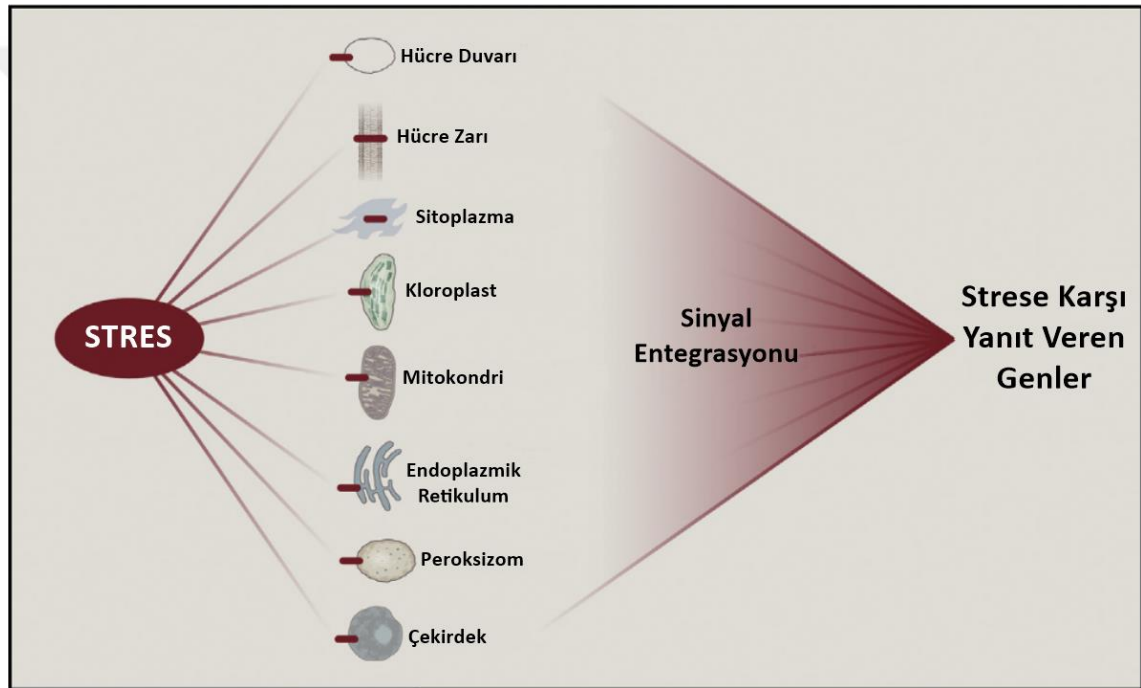
1.2.3.2. Cd Stresinin Organeller Üzerine Etkisi

Sabit organizmalar olarak bilinen bitkiler, Cd gibi abiyotik streslerle başa çıkmak zorundadırlar. Cd stresi, kloroplast, mitokondri, peroksizom, çekirdek ve hücre duvarı gibi diğer organellerle ilişki içerisinde ve tüm organellerden gelen stres kaynaklı sinyaller, hücresel homeostazı yeniden sağlamak için strese duyarlı gen ekspresyonunu ve diğer hücresel aktiviteleri düzenlemek için entegre edilmiştir (Zhu, 2016).

Bununla birlikte abiyotik stres, proteinin yanlış katlanmasına veya Endoplazmik retikulum (ER) zarındaki spesifik sensör proteinleri tarafından ER stresi olarak algılanan katlanmamış proteinlerin birikmesine neden olabilir (Walter ve Ron, 2011). Ayrıca ER,

Cd'a maruz kalan hücrelerin hedef organelidir ve Cd stresi altında ER fizyolojik işlev bozukluğuna ve kalsiyum homeostaz dengesizliğine eğilimlidir (Wang vd., 2022).

Kloroplast ise taşınma ve birçok metabolik reaksiyonun gerçekleştiği ve fotosentetik elektronun bulunduğu bir organelidir. Kloroplasttaki metabolik denge, ağır metal gibi çevresel stresler tarafından kolayca bozulabilir (Ramel vd., 2012). Benzer şekilde kloroplastlar gibi mitokondri ve hatta belki peroksizomlar da stres tepkileri için önemli olan sinyaller üretebilir (Ng vd., 2014). Stres, çeşitli organellerde bozulmalara neden olarak, nükleer gen ekspresyonunu ve hücresel homeostazın yeniden sağlanmasına yardımcı olan diğer hücresel aktiviteleri düzenlemek için entegre sinyaller üretmektedir. Şekil 4'te farklı hücre organellerinde stres algılama ve sinyal verme modeli gösterilmiştir.



Şekil 4. Organeller tarafından dağılmış stres algılama modeli (Zhu, 2016).

1.2.3.3. Cd Stresinin Su İçeriği, Fotosentez Ve Protein Üzerine Etkisi

Ağır metal stresi, tarımsal verimlilikte kayıplara ve sağlığa zararlı etkilere neden olan çevresel bir sorundur (Rattan vd., 2002). Ağır metaller arasında Cd, çevrede doğal olarak bulunan esansiyel olmayan bir kirleticidir. Bitkiler topraktan kolayca Cd^{2+} almaktadırlar. Yüksek Cd^{2+} seviyelerine maruz kalma, fotosentez, kloroz, büyüme inhibisyonu, su ve besin alımı oranlarında azalma ile sonuçlanmaktadır (Rady, 2011).

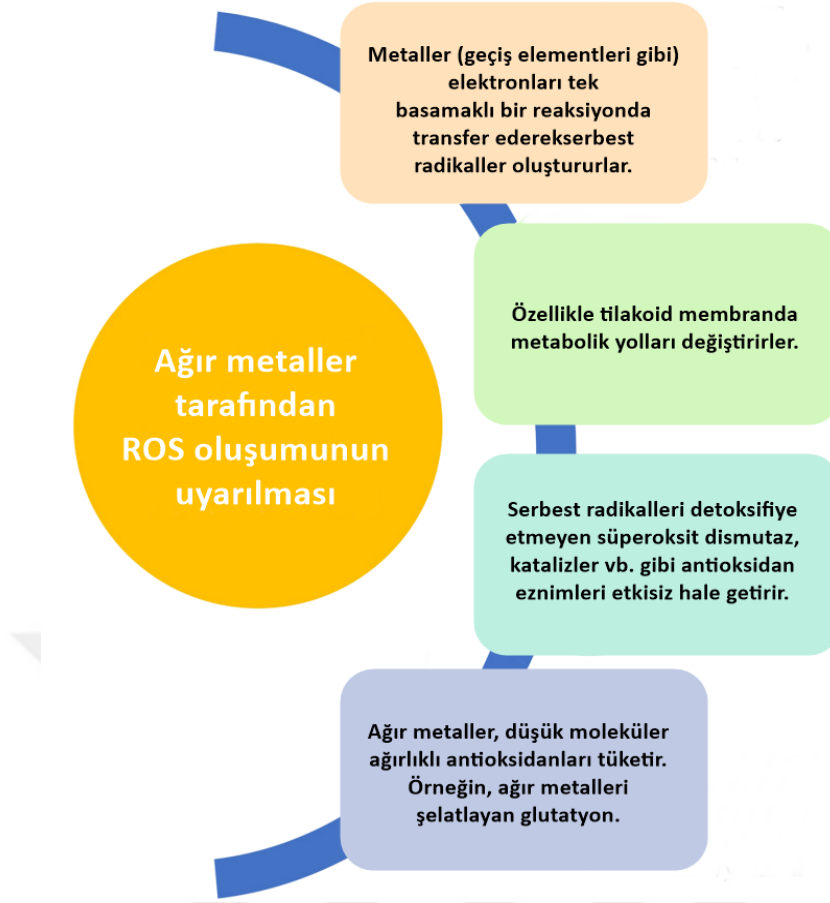
Ağır metaller, mineral ve su alımı gibi kök metabolizmasının çeşitli kısımlarını etkileyerek bitkilerin büyüme hızını azaltmaktadır. Buna bağlı olarak Cd stresinin sınırlı CO_2 erişiminden kaynaklanan olumsuz etkisi, fotosentetik hızı kademeli olarak düşürerek

bitki büyümesinin ve verimliliğinin azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca hücre duvarı elastikiyetinin azalmasına sebep olur. Bundan dolayı turgor kaybına neden olarak yaprak boyutunu küçültür, gövde uzamasını ve kök çoğalmasını sağlar, su emilimini ve taşınmasını azaltır. Ayrıca, bitkilerde mineral besin maddelerinin alımı ve dağılımındaki bozulma da fotosentezi olumsuz yönde etkilemektedir (Farid vd., 2013).

Bitkilerde ROS hasarlarının belirtileri olarak lipid peroksidasyonu, protein peroksidasyonu ve DNA hasarı bilinmektedir. Cd stresi, protein sentezinin azalmasına ve tüm organizmanın büyümesini ve gelişimini etkileyen fotosentetik proteinlerin zarar görmesine sebep olarak DNA hasarına yol açmaktadır (Gill ve Tuteja, 2010).

1.2.3.4. Cd'un Reaktif Oksijen Türlerinin Sentezi Ve Antioksidanlar Üzerine Etkisi

ROS, bitkilerde birçok farklı süreci kontrol etmektedir. Bununla birlikte, bitkilerde ve diğer aerobik organizmalarda toksik moleküller olarak bilinirler ve bu yüzden hücrelere zarar verebilirler (Gechev vd., 2006; Mittler vd., 2004). ROS'lar, bitkilerde çeşitli metabolik yolların yan ürünleri olarak devamlı üretilmektedir. ROS üretimi ve ROS süpürme işlemi kesinlikle kontrol edilmelidir. Çünkü, ROS üretimi ve ROS süpürme arasındaki hassas denge bozulduğu zaman ağır metaller, tuzluluk, kuraklık, soğuk, UV ışınımı vb. gibi abiyotik stres faktörleri altında oksidatif hasar meydana gelir. Bu hücrel hasarlar, bitki hücrel ölümünde birleşen pigmentler, proteinler, lipitler, karbonhidratlar ve DNA gibi biyomoleküllerin bozulması ile ortaya çıkar (Das ve Roychoudhury, 2014; Apel ve Hirt, 2004). Mittler ve diğerlerinin yaptıkları bir çalışmada, *Arabidopsis*'te H_2O_2 ve $O_2^{\bullet-}$ gibi ROS'un yaklaşık 152 gen içeren büyük bir gen ağı gerektiren bir sinyal molekülü olarak işlev görebildiği gösterilmiştir (Mittler vd., 2004).

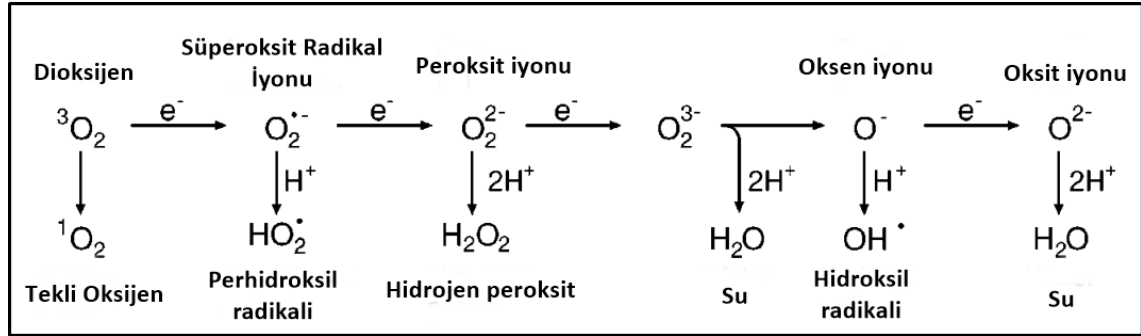


Şekil 5. Ağır metallerin farklı mekanizmalarla oksidatif strese neden olması (Ghori vd., 2019).

Bitkiler çeşitli abiyotik streslere maruz kaldıklarında, singlet oksijen ($^1O_2$), süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikalleri ($\bullet OH$) gibi bazı reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini indükler (Büyük vd., 2012). Bitkiler, abiyotik stres koşulları altında artan ROS'lara karşı direnç gösterebilmek için, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), guaiacol peroksidaz (GPX), glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimatik bileşenleri ve askorbik asit (AsA), İndirgenmiş glutatyon (GSH), a-tokoferol, karotenoidler, avonoitler, osmolitprolin gibi enzimatik olmayan antioksidan etki mekanizmaları geliştirmişlerdir (Das ve Roychoudhury, 2014; Apel ve Hirt, 2004).

Bitkiler, elektron alıcısı olarak dioksijeni (O_2) kullanmaktadırlar ve O_2 'nin indirgenmesinin bir sonucu olarak ROS'lar üretilmektedir (Gechev vd., 2006). Reaktif oksijen türlerinin (ROS) bitkiyi abiyotik ve biyotik streslerden korumada, hormonal sinyal iletimi mekanizmasında, hücre çeperinin polimer yapısında meydana gelen değişimde, bitki gelişimi için önemli düzenlemelerde kritik rol oynadığı belirtilmiştir

(Swanson ve Gilroy, 2010). Bitkilerin abiyotik stresler tarafından tetiklenen ROS üretimi Şekil 6’da gösterilmiştir.



Şekil 6. Moleküler oksijenin indirgenmesi ile farklı ROS üretimi (Apel ve Hirt, 2004).

1.2.3.4.1. Serbest Radikaller

1.2.3.4.1.1. Süperoksit Radikali (O₂•-)

ROS, O₂'nin kısmi azalması ya da enerjinin O₂'ye aktarılması sonucu kloroplastlarda sürekli olarak üretilmektedir (Das ve Roychoudhury, 2014). Süperoksit radikali (O₂•-), oksijenin (O₂) bir elektronunun başka bir yere taşınması sonucu meydana gelir. Hüresel şartlar altında oluşturulan süperoksit radikali (O₂•-), indirgeyici ya da oksitleyici görevlerde bulunabilir. O₂•- 'nin, almış olduğu elektronu tekrar oksijene oksitleyebilmesi için metal iyonuna, sitokrom-c'ye ya da bir radikale vermesi gerekmektedir. Süperoksitin oksitleyiciliği oksijenden daha fazladır ve 1 elektron daha alarak peroksit anyonuna indirgenebilir. Oksijenli solunum yapan canlılarda, O₂•- 'nin H₂O₂'ye dönüştürülmesi kataliz özelliği oldukça fazla olan süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile sağlanmaktadır (Büyük vd., 2012).

Sadece bir eşleşmemiş elektron ile süperoksit, O₂'den daha az radikal olarak bilinir. Süperoksit radikali (O₂•-), yaklaşık 2-4 µs'lik bir yarılanma ömrüne sahip, orta derecede reaktif olan ve kısa ömürlü bir ROS olarak bilinmektedir. Bundan dolayı, O₂•- biyolojik zarları geçemez ve kolaylıkla H₂O₂'ye ayrılır (Garg ve Manchanda, 2009). O₂•-, tek başına büyük bir tahribat oluşturmadığı için daha reaktif ve toksik olan OH• ve ¹O₂'ye dönüşerek membran lipid peroksidasyonuna yol açar (Halliwell, 2006). Bunun yanı sıra O₂•-, kinonları ve Fe⁺³ ile Cu⁺²'nin geçiş metali komplekslerini azaltarak metal içeren enzimlerin aktivitelerini etkilemektedir (Garg ve Manchanda, 2009).

1.2.3.4.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit (H_2O_2), hem süperoksitin disproporsiyonu sonucu hem de askorbat (Asc), tiyoller, ferrodoksinler ve diğerleri gibi bir indirgeyici ile O_2 'nin indirgenmesi sonucu oluşur. H_2O_2 , reaktif oksijen türlerinin (ROS) en kararlı olanıdır ve bundan dolayı çeşitli fizyolojik süreçlerde sinyal molekülü olarak önemli bir görevde rol alır. H_2O_2 , bitki hücrelerinde fotosentez ve fotorespirasyon sırasında daha fazla üretilirken solunum süreçlerinde daha az üretilmektedir. Aynı zamanda bitki büyümesini, gelişimini, alıştırma ve savunma tepkilerini düzenleyen hücre dışı matris (ECM), H_2O_2 'nin üretildiği diğer önemli kaynaklardanır (Slesak vd., 2007).

Oksidatif stresin, birçok hastalığın başlaması ve ilerlemesi ile ilişkili hücre hasarının önemli bir nedeni olduğu iyi bilinmektedir. Bunun sonucunda, hidrojen peroksit de dahil olmak üzere havada yaşayan tüm organizmalar reaktif oksijen türlerini detoksifiye ederek oksidatif stresi sınırlayan antioksidan enzimler içermektedirler (Veal vd., 2007).

Yapılan son çalışmalar, hidrojen peroksitin bitkilerde abiyotik ve biyotik streslere karşı cevap veren bir sinyal molekülü olduğunu doğrulamaktadır. H_2O_2 , şu zamana kadar toksik bir hücresel metabolit olarak görülmüştür. Fakat, artık hem bitki hem de hayvan hücrelerindeki çeşitli uyaranlara yanıt veren bir sinyal molekülü olarak işlev gördüğü bilinmektedir. H_2O_2 , sitokinler ve büyüme faktörleri dahil olmak üzere çeşitli uyaranlara yanıt olarak üretilir ve bitkilerde stoma kapanması ve kök büyümesi gibi çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynar. Ayrıca H_2O_2 , spesifik enzimler tarafından da üretilir (Neill vd., 2002; Veal vd., 2007). Böylece, antioksidan enzimler hidrojen peroksit'e yanıt veren çok sayıda yolun kilit düzenleyicileri olarak ortaya çıkmaktadır (Veal vd., 2007).

1.2.3.4.1.3. Hidroksil Radikali ($OH\bullet$)

Hidroksil radikali ($OH\bullet$), difüzyon sınırlı bir reaksiyonda her türlü organik molekülü parçalayabilen kısa ömürlü ve son derece reaktif olan moleküllerdir (Schweikert vd., 2000). Hidroksil radikali, H_2O_2 'nin Fe^{+2} iyonları (Fenton reaktifi) ile indirgenmesi sonucu üretilmektedir (Schopfer, 2001). Oksidatif stres koşulları altında $OH\bullet$, hücre hasarı ve ölümünde önemli bir rol oynar. Fakat, in vivo hidroksil radikali oluşumu bitkilerde nadiren gösterilmiştir. Aynı zamanda, bitki peroksidazlarının, NADH gibi uygun bir indirgeyici varlığında O_2 'den $OH\bullet$ üretimini katalize edebileceğine dair benzer fikirler ortaya konulmuştur. Bu gibi koşullar altında enzim, ara ürün olarak

süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$) ve H_2O_2 içeren karmaşık bir reaksiyon döngüsü başlatır (Schweikert vd., 2000).

Bilinen en yüksek derecede reaktif olan ROS'lar arasında özellikle hidroksil radikali bulunur (Gill ve Tuteja, 2010). Fe veya Cu iyonları tarafından katalize edilen süperoksit ile hidrojen peroksitin indirgenmesinin hidroksil radikalının biyolojik üretimine aracılık ettiği düşünülmektedir (Schopfer, 2001). Hidroksil radikali, DNA, proteinler, lipidler ve daha birçok hücre bileşeni gibi tüm biyolojik moleküller ile potansiyel olarak reaksiyona girebilmektedir. Bundan dolayı hidroksil radikalının aşırı üretimi hücre ölümüne yol açmaktadır (Gill ve Tuteja, 2010).

1.2.3.4.1.4. Singlet Oksijen ($^1O_2$)

Singlet Oksijen ($^1O_2$) yolu, yüksek bitkilerde en çok çalışılan ROS-bağımlı retrograd sinyal yoludur. $^1O_2$ uzun zamandır, çoklu doymamış yağ asitleri içeren lipidlerin oksidasyonuna yol açarak kloroplastlara ciddi zarar veren toksik bir ROS molekülü olarak bilinmektedir (Suzuki vd., 2012; Foyer ve Noctor, 2009).

$^1O_2$ üretimi, PSII'de üçlü durum ($^3O_2$) oksijeninin, reaksiyon merkezi klorofil tarafından tekli duruma ($^1O_2$) uyarılmasıyla gerçekleştirilir (Asada, 2006). Ayrıca, çeşitli abiyotik stresler stomanın kapanmasına sebep olmaktadır. Böylece kloroplastta meydana gelen düşük hücre içi CO_2 konsantrasyonu, $^1O_2$ oluşumuna yol açmaktadır (Wagner vd., 2004). Singlet oksijen ($^1O_2$) sinyali, hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi diğer ROS sinyalleri ile iletişime geçer ve H_2O_2 'nin $^1O_2$ oluşumunu azaltmada olumlu bir rolü vardır (Suzuki vd., 2012). $^1O_2$ oluşumunun PSI, PSII ve ayrıca tüm fotosentetik mekanizmalar üzerinde ciddi bir zararlı etkisi olduğu görülmüştür (Gill ve Tuteja, 2010).

1.3. Bitkilerin Cd Stresine Karşı Geliştirdikleri Tolerans Mekanizmaları

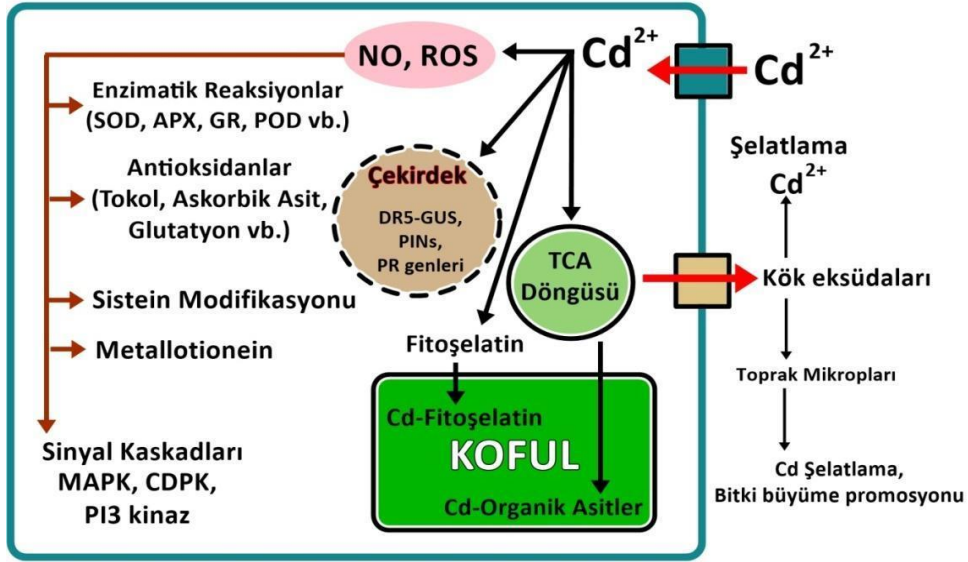
Ağır metal toksisitesi dünyanın birçok yerindeki tarım topraklarını olumsuz olarak etkilemiştir. Arsenik (As), kurşun (Pb), kadmiyum (Cd), civa (Hg), çinko (Zn), kobalt (Co), bakır (Cu), krom (Cr) ve nikel (Ni) gibi ağır metallerin eklenmesiyle toprak kirlenmesi metallerin çevreye verdiği potansiyel zararlı etkilerden dolayı çok önemli bir çevre sorunu haline gelmiştir (Ahmad vd., 2018; Jalmi vd., 2018). Bu tür zehirli maddeler toprakta geniş çapta yayılır ve bitkilere akut, kronik zehirlilik verir. Esansiyel olmayan bir element olan kadmiyum (Cd), bitkiler tarafından kolayca alınır ve bitki metabolizmasını, büyümesini, gelişimini olumsuz etkiler. Sabit yapıları nedeniyle bitkiler metal toksisitesini azaltmak için farklı mekanizmalar geliştirmiştir (Ahmad vd., 2019).

Bitkilerin Cd toksisitesine tepkisi çeşitlere, büyüme koşullarına ve Cd'ye maruz kalma süresine göre değişmektedir (Rizwan vd., 2016).

Birçok çalışmada, toksik bir ağır metal olan kadmiyumun (Cd) bitkilerde fotosentez veya büyümede azalmaya sebep olan fizyolojik ve morfolojik değişiklikleri meydana getirdiği görülmektedir (Farid vd., 2013). Bu değişiklikler oksidatif stresin artması, ROS oluşumu, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların aktivitesinin azalması ile sonuçlanmaktadır (Mishra vd., 2006; Farid vd., 2013).

Ağır metaller, mahsul bitkilerinin tam genetik potansiyellerini sınırlayarak ve üretkenliklerini azaltarak tarım topraklarının kirlenmesine sebep olmaktadır (Yadav, 2010). Bitkide, ağır metal kirliliğinden fazlaca etkilenen hücresel aktiviteler arasında; mineral beslenme, fotosentez, solunum, zar yapısı, gen ekspresyonu ve diğer özellikler yer almaktadır (Peixoto vd., 2001). Ağır metaller, DNA hasarına neden olmaktadır ve bunun sonucunda hayvanlarda ve insanlarda kanserojen etkiler ortaya çıkmaktadır (Baudouin vd., 2002). Cd, mikro besin dengesini bozmaktadır ve bitkilerin Cd'a karşı gösterdikleri tolerans mekanizmaları bitki türleri arasında farklılık göstermektedir (Cobbett ve Goldsbrough, 2002; Metwally vd., 2005).

Kadmiyum hücre duvarlarını Zn, Fe, Cu ve Ca iyonları taşıyıcıları aracılığıyla geçer. Cd girişi, ROS ve nitrik oksit (NO) aşırı üretimine yol açarak antioksidan enzim aktivitesinin gerçekleşmesine ve antioksidanların sentezine sebep olur. Cd stresinde yer alan anahtar sinyal yolları, sırasıyla mitojenle aktif hale gelen protein kinaz (MAPK), kalsiyuma bağımlı protein kinaz (CDPK) ve fosfoinositid 3-kinazlar (PI3 kinazlar)'dır. Kadmiyum stresi ayrıca oksine duyarlı promotörü (DR5-GUS), oksin akış taşıyıcılarını (PIN'ler) ve patojenle ilgili genleri (PR genleri) aktive eder. Cd stresine yanıt olarak sentezlenen fitoşelatinler, vakuoller yoluyla Cd'a karşı bir bitki savunma sistemi görevi görür (Şekil 7).



Şekil 7. Kadmiyum stresi ve detoksifikasyon şeması (El Rasafi vd., 2020).

1.3.1. SOS Sinyal İletim Yolu

Bitkilerde SOS sinyal iletim yoluyla bağlantılı 6 adet lokus tanımlanmıştır; SOS1, SOS2, SOS3, SOS4, SOS5 ve SOS6 (Shi vd., 2003; Zhu vd., 2010). SOS5 geni (FLA4), fasiklin benzeri bölge ve arabinogalaktan protein benzeri bölgelerden meydana gelmektedir (Mahajan vd., 2008; Seifert vd., 2014). SOS5 geni, hücre gelişimi sırasında ihtiyaç duyulan hücre yüzeyi adhezyon proteinini kodlamaktadır. Tuz stresi altında sos5 mutant bitkilerinde oluşan aşırı hassasiyet sebebiyle hücre çeperinin incilmesi ve orta lamelin azalması gibi strese karşı cevaplar meydana gelmektedir. Buna bağlı olarak bu genin, tuz stresi koşullarındaki hücrenin normal büyümesi ve gelişmesi için hücre duvarı sağlamlığını devam ettirmede oldukça önemli bir rol aldığı görülmüştür (Shi vd., 2003).

Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda, bitkilerin tuz stresinin olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için geliştirdikleri mekanizmaların, ağır metal streslerine verilen cevaplarla yakın olduğu; bu yüzden halofit bitkilerin ağır metalleri dokularında biriktirebildiği ileri sürülmüştür (Gall vd., 2015; Lutts ve Lefevre, 2015; Oosten vd., 2015).

Literatürdeki bu bilgiler ışığında, tuz stresi koşullarında ABA sinyal iletimi ve hücre çeperi senteziyle yakından ilişkili olan SOS5 geninin ağır metal stresine cevapta da etkili bir rol üstlenebileceği düşünülmektedir. Bu amaçla, SOS5 gen fonksiyonunu sürdürdüğümüz sos5 mutant bitkilerinde, yabani tiplerle kıyaslamalı olarak ABA ile ilişkili genlerin ifade düzeylerine bakılacaktır.

1.3.2. Bitkilerin Reaktif Oksijen Türlerine Karşı Gösterdiği Antioksidan Yanıtlar

Çeşitli çevresel stresler, süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali ($\bullet OH$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve tekli oksijen ($^1O_2$) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna sebep olur. ROS'ların detoksifikasyonu, enzimatik olan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), karotenoidler ve fenolikler gibi antioksidanlar tarafından sağlanır (Sharma vd., 2012).

ROS'un bitki gelişiminde karmaşık bir sinyal iletim ağını ve çeşitli stres faktörlerine verdiği yanıtları düzenlediği bilinmektedir. Bununla birlikte antioksidan enzimler, antioksidanlar ve ROS üreten enzimlerden oluşan bir bitki sinyal iletim ağı, ROS seviyelerinin kontrol altında tutulmasını sağlamaktadır (Gechev vd., 2006). Ağır metal stresine yanıt olarak oluşan antioksidan enzimlerin aktivasyonu Tablo 1'de özetlenmiştir (Ahsan vd., 2009).

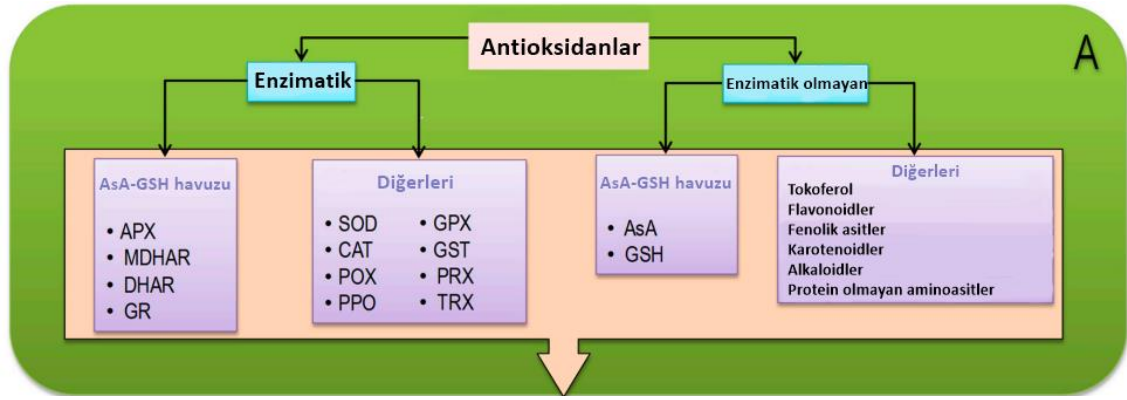
Tablo 1. Ağır metal stresine yanıt olarak belirlenmiş olan proteinler ve fonksiyonları (Ahsan vd., 2009).

Protein	Fonksiyon	Metal
APX, CAT, SOD, GPX, CS, DHAR, glioksalaz I, GSH1, MDHAR, POD, Prx, Trx, GST	Antioksidatif Savunma	Cd, Al, Cu, Ni, Mn, B, As, Cr, Cs

1.3.2.1. Antioksidan Enzimler

Bitkiler, oksidatif stresin olumsuz etkilerini azaltmak için antioksidan savunma sistemlerini harekete geçirir. Antioksidan savunma sistemi, düşük moleküler ağırlıklı enzimatik olmayan antioksidanlardan ve bazı antioksidan enzimlerden oluşmaktadır (Hasanuzzaman vd., 2020).

Antioksidanlar doğrudan veya dolaylı olarak ROS'u temizler ve/veya ROS üretimini kontrol eder (Carocho ve Ferreira, 2013). Aşırı ROS üretimini engellemek için AsA, GSH, a-tokoferol, fenolik bileşikler (PhOH), flavonoidler, alkaloidler ve protein olmayan amino asitler gibi enzimatik olmayan antioksidanlar ve SOD, CAT, POX, polifenol oksidaz (PPO), APX, MDHAR, DHAR, GR, GPX, GST, TRX, PRX gibi antioksidan enzimlerle koordineli bir şekilde çalışır (Nath vd., 2018; Laxa vd., 2019).



Şekil 8. Bitki antioksidan savunma sistemine genel bakış (Hasanuzzaman vd., 2020).

1.3.2.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD, (EC) 1.15.1.1), süperoksit serbest radikalının ($O_2^{\bullet-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene (O_2) dönüşümünü katalize ederek sitotoksik $O_2^{\bullet-}$ 'nin neden olduğu potansiyel sonuçlara karşı koruma sağlayan bir enzimdir. Böylece, SOD'lara biyotik strese bağlı gelişmiş ROS ve reaksiyon ürünlerine karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadır (Gill vd., 2015). SOD, bir metaloenzimdir ve ilk kez Mann ve Keilis (1938) tarafından yeşil bir Cu-proteini olarak sığır kanından izole edilmiştir. Aynı zamanda bakır depolanmasında işlev gördüğüne inanılmaktadır (Mann ve Keilin, 1938).

SOD, dismutasyonu katalizleyerek süperoksit serbest radikalini ($O_2^{\bullet-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürür. $O_2^{\bullet-}$ 'yi uzaklaştırır ve böylece Haber-Weiss reaksiyonu ile $OH^{\bullet}$ oluşumu riskini azaltmaktadır (Gill ve Tuteja, 2010). Bu değer aşağıdaki Eşitlik 1 ile elde edilir.



Bu eşitlikte:

O: Oksijen,

H: Hidrojen,

.-: Redoks

SOD: Süperoksit Dismutaz

SOD'ların mitokondri, kloroplastlar, peroksizomlar, apoplastlar ve sitozol gibi bölgelerde meydana geldiği düşünülmektedir (Alscher vd., 2002). Böylece, hücrel olmayan süperoksit dismutazın kritik bir rolünün olduğu vurgulanmaktadır (Pilon vd., 2011). Yapılan çalışmalarda ağır metal stresi altında (Pb) gelişen pirinç bitkilerinde SOD

aktivitesinin artarak pirinçte Pb kaynaklı oksidatif hasara karşı antioksidatif savunma mekanizması geliştirdiği gösterilmektedir (Verma ve Dubey, 2003). Diğer bir çalışmada ise bakır toksisitesinden kaynaklanan stres, SOD aktivitesinin artmasına ve SOD ile CAT gen ekspresyonunun aynı anda uyarılmasına neden olmuştur. Bu çalışmada, P. cerasifera bitkisinin bakır stres hasarlarını azaltmak amacıyla süperoksit dismutazı ve katalazı harekete geçirdiği belirlenmiştir (Lombardi ve Sebastiani, 2005).

1.3.2.1.2. Katalaz (CAT)

Antioksidan enzimler, ROS süpürme sistemindeki en önemli bileşenler olarak bilinmektedir (Meloni vd., 2003). Oksidatif stres ve bitkilerdeki hücre ölümü, fazla H₂O₂ birikiminden kaynaklanabilmektedir. Bitkiler, katalazlar (CAT) gibi birçok H₂O₂ temizleme mekanizmasını temsil eden enzimlere sahiptir (Apel ve Hirt, 2004). CAT, genellikle peroksizomlarda bulunan bir demir porfirin enzimi olarak bilinmektedir (Purev vd., 2010).

Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6), H₂O₂'nin H₂O ve O₂'ye dönüşümünü katalize eden tetramerik bir enzimdir ve herhangi bir stres esnasında ROS detoksifikasyonu için son derece önemlidir (Garg ve Manchanda, 2009). CAT, dakikada yaklaşık 6 milyon H₂O₂ molekülünü H₂O ve O₂'ye dönüştürebildiği için tüm enzimler arasında en yüksek devir hızlarından birine sahiptir (Gill ve Tuteja, 2010).

Katalazın rolünü gösteren genel bir reaksiyon aşağıda Eşitlik 2'de verilmiştir (Apel ve Hirt, 2004).



Bu eşitlikte:

O: Oksijen,

H: Hidrojen,

CAT: Katalaz

Katalazın temel görevi, oksidatif hasarı engellemek için biyotik ve abiyotik stres esnasında fazla olan H₂O₂'yi uzaklaştırmaktır (Mhamdi vd., 2010).

1.3.2.1.3. Askorbat Peroksidaz (APX)

Bitkiler, çeşitli stres durumlarında üretilen ROS'ları süpürmek için askorbat peroksidaz (APX), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve peroksidaz (POD) gibi antioksidan enzimleri kullanmaktadırlar (Kwon vd., 2002). Multigen ailesinden olan askorbat peroksidaz (APX, EC 1.11.1.11) enziminin, bitkilerde kloroplastlarda peroksizomal/glikoksizomal, stromal APX (sAPX), tilakoid membrana-bağlı APX (tAPX), mitokondriyal APX (mitAPX) ve sitosolik APX (cAPX) gibi formları bulunmaktadır. APX, H_2O_2 ile H_2O 'nun dönüşümünü katalize etmektedir (Anjum vd., 2014; Gill ve Tuteja, 2010). Antioksidan enzimler ve formları serbest radikalleri uzaklaştırmak için aktive olmaktadır ve APX bu sistemdeki merkezi enzimlerdendir (Pandey vd., 2017).

Bitki hücrelerindeki hidrojen peroksit (H_2O_2) temizleme sistemi, askorbat peroksidaz (APX) enzimlerinin önemli bir rol oynadığı askorbat-glutasyon döngüsüdür. APX genlerinin ekspresyonu, biyotik ve abiyotik streslere tepki olarak düzenlenmektedir ve bu tepkiler, çevresel stres koşulları altında bitkinin korunmasında doğrudan yer almaktadır (Caverzan vd., 2012). APX'ler, H_2O_2 'nin çıkarılmasından sorumlu olan gerekli enzimlerden biridir (Li vd., 2012). APX, H_2O_2 için diğer enzimlerden daha yüksek bir afinite göstermektedir ve kloroplastlar, peroksizomlar, sitozol, mitokondri ve apoplastik alanlarda H_2O_2 'yi H_2O 'ya dönüştürerek spesifik elektron donörü olarak askorbat kullanmaktadır (Sofa vd., 2015). Büyüme düzenlemesinde önemli bir role sahip olan APX, askorbat yokluğunda kararsız hale gelmektedir (Shigeoka vd., 2002).

1.3.3. Ağır Metal Stresi Ve Absisik Asit Arasındaki İlişki

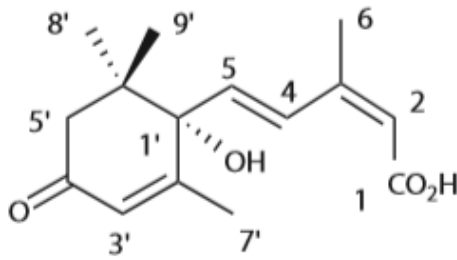
Bitkiler, abiyotik stres faktörlerinden olumsuz yönde etkilenirler ve sağlıklı bitki gelişimini koruyabilmek için bu koşullara karşı çeşitli tolerans mekanizmaları geliştirmişlerdir (Osakabe vd., 2013). Bitkilerin, çeşitli stres koşullarında hayatta kalabilmek için ABA biriktirdikleri bilinmektedir. Bitkilerin bir fitohormon olan ABA düzeyini artırarak bitki gelişimini ve stres yanıtlarının kontrolünü ayarladığı, bitkilerde metabolik değişimleri ve çeşitli stres ilişkili genlerin ekspresyonunu uyardığı belirlenmiştir (Chen vd., 2005; Tuteja, 2007; Cutler vd., 2010). ABA'nın tohum çimlenmesi ve stres tepkilerinde birçok fizyolojik ve biyokimyasal süreci düzenleyici rolü olduğu bildirilmiştir (Wang vd., 2013). Absisik asit, tohum olgunlaşması sırasında dormansinin indüklenmesinde önemli bir pozitif düzenleyicisidir (Holdsworth vd., 2008). Aynı zamanda tohum olgunlaşması sırasında, ABA besleyici rezervlerin alınmasını tetikler. Vejetatif büyüme sırasında ise ABA, çeşitli çevresel stres koşullarına karşı

geliştirilen yanıtlara aracılık eder. Ayrıca su kaybını engellemek için stoma gözeneklerinin kapanmasına aracılık eder (Kuhn ve Schroeder, 2003).

ABA ile ilgili şimdiye kadar yapılan çalışmalarda ABA'nın, ağır metal, kuraklık, donma, soğuk ve tuz stresi gibi çeşitli abiyotik streslere karşı bitkide koruma özelliği sağladığı gösterilmiştir (Hsu vd., 2006; Iuchi vd., 2001; Zhou vd., 2006; Kumar vd., 2008; Etehadnia vd., 2008). Böylece, ABA'ya duyarsız ve biyosentetik mutantlar aracılığıyla, stres algısı ile hücrel stres yanıtı arasında bir ara molekül olarak ABA'nın rol aldığı onaylanmıştır (Bartels ve Sunkar, 2005).

1.3.4. ABA'nın Moleküler Yapısı

ABA'nın moleküler yapısı, bitkilerdeki biyolojik aktivite için oldukça önemli birçok özelliğe sahiptir. Bunlardan biri, karboksilik aside bağlanmış iki çift bağ içeren ABA molekülünün yan zinciridir; halkaya bitişik olan çift bağın konjugasyonu trans izomeri ve asit grubu ise proksimal cis izomeri olarak adlandırılır (Cutler vd., 2010). ABA'nın moleküler yapısı Şekil 9'da gösterilmiştir.

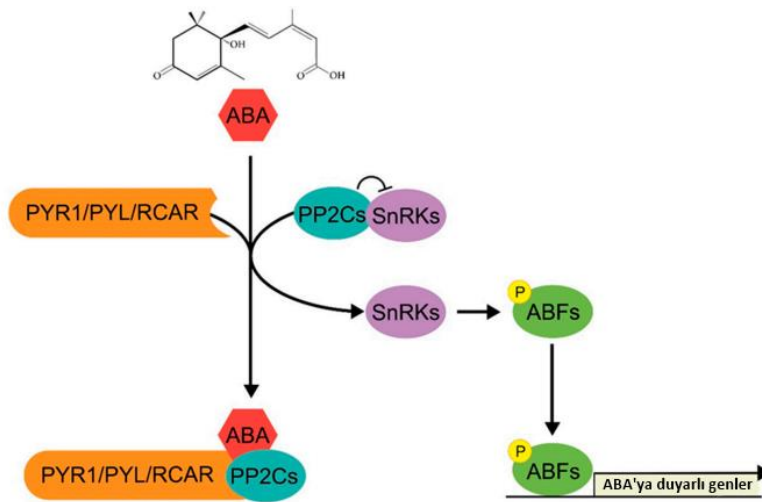


Şekil 9. Absisik asitin (ABA) moleküler yapısı (Cutler vd., 2010).

1.3.4.1. ABA Biyosentezi Ve Katabolizması

ABA, bitki yaşam döngüsünde hayati rollere sahip çok işlevli bir fitohormondur (Finkelstein, 2013). Fitohormonlar, bitkilerde ağır metal emiliminin ve taşınmasının düzenlenmesinde rol oynar. ABA, çevresel streslere yanıt için temel bir düzenleyicidir ve ağır metal maruziyetine bağlı toksisite etkilerini hafifletmede kritik bir rol oynamaktadır. Maş fasulyesi fidelerini içeren bir çalışma, ABA'nın, tesadüfi kök oluşumu ve büyümesinin inhibisyonunu azaltmak için antioksidan savunma sistemini düzenleyebileceğini göstermiştir (Hauser vd., 2017; Li vd., 2014). Diğer bir çalışmada ise *Populus euphratica*'da ABA, antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak Cd stresini hafifletir ve Cd'un hücre içine taşınmasını inhibe eder (Han vd., 2016).

ABA, stoma kapanması, tohum dormansisi, tohum çimlenmesi gibi birçok fizyolojik ve metabolik süreçte yer alır ve meyve olgunlaşması ve yaprak dökülmesi gibi bitkilerde birçok büyüme ve gelişme sürecini düzenler. ABA'nın sinyal yolları, karmaşık ABA düzenlemesinde önemli bir rol oynayan PP2C, SnRK2 ve PYL/PYL/RCAR'ı içerir (Wang vd., 2014). ABA, ROS oluşumuna yanıt olarak bitki savunma sistemi tarafından dolaylı olarak uyarılan bir sinyal mesajcı moleküldür (Xia vd., 2015). ABA içeriği miktarındaki değişiklikler, ABA taşınması, ABA katabolizması ve ABA sentezi dahil olmak üzere bir dizi mekanizma ve ayrıca konjugasyon ve dekonjugasyon mekanizmaları yoluyla glikoz ile reaksiyon yoluyla gerçekleşir (Verslues, 2016). ABA sentezi, kloroplastlarda karotenoid violaksantin'in bozunması ve neoksantin'in ksantoksine katalizi dahil olmak üzere iki kimyasal yolla gerçekleşir (Liu vd., 2018). ABA ayrıca kurutma işlemi sırasında de novo ile sentezlenir (Roychoudhury vd., 2013). ABA konjugasyonu, ABA'nın ve onun vakuolar deposunun kalıcı olarak devre dışı bırakılmasıyla sonuçlanır (Verslues, 2016). ABA'ya yanıt olarak, ABA reseptörü PYR1/PYL/RCAR, PP2C'ler ile bir kompleks oluşturur ve ABF transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini belirleyen kinazlar olan SnRK'leri aktive eder. ABF'nin SnRK aracılı fosforilasyonu, ABA'ya tepki veren genlerin ve ABA tepkisinin ekspresyonunu destekler (Şekil 10).

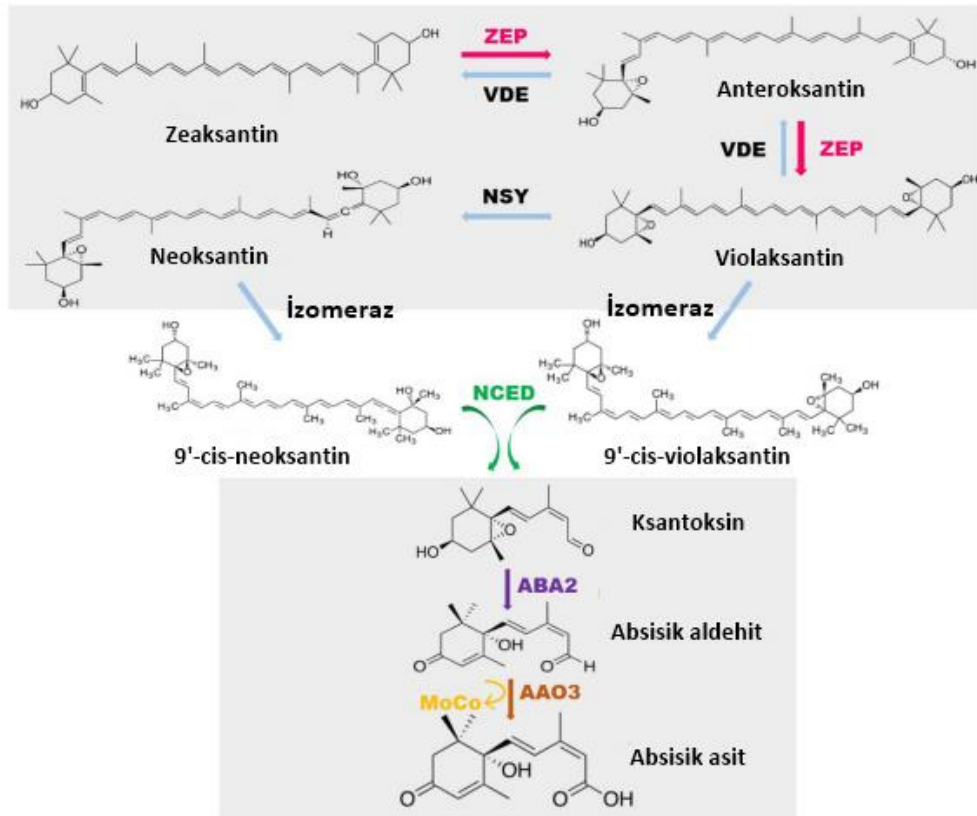


Şekil 10. ABA sinyal yolunun bir şeması (Yoon vd., 2020).

Bitki hormonu olan ABA, ilk olarak genç pamuklu meyvelerde ve çınar otlarının tomurcuklarında keşfedilmiştir ve bitki gelişiminde çeşitli biyotik ve abiyotik streslere karşı adaptasyonu düzenlemektedir. Daha yüksek bitkilerde ABA biyosentezi, birçok

enzimatik yollar aracılığıyla C40 karotenoidlerin bölünmesini gerektirmektedir (Soto vd., 2013).

Zeaksantin, bütün trans-likopenin β -karoten yoluyla siklizasyonundan ve hidroksilasyonundan sonra bir trans-izomer olarak üretilmektedir. ABA'nın C15 bileşiği, violaksantin ve neoksantincis-izomerlerinin sentezi aracılığıyla oluşmaktadır. Zeaksantin, violaksantin'e dönüşümü, zeaksantinepoksidadaz (ZEP) enzimi tarafından katalize edilmektedir (Nambara ve Marion-Poll, 2005). Yapılan çalışmalarda, Arabidopsis'te zeaksantin enziminin birikmesiyle ABA içeriğinde ciddi bir azalma gözlemlenmiştir. Bu enzim Arabidopsis'te ABA1 lokusu aracılığıyla kodlanmaktadır (Merlot vd., 2002). ABA'nın biyosentez ve katabolik yolları Şekil 11'de gösterilmiştir.



Şekil 11. Absisik asit (ABA) Biyosentez Yolu (Vishwakarma vd., 2017).

1.3.4.2. ABA Ve Sinyal İletimi

Bitki gelişiminin birçok aşamasında rol oynayan ve bir fitohormon olan ABA, çeşitli çevresel streslere karşı fizyolojik tepkilere aracılık etmede önemli bir göreve sahiptir. Genel olarak, bitkilerin çeşitli stres koşullarına uyarlanabilir tepkileri ABA-bağımlı veya ABA-bağımsız olabilmektedir (Dilukshi Fernando ve Schroeder, 2016). Strese yanıt olarak önemli bir biyokimyasal değişiklik, strese cevap veren genlerin bir

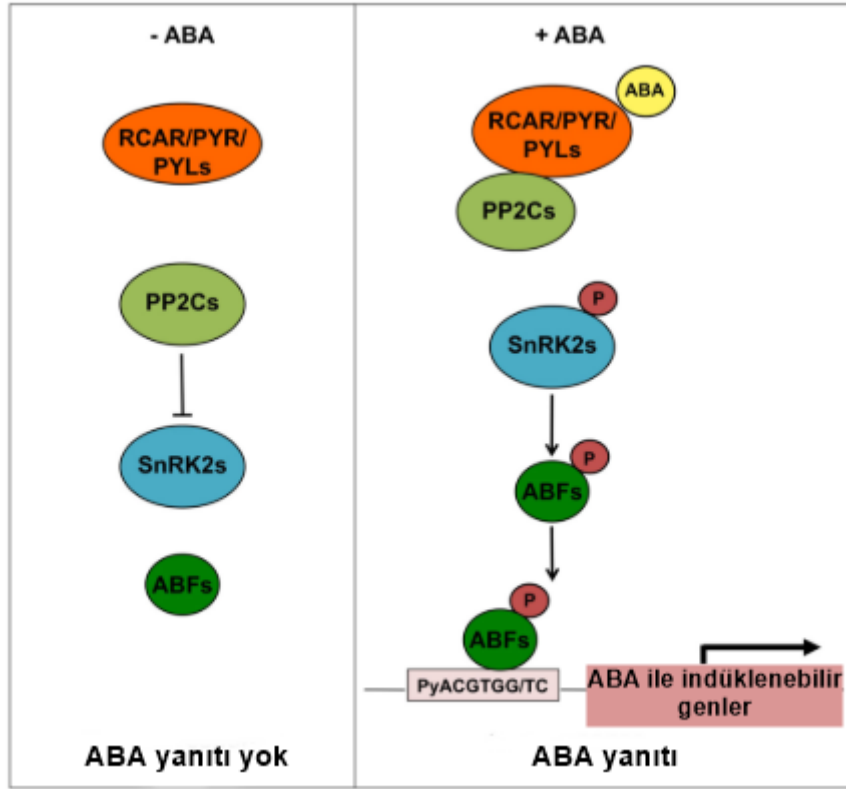
kaskadının ekspresyonunu tetikleyen ABA seviyelerinin yükselmesidir (Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Absisik asit, bitkilerde tohum gelişimi, fide kuruluşu, vejetatif ve üreme gelişimi ve aynı zamanda tohum dormansisinin desteklenmesine katılmaktadır (Barrero vd., 2005). Bundan dolayı, bitki performansını artırmak için ABA sinyallemesini anlamak oldukça önemlidir. *Arabidopsis thaliana*'daki genetik ekranlar birçok alt akım ABA sinyal bileşenini tanımlamada başarılı olmuştur. ABA sinyalizasyon alanındaki son bulgular, ABA'nın ABA reseptörlerinin, ABA Reseptör/PyrabactinResistant Protein1/PYR-likeProteins (RCAR/PYR1/PYL'ler) Düzenleyici Bileşenlerine bağlandığı benzersiz bir hormon algılama mekanizması ortaya koymaktadır. START-domain süper familyasına ait olan RCAR/PYR/PYL proteinleri, çözünür ligand bağlama özelliklerine sahiptirler ve bu proteinlerin reseptörleri sitoplazma ve çekirdekte bulunur. RCAR/PYR/PYL proteinlerine ABA bağlanması, ABSİSİK ASİT INSENSITIVE 1 (ABI1) ve onun yakın homoloğu olan ABI2 gibi tip 2C protein fosfatazların (PP2C'ler) inaktivasyonuna sebep olmaktadır (Nishimura vd., 2010).

RCAR protein ailesinin 14 üyesinin tamamı ABA'ya bağlanır ve PP2C'lerle etkileşime girmektedir. RCAR7/PYL13 haricindeki tüm RCAR üyeleri ABA sinyallemesinin pozitif düzenleyicileridir (Dilukshi Fernando ve Schroeder, 2016). *Arabidopsis* 'te tanımlanan 80 PP2C bulunmaktadır. Bu fosfatazlar ve RCAR/PYR/PYL proteinleri, ko-reseptör görevi görmektedir. Aynı zamanda, yüksek afiniteli bir ABA bağlanma yeri oluşturmaktadır. PP2C'lerin etkisiz hale getirilmesi, ABA sinyallemesinin önemli pozitif düzenleyicilerinden olan SNF1 (Sükroz-Fermente Olmayan Kinaz1) ile ilişkili protein kinazlar (SnRK2s) PP2C aracılı defosforilasyonunun bastırılmasına yol açar. Bunun sonucunda, aktif SnRK2'ler ABA'ya bağımlı gen ekspresyonunu ve iyon kanallarını hedefler (Raghavendra vd., 2010; Cutler vd., 2010). Fosforile edilmiş SnRK2'ler daha sonra, temel lösin fermuar transkripsiyon faktörleri olan ABA'ya duyarlı eleman Bağlayıcı Faktörleri (ABF'ler) fosforile eder. ABF'lerin fosforilasyonu, cis etkili ABA Duyarlı Elemanlar (ABRE) (PyACGTGG/TC) yoluyla aşağı akım gen ekspresyonunu aktive eder (Lumba vd., 2014).

Stres sırasında, ABA biyosentezi önce köklerde artar ve daha sonra ksilem aracılığıyla gövdeye taşınır. Böylece, stomaların kapanmasını sağlayarak kimyasal bir sinyal olarak işlev görür (Gallé vd., 2013). Abiyotik stres altında tohum çimlenmesinin engellenmesi ABA'nın bir başka işlevidir. Olgunlaşmanın geç aşamalarında tohumlar ABI5'i biriktirir ve bu da Late Embriyogenezisine Bağlı (LEA) proteinlerinin transkripsiyonunu aktive eder. LEA proteinleri embriyoya ozmotolerans sağlar.

Tohumlar elverişsiz çevre koşullarında olduğunda, yüksek endojen ABA seviyeleri ABI5 birikimi ile sonuçlanarak tohumların çimlenmesini önler (Finkelstein ve Tim Lynch, 2000). ABA sinyal iletim yolundaki ana bileşenler Şekil 12’de gösterilmiştir (Dilukshi Fernando ve Schroeder, 2016).



Şekil 12. ABA sinyal iletim yolundaki ana bileşenler (Dilukshi Fernando ve Schroeder, 2016).

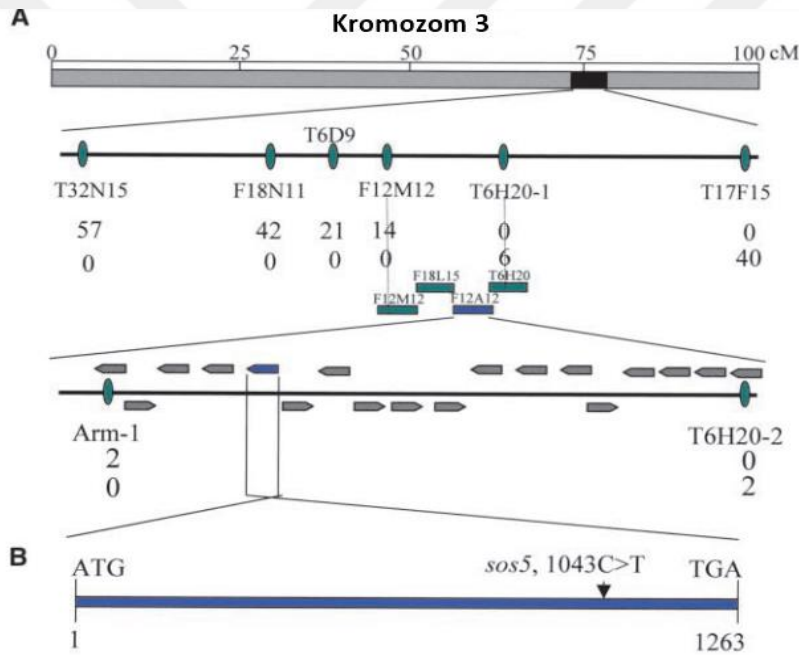
1.4. SOS5 Geninin Hücre Çeperi İle İlişkisi

Bitki hücre çeperi, büyük ölçüde polisakkaritler (selüloz, hemiselülozlar ve pektinler), enzimler ve yapısal proteinlerden oluşan karmaşık bir yapıdır. Ayrıca, bitki hücre çeperleri, hücre boyutu ve şekli, büyüme ve gelişme, hücreler arası iletişim ve çevre ile etkileşimin belirlenmesinde yer almaktadır (Micheli, 2001). Hücre çeperinin fonksiyonunun ve bütünlüğünün biliniyor olması, bitkinin yaşam fonksiyonlarını devam ettirmesi ve çoğalması, genişlemesi ve farklılaşması, biyotik ve abiyotik ortamdaki değişimlere verilen yanıtların anlaşılması için oldukça önemlidir (Blaukopf vd., 2011).

Bitki hücre çeperleri, ekstensinler (EXT'ler), prolin açısından zengin proteinleri (PRP'ler) ve arabinogalaktan proteinleri (AGP'ler) içeren polisakkaritler ve hidroksiprolin bakımından zengin glikoproteinlerden (HRGP'ler) oluşmaktadır (Velasquez vd., 2011). Hücre çeperi ile sitoplazma arasındaki bilgi geçişini sağlayan Arabinogalaktan proteinler,

hücre çeperinin ilgi çekici bileşenlerindendir ve bu glikoproteinlerin çoğu, plazma zarına bağlanırlar. (Driouich ve Baskin, 2008). AGP'ler, hücreler arası boşluklarda, hücre duvarlarında, plazma membranlarında ve sitoplazmik veziküllerde bulunan glikoproteinlerdir. Bundan dolayı AGP'ler, hücre büyümesi ve bitki gelişimi ile ilgili birçok süreçte görev almaktadır (Majewska-Sawka ve Nothnagel, 2000). Fasiklin benzeri arabinogalaktan proteinleri (FLA'lar) de, arabinogalaktan proteinlerinin alt sınıfına girmektedir (Johnson vd., 2003).

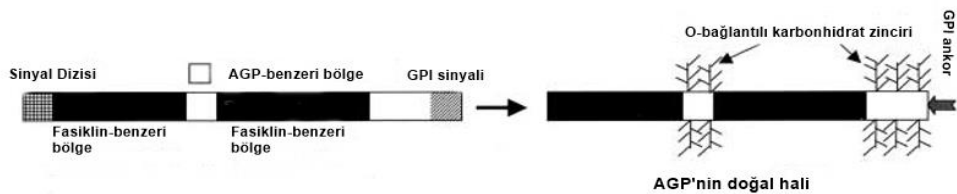
SOS5, Arabidopsis'te 3. kromozomun alt kolunda bulunan bir gendir (Şekil 10). Aynı zamanda SOS5, alternatif olarak organize edilmiş iki fasiklin benzeri alan ve iki AGP benzeri alan içermektedir. Bu yüzden SOS5 protein omurgası, bir N-terminal sinyal sekansı, iki AGP benzeri alan, iki fasiklin benzeri alan ve bir GPI anchor sinyal sekansı (Şekil 13) gibi 4 önemli yapı içerdiği sonucuna varılmıştır (Shi vd., 2003).



Şekil 13. Kromozom Üzerinde SOS5 Geninin Konumu (Shi vd., 2003).

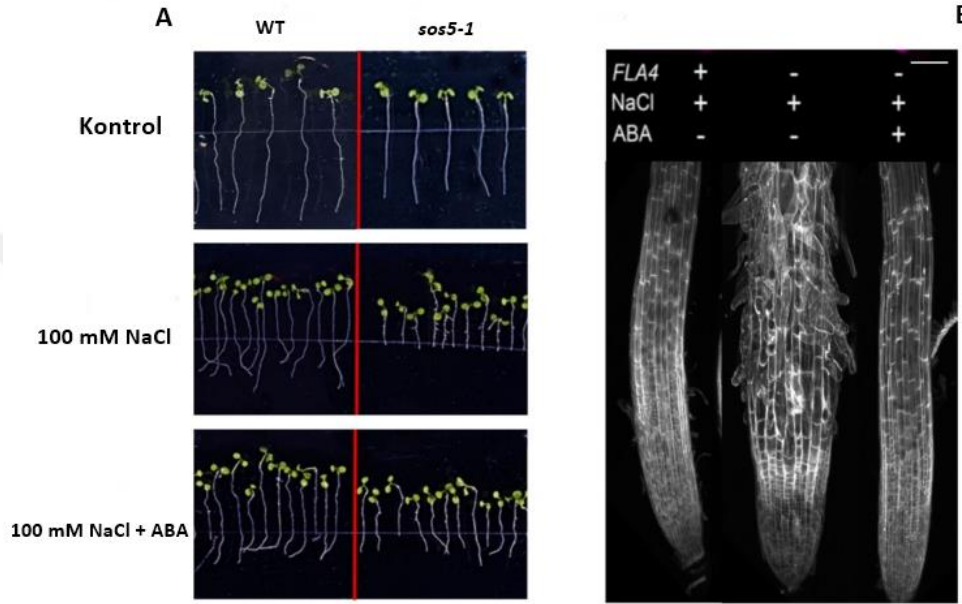
(A) SOS5, 3. kromozomun alt kolunda bulunur.

(B) SOS5 intronsuz bir gendir ve SOS5 mutasyonunun yeri belirtilir.



Şekil 14. AGP benzeri etki alanları ve fasiklin benzeri etki alanları içeren SOS5 geninin yapısı (Shi vd., 2003).

Acet ve Kadioğlu 2020 yılında yaptıkları çalışmada, NaCl stresi altında ABA ile muamele edilmiş mutant *sos5-1* bitkisi üzerinde araştırma yapmışlardır ve tuz stresi altında ABA ile muamele edilen *sos5-1* mutant bitkilerin, sadece tuz stresine maruz kalanlara göre hücresel hasarı ortadan kaldırdığını tespit etmişlerdir. Ayrıca NaCl stresine maruz kalan *sos5-1* mutant bitkilerde kısa ve genişlemiş kök ucu fenotipi ortaya çıktığını göstermişlerdir (Şekil 15) (Acet ve Kadioğlu, 2020).



Şekil 15. Tuz stresine maruz kalan WT ve mutant bitkilerde ABA etkisiyle kök fenotiplerindeki değişikliklerin karşılaştırılması (Acet ve Kadioğlu, 2020).

Bitki hücre çeperi polisakkaritleri, proteinler, amino asitler ve fenolikler gibi diğer bileşiklerin yanı sıra ağır metal bağlanması ve hücre çeperi birikiminde önemli bir göreve sahiptirler (Krzeslowska, 2011; Vuletic vd., 2013). Yapılan çalışmalarda, hücre çeperinin ana yapı taşı olan selüloz sentezinin ve birikiminin bitkileri ağır metallerle karşı toleranslı hale getirdiği belirlenmiştir (Song vd., 2013; Gall vd., 2015). Gao ve arkadaşlarının 2013'te yaptıkları çalışmada, ağır metalleri aşırı biriktiren bir tür olan *Sedum alfredii* Hance'de yapılan transkriptom analizlerinin sonucunda, hücre çeperi biyosentezini kodlayan CesA ve XTH genlerinin regülasyonunu arttığı tespit edilmiştir (Gao vd., 2013). Aynı zamanda, glikofit bitkilerde katyon değiştirici (CAX), seçici olmayan katyon kanalı (NSCC) ve çinko-demir geçirgenliği (ZIP) gibi metal taşıyıcıları tanımlanmıştır (Lutts ve Lefevre, 2015). Bitkilerde, soğuk, kuraklık ve tuz stresi ile ilişkili genlerin ifadesini uyaran transkripsiyon faktörlerinden (TFs) DREB2A, ağır metaller ile de uyarılmaktadır ve aynı zamanda SOS5, ABA ve abiyotik streslerle yakından ilişkili olan RD29A genini

aktive ettiği belirlenmiştir (Dalcorso vd., 2008). Bundan dolayı, tuz stresine karşı toleransta görev alan tanımlanmış genlerin, ağır metal stresi altında da vereceği ortak cevaplar olabileceği düşünülmektedir.

1.5. *Arabidopsis thaliana* Bitkisinin nemi

Bitkilerin büyüme ve gelişmesindeki zorlu süreçlerin anlaşılmasında *Arabidopsis thaliana* rnek organizma olarak görev alır. Model bir bitki olarak bilinen *Arabidopsis thaliana* (Fare Kulağı Teresi) lahanagiller (Brassicaceae) familyasında yer almaktadır. 50 yıldır biyokimyasal, fizyolojik, genetik ve moleküler çalışmalarda kullanılan önemli bir bitkidir. Genetik çalışmalarda kullanılmasındaki nedenler; *A. thaliana*'nın pahalı olmayan ortamlarda gelişme göstermesi, özel iklim koşullarına gerek duymaması, mineral isteğinin az olmasıdır. Moleküler çalışmalarda kullanılma nedenleri ise; *A. thaliana*'nın tohum üretiminin çok olması, hücrelerde bulunan toplam DNA'nın oransal olarak az olması, mutant birey bulundurması ve gen aktarım çalışmaları için uygun organizma olmasıdır. Moleküler ve genetik çalışmada kullanılma nedenlerinin yanısıra tercih edilmesindeki diğer önemli faktörler; genetik transformasyonunun zor olmaması, polimorfizminin fazla olması, genin izole edilmesinde ve birçok genom çalışmalarında kullanılması nedeniyle laboratuvar da çalışmak için mkemmek bir model organizma olmasıdır. *Arabidopsis thaliana*, dünya üzerinde genom sekansı tam olarak belirlenen ilk bitki olmuştur (TAIR, 2011; Copenhaver, 2000).



şekil 16. *Arabidopsis thaliana* bitkisi (Arslan, 2019).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi Ve Uygulanan Stres Yöntemleri

2.1.1. Tohumların Eldesi

Mevcut çalışmada kullandığımız Arabidopsis bitkisinin Col-gl (WT) ve sos5 (mutant) bitki tohumları Dr. Georg Seifert tarafından (Bodenkultur University, Vienna, Austria) tedarik edildi (Tablo 2).

Tablo 2. Mutant isimlerinin kısaltmaları

Kısaltılmış Biçimi	Adı	Özelliği	Kullanım amacı
Col-gl	<i>Columbia glabrous</i>	sos5 mutantının alt yapısı (background) ve yabani bir ekotip	Kontrol-1
sos5 (fla4)	<i>Salt overly sensitive</i> 5 tek mutant (Fasiklin benzeri arabinogalaktan protein mutanı)	Tuza aşırı hassas kök fenotipi sergiliyor, ABA sinyalizasyonunda aksaklık olduğu düşünülüyor.	SOS5 geni ve Cd ağır metali arasındaki ilişkiyi aydınlatmak

2.1.2. Tohum Sterilizasyonu

Tohumlar endorf tüplere konularak üzerlerine 1:10 oranında hipoklorit içeren çamaşır suyu eklendi ve 5 dk bekletilerek maksimum ayarda vorteksleme işlemi yapıldı. Bu şekilde tohumların sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra, süpernatant dökülerek tohumlar 3 defa steril saf sudan geçirilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi ve tohumlar ekime hazır hale getirilmiş oldu.

2.1.3. Arabidopsis thaliana Bitki Materyali Ve Büyüme Koşulları

Öncelikle, %1'lik Sukroz ve MS media saf su ile çözüldü ve pH: 5.8'e ayarlandı. Daha sonra besi ortamının katılaşması için %0.8'lik Fitajel eklendi ve otoklav yapıldı. Bu şekilde, tohumların petri kaplarında ekimlerinin gerçekleştirilmesi için vitamin içeren MS Media (Murashige&Skoog, 1962) besi ortamı hazırlandı. Hazırlanan besi ortamı plastik petri kaplarına aktarıldı ve soğuması için bekletildi. Bitki kök ve gövdelerindeki fenotipik değişimlerin gözlenmesi ve böylece Cd'ye olan hassasiyetlerin belirlenmesi amacıyla yapılan deneylerde tohumlar Barky Ultipette (0.5-10 µl productcode CP-10) ile tek tek ekildi. Daha sonra plastik petrilerin etrafı hava girişi olacak şekilde fakat kontaminasyonu engelleyen porlu bantlar ile kapatıldı. Bu işlemten sonra, tohumların dormansisini engellemek için petriler karanlıkta, +4 °C'de 2 gün bekletilerek çimlenmeleri sağlandı.

Daha sonra petriler dikey bir biçimde Memmert marka büyütme kabinine yerleştirilerek bitkiler 24.5° C’de, %70 nem oranında, 120-150 $\mu\text{mol/m}^2$ ışık yoğunluğu ve 16h/8h gündüz/gece ışık periyodu altında yetiştirildi (Şekil 17).



Şekil 17. Petrilerde büyütülen bitkilerin kabin içerisindeki görünümü

2.1.4. Bitkilere Cd Stresi Ve ABA Uygulaması

Fideler 3-4 gün sonra, steril bir cımbız yardımı ile petrilerden dikkatli bir şekilde alınarak naylon mesh üzerinde MS0, 50 μM Cd ve 50 μM Cd + 5 μM ABA içeren besi ortamlarına 3 biyolojik tekerrür olacak şekilde 10’ar tane aktarıldı ve böylece 48 saat sonra fenotipik gözlem deneyleri gerçekleştirildi. Fenotipik gözlemler, 3 gün süresince kök uzunlukları ölçülerek ve mikroskop (Nikon marka) ile görüntülenerek gerçekleştirildi. Ardından, naylon mesh üzerinde 7 gün boyunca büyütülen fideler direkt olarak sıvı azot ile muamele edildi ve toz haline getirilerek RNA çalışmalarında kullanıldı.

2.2. Stres Altında Bitkilerde Meydana Gelen Morfolojik Değişimlerin Belirlenmesi

Öncelikle bitkilere (WT ve sos5 mutan) Cd’un farklı konsantrasyon aralıkları (0.5-1-5-10-20-50 ve 100 μM) uygulandı. Ardından, kök ve gövdelerin uzunluk ve fenotipik değişimleri gözlemlendi. Petri kaplarında büyüyen bitkilerin, 3 gün boyunca görüntülenmesi yapılarak ImageJ Programı aracılığıyla kök uzunluklarının mm cinsinden ölçümü yapıldı. Köklerin en hassas olduğu (kısa, şişkin, hasarlı vb.) konsantrasyon (50 μM) bizim için uygun olarak kabul edildi ve uygun konsantrasyon seçimi yapıldı.

2.3. Bağıl Su İçeriğinin (RWC) Belirlenmesi

Bağıl su içeriği analizi Smart ve Bingham (1974)'a göre gerçekleştirildi. MS Media ortamında yetiştirilen ve 7 gün 50 µM Cd stresine maruz bırakılan bitkilerden alınan örneklerin öncelikle yaş ağırlıkları alındı. Ardından, 4 saat saf suda bekletildi ve hızlı bir şekilde turgit ağırlıkları (TA) ölçüldü. Kuru ağırlıklar ise, etüvde 70°C'de 48 saat bekletildikten sonra ölçüldü. %RWC aşağıda belirtilen Eşitlik 3'e göre hesaplandı.

$$RWC (\%) = \frac{(Yaş\ Ağırlık - Kuru\ Ağırlık)}{(Turgit\ Ağırlık - Kuru\ Ağırlık)} * 100 \quad (Eşitlik\ 3)$$

Bu eşitlikte:

RWC: Bağıl Su İçeriği

2.4. Fotosentetik Pigment Analizi

Klorofil miktarının belirlenmesi Arnon (1949)'un metoduna göre gerçekleştirildi. MS Media ortamında yetiştirilen ve 7 gün 50 µM Cd stresine maruz bırakılan bitkilerden alınan 25 mg'lık taze bitki örnekleri 500 µL %80 aseton (25 ml Tris-HCl pH 7.5, 75 ml saf su ve 400 ml aseton) ile muamele edilerek ependorflar içerisinde ezildi ve homojenatlar 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Ardından, 250 µL süpernatant kısmı alınarak Multiskan GO Mikropilaka okuyucuda (Thermo Scientific) 450 nm, 645 nm ve 663 nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Ölçülen absorbans değerleri aşağıda belirtilen formüllerde yerine konularak, klorofil miktar sonuçları mg/g TA cinsinden hesaplandı.

$$Klorofil-a\ İçeriği = (12.7 \times A_{663}) - (2.69 \times A_{645}) \quad (Eşitlik\ 4)$$

$$Klorofil-b\ İçeriği = (22.9 \times A_{645}) - (4.68 \times A_{663}) \quad (Eşitlik\ 5)$$

$$Toplam\ Klorofil\ İçeriği = Klorofil-a + Klorofil-b \quad (Eşitlik\ 6)$$

$$Toplam\ Karotenoid\ İçeriği = 4.07 \times A_{450} - (0.0435 \times K_{l-a} + 0.3367 \times K_{l-b}) \quad (Eşitlik\ 7)$$

2.5. Antosiyanin Miktarının Belirlenmesi

Antosiyanin miktarının belirlenmesi Robe vd., (2020)'nin metoduna göre gerçekleştirildi. 25 mg taze bitki örneği 500 µL asidik metanol (1% HCl, w/v) ile homojenize edildi ve karanlıkta +4°C'de bir gece karıştırıcıda bekletildi. Ardından, 14000 rpm'de 5 dk +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı alındı ve mikropalakaya yüklenerek 530 nm ve 657 nm dalga boylarında mikropalaka okuyucuda absorbanslar ölçüldü. Toplam antosiyanin miktarı, aşağıdaki Eşitlik 8'e göre hesaplandı ve sonuçlar $A_{\text{Antosiyanin}} / \text{mg TA}$ cinsinden verildi.

$$\text{Antosiyanin miktarı} = (A_{530} - (0.25 * A_{657})) \quad (\text{Eşitlik 8})$$

2.6. Prolin Miktarının Belirlenmesi

Prolin miktarının belirlenmesi Bates (1973)'in metoduna göre gerçekleştirildi. Öncelikle 10 mM stok prolin çözeltisi hazırlandı ve stok çözeltiden 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µM çözeltiler elde edildi. 0.6 g bitki örneği hassas terazide tartılarak 10 mL %3'lük sülfosalisilik asit solüsyonunda ekstrakte edildi ve 3000 rpm'de santrifüjlendi. 1 mL süpernatant, 1 mL asit-ninhidrin çözeltisi ve 1 mL glasiyal asetik asit çözeltisi 1 saat 100 °C'de inkübe edildi ve reaksiyon buz banyosunda sonlandırıldı. Pembe rengi alan reaksiyon karışım 3 mL tolüenle 15-20 saniye vorteksenerek karıştırıldı. Üst fazda kalan süpernatant karışım absorbans değeri ölçülmek üzere ayrıldı. Kör tüpe tolüen eklenerek 520 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Toplam prolin miktarı, aşağıdaki Eşitlik 9'a göre hesaplandı ve sonuçlar µmol/g TA cinsinden verildi.

$$\text{Prolin miktarı} = [(\mu\text{g prolin/mL tolüen}) / 115.5 \mu\text{g}/\mu\text{mol}] / [(\mu\text{g örnek}) / 5] \quad (\text{Eşitlik 9})$$

2.7. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Tayini

Bitkiler çeşitli abiyotik streslere maruz kaldıklarında, singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikalleri ($\cdot\text{OH}$) gibi bazı reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini indükler (Büyük vd., 2012). Reaktif oksijen türleri (ROS), hücre zarlarında hasara, protein oksidasyonuna, enzim inhibisyonuna ve nükleik asitlerde zincir kırılmasına neden olmaktadır. Bitkiler, bu ROS'ları detoksifiye etmek için ayrıntılı mekanizmalar geliştirmiştir ve bu mekanizmalarda enzimler çok önemli bir rol oynamaktadır (Elavarthi ve Martin, 2010).

2.7.1. Enzimler İçin Ekstrakt Hazırlanması

100 mg bitki, sıvı azot içerisinde konularak dövüldü. Elde edilen toz 1 mL ekstraksiyon tamponu (50 mM K₂HPO₄, 1 mM EDTA pH 7.0, %1 Triton-X) ile ekstrakte edildi ve +4°C'de 15000 g'de 30 dakika santrifüj edildi. Oluşan süpernatant toplam protein miktarı ve antioksidan enzim aktivitelerinin tayini için kullanıldı.

2.7.2. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Tayini

Katalaz (EC 1.11.1.6), hidrojen peroksitin (H₂O₂) su ve oksijene ayrışmasını katalize eden her yerde bulunan bir antioksidan enzimdir.

Bitki örneklerinin CAT seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda Bioassay Technology Laboratory Catalase Assay Kit (CAT) kullanılarak belirlendi. Bitki dokuları küçük parçalara ayrıldı ve tartıldı. Daha sonra buz üzerinde PBS (0.01 M, pH 7.4) içerisinde homojenize edildi (PBS hacmi (mL): dokunun ağırlığı (g) = 9:1). Homojenat, 15 dakika boyunca 3000 rpm'de santrifüjlendi. Tespit için süpernatant elde edildi.

CAT aktivitesi için elde edilen süpernatanttan 12.5 µL alınarak firmanın prosedürleri takip edildi, diğer reaktifler eklenerek son hacim 562.5 µL olarak elde edildi. Mikroplate'e 250 µL konularak 405 nm'de ölçüm yapıldı. Katalaz aktivitesi, aşağıdaki Eşitlik 10'a göre hesaplandı.

$$(\text{OD}_{\text{Kontrol}} - \text{OD}_{\text{Numune}}) \times \frac{325}{(60 \times \text{Numune hacmi})}$$

÷ Test edilen numunenin protein konsantrasyonu (mg/mL) (Eşitlik 10)

2.7.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini

Süperoksit dismutazlar (SOD, EC1.15.1.1) süperoksitin O₂ ve H₂O₂'ye dismutasyonunu katalize eden enzimlerdir.

Bitki örneklerinin SOD seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda Bioassay Technology Laboratory Superoxide Dismutase Assay Kit (SOD) kullanılarak belirlendi. Bitki örnekleri küçük parçalara ayrıldı ve tartıldı. Daha sonra buz üzerinde normal salin içinde homojenize edildi (Normal salin hacmi (mL): dokunun ağırlığı (g) = 9:1). Doku homojenatı 2500~3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi ve süpernatant elde edildi. SOD aktivitesi için 20 µL örnek, 20 µL enzim çalışma solüsyonu ve 200 µL substrat uygulanmış solüsyon ile bir reaksiyon karışımı hazırlanarak son hacim 240 µL elde edildi. Daha sonra microplate içerisinde 405 nm'de okumalar yapıldı. SOD

inhibisyon oranı (%), aşağıdaki Eşitlik 11 kullanılarak hesaplandı. SOD aktivitesi (U/mg prot), aşağıdaki Eşitlik 12 kullanılarak hesaplandı.

$$\frac{((AKontrol-ABlank Kontrol)-(ANumune-ABlank Numune))}{AKontrol-ABlank Kontrol} \times 100\% \quad (\text{Eşitlik 11})$$

$$\text{SOD inhibisyon oranı (\%)} \div 50\% \times (0.24 \text{ mL}/0.02 \text{ mL}) \quad (\text{Eşitlik 12})$$

2.7.4. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesinin Tayini

Askorbat Peroksidaz (APX), bitkilerdeki aktif oksijeni uzaklaştırmak için önemli antioksidanlardan ve glutatyon-askorbat döngüsündeki anahtar enzimlerden biridir.

Bitki örneklerinin APX seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda Bioassay Technology Laboratory Ascorbate Peroxidase Assay Kit (APX) kullanılarak belirlendi. Bitki örnekleri tartıldı ve 1 g doku ila 10 mL reaktif oranında reaktif I eklendi. Karışım homojenize edildi ve homojenat buzlu su banyosunda 20 dakika 13000 g'de santrifüjlendi. Süpernatant elde edildi ve ölçümden önce buz ile soğuk tutulması sağlandı.

APX aktivitesi için 25 µL süpernatant, 175 µL reaktif I, 25 µL reaktif II ve 25 µL reaktif III reaksiyon karışımı hazırlanarak toplam hacim 250 µL olarak elde edildi. Daha sonra 10 sn ve 130 sn olmak üzere A3 ve A4 absorbanslarının 290 nm'de ölçümleri yapıldı. Sonrasında $\Delta A = A3 - A4$ formülü ile absorbans ölçümleri hesaplandı. APX aktivitesi (U/mg) aşağıdaki Eşitlik 13'e göre hesaplandı.

$$(\Delta A_{\text{Numune}} - \Delta A_{\text{Blank}}) \times 1.79 \div C_{\text{Protein}} \text{ mg/ml} \quad (\text{Eşitlik 13})$$

2.8. İçsel Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Tayini

İçsel H₂O₂ miktarı Velikova (2000) 'nin yönteminde küçük modifikasyonlar yapılarak belirlendi. Buna göre, 50 mg tartılan taze bitki örnekleri sıvı azottan geçildikten sonra üzerine 1000 µL %1'lik TCA ilave edilerek homojenize edildi. Bu homojenat 4500 rpm'de 15 dk santrifüj edildikten sonra oluşan süpernatant dan 100 µL alınarak sırasıyla üzerine 100 µL 10 mM potasyum fosfat tamponu (pH:7.0) ve 200 µL 1 M potasyum iyodür (KI) eklendi. Örneklerin absorbans değerleri 390 nm'de mikropate okuyucuda ölçüldü. Sonuçlar, standart grafiğe göre hesaplanarak µM/g TA H₂O₂ olarak belirtildi.

2.9. Lipit Peroksidasyonu (MDA) Miktarının Belirlenmesi

MDA miktarının belirlenmesi Heath (1968)'in spektrofotometrik metoduna göre gerçekleştirildi. Bitki örneklerinden 0.5 g alınarak 5 mL %0.1'lik TCA ile homojenize edildi. Daha sonra homojenize edilen bitki örnekleri 4500 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatanttan 0.5 mL alınarak üzerine %0.5'lik TBA çözeltisinden 0.5 mL ilave edildi. 95 °C'de 25 dakika inkübe edildikten sonra buz banyosunda 5 dk soğutuldu. Kör olarak %0.1'lik TCA kullanıldı. Her bir numunenin spektrofotometre cihazı ile 532 nm ve 600 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Toplam MDA miktarı, aşağıdaki Eşitlik 14'e göre hesaplandı ve sonuçlar µmol/g TA cinsinden verildi.

$$\text{MDA miktarı} = [(A_{532} - A_{600})/155000] \times 106 \quad (\text{Eşitlik 14})$$

2.10. Cd Analizi

Mineral analizleri NMKL186'ya göre yapıldı. Numunelerden 0,5 g tartılarak üzerine 7.00 mL %65'lik derişimde HNO₃ ve 1,00 mL %30'luk hidrojen peroksit (H₂O₂) eklendi. Bu işlemlerden sonra, mikrodalga yakma cihazında (MILESTONE, START D) 180°C'lik sıcaklık ve 270 bar basınçta numunelerin sıvı olarak şeffaf bir renk alıncaya ve içinde tortu kalmayıncaya kadar yanması sağlandı. Daha sonra numuneler, saf su ile 50 mL'ye seyreltilerek +4 °C'de muhafaza edildi.

Yakılan numunelerin element analizi ICP-MS cihazı (Agilent, 7700 Series) ile gerçekleştirildi (NMKL186, 2007).

2.11. Total RNA İzolasyonu Ve cDNA Sentezi

Bu aşamada bitki örnekleri 2 tekerrürlü olarak kullanıldı. Arabidopsis fideleri bir naylon mesh üzerinde 7 gün boyunca yetiştirildikten sonra MS0, 50 µM Cd ve 50 µM Cd + 5 µM ABA besi ortamlarına aktararak 7 gün bekletildi. Ardından fideler cımbız yardımıyla dikkatlice alınarak, eppendorflara konuldu ve hemen sıvı azota atıldı. Daha sonra doku, havan içerisinde sıvı nitrojen ile öğütüldükten sonra toz haline getirilen doku eppendorf tüpe transfer edildi. RNA izolasyonu, QIAGEN RNeasy Plant Mini Kit ile üretici firma talimatları uygulanarak gerçekleştirildi.

RNA konsantrasyonu Multiskan GO Microplate Reader (Thermo Scientific) cihazı ile ölçüldü ve bütün RNA konsantrasyonları aynı konsantrasyona eşitlendi.

cDNA sentezi için 10 pg ile 1 µg RNA örneği kullanıldı. QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) ve RT Primerleri kullanılarak kit protokolüne göre cDNA sentezi gerçekleştirildi.

2.11.1. Reverse Transkriptaz PCR

Sentezlenen cDNA'lar, belli bir PCR prosedürü (Tablo 3) kullanılarak ilgili gen primerleri (Tablo 4) ile Thermo Scientific Thermalcycler cihazında analiz edildi. Oluşan PCR ürünleri %1.5' luk agaroz jelde yürütülerek, bantlarda oluşan görüntülere bakılarak gen ifade durumları belirlendi.

Tablo 3. PCR prosedürü için gereken bileşenler

Master Mix	Miktar (1Rxn)
10X Buffer	1 µL
2 mM dNTP mix	1 µL
Taq DNA Polimeraz	0.1 µL
5 µM R-Primer	0.5 µL
5 µM F-Primer	0.5 µL
NFW	6.4 µL
cDNA	0.5 µL
Toplam Hacim: 10 µl/35 döngü	

Tablo 4. PCR'da kullanılan primerlerin baz dizilimleri (URL-1, 2022).

Primer	Görevi	Baz Dizilimi
ABA1: AT5G67030	ABA biyosentezinin ilk adımında işlev gören gen	ABA1-F: GTGGTTTGAAGAABA1-R: GATTACTTTCACCCTAAACGCCTGACGATGC
ABA1/ZEAXANTHIN EPOXIDASE		
CYP707A3: AT2G29090	ABA katabolizmasında görev alan gen	CYP707A3-F: TCCAAGAGACATTAAGAGCTGC CYP707A3-R: ATTCTGAGGAAGAGCGAACG
RD29A: AT5G52310.1	Yaprak yaşlanmasına, soğuğa, kurumaya, ozmotik strese, tuz stresine ve su yoksunluğuna tepki olarak ABA ile cevapta rol alan gen	RD29A-F: AAGTTACTGATCCCACCAAAGAAGAAAC RD29A-R: TTTCTCCCAACGGAGCTCCTAAAC
RD29B: AT5G52300.1	Yüksek tuzluluk, soğuk ve kuraklık streslerine cevapta ABA ile görev alan gen	RD29B-F: TCCGGTTTACGAAAAAGTCAAAGAAAC RD29B-R: AATCCGAAAACCCCATAGTCCCAAC

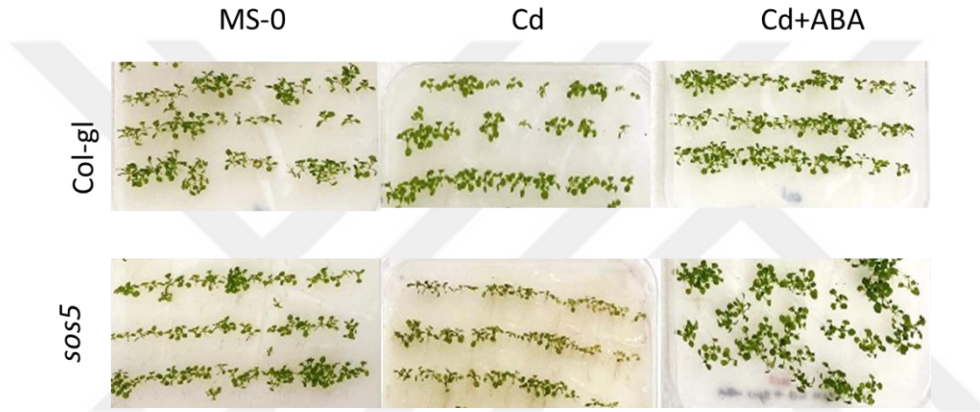
2.11.2. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR ürünleri Sigma markalı %1.5 Agaroz jelde yürütüldü ve abm safeview boya ile UV Transilluminator cihazında görüntülendi. %1.5' luk Agaroz 1X TAE tampon ile mikrodalgada 120 °C sıcaklıkta çözüldü. Elde edilen jel bir süre oda sıcaklığında bekletilerek içerisine 3 µl safeview boya eklendi. Daha sonra jel katılaşmadan, tarakları yerleştirilen jel tankına döküldü. Jel katılaştıktan sonra taraklar çıkarıldı ve elektroforez tankına yerleştirildi. Her PCR ürününden ve 1X yükleme boyasından 5 µL kuyucuklara eklenerek, ilk kuyucuğa 1 kb DNA ladder yüklendi. 1X TAE tamponu içerisinde 80 V 40 dk boyunca Biorad elektroforez cihazında yürütüldü.

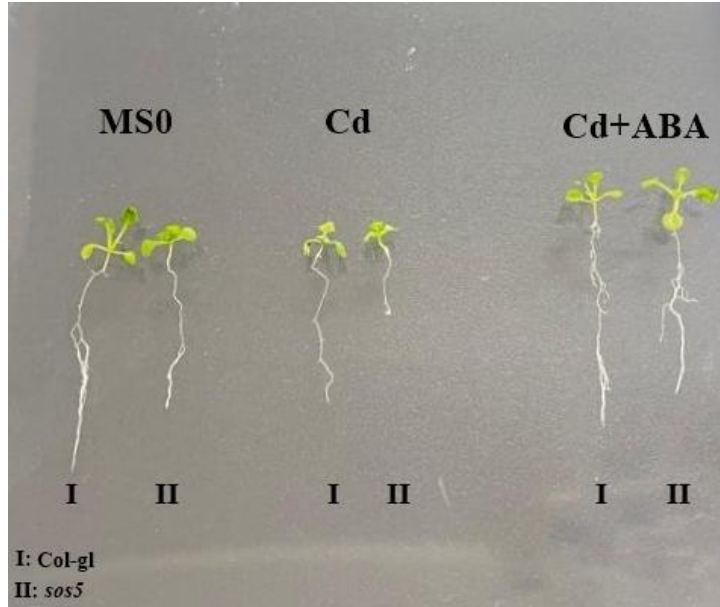
3. BULGULAR

3.1. ABA'nın Cd Stresine Maruz Kalan *sos5* Mutant Bitkileri Üzerine Etkisi

Arabidopsis bitkisinin Col-gl ve *sos5* mutant bitkileri 3-4 gün MS0 besi ortamında yetiştirildikten sonra, MS0, 50 μ M Cd ve 50 μ M Cd+5 μ M ABA eklenen besiyeri ortamlarına aktarıldı ve köklerdeki fenotipik değişimler 7 gün boyunca gözlemlendi. Cd stresi altında ABA muamelesinin aşırı hassas *sos5* mutant kök fenotipini baskıladığı ve yabani tipe benzer hale getirdiği Şekil 18'de gösterilmiştir.

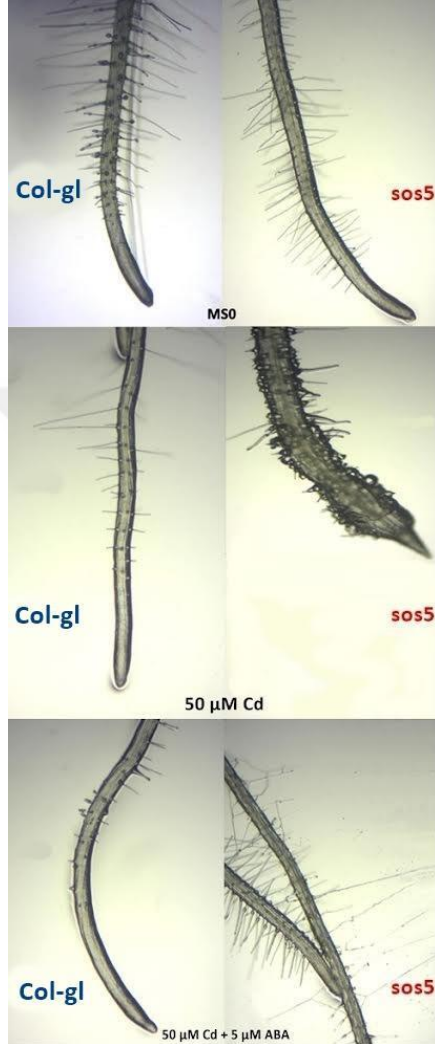


Şekil 18. MS0, 50 μ M Cd ve 50 μ M Cd + 5 μ M ABA içeren besi ortamlarındaki bitkilerin naylon mesh üzerindeki görünüşleri.



Şekil 19. MS0, 50 μ M Cd ve 50 μ M Cd + 5 μ M ABA içeren besi ortamlarının kök uzunluklarına etkisi.

Cd stres koşullarında mutant bitkide kısa ve şişkin olan kök fenotipi görülürken, ABA'nın etkisiyle mutant bitki ve yabani tip bitkinin birbirine benzer bir hale geldiği görüldü. Cd içermeyen kontrol ortamında, Cd içeren ortamda ve Cd+ABA içeren ortamdaki bitkilerin genel görünüşleri Şekil 19 ve 20'de gösterilmiştir.



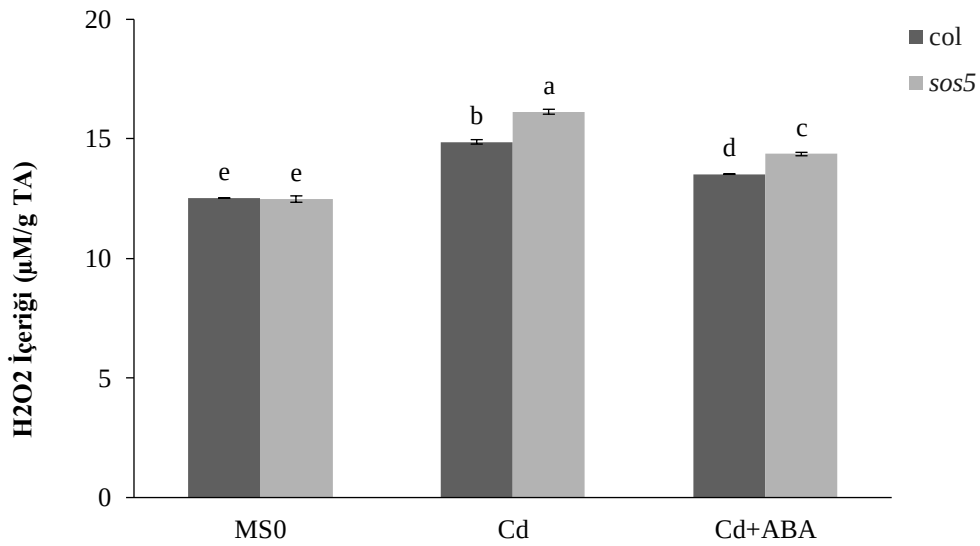
Şekil 20. MS0, Cd ve Cd+ABA ortamlarında yabani tip ve sos5 mutant bitki köklerinin genel görünümü

3.2. ABA'nın Cd Stresine Maruz Kalan sos5 Mutant Bitkilerindeki Hidrojen Peroksit İçeriğine Etkisi

H₂O₂, ROS'ların en kararlı olanıdır ve bundan dolayı çeşitli fizyolojik süreçlerde sinyal molekülü olarak önemli bir görevde rol alır. Aynı zamanda bitki büyümesini, gelişimini, alıştırma ve savunma tepkilerini düzenleyen hücre dışı matris (ECM), H₂O₂'nin üretildiği diğer önemli kaynaklardanır (Slesak vd., 2007). H₂O₂, sitokinler ve büyüme faktörleri dahil olmak üzere çeşitli uyarılara yanıt olarak üretilir ve bitkilerde stoma kapanması ve kök büyümesi gibi çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol

oynar. Ayrıca H_2O_2 , spesifik enzimler tarafından da üretilebilir (Neill vd., 2002; Veal vd., 2007).

Cd stresi altında mutant ve yabani tip bitkilerde ABA etkisiyle hidrojen peroksit miktarındaki değişimler gözlemlendi. Stres içermeyen koşullarda yabani tip ve mutant (col-gl ve sos5) genotiplerinin H_2O_2 miktarlarında bir farklılık gözlemlenmedi. Ancak stresin artışı ile sos5 ve col-gl genotipinde H_2O_2 miktarında belirgin bir artış gözlemlendi. Stres altında ABA muamelesinin mutant bitki ve yabani tip bitkideki H_2O_2 miktarının düştüğü görüldü. Aynı zamanda, Şekil 20’de Cd stresi altındaki yabani tip bitkinin mutant tip bitkiye göre daha düşük H_2O_2 miktarı içerdiği gözlemlendi.



Şekil 21. Cd stresi altında mutant ve yabani tip bitkilerde ABA etkisiyle hidrojen peroksit miktarındaki değişimler (^{a, b, c, d, e} ifadeleri istatistiksel bir biçimde, sonuçların birbirinden anlamlı olarak farklı olduğuna işaret etmektedir ($p < 0.05$). $\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir)

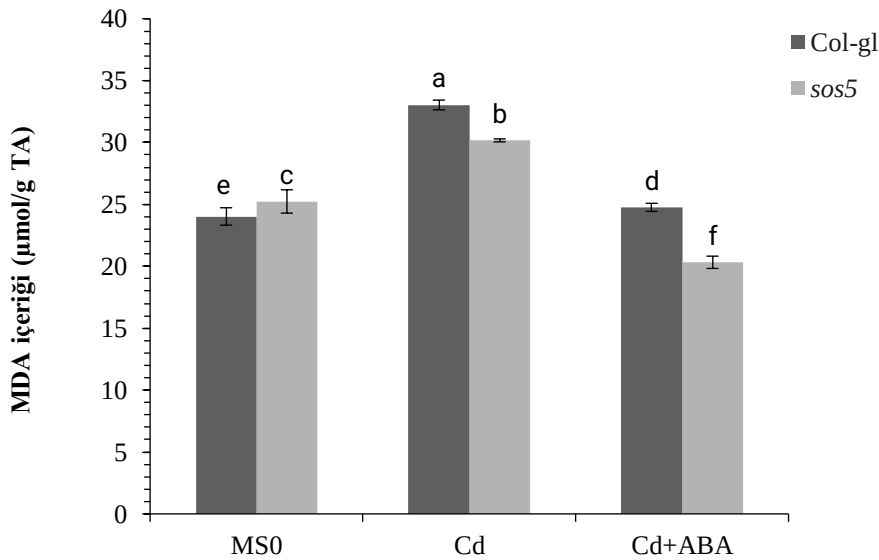
Tablo 5. Cd stresi altında mutant ve yabani tip bitkilerde ABA etkisiyle hidrojen peroksit değişim miktarları ($\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir ($p < 0.05$))

	MS0	Cd	Cd+ABA
Col-gl	12.524 ± 0.092	14.877 ± 0.010	13.527 ± 0.010
sos5	12.483 ± 0.133	16.136 ± 0.102	14.366 ± 0.072

3.3. ABA'nın Cd Stresine Maruz Kalan sos5 Mutant Bitkilerindeki MDA Miktarına Etkisi

ROS kimyasal olarak saldırgan türlerdir ve membran lipidlerinin çoklu doymamış yağ asidi bileşenleri üzerindeki serbest radikallerin saldırısı, membran yapısını ve fonksiyonunu değiştiren lipid peroksidasyonunu başlatır. Lipid peroksidasyonu, serbest radikal aracılı hasar için biyokimyasal bir belirteçtir (Verma and Dubey, 2003). Daha önceki çalışmalarda, pirinç bitkilerinin Cd'yi serbestçe emdiğini ve dokularda Cd birikiminin, artan lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzimler SOD ve peroksidaz seviyelerinde belirgin yükselme ile paralellik gösterdiğini ileri sürmektedir (Shah vd., 2001).

MDA (Malondialdehit) içeriği, lipid peroksidasyonunun son ürünü olarak ortaya çıkar ve membranlarda oluşan hasarın bir işaretidir. Lipid peroksidasyonunu MDA tayini ile göstermek mümkündür. Stres içermeyen ortamda yabani tip ve mutant (col ve sos5) bitkilerdeki MDA içerikleri her iki genotipte de birbirine yakın değerler ile sonuçlandı. Ancak, stresin artmasıyla her iki genotipinde MDA içeriğinde belirgin bir artış görüldü. Stres altında ABA muamelesinin mutant (sos5) bitkideki MDA içeriğinin yabani tip (col-gl) bitkideki içeriğine kıyasla daha düşük olduğu görüldü. Cd stresi altında yabani tipte MDA içeriği oldukça yükseldi. Cd içeren ortamla kıyaslama yapıldığında, stres altında ABA muamelesi ile MDA içeriğinin azaldığı gözlemlendi. Diğer taraftan, Cd stresi altında mutant bitkilerde stres içermeyen ortama kıyasla MDA içeriğinin arttığı görüldü. Cd stresi altında ABA muamelesi, MS0 kontrole göre ve Cd içeren ortama göre kıyaslandığında MDA içeriğinde düşüş gözlemlendi.



Şekil 22. Cd stresi altında mutant ve yabani tip bitkilerde ABA etkisiyle MDA miktarındaki değişimler (^{a, b, c, d, e, f} ifadeleri istatistiksel bir biçimde, sonuçların birbirinden anlamlı olarak farklı olduğuna işaret etmektedir ($p<0.05$). $\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir)

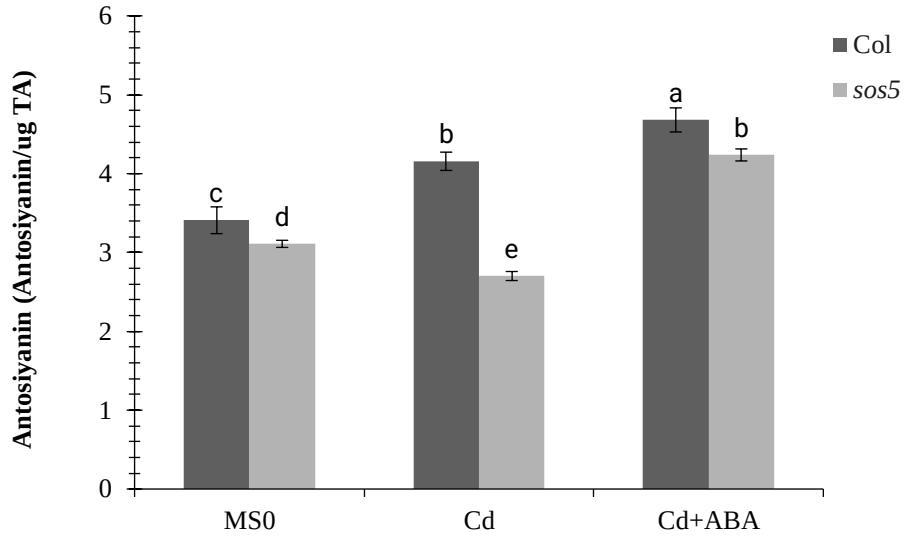
Tablo 6. Cd stresi altında mutant ve yabani tip bitkilerde ABA etkisiyle MDA değişim miktarları ($\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir ($p<0.05$))

	MS0	Cd	Cd+ABA
Col-gl	24.026 ± 0.702	33.032 ± 0.397	24.761 ± 0.329
sos5	25.239 ± 0.939	30.168 ± 0.118	20.323 ± 0.498

3.4. ABA'nın Cd Stresine Maruz Kalan sos5 Mutant Bitkilerindeki Antosiyanin İçeriğine Etkisi

Antosiyaninler, doğal olarak oluşan, suda çözünür, flavonoid pigmentlerdir. Bununla birlikte, bu matrisler yüksek enzimatik aktivite özelliği göstermektedirler (Silva vd., 2015). Antosiyaninler, yapraklar, meyveler veya gövdeler gibi birkaç farklı dokudaki hücre vakuollerinde birikmiş olarak bulunmaktadır (Gould vd., 2008). Antosiyanin birikiminin genel olarak, biyotik ve abiyotik stresörlerin varlığında yükseldiği tespit edilmiştir (Silva vd., 2015). Bundan dolayı antosiyaninler, stres koşullarına karşı bitkilerin korunmasındaki rolleri ve antioksidan özellikleri ile bitkilerin hem semptomu hem de başa çıkma mekanizması olarak kabul edilmiştir (Gould vd., 2008).

Stres içermeyen MS0 koşullarında yabani tip ve mutant (col ve sos5) bitkilerdeki antosiyanin içerikleri benzer olarak gözlemlendi. Ancak, Cd stres artışıyla mutant genotipin antosiyanin içeriğinde azalma görülürken yabani tip bitkinin antosiyanin içeriğinde artış olduğu görüldü. Stres altında ABA muamelesinin yabani tip (col-gl) bitkideki antosiyanin içeriğinin mutant (sos5) bitkideki içeriğine kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlendi. Stres altında ABA muamelesi ile her iki genotipte de antosiyanin içeriğinin arttığı görüldü.



Şekil 23. Cd stresi altında mutant ve yabani tip bitkilerde ABA etkisiyle antosiyenin miktarındaki değişimler (^{a, b, c, d, e, f} ifadeleri istatistiksel bir biçimde, sonuçların birbirinden anlamlı olarak farklı olduğuna işaret etmektedir ($p < 0.05$). $\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir)

Tablo 7. Cd stresi altında mutant ve yabani tip bitkilerde ABA etkisiyle antosiyenin değişim miktarları ($\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir ($p < 0.05$))

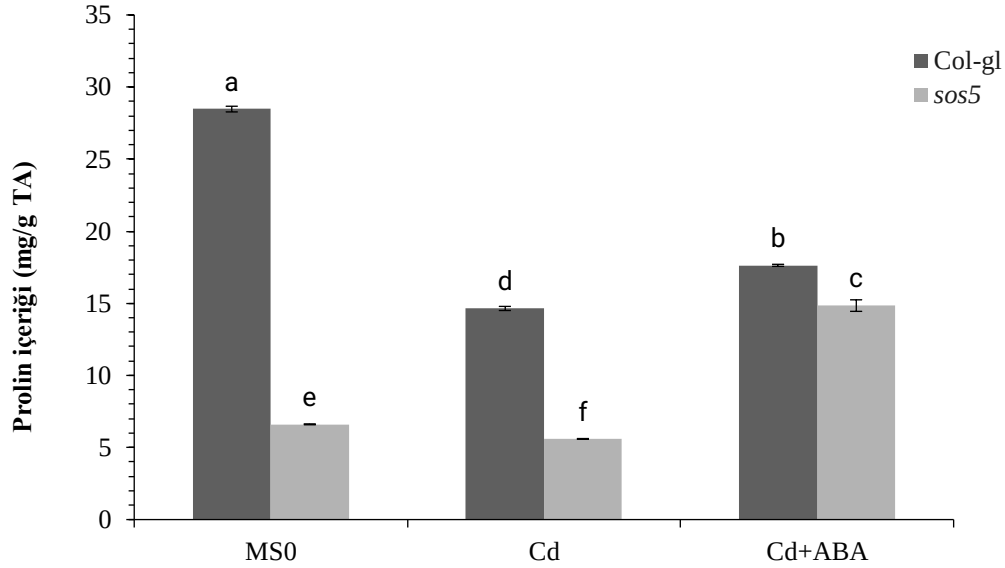
	MS0	Cd	Cd+ABA
Col-gl	3.408 ± 0.170	4.156 ± 0.116	4.68 ± 0.153
sos5	3.109 ± 0.045	2.701 ± 0.057	4.236 ± 0.076

3.5. ABA'nın Cd Stresine Maruz Kalan sos5 Mutant Bitkilerindeki Prolin Miktarına Etkisi

Prolin, çevresel strese tepki olarak birçok bitki türünde birikmektedir. Prolin, mitokondriyal fonksiyonları düzenlemek, hücre proliferasyonunu veya hücre ölümünü etkilemek ve bitkiyi stresten korumak için gerekli olabilecek spesifik gen ekspresyonunu tetiklemek için bir sinyal molekülü görevi görmektedir (Szabados ve Savouré, 2010). Prolin, olağanüstü bir yapısal sertliğe sahip proteinojenik bir amino asittir ve birincil metabolizma için gereklidir. Kuraklık, yüksek tuzluluk, yüksek ışık ve UV ışınlaması, ağır metaller, oksidatif stres ve biyotik streslere cevap olarak prolin birikimi tespit edilmiştir (Choudhary vd., 2005; Yoshida vd., 1995; Saradhi vd., 1995; Schat vd., 1997; Yang vd., 2009; Fabro vd., 2004; Haudecoeur vd., 2009).

Stressiz ortamda Col-gl bitkilerdeki prolin miktarı mutant bitkilerdeki prolin miktarına göre oldukça yüksek sonuçlandı. Col-gl bitkisindeki prolin miktarları MS0 kontrole göre kıyaslama yapıldığında, Cd stresi içeren ortamda azaldığı ve stres altında

ABA muamelesinde, prolin içeriğinin artmış olduğu görüldü. Ayrıca mutant bitkiler MS0 kontrole göre kıyaslandığında, stres içeren ortamda prolin içeriğinin azaldığı gözlemlendi. Sadece Cd içeren ortama göre kıyaslandığında ise, stres altında ABA varlığının, prolin içeriğini artırdığı belirlendi.



Şekil 24. Cd stresi altında mutant ve yabani tip bitkilerde ABA etkisiyle prolin miktarındaki değişimler (^{a, b, c, d, e, f} ifadeleri istatistiksel bir biçimde, sonuçların birbirinden anlamlı olarak farklı olduğuna işaret etmektedir ($p < 0.05$). $\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir)

Tablo 8. Cd stresi altında mutant ve yabani tip bitkilerde ABA etkisiyle prolin değişim miktarları ($\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir ($p < 0.05$))

	MS0	Cd	Cd+ABA
Col-gl	28.471 ± 0.198	14.644 ± 0.143	17.634 ± 0.072
sos5	6.605 ± 0.029	5.598 ± 0.023	14.841 ± 0.400

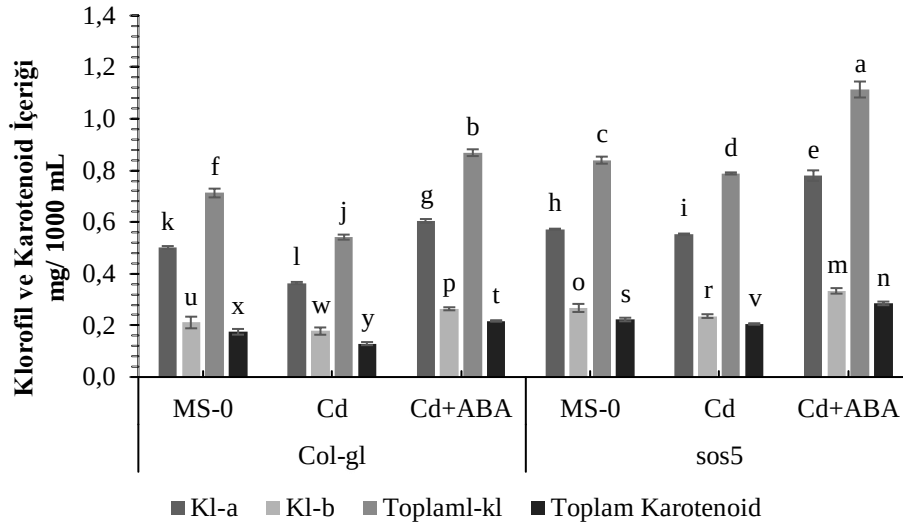
3.6. ABA'nın Cd Stresine Maruz Kalan sos5 Mutant Bitkilerindeki Klorofil Ve Karotenoid İçeriğine Etkisi

Yaprak klorofil konsantrasyonu, kloroplast içeriğinin, fotosentetik mekanizmanın ve bitki metabolizmasının bir göstergesi olarak ölçülen önemli bir parametredir. Klorofil, yeşil yapraklı bitkilerin kloroplastında bulunan ve depolanan ve esas olarak yaprakların, gövdelerin, çiçeklerin ve köklerin yeşil alanlarında bulunan bir antioksidan bileşiktir (Mirza vd., 2013; Srichaikul vd., 2011). Aynı zamanda klorofil üretimi, bitki için ana enerji kaynağıdır (Srichaikul vd., 2011). Klorofil a ve Klorofil b, bitki fotosistemlerinin

temel pigmentleridir (Richardson vd., 2002). Ayrıca klorofil a, bitkilerde enerji üretimine yardımcı olan birincil fotosentetik pigmenttir (Srichaikul vd., 2011). Pigmentler üzerindeki metal etkileri ile ilgili olarak, aşırı ağır metal bileşiklerinin fotosentetik aparatın performansını azalttığı ve fotosentetik pigmentlerde bir azalmayı teşvik ettiği bilinmektedir. Genel olarak çeşitli metaller, bitkilerde klorofil ve karotenoid üretimini engeller, ancak klorofil üretimini karotenoidlerin üretiminden daha fazla etkilerler (Baek vd., 2012).

Stres içermeyen MS0 kontrolüne göre yabancı tip ve mutant tip bitkilerde K1-a ve K1-b içerikleri birbirine yakın değerler gösterdi. Yabancı tip bitki K1-a ve K1-b içerikleri MS0 kontrole göre kıyaslandığında, Cd stresi içeren ortamda azaldığı görüldü. Fakat Cd stresi içeren ortama kıyasla stres altında ABA muamelesinde değerlerin yükseldiği gözlemlendi. Mutant tip bitki K1-a ve K1-b içerikleri MS0 kontrole göre, Cd stresi içeren ortamda belli miktarda azaldı. Cd stresi içeren ortamla kıyasladığımızda ise stres altında ABA muamelesi ile yükseldiği belirlendi.

MS0 kontrol ortamında Col-gl bitkilerindeki toplam klorofil ve toplam karotenoid miktarı mutant bitkideki toplam klorofil ve toplam karotenoid miktarı ile benzer değerlerde sonuçlandı. Yabancı tip bitkilerde toplam klorofil ve karotenoid içerikleri MS0 kontrole göre kıyaslandığında, Cd stresi içeren ortamda azaldığı gözlemlendi. Ancak Cd stresi içeren ortama göre kıyaslama yaptığımızda, stres altında ABA muamelesi varlığında toplam klorofil ve karotenoid içeriklerinde artış olduğu görüldü. Diğer taraftan mutant tip bitkilerde toplam klorofil ve karotenoid içerikleri MS0 kontrole göre kıyaslandığında, Cd stresi içeren ortamda bir miktar düşüş gerçekleşti. Ancak Cd stresi içeren ortama göre kıyaslama yaptığımızda, stres altında ABA muamelesi varlığında toplam klorofil içeriğinde belirgin bir artış gözlemlenirken toplam karotenoid içeriğinde az miktarda artış gözlemlendi.



Şekil 25. Cd stresi altında mutant ve yabani tip bitkilerde ABA etkisiyle klorofil ve karotenoid miktarlarındaki değişimler (^{a, b, c, d, e, f} ifadeleri istatistiksel bir biçimde, sonuçların birbirinden anlamlı olarak farklı olduğuna işaret etmektedir ($p < 0.05$). $\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir)

Tablo 9. Cd stresi altında mutant ve yabani tip bitkilerde ABA etkisiyle klorofil ve karotenoid değişim miktarları ($\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir ($p < 0.05$))

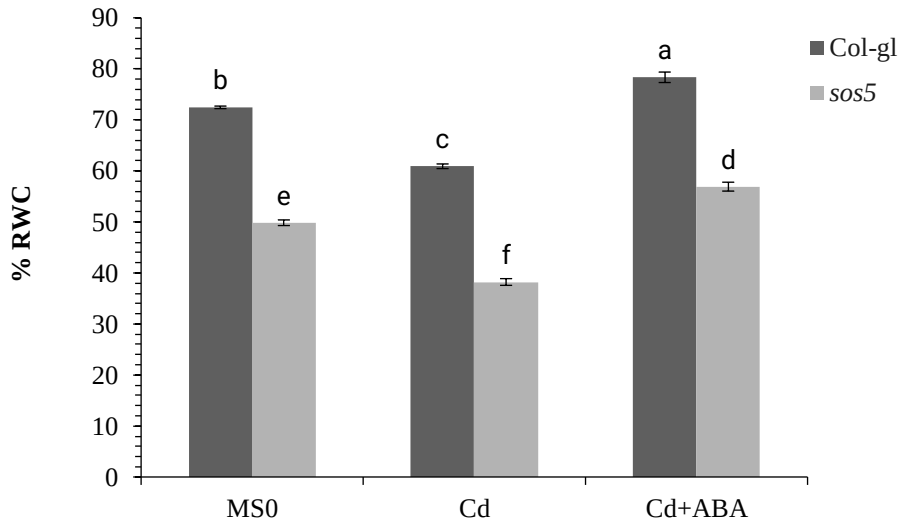
		Kl-a	Kl-b	Toplam Kl	Toplam Karotenoid
Col-gl	MS-0	0.502 ± 0.01	0.211 ± 0.03	0.713 ± 0.02	0.175 ± 0.02
	Cd	0.364 ± 0.01	0.178 ± 0.02	0.542 ± 0.01	0.129 ± 0.01
	Cd+ABA	0.605 ± 0.01	0.264 ± 0.01	0.869 ± 0.02	0.217 ± 0.00
sos5	MS-0	0.573 ± 0.00	0.268 ± 0.02	0.840 ± 0.02	0.223 ± 0.01
	Cd	0.553 ± 0.00	0.236 ± 0.01	0.789 ± 0.01	0.206 ± 0.00
	Cd+ABA	0.780 ± 0.03	0.334 ± 0.02	1.114 ± 0.04	0.285 ± 0.01

3.7. ABA'nın Cd Stresine Maruz Kalan sos5 Mutant Bitkilerindeki %RWC Değerine Etkisi

Fotosentez, bitkilerin yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmesi için en önemli faktörlerden biridir ve kuraklık stresinden önemli oranda etkilenmektedir. (Razi ve Muneer, 2021). Bitki yapraklarının bağıl su içeriği (RWC), net fotosentez hızını, terleme oranını, stoma iletkenliğini ve su potansiyelini azaltmakta, su kullanım etkinliğini arttırmaktadır (Siddique vd., 2000; Zhang vd., 2015; Galeano vd., 2019). Aynı zamanda RWC, bitkideki su içeriğini anlamamızda uygun bir veri olabilir (Deligöz ve Bayar,

2021). Yapraklardan terleme yoluyla meydana gelen su kaybı ve köklerden alınan su bağıl su içeriğindeki değişimler ile ilişkilidir (Anjum vd., 2011). Böylece, bitkilerde su kaybının minimum seviyeye inmesi için bitkiler stomalarını hızlı bir şekilde kapatır veya daraltır. Bu yüzden CO₂ alım miktarı azalmakta ve fotosentez hızı direkt olarak etkilenmektedir (Chaves vd., 2009).

MS0 kontrol ortamında mutant tip bitkilerdeki RWC miktarı yabani tip bitkilerdeki RWC miktarına göre oldukça düşük sonuçlandı. Yabani tip bitkilerdeki RWC içerikleri MS0 kontrole göre kıyaslandığında, Cd stresi içeren ortamda azaldı. Ancak, Cd stresi içeren ortama göre kıyaslayacak olursak, stres altında ABA muamelesi ile RWC içeriği oldukça yüksek artış gösterdi. Diğer taraftan mutant bitkiler MS0 kontrol ile karşılaştırıldığında, stres içeren ortamda RWC içeriğinin azaldığı gözlemlendi. Sadece Cd içeren ortama göre kıyaslandığında ise, stres altında ABA varlığının, RWC içeriğini artırdığı tespit edildi.



Şekil 26. Cd stresi altında mutant ve yabani tip bitkilerde ABA etkisiyle bağıl su miktarındaki değişimler (a, b, c, d, e, f ifadeleri istatistiksel bir biçimde, sonuçların birbirinden anlamlı olarak farklı olduğuna işaret etmektedir (p<0.05). ± standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir)

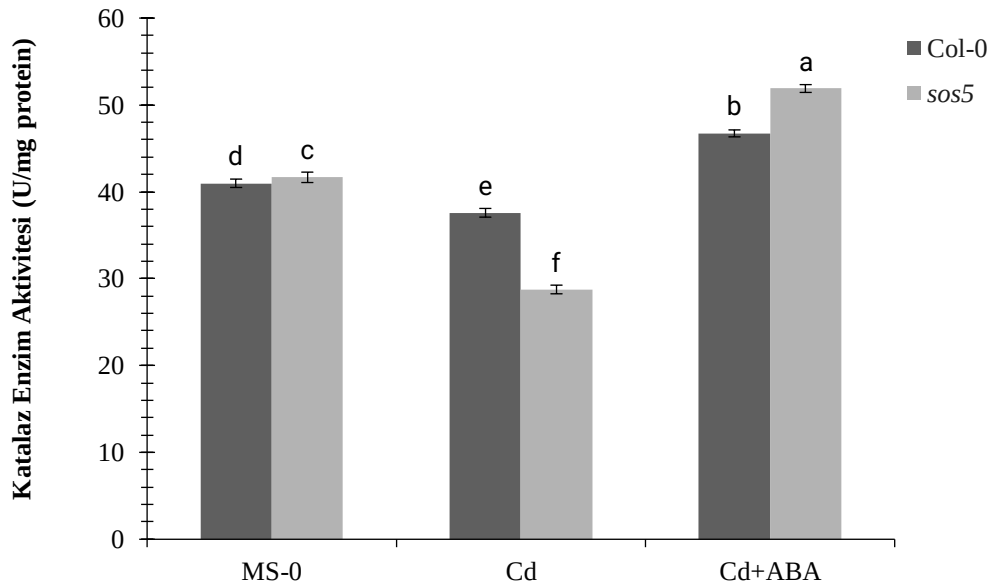
Tablo 10. Cd stresi altında mutant ve yabani tip bitkilerde ABA etkisiyle bağıl su değişim miktarları (± standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir (p<0.05))

	MS0	Cd	Cd+ABA
Col-gl	72.453 ±0.25	60.897 ±0.45	78.346 ±1.03
sos5	49.832 ±0.55	38.218 ±0.66	56.911 ±0.87

3.8. ABA'nın Cd Stresine Maruz Kalan sos5 Mutant Bitkilerindeki CAT Aktivitesine Etkisi

Katalazlar, H_2O_2 'yi doğrudan değiştirebilen ve stres koşullarında ROS detoksifikasyonu için gerekli olan başlıca temizleyici enzimlerdir (Van Breusegem vd., 2001). Katalaz aktivitesindeki artışın, H_2O_2 'nin toksik seviyelerini azaltarak doku metabolizmasındaki hasarın üstesinden gelmeye yardımcı olduğu bilinmektedir (Vital vd., 2008; Sekmen vd., 2007; Upadhyaya vd., 2008).

MS0 kontrol ortamında Col-gl bitkilerindeki katalaz (CAT) enzim aktivitesinin mutant ile benzer oranda olduğu görüldü. Yabani tip bitkilerdeki CAT enzim aktivitesi kontrolle karşılaştırıldığında, stres içeren ortamda CAT aktivitesinin kontrole göre bir miktar azaldığı görüldü. Sadece stres içeren ortam ile kıyaslama yapıldığında, Cd+ABA muamelesinin yabani tip bitkilerdeki CAT aktivitesini arttırdığı gözlemlendi. Diğer yandan mutant bitkiler kontrolle karşılaştırıldığında, Cd stresi koşullarında mutant bitkilerdeki enzim aktivitesinin kontrole göre önemli derecede azaldığı görüldü. Cd stresi altında ABA muamelesinin enzim aktivitesi ise kontrole ve Cd stres koşullarına göre oldukça yüksek bir artış gösterdi. Col-gl ve mutant bitkilerdeki enzim aktiviteleri kıyaslandığında, genellikle mutant tip enzim aktiviteleri yabani tip bitkiye göre daha fazla görülmesine rağmen, Cd stresi koşullarında yabani tip enzim aktivitesi mutant bitkiye göre daha yüksek bulundu.



Şekil 27. Cd stresi altında mutant ve yabani tip bitkilerde ABA etkisiyle CAT aktivitesi değişimleri (^{a, b, c, d, e, f} ifadeleri istatistiksel bir biçimde, sonuçların birbirinden anlamlı olarak farklı olduğuna işaret etmektedir ($p < 0.05$). $\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir)

Tablo 11. Cd stresi altında mutant ve yabani tip bitkilerde ABA etkisiyle CAT aktivitesi değişim miktarları ($\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir ($p<0.05$))

	MS-0	Cd	Cd+ABA
Col-gl	40.984 ± 0.48	37.585 ± 0.5	46.723 ± 0.4
sos5	41.668 ± 0.6	28.756 ± 0.5	51.891 ± 0.45

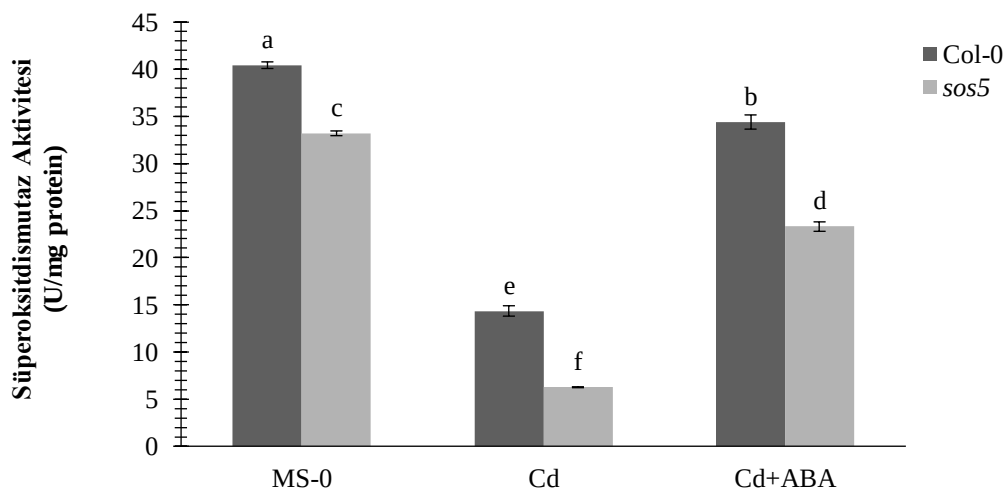
3.9. ABA'nın Cd Stresine Maruz Kalan sos5 Mutantındaki SOD Aktivitesine Etkisi

Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi $O_2^{\bullet -}$ 'yi H_2O_2 'ye dönüştürmektedir (Del Río vd., 2018). SOD'ların düzenlenmesi, abiyotik strese bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif stresle mücadelede rol oynamaktadır ve bitkilerin hayatta kalmasında önemli bir yere sahiptir (Kirecci, 2018; Upadhyaya vd., 2008).

MS0 kontrol ortamında yabani tip bitkilerdeki SOD aktivitesinin mutanta göre fazla olduğu görüldü. Cd stresi içeren ortamda ise yabani tip bitkilerde SOD aktivitesinin kontrole göre azaldığı görüldü. Sadece stres içeren ortam ile kıyaslama yapıldığında ise, Cd+ABA eklenmesinin yabani tip bitkilerdeki SOD aktivitesini artırdığı belirlendi.

Öte yandan, Cd stresi koşullarında mutant bitkilerdeki enzim aktivitesinin kontrole kıyasla önemli derecede azaldığı görüldü. Cd stresi altında ABA muamelesinin enzim aktivitesi Cd stresi içeren ortama göre kıyaslandığında önemli derecede artış gösterdi.

Col-gl ile mutant bitkilerinin enzim aktiviteleri arasında kıyaslama yapıldığında, genellikle WT bitkilerin enzim aktiviteleri mutant tip bitkilere göre daha fazla görüldü.



Şekil 28. Cd stresi altında mutant ve yabani tip bitkilerde ABA etkisiyle SOD aktivitesi değişimleri (^{a, b, c, d, e, f} ifadeleri istatistiksel bir biçimde, sonuçların birbirinden anlamlı olarak farklı olduğuna işaret etmektedir ($p<0.05$). $\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir)

Tablo 12. Cd stresi altında mutant ve yabani tip bitkilerde ABA etkisiyle SOD aktivitesi değişim miktarları ($\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir ($p < 0.05$))

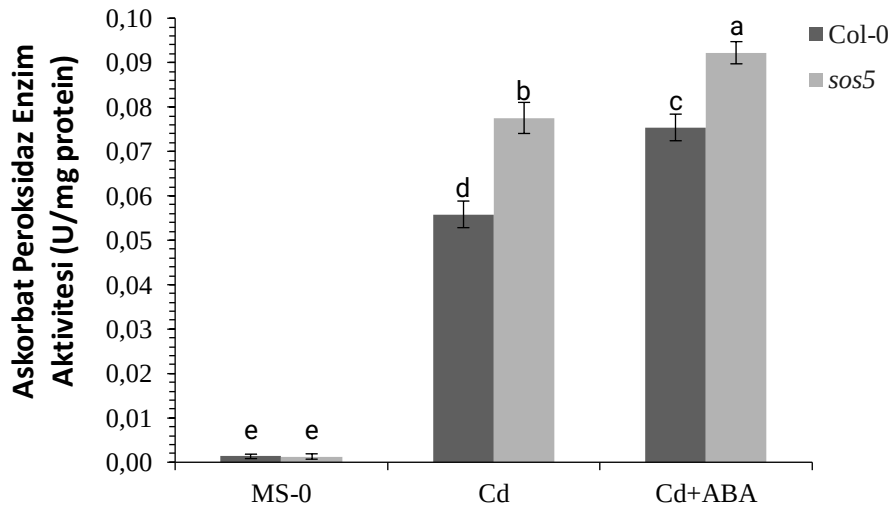
	MS-0	Cd	Cd+ABA
Col-gl	40.436 ± 0.35	14.359 ± 0.55	34.407 ± 0.75
sos5	33.206 ± 0.25	6.261 ± 0.05	23.307 ± 0.5

3.10. ABA'nın Cd Stresine Maruz Kalan sos5 Mutant Bitkilerindeki APX Aktivitesine Etkisi

APX (askorbat peroksidaz), H_2O_2 'nin indirgenerek organellerde suya dönüştürülmesini sağlamak ve böylece bitkilerin antioksidan sisteminde önemli bir rol oynamaktadır (Blokhina vd., 2003; Kangasjarvi vd., 2008).

MS0 kontrol ortamında WT bitkilerindeki APX enzim aktivitesinin mutanta göre yaklaşık değerler gösterdiği belirlendi. Yabani tip bitkilerdeki APX enzim aktivitesi kontrole karşılaştırıldığında, Cd stresi altında APX aktivitesi kontrole göre artış gösterdi. Cd içeren ortama göre, stres içeren koşullarda ABA uygulamasında da enzim aktivitesinin yükseldiği görüldü.

Mutant bitkilerin enzim aktivitelerinin kontrole göre, Cd stresi altında daha yüksek olduğu görüldü. Cd stresi altında ABA muamelesinin enzim aktivitesi kontrole göre oldukça ciddi artış gösterdi. Sadece Cd stresi içeren ortama göre kıyaslandığında ise, yine artış gösterdi.



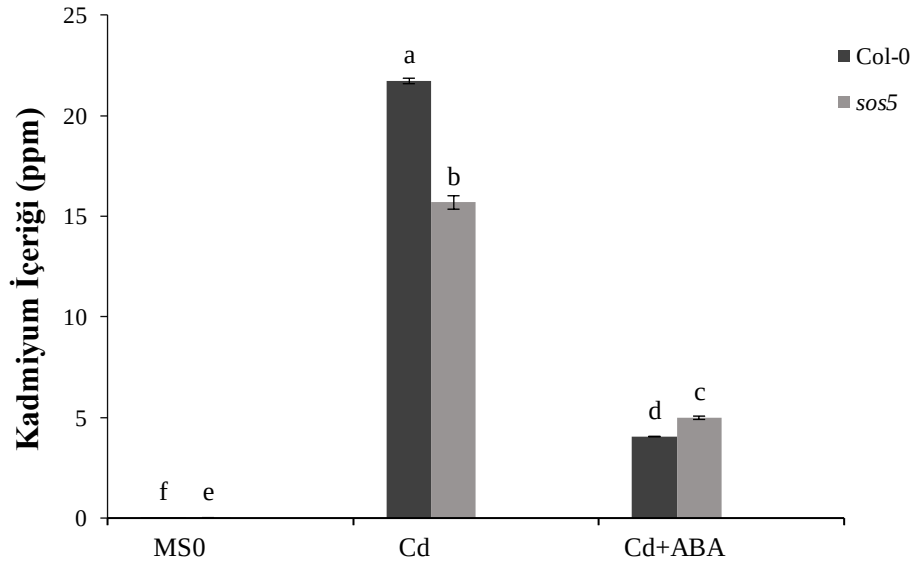
Şekil 29. Cd stresi altında mutant ve yabani tip bitkilerde ABA etkisiyle APX aktivitesi değişimleri (^{a, b, c, d, e} ifadeleri istatistiksel bir biçimde, sonuçların birbirinden anlamlı olarak farklı olduğuna işaret etmektedir ($p < 0.05$). $\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir)

Tablo 13. Cd stresi altında mutant ve yabancı tip bitkilerde ABA etkisiyle APX aktivitesi değişim miktarları ($\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir ($p<0.05$))

	MS-0	Cd	Cd+ABA
Col-gl	0.001329 ± 0.0005	0.05584 ± 0.003	0.075414 ± 0.003
sos5	0.001298 ± 0.0006	0.077555 ± 0.0035	0.092242 ± 0.0025

3.11. sos5 (fla4) Mutant Ve Yabancı Bitkilerde Cd Miktarı

MS0 kontrol ortamında WT ve mutant bitkilerde Cd miktarı yok denilecek kadar az görüldü. Cd stresi içeren ortamda WT ve mutant bitkilerde Cd miktarı kontrole göre oldukça fazla gözlemlendi. Sadece Cd içeren ortamla Cd+ABA içeren ortam karşılaştırıldığında, WT ve mutant bitkilerde Cd miktarının azaldığı belirlendi.



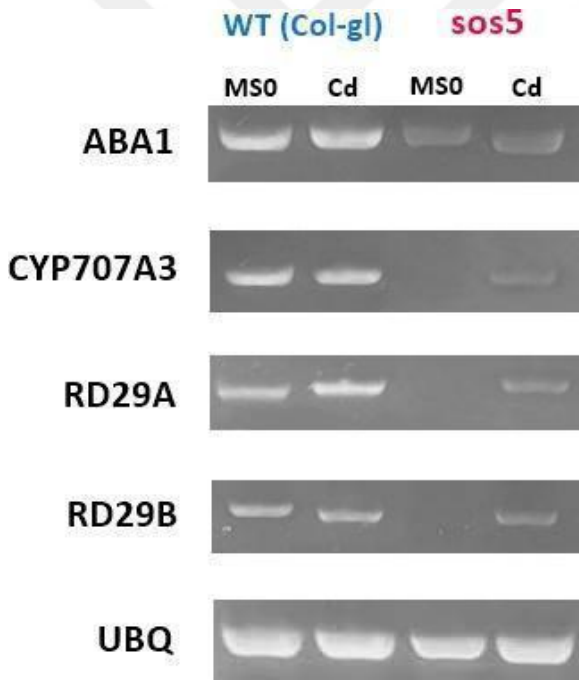
Şekil 30. sos5 (fla4) mutant ve yabancı tip bitkilerde Cd miktar analizi (^{a, b, c, d, e, f} ifadeleri istatistiksel bir biçimde, sonuçların birbirinden anlamlı olarak farklı olduğuna işaret etmektedir ($p<0.05$). $\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir)

Tablo 14. sos5 (fla4) mutant ve yabancı tip bitkilerde Cd miktarları ($\pm$ standart sapma: 3 tekerrürlü denemelerden elde edilen sonuçların ortalamasını göstermektedir ($p<0.05$))

	MS-0	Cd	Cd+ABA
Col-gl	0.016 ± 0.00	21.716 ± 0.14	4.05 ± 0.01
sos5	0.022 ± 0.00	15.679 ± 0.33	4.983 ± 0.08

3.12. Cd Stresi Altındaki Yabani Tip Ve *sos5* Mutant Bitkilerin Gen İfade Düzeylerinin Karşılaştırılması

Yabani tip ve mutant bitkilerin gen ifade düzeylerine bakılırken UBQ geni kontrol olarak kullanıldı. ABA1, CYP707A3, RD29A ve RD29B genleri kullanılarak agaroz jel üzerinde yabani tip ve mutant bitkilerin gen ifade düzeyleri karşılaştırıldı. Cd stresi içermeyen MS0 ve Cd stresi içeren ortamlarda, ABA1 geninin mutant bitkiye kıyasla yabani tip bitkide daha fazla ifade olduğu gözlemlendi. Aynı şekilde, CYP707A3 geninin MS0 ve Cd stresi içeren ortamlarda yabani tip bitkide mutant bitkiye göre daha fazla ifade olduğu görüldü. RD29A geninin stres içermeyen kontrol ortamında ve stres içeren ortamda yabani tip bitkilerde mutant bitkiye göre daha fazla ifade edildiği belirlendi. RD29B geni ise MS0 ve Cd stresi içeren ortamda diğer genlerle benzer şekilde, yabani tip bitkide mutant bitkiye göre gen ifadesinin daha belirgin olduğu görüldü. WT ve mutant bitki genlerinin ifade düzeyleri Şekil 31’de verilmiştir.



Şekil 31. MS0 ve Cd stresi ortamlarında yabani tip ve mutant bitkilerdeki gen ifade oranlarının değişimi

4. TARTIŞMA

Ağır metaller toprak ve su kalitesini değiştirerek, tüm canlıları olumsuz şekilde etkileyen önemli çevresel kirleticilerdir. Kadmiyum (Cd), bitkiler için en toksik ağır metallerden bir tanesidir. Bitkiler, maruz kaldıkları Cd toksisitesine karşı çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalardan birisi, hücre duvarının bir kalkan gibi davranarak, ağır metal iyonlarının hücre içerisine intikal etmelerini engellemesi veya içerisine gömülü olan reseptör proteinler vasıtasıyla, hücre içerisine sinyaller göndermesidir. Bir diğer mekanizma ise, absisik asit (ABA) yollarının uyarılmasını sağlamaktır. Bu çalışmada, bitkilerin Cd toksisitesine karşı gösterdiği tolerans mekanizmalarını anlayabilmek için, ABA sinyal iletimi ve hücre çeperi senteziyle yakından ilişkili olan SOS5 geninin Cd stresine cevapta da etkili olduğunun kanıtlanması amaçlanmıştır. Bunun için yetiştirilmesinin basit ve ucuz olması, az polimorfizm göstermesi, DNA yapısının genetik transformasyona uygun olması ve mutant birey oluşturulmasının kolay olması gibi nedenlerle, moleküler ve genetik çalışmalarda baş model organizma olarak bilinen *Arabidopsis thaliana* bitkisi kullanılmıştır (Kramer, 2015; TAIR, 2011; Copenhaver, 2000).

Çalışmamızda 50 µM Cd stresi altında *Arabidopsis thaliana* Col-gl (yabani tip) ve sos5 mutant bitkilerinin fizyolojik, morfolojik ve moleküler düzeydeki değişimleri incelenmiştir. Aynı zamanda, yabani tip ve sos5 mutant bitkilerinde ABA'nın antioksidan sistemini uyararak strese karşı nasıl bir rol oynadığı araştırılmıştır. Ayrıca, Cd stresi içermeyen ve Cd stresi içeren koşullarda yabani tip ve mutant bitkilerin gen ifade oranları karşılaştırılmıştır. Bununla birlikte, Cd stresi altında yabani tip ve sos5 mutant bitkilerin ABA ile arasındaki ilişkiyi anlayabilmek için abiyotik strese tepki olarak ABA ile cevapta rol alan genler, ABA biyosentezi ve katabolizmasında rol alan genlerin ifade düzeylerine bakılmıştır.

1. Cd stresi koşullarında sos5 mutant bitkisinin yabani tipe (Col-gl) göre daha kısa ve şişman kök fenotiplerinin olduğu gözlemlendi.

Bitkilerde ağır metal stresi ilk olarak köklerden algılanır ve kök fenotipindeki değişimler bize bitkinin nasıl etkilendiği hakkında bilgi vermektedir (Moon vd., 2019). Bu çalışmada da Cd stresi koşullarında *Arabidopsis thaliana* bhlh104 mutant bitkisinin yabani tipe göre kısa ve şişman kök fenotiplerinin olduğu belirlenmiştir (Yao vd., 2018). Başka bir çalışmada ise *Arabidopsis thaliana* bitkisinin sos5 mutantlarının tuz stresi altında kısa kök fenotipi ve küçük bir sürgün fenotipi olduğu gözlemlenmiştir

(Ashagre vd., 2021). Aynı şekilde çalışmamızda da Cd stresine maruz kalan *sos5* mutant bitkilerinin benzer fenotipik değişimler gösterdiği gözlenmiştir. Bu da SOS5 gen bölgesinin Cd stresinde de etkili olabileceğini düşündürmektedir. Literatürde, Cd toksisitesine maruz kalan *sos5* mutant bitkilerinde, SOS5 geninin ABA ile ilişkili olarak, tolerans mekanizmalarını nasıl uyardığı hakkında herhangi bir bilgiye ulaşılamamıştır. Bu tez çalışması ile literatürdeki eksiklik göz önüne alınarak, Cd toksisitesine maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana sos5* mutantında ABA'nın etkilerinin, morfolojik, fizyolojik ve moleküler düzeylerde araştırılması amaçlanmıştır.

2. Cd stresi altında ABA muamelesi aşırı hassas *sos5 (fla4)* kök fenotipini baskıladığı ve yabancı tipe benzer hale getirdiği gözlemlendi.

Bu çalışmada, SOS5 gen bölgesinin ABA fitohormonu ile nasıl sinerjik hareket ettiği ve antioksidan sistemi uyardığı anlaşılmaya çalışılmıştır. *Arabidopsis thaliana* Fasciclin benzeri arabinogalactan protein 4 (FLA4) lokusu bitkilerde normal kök gelişimi için gereklidir (Turupcu vd., 2018) ve *sos5-1 (fla4)* mutanti tuz stresi altında aşırı hassas kök fenotipi sergilemektedir (Shi vd., 2003). Seifert vd., tarafından 2014 yılında yapılan çalışmada bu stres altında dışarıdan ABA uygulamasının söz konusu hassasiyeti baskıladığı gösterilmiştir. Mevcut çalışmada, benzer bir etki Cd stresi altında da gözlemlenmiştir. Bu da bitki hücre duvarında yer alan reseptör proteinlerin ağır metal ve tuz streslerinde ortak sinyal yolları aktive edebileceğini göstermektedir. ABA'nın *Arabidopsis* kök sistemi yapıları üzerine etkileri olduğu zaten çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (Hong vd., 2013; Dong vd., 2020). Yine, stres koşullarında dışarıdan ABA uygulamalarının antioksidan enzim sistemlerini uyarak, ozmotik ayarlama sağladığı ve bitkilerin hayatta kalmaları için yararlı olduğu bilinmektedir (Teng vd., 2014; Acet ve Kadioğlu, 2020). Diğer taraftan yakın tarihli bir çalışmada da ABA'nın *Sedum alfredii*'de Cd toksisitesini hafifletmedeki rolü rapor edilmiştir (Lu vd., 2020).

Yapılan çalışma sonucunda ABA muamelesi, Cd stresi altındaki *sos5* mutant bitkisinin kısa ve şişman kök fenotipini baskılayarak yabancı tip bitki kök fenotipine benzer bir görünüme sahip olmasını sağlamıştır. Yapılan bu işlemler, ABA'nın Cd stresi koşullarında *sos5* fenotipini onardığını ve SOS5 geninin ABA sinyal yolları ile arasında bir ilişki olduğunu anlayabilmemizi sağlamıştır. Ayrıca, Cd stresi koşullarında *sos5* mutantının yeterli seviyede ABA üretimini gerçekleştiremediğinden strese karşı herhangi bir yanıt oluşturamadığı görülmüştür. Yaptığımız çalışmada, Cd stresi altında ABA'nın antioksidan sistemini uyarak toleransı arttırdığı hakkında önemli deliller ortaya konulmuştur. Mevcut çalışmamıza benzer olarak, absisik asitin pirinç, maş fasulyesi ve patates bitkilerinde Cd stresine karşı tolerans mekanizmasını düzenlemede

pozitif etkileri olduğu belirtilmiştir (Hsu vd., 2008; Leng vd., 2020; Stroinski vd., 2012). Böylelikle elde edilen bulgular, literatürle de uyumluluk göstermektedir.

3. Cd içeren ortamla stres altında ABA muamelesi karşılaştırıldığında, MDA içeriğinin azaldığı gözlemlendi.

MDA (malondialdehit) içeriği bitki hücre zarlarının parçalanması sonucu açığa çıkan bir maddedir ve bitkinin stresten etkilenme durumu hakkında çıkarım yapmayı sağlamaktadır (Chen vd., 2019). Meng ve arkadaşlarının 2022 yılında yaptıkları çalışmada, Cd stresi altında antioksidan enzimlerin aktivitelerinin azalmasının reaktif oksijen türlerinin ve Cd'a karşı direnci zayıflatan MDA'nın birikiminin artmasına neden olduğu gözlenmiştir.

ABA'nın Cd stresi koşullarında lipid peroksidasyonuna nasıl etki ettiğini anlayabilmemiz için yaptığımız deneylerde de Cd stresinin iki genotip için de MDA yükselmesine sebebiyet verdiği gözlemlendi. Fakat, Cd stresi ortamına ABA ilavesi ile mutant bitki ve yabancı tip bitkide MDA miktarında düşüşe sebep olarak iyileştirici ve düzenleyici etki gösterdiği tespit edilmiştir.

4. Cd içeren ortamla stres altında ABA muamelesi karşılaştırıldığında, prolin miktarındaki değişimler gözlemlendi.

Prolin, stres koşullarındaki bitkinin metabolizması ve gelişiminde yardımcı olan protein öncüleri ve yapı taşları olarak görev almaktadır. Bitkiler çeşitli abiyotik streslere maruz kaldığında prolin farklı kısımlarda birikerek bir antioksidan ve sinyal molekülü olarak hareket etmektedir (Hassan vd., 2021).

Cd stresi altında ABA'nın bitkideki prolin miktarına etkisini anlayabilmek amacıyla yaptığımız çalışmalarda, stres içeren ortamda WT bitkideki prolin miktarı mutant bitkilere göre daha yüksek görülmüştür. Cd+ABA ortamında ise prolin miktarının yabancı tip ve mutant bitkide artmış olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum Cd stresi içeren ortamda sos5 mutant bitkilerin yeteri kadar prolin sentezleyemediği için Cd'a karşı hassas olduğunu göstermiştir. ABA ilavesi ile prolin seviyesinin arttığı ve böylece bitkinin Cd'a karşı tolerans gösterdiği tespit edilmiştir.

Leng ve diğerlerinin 2020'de yaptıkları çalışmada Cd stresi, maş fasulyesi fidelerinin prolin düzeylerinde dikkate değer azalmalara neden olmuştur. Bununla birlikte, ABA'nın yapraktan uygulanmasının fideler üzerindeki Cd toksisitesini azaltarak prolin miktarında artışa sebep olduğu belirlenmiştir (Leng vd., 2020). Diğer bir çalışmada da ABA'nın (0.5, 5, 50 μ M) eksojen uygulaması bezelye bitkilerinin A yapraklarındaki prolin konsantrasyonunu önemli ölçüde arttırdığı ortaya konulmuştur (Zdunek-Zastocka

vd., 2021). Bu durum, Cd stresi altında prolin miktarındaki artış ile bitkinin Cd'a karşı toleransının artmış olduğu düşüncesini ortaya koymuştur.

5. Cd içeren ortamla stres altında ABA muamelesi karşılaştırıldığında, antosiyanin miktarındaki değişimler gözlemlendi.

Antosiyaninler, bitkilerde stres koşullarına karşı koyabilmek için geliştirilen mekanizmalardan biri olarak bilinmektedir (Gould vd., 2008). Örnek bir çalışmada, Cd stresinin maş fasulyesi bitkilerinde antosiyanin içeriğini önemli ölçüde azalttığı görülmüştür (Rehman vd., 2022). Diğer bir çalışmada ise, ABA'nın *Lycium* bitkilerinde gelişime bağlı olarak antosiyanin biyosentezinde görev aldığı belirlenmiştir ve ayrıca ABA miktarına bağlı olarak antosiyanin miktarında artış gözlemlenmiştir (Li vd., 2019).

Cd stresi koşullarında ABA'nın içsel antosiyanin miktarına etkisini anlayabilmek için yaptığımız çalışmada da stres içeren ortamda mutant bitkideki antosiyanin miktarı yabani tip bitkiye göre daha düşük bulunmuştur. Stres altında ABA muamelesi sonucunda ise antosiyanin miktarının her iki genotipte de artmış olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, antosiyanin içeriğinin ABA ile bağlantılı olabileceğini göstermiş olabilir.

6. Cd içeren ortamla stres altında ABA muamelesi karşılaştırıldığında, klorofil ve karotenoid miktarındaki değişimler gözlemlendi.

Kadmiyum fotosentez, solunum, su hareketi, yaprak gazı değişimi gibi çeşitli fizyolojik süreçleri engeller ve bu nedenle bitki metabolizmasını bozar. Ek olarak, Cd stresi klorofil sentezini azaltır ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırarak antioksidan aktiviteleri indükler (Tang vd., 2018; Rashed vd., 2020; Hussain vd., 2022).

Cd stresi koşullarında ABA'nın klorofil ve karotenoid miktarına etkisini anlayabilmek için yaptığımız çalışmalarda, yabani tip bitki Kl-a ve Kl-b içerikleri MS0 kontrole göre kıyaslandığında, Cd stresi içeren ortamda azaldığı görülmüştür. Fakat ABA muamelesi sonucunda değerlerin yükseldiği gözlemlenmiştir.

Örnek bir çalışmada, *Solanum photeinocarpum* bitkisinin biyokütle ve klorofil içeriğinin artan ABA konsantrasyonu ile arttığı gösterilmiştir (Wang vd., 2016). Diğer bir çalışmada ise Cd stresinin, yapraklarda klorofil sentezi sırasında anahtar enzimlerin ekspresyonunu inhibe ettiği ve bunun sonucunda klorofil içeriğinin azalmasına neden olduğu bulunmuştur. Yapraklardaki karotenoid içeriğinde ise Cd stresi altında önemli bir değişim olmadığı gözlenmiştir (Zhang vd., 2020).

7. Cd stresi altında SOS5 geninin ABA ve antioksidan enzim sistemleri ile arasındaki ilişkiyi anlayabilmek için sos5 mutant bitkilerde CAT, SOD ve APX enzim aktiviteleri incelendi.

Bitkiler, enzimatik olmayan ve enzimatik antioksidanları içeren iki farklı detoksifikasyon mekanizması ile homeostazı koruyabilirler. Bitkilerde süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve askorbat peroksidaz (APX) başlıca enzimatik antioksidanlardır. CAT, bitki hücrelerinin peroksisomlarında bulunur ve ana rolü, SOD reaksiyonu ile üretilen H_2O_2 'nin ortadan kaldırılmasıdır. Başka bir antioksidan olan APX de H_2O_2 'nin eliminasyonunda görev alır. SOD ise kloroplastlardaki süperoksit serbest radikallerinin etkin bir şekilde uzaklaştırılmasını katalize eder (Kim vd., 2017).

Yapmış olduğumuz çalışmada, Cd içeren ortamda WT bitkide CAT enzim aktivitesinin mutant bitkiye göre daha fazla olduğu görülmüştür. Cd stresi altında ABA muamelesi uygulandığında ise CAT miktarının mutant bitkide yabani tipe göre daha fazla artış gösterdiği bulunmuştur. Bu durum, stres altında ABA ilavesi sonucu mutant bitkideki enzim artışının, ABA'nın bitki fenotipinde iyileştirici etkisinden kaynaklı olduğunu söylememize yardımcı olabilir.

Örnek bir çalışmada da Cd stresi koşullarında ABA ilavesi ile maş fasulyesi fidelerinin kök ve gövdelerinde katalaz (CAT) aktivitelerinin önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir (Leng vd., 2020). Sonuç olarak, Cd stresinin bitkide CAT enzim aktivitesini azalttığını ve ABA ilavesinin enzim aktivitesini artırarak desteklediğini görmüş bulunmaktayız. Ayrıca Cd stresi altında ABA muamelesi ile CAT enzim aktivitelerinin mutant ve yabani tipte birbirine yakın değerlerde olması fenotipik değişimlerinin ve kök uzunluklarının benzer hale gelmesini açıklayabilir.

SOD enzim aktivitesinin Cd içeren ortamda hem mutant tip hem de yabani tip bitkide oldukça azaldığı tespit edilmiştir. Cd stresi altında ABA ilavesi sonucunda ise her iki genotipte de aktivitenin arttığı görülmüştür. Benzer bir çalışmada, Cd stresi altında dışarıdan ABA uygulaması ile SOD enzim aktivitesinde artış olduğu belirtilmiştir (Tang vd., 2019). Diğer bir çalışmada ise Cd stresi altında köklerde süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerinin indüklendiği gözlenmiştir (AbdElgawadab vd., 2020). Tüm bunların sonucunda, Cd toksisitesine karşı kök ve sürgün organlarının spesifik tepkilerinin sadece Cd birikimi ile ilişkili olmadığı ve bunlarla başa çıkacak antioksidanlar düzeyinde özelleştiği düşüncesine varılabilir.

APX enzim aktivitesini incelemek için yapılan çalışmada, Cd stresi altında hem yabani tipte hem de mutant bitkide APX aktivitesinin MS0 kontrol ortamına kıyasla önemli derecede artmış olduğu tespit edilmiştir. Cd+ABA uygulaması sonucunda ise her iki genotipte de APX enzim aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Parveen ve arkadaşlarının 2021'de yaptıkları çalışmada tuza hassas buğday bitkisinde APX enzim aktivitesinin stres altında artmış olduğu gösterilmiştir (Parveen vd., 2021). Diğer bir çalışmada ise sonuçlar,

APX antioksidan enzim aktivitelerinin Cd stresi altında önemli ölçüde arttığını göstermiştir (Rehman vd., 2022). Bütün sonuçlar değerlendirildiğinde Cd stresi altında APX enzim aktivitesini artırmış ve ABA ilavesiyle, mutant tip enzim aktivitesinde ekstra artış gözlemlenmiştir. Buna göre, ABA'nın Cd stresi altında bitkilerde iyileştirici etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

8. Cd stresi altında ROS'lerden biri olan H_2O_2 miktarının yabani tip ve mutant tip bitkideki değişimleri araştırıldı.

Reaktif oksijen türlerinden (ROS) biri olan hidrojen peroksit (H_2O_2) çok reaktif ve toksik ara maddelerdir. H_2O_2 , bitki hücre zarlarına ve diğer hücrel bileşenlere zarar verir ve zarlar arasında serbestçe yayılabilir, bu da hasarın yayılmasını sağlar. Ayrıca DNA, proteinler, karbonhidratlar ve lipitlere karşı güçlü afinitelere sahiptir. Bundan dolayı bu moleküller, genellikle belirli bölmelerle sınırlı olan farklı enzimatik olmayan ve enzimatik detoksifikasyon mekanizmaları tarafından sürekli olarak temizlenir (Saxena vd., 2016).

Örnek bir çalışmada, Cd'un köklerin epidermisinde ve ekzodermisinde tutulduğunu ve epidermis ve ekzodermisin en yüksek hidrojen peroksit (H_2O_2) içeriğine ve SOD aktivitesine sahip olduğunu bulmuşlardır (Pan vd., 2020). Diğer benzer bir çalışmada ise farklı Cd konsantrasyonlarına maruz bırakılan *Scrophularia striata* fidelerinde Cd stresine verilen tepkilere aracılık eden fizyolojik ve sinyal yolları karakterize edilmiştir. Sonuçlar, H_2O_2 içeriklerinin 48 saatte önemli ölçüde arttığını göstermiştir (Beshamgan vd., 2019).

Bizim çalışmamızda da MS0 kontrol ortamında mutant ve yabani tip bitkideki H_2O_2 miktarlarının birbirine benzer oranda olduğu ortaya çıkmıştır. Cd stresi koşullarında H_2O_2 miktarının yabani ve mutant tipte arttığı gözlemlenmiştir. Bu sonuç, *sos5* mutant bitkinin Cd stresine karşı çok hassas olduğunu ve daha fazla ROS üretimine sebep olarak fenotipte olumsuz etkilerin meydana gelebileceğine işaret edebilir. Cd stresi altında ABA ilavesi ile mutant ve yabani tipte H_2O_2 miktarları düşmüştür ve *sos5* mutantı fenotipik olarak normale dönmüştür.

Bu bilgiler doğrultusunda Cd stresi koşullarında ABA uygulamasının içsel H_2O_2 miktarını azaltarak fenotipik açıdan dokuları zarara uğratmayacak şekilde iyileştirici etkiye sebep olduğu söylenebilir.

9. WT ve *sos5* mutant tip bitkinin Cd bulunan ortamda ABA biyosentezinden ve katabolizmasından sorumlu olan genlerle karşılaştırılması yapıldı.

ABA1, CYP707A-3, RD29A ve RD29B genleri ABA biyosentezinde ve katabolizmasında görev alan genlerdir. Ayrıca strese karşı tepki olarak ABA ile cevapta

da rol alırlar. Örnek bir çalışmada, Cd stresine bağılı olarak RD29A gibi stresle ilişkili genlerin ifade oranlarının düştüğü saptanmıştır (Lu vd., 2020).

Bizim çalışmamızda da Cd stresi altında ve MS0 kontrol ortamında yetiştirilen WT bitkilerde mutant bitkilere göre ABA biyosentezinden sorumlu ABA1 geninin daha fazla ifade edildiği gözlemlenmiştir. ABA katabolizmasında rol alan CYP707A-3 geni ise MS0 ortamında yine aynı şekilde yabancı tipte fazlayken, mutantta yok denecek kadar az ifade edildiği görülmüştür.

Bunun sonucunda, Cd stresi koşullarında sos5 mutant bitkilerde ABA biyosentez genlerinin ifadesinin azalması, mutant bitkinin Cd stresine karşı yeterli seviyede ABA sentezleyemeyerek strese tolerans gösteremediğinin bir işareti olabilir. ABA katabolizma genlerinin ifadesindeki düşüş ise ortamda ABA seviyesinin az olmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Bu durum ABA sentez mekanizmasında bozulmaya sebep olduğunu belirtmektedir. Diğer bir ABA bağımlı RD29A ve RD29B genlerinin ifade düzeyleri, MS0 ortamında mutant tipte yabancı tipe göre yok denecek kadar az çıkmıştır. Cd stresi altında ise yine aynı şekilde yabancı tipte mutanta göre biraz daha yüksek gözlenmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlar, SOS5 geninin Cd stresine karşı toleransında ABA ile doğrudan ilişkili olduğunun bir göstergesi olabilir. Elde ettiğimiz verilere benzer bir çalışma olan Acet ve Kadiğlu (2020)'nin elde ettiği sonuçlarda da ABA bağımlı RD29A, RD29B ve ABA1 genlerin ekspresyonunun yabancı tip ile karşılaştırıldığında sos5 mutant bitkide oldukça düştüğü belirlenmiştir.

Verilerimizi destekleyen başka bir çalışmada ise ABA bağımlı olan genlerden, RD29B genlerinin ekspresyonunun tuz stresine karşı *Arabidopsis thaliana* kontrol grubunda yüksek çıktığı ve RD29A geninin ekspresyonunun değişmediği belirlenmiştir (Shukla vd., 2021).

5. SONUÇ VE DEĞERLENDİRME

Günümüzde sanayi ve teknolojinin gelişmesiyle çevresel sorunlar da artmaktadır. Topraktaki ağır metal miktarının artması da tüm canlılar için önemli bir besin kaynağı olan bitkileri olumsuz etkilemektedir. Oluşan strese karşı bitkiler çeşitli tolerans mekanizmaları geliştirerek yaşamlarını sürdürmektedirler. Çalışmamızda moleküler model bir bitki olan *Arabidopsis thaliana*'nın tuza oldukça hassas *sos5* mutanı kullanılmıştır. Cd stresi koşullarında ABA muamelesi ile mutant bitkilerdeki hassasiyet ortadan kalkmış ve Cd stresine karşı tolerans artmıştır. ABA'nın Cd stresine karşı iyileştirici etkisinin olduğunu düşündüren sonuçlar elde edilmiştir.

Günümüz biyoteknolojisi bitkilerin strese karşı dayanıklı olabilmesi için stres toleransında yer alan genlerin, tarımsal açıdan değerli olan başka bitkilere aktarımını mümkün kılmaktadır. Çalışmamızda, ABA bağımlı genlerden ABA1, CYP707A-3, RD29A ve RD29B genlerinin ifade düzeylerinin yabani tip ve mutant arasındaki farkı jel görüntüsüne bakılarak kıyaslandığında, SOS5 geninin Cd stresine karşı toleransında ABA'ya bağımlı sinyal yollarını kullandığının bir işareti olabileceği düşünülmektedir. Cd stresi koşullarında, mutant bitkinin ABA bağımlı genleri yabani tipe kıyasla fazla ifade edemediği ve bu yüzden ABA'yı yeterli seviyede sentezleyemediği için Cd stresine karşı direnç gösteremediği düşünülmektedir. *sos5* mutant bitkilerinin tuza karşı olduğu kadar Cd stresine de hassasiyet gösterdiği söylenebilir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bütün sonuçlar, ABA biyosentez yoluyla ilgili kısmen bilgi vermektedir. ABA bağımlı başka genlerin de çalışmaya eklenmesiyle sonuçların daha da netleştirilmesi gerektiği düşünülmektedir. Bununla birlikte, özellikle Cd toksisitesi ve toleransı üzerinde durularak, fitohormonlar ve metal stres toleransı arasındaki karşılıklı konuşmayı anlamak için daha ayrıntılı çalışmalar yapılması önerilebilir.

Ağır metalin neden olduğu strese karşı bitkinin gösterdiği tolerans mekanizmalarında antioksidan enzimler önemli bir rol oynamaktadır. Antioksidan enzimlerin indüklediği tolerans mekanizmaları biyomoleküllerin oksidasyonunun yavaşlatılması ve ROS süreçlerinin engellenmesine yardımcı olarak bitkinin stres koşullarında hayatta kalmasını sağlamaktadır. Bu çalışmada da ROS'un SOD, CAT ve APX antioksidan enzimleri tarafından temizlendiği görülmüştür. Çevresel strese iyi adapte olan bitkilerin yetiştirilmesi için çeşitli bitkilerle ve farklı parametrelerle değişen çalışmaların yapılması önerilmektedir. Böylece bitkilerin üretkenliğinin daha da artması sağlanmış olacaktır.

KAYNAKÇA

- Abbas, T., Rizwan, M., Ali, S., Adrees, M., Zia-ur-Rehman, M., Qayyum, M. F. . . . Murtaza, G. (2017). Effect of biochar on alleviation of cadmium toxicity in wheat (*Triticum aestivum* L.) grown on Cd-contaminated saline soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 25, 25668-25680.
- Abdel Latef, A.A.H. ve Chaoxing, H. (2014). Does inoculation with *Glomus mosseae* improve salt tolerance in pepper plants?. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33(3), 644-653.
- AbdElgawadab, H., Zinta, G., A. Hamed, B., Selim, S., Beemster, G., Hozzein, W.N. . . . Abuelsoud, W. (2020). Maize roots and shoots show distinct profiles of oxidative stress and antioxidant defense under heavy metal toxicity. *Environmental Pollution*, 258.
- Acet, T. ve Kadioğlu, A. (2020) SOS5 gene-abscisic acid crosstalk and their interaction with antioxidant system in *Arabidopsis thaliana* under salt stress. *Physiol Mol Biol Plants*, 26(9),1831-1845.
- Ahmad, J., Ali, A. A., Baig, M. A., Iqbal, M., Haq, I. ve Qureshi, M. I. (2019). Chapter 8- Role of Phytochelatins in Cadmium Stress Tolerance in Plants. *Elsevier Inc.*, 385.
- Ahmad, J., Baig, M. A., Ali, A. A., Al-Huqail, A. A., Ibrahim, M. M., Qureshi, M. I. (2018). Differential antioxidative and biochemical responses to aluminium stress in *Brassica juncea* cultivars. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 59, 615-627.
- Ahsan, N., Renaut, J. ve Komatsu, S. (2009). Recent developments in the application of proteomics to the analysis of plant responses to heavy metals. *Proteomics*, 9, 2602-2621.
- Alazem, M., Lin, N. S. (2020). Interplay between ABA signaling and RNA silencing in plant viral resistance. *Curr Opin Virol*, 42, 1-7.
- Alscher, R. G., Erturk, N. ve Heath, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1331-1341.
- Andersen, E. ve Küpper, H. (2013). Cadmium: From Toxicity to Essentiality, Sigel, A., Sigel, H. ve Sigel, R. K. O. (eds.), Springer Science + Business Media, Germany, pp. 395-398.

- Anjum, N. A., Gill, S. S., Gill, R., Hasanuzzaman, M., Duarte, A. C., Pereira, E. . . . Tuteja, N. (2014). Metal/metalloid stress tolerance in plants: Role of ascorbate, its redox couple, and associated enzymes. *Protoplasma*, 251(6), 1265-1283.
- Anjum, S. A., Xie, X., Wang, L., Saleem, M. F., Man, C., Lei, W. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, 6(9), 2026-2032.
- Apel, K. ve Hirt, H. (2004). Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24, 1-15.
- Arslan, E. (2019). *Pseudomonas Putida'nın Arabidopsis Thaliana ve Nicotiana Tabacum Bitkileri ile In Vitro Biyotizasyonu ve 2,4-Dinitrotoluen'in Biyotransformasyonu*. Yayınlanmamış yüksek lisans tezi, Gebze Teknik Üniversitesi, Kocaeli.
- Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions, *Plant Physiology*, 141, 391-396.
- Baek, S., Han, T., Ahn, S. K., Kang, H., Cho, M. R., Lee, S. C. ve Im, K. H. (2012). Effects of heavy metals on plant growths and pigment contents in *arabidopsis thaliana*. *Plant Pathol. J.*, 28(4), 446-452.
- Barrero, J. M., Piqueras, P., Gonzalez-Guzman, M., Serrano, R., Rodriguez, P. L., Ponce, M. R. ve Micol, J. L. (2005). A mutational analysis of the *aba1* gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of *aba* in vegetative development, *Journal of Experimental Botany*, 56(418), 2071-2083.
- Bartels, D. ve Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24, 23-58.
- Batır, M. B. (2014). *Kurşun (Pb) ve Bakır (cu) ağır metal stresi uygulanan Enginar (Cynara scolymus L.) tohumlarının fidelerinde oluşan DNA değişikliklerinin belirlenmesi*. Yayınlanmamış yüksek lisans tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir.
- Baudouin, C., Charveron, M., Tarrouse, R. ve Gal, Y. (2002). Environmental pollutants and skin cancer. *Cell Biology and Toxicology*, 18, 341-348.
- Beshamgan, E.S., Sharifi, M. ve Zarinkamar, F. (2019). Crosstalk among polyamines, phytohormones, hydrogen peroxide, and phenylethanoid glycosides responses in *Scrophularia striata* to Cd stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 143, 129-141.

- Blaukopf, C., Krol, M. Z. ve Seifert, G. J. (2011). New insights into the control of cell growth, the plant cell wall. *Methods in Molecular Biology*, 715, 221-244.
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Annals of Botany*, 91(2), 179-194.
- Borsani, O., Valpuesta, V. ve Botella, M. A. (2003). Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology approach. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 73, 101-115.
- Brown, D. M., Zeef, L. A. H., Ellis, J., Goodacre, R. ve Turner, S. R. (2005). Identification of novel genes in Arabidopsis involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics. *Plant Cell*, 17, 2281-2295.
- Brunetti, C., Sebastiani, F., Tattini, M. (2019). Review: ABA, flavonols, and the evolvability of land plant. *Plant Sci.*, 280, 448-454.
- Büyük, İ., Soydam Aydın, S. ve Aras, S. (2012). Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69(2), 97-110.
- Carocho, M. ve Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.*, 51, 15-25.
- Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S. B., Ribeiro, C. W., Lazzarotto, F. ve Margis Pinheiro, M. (2012). Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4), 1011-1019.
- Chaves, M. M., Flexas, J., Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103, 551-560.
- Chen, B., Stein, A. F., Castell, N., Gonzalez-Castanedo, Y., Sanchez, Dela-Campa, A. M., Dela-Rosa, J. D. (2016). Modeling and evaluation of urban pollution events of atmospheric heavy metals from a large Cu-smelter. *Sci. Total Environ.*, 539, 17-25.
- Chen, D., Chen, D., Xue, R., Long, J., Lin, X., Lin, Y. . . . Song, Y. (2019). Effects of boron, silicon and their interactions on cadmium accumulation and toxicity in rice plants, *Journal of Hazardous Materials*, 367, 447-455.
- Chen, Z., Hong, X., Zhang, H., Wang, Y., Li, X., Zhu, J.K. ve Gong, Z. (2005). Disruption of the cellulose synthase gene, Atcesa8/IRX1, enhances drought and osmotic stress tolerance in Arabidopsis, *The Plant Journal*, 43, 273-283.

- Choudhary, N. L., Sairam, R. K. ve Tyagi, A. (2005). Expression of delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene during drought in rice (*Oryza sativa* L.). *Ind. J. Biochem. Biophys.*, 42, 366-370.
- Cobbett, C. ve Goldsbrough, P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 159-182.
- Copenhaver, G. P. (2000). Analysis of The Genome Sequence of the Flowering Plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408, 796-815.
- Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R. ve Abrams, S. R. (2010). Absciscic acid: Emergence of a core signaling network. *The Annual Review of Plant Biology*, 61, 651-679.
- Çelebi, H. ve Gök, G. (2018). Topraklarda otoyol ve trafik kaynaklı ağır metal kirliliğinin değerlendirilmesi, *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 24(6), 1169-1178.
- DalCorso, G., Farinati, S., Maistri, S., ve Furini, A. (2008). How plants cope with Cadmium: Staking all on metabolism and gene expression. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(10), 1268-1280.
- Das, K. ve Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-Scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2(53), 1-13.
- Del Río, L. A., Corpas, F. J., López-Huertas, E., Palma, J. M. (2018). Plant superoxide dismutases: Function under abiotic stress conditions. In: Gupta D., Palma, J., Corpas, F. (eds) *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*, Springer, 1-26s.
- Deligöz, A. ve Bayar, E. (2021). Makedonya Meşesi (*Quercus Trojana* P.B. Webb.) fidanlarında kuraklık stresinin su potansiyeli ve gaz değişim parametreleri üzerindeki etkisi, *Türkiye Ormancılık Dergisi*, 22(4), 366-370.
- Demircan, N. (2019). *Arabidopsis thaliana*'da ağır metal toksisitesinin katlanmamış protein yanıtı üzerine etkilerinin araştırılması. Yayınlanmamış yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi, İzmir.
- Dhalaria, R., Kumar, D., Kumar, H., Nepovimova, E., Kuca, K., Islam, M. T. ve Verma, V. (2020). Arbuscular Mycorrhizal fungi as potential agents in ameliorating heavy metal stress in plants. *Agronomy*, 10(6), 815.

- Dilukshi Fernando, V. C. ve Schroeder, D. F. (2016). Role of ABA in Arabidopsis salt, drought, and desiccation tolerance. *IntechOpen-Open Science Open Minds*, 507-524.
- Dong, H., Ma, X., Zhang, P., Wang, H., Li, X., Liu, J. . . . Song, C. P. (2020). Characterization of Arabidopsis thaliana root-related mutants reveals aba regulation of plant development and drought resistance. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39(3), 1393-1401.
- Driouich, A. ve Baskin, T. I. (2008). Intercourse between cell wall and cytoplasm exemplified by arabinogalactan proteins and cortical microtubules. *American Journal of Botany*, 95(12), 1491-1497.
- Du, Y. P., Li, H. J., Yin, K. L. ve Zhai, H. (2012). Cadmium accumulation, subcellular distribution, and chemical forms in Vitis vinifera cv. Chardonnay grapevine. *Journal of Applied Ecology*, 23(6), 1607-1612.
- Dutta, S., Mitra, M., Agarwal, P., Mahapatra, K., De, S., Sett, U. ve Roy, S. (2018). Oxidative and genotoxic damages in plants in response to heavy metal stress and maintenance of genome stability. *Plant Signaling & Behavior*, 13(8), e1460048.
- El Rasafi, T., Oukarrouma, A., Haddioui, A., Songc, H., Kwonc, E. E., Boland, N. . . . Rinklebe, J. (2020). Cadmium stress in plants: A critical review of the effects, mechanisms, and tolerance strategies. *Critical Reviews In Environmental Science and Technology*, 52(5), 675-726.
- Elavarthi, S. ve Martin, B. (2010). Spectrophotometric Assays for antioxidant enzymes in plants, *Plant Stress Tolerance*, 273-280.
- Etehadnia, M., Waterer, D. R. ve Tanino, K. K. (2008). The method of ABA application affects salt stress responses in resistant and sensitive Potato lines. *Journal of Plant Growth Regulation*, 27, 331-341.
- Ezaki, B., Gardner, R. C., Ezaki, Y. ve Matsumoto, H. (2000). Expression of Aluminum-induced genes in transgenic Arabidopsis plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress, *Plant Physiology*, 122, 657-665.
- Fabro, G., Kovács, I., Pavet, V., Szabados, L.ve Alvarez, M. E. (2004). Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in Arabidopsis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(4), 343-350.
- Farid, M., Shakoor, M. B., Ehsan, S., Ali, S., Zubair, M. ve Hanif, M. A. (2013). Morphological, physiological and biochemical responses of different plant species

- to Cd stress. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences*, 3, 53-60.
- Finkelstein, R. (2013). Absciscic Acid synthesis and response. *Arabidopsis Book*, 1(11), e0166.
- Finkelstein, R. R. ve Lynch, T. J. (2000). The Arabidopsis absciscic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor, *The Plant Cell*, 12, 599-609.
- Foyer, C. H. ve Noctor, G. (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(4), 862-890.
- Galeano, E., Vasconcelos, T. S., Novais de Oliveira, P., Carrer, H. (2019). Physiological and molecular responses to drought stress in teak (*Tectona grandis* L.f.). *Plos One*, 14(9), e0221571.
- Gall, H. L., Philippe, F., Domon, J-M., Gillet, F., Pelloux, J. ve Rayon, C. (2015). Cell wall metabolism in response to Abiotic Stress. *Plants*, 4, 112-166.
- Gallé, A., Csiszár, J., Benyó, D., Laskay, G., Leviczky, T., Erdei, L. ve Tari, I. (2013). Isohydric and anisohydric strategies of wheat genotypes under osmotic stress: biosynthesis and function of ABA in stress responses, *Journal of Plant Physiology*, 170, 1389-1399.
- Gallego, S. M., Pena, L. B., Barcia, R. A., Azpilicueta, C. E., Iannone, M. F., Rosales, E. P., Benavides, M. P. (2012). Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. *Environ. Exp.*, 83, 33-46.
- Gao, J., Sun, L., Yang, X. ve Liu, J. X. (2013). Transcriptomic analysis of cadmium stress response in the heavy metal hyperaccumulator *Sedum alfredii* hance. *PLoS One*, 8(6), e64643.
- Garg, N. ve Manchanda, G. (2009). ROS generation in plants: Boon or bane?. *Plant Biosystems*, 143(1), 81-96.
- Gechev, T. S., Breusegem, F. V., Stone, J. M., Denev, I. ve Laloi, C. (2006). Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays*, 28, 1091-1101.
- Ghori, N. H., Ghori, T., Hayat, M. Q., Imadi, S. R., Gul, A., Altay, V. ve Ozturk, M. (2019). Heavy metal stress and responses in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 6, 1807-1828.

- Gill, S. S. ve Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Gill, S. S., Anjum, N. S., Gill, R., Yadav, S., Hasanuzzaman, M., Fujita, M. . . . Tuteja, N. (2015). Superoxide dismutase-mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 10375-10394.
- Gonzalez-Guzman, M., Apostolova, N., Belles, J. M., Barrero, J. M., Piqueras, P., Ponce, M. R. . . . Rodríguez, P. L. (2002). The short-chain alcohol dehydrogenase aba2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *The Plant Cell*, 14, 1833-1846.
- Gould, K., Davies, K. M., ve Winefield, C. (2008). Anthocyanins: Biosynthesis, functions, and applications. *Springer Science & Business Media*.
- Gutsch, A., Keunen, E., Guerriero, G., Renaut, J., Cuypers, A., Hausman, J. F. ve Sergeant, K. (2018). Long-term cadmium exposure influences the abundance of proteins that impact the cell wall structure in *Medicago sativa* stems. *Plant Biol (Stuttg)*, 20, 6, 1023-1035.
- Haider, F. U., Liqun, C., Coulter, J. A., Cheema, S. A., Wu, J., Zhang, R., Wenjun, M. ve Farooq, M. (2021). Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 211, 1-2.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141, 312-322.
- Han, Y. S., Wang, S. J., Zhao, N., Deng, S., Zhao, C., Li, N. . . . Chen, S. (2016). Exogenous abscisic acid alleviates cadmium toxicity by restricting Cd^{2+} influx in *Populus euphratica* cells. *J Plant Growth Regul.*, 35, 827-837.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M., Anee, T.I., Parvin, K., Nahar, K., Mahmud, J.A. ve Fujita, M. (2019). Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. *Antioxidants*, 8, 384.
- Hasanuzzaman, M., Borhannuddin Bhuyan, M. H. M., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Al Mahmud, J. . . . Fotopoulos, V. (2020). Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, 9, 681.
- Hassan, M., Israr, M., Mansoor, S., Hussain, S. A., Basheer, F., Azizullah, A., Rehman, S. U. (2021). Acclimation of cadmium-induced genotoxicity and oxidative stress in mung bean seedlings by priming effect of phytohormones and proline. *PlosOne*, 1-26.

- Haudecoeur, E., Planamente, S., Cirou, A., Tannières, M., Shelp, B. J., Moréra, S., ve Faure, D. (2009). Proline antagonizes GABA-induced quenching of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106, 14587-14592.
- Hauser, F., Li, Z. X., Waadt, R., Schroeder, J. I. (2017). SnapShot: Absciscic acid signaling. *Cell*, 171,1708-1708.
- Hermans, C., Chen, J., Coppens, F., Inz'e, D., Verbruggen, N. (2011). Low magnesium status in plants enhances tolerance to cadmium exposure. *New Phytol.*, 192, 428-436.
- Holdsworth, M. J., Bentsink, L. ve Soppe, W. J. J. (2008). Molecular networks regulating arabidopsis seed maturation, after ripening, dormancy and germination. *New Phytologist*, 179, 33-54.
- Hong, J. H., Seah, S. W., Xu, J. (2013). The root of ABA action in environmental stress response. *Plant Cell Rep.*, 32, 971-983.
- Hossain, M. A., Piyatida, P., Silva, J. O. ve Fujita, M. (2012). Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *Journal of Botany*, 872875, 1-37.
- Hsu, Y. T., Kuo M. C. ve Kao, C. H. (2006). Cadmium-induced ammonium ion accumulation of rice seedlings at high temperature is mediated through absciscic acid. *Plant Soil*, 287, 267-277.
- Hussain, S., Irfan, M., Sattar, A., Hussain, S., Ullah, S., Abbas, T. . . . Yang, J. (2022). Alleviation of cadmium stress in wheat through the combined application of boron and biochar via regulating morphophysiological and antioxidant defense mechanisms. *Agronomy*, 12, 434.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T. . . . Shinozaki, K. (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in absciscic acid biosynthesis in arabidopsis. *The Plant Journal*, 27, 325-333.
- Jali, P., Pradhan, C., Das, A. B. (2016). Effects of cadmium toxicity in plants: A review article. *Sch. Acad. J. Biosci.*, 4, 1074-1081.
- Jalmi, S. K., Bhagat, P. K., Verma, D., Noryang, S., Tayyeba, S., Singh, K. . . . Sinha, A. K. (2018). Traversing the links between heavy metal stress and plant signaling. *Front. Plant Sci.*, 9, 12.

- Johnson, K. L., Jones, B. J., Bacic, A. ve Schultz, C. J. (2003). The fasciclin-like arabinogalactan proteins of Arabidopsis. A multigene family of putative cell adhesion molecules. *Plant Physiology*, 133, 1911-1925.
- Kaçar, B. (2015). *Genel Bitki Fizyolojisi*. Nobel Akademik Yayıncılık, Ankara. 510-527s.
- Kangasjarvi, S., Lepistö, A., Hännikäinen, K., Piippo, M., Luomala, E. M., Aro, E. M., Rintamäki, E. (2008). Diverse roles for chloroplast stromal and thylakoid bound ascorbate peroxidases in plant stress responses. *Biochemistry Journal*, 412, 275-285.
- Khan, M. I. R., Chopra, P., Chhillar, H., Ahanger, M. A., Hussain, S. J. ve Maheshwari, C. (2021). Regulatory hubs and strategies for improving heavy metal tolerance in plants: Chemical messengers, omics and genetic engineering. *Plant Physiology and Biochemistry*, 164, 260-278.
- Kim, Y. H., Khan, A. L., Waqas, M. ve Lee, I. J. (2017). Silicon Regulates Antioxidant Activities of Crop Plants under Abiotic-Induced Oxidative Stress: A Review. *Front. Plant Sci.*, 8, 510.
- Kirecci, O. A. (2018). The effects of salt stress, SNP, ABA, IAA and GA applications on antioxidant enzyme activities in *Helianthus Annuus L.* *Fresenius Environ. Bull*, 27(5), 3783-3788.
- Knudsen, C., Gallage, N. J., Hansen, C. C., Moller, B. L. ve Laursen, T. (2018). Dynamic metabolic solutions to the sessile life style of plants. *Natural Product Reports*, 35, 1140.
- Kocaman, P. (2016). *Çorlu-Çerkezköy Civarındaki Bazı Fabrikalara Yakın Tarım Arazilerindeki Çeşitli Ağır Metal Kirlilik Düzeylerinin Toprak ve Bitki Analizleri ile Belirlenmesi*. Yayımlanmamış yüksek lisans tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ.
- Kochian, L. V. (1995). Cellular Mechanisms of Aluminum Toxicity and Resistance in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46, 237-60.
- Kosakivska, I. V., Babenko, L. M., Romanenko, K. O., Korotka, I. Y. ve Potters, G. (2020). Molecular mechanisms of plant adaptive responses to heavy metals stress. *Cell Biology International*, 45(2), 258-272.
- Kramer, U. (2015). Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *Elife*, 4.

- Krzesłowska, M. (2011). The Cell Wall in Plant Cell Response to Trace Metals: Polysaccharide Remodeling and Its Role in Defense Strategy. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 35-51.
- Kuhn, J. M. ve Schroederz, J. I. (2003). Impacts of Altered RNA Metabolism on Absciscic Acid Signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 463-469.
- Kumar, S., Kaur, G. ve Nayyar, H. (2008). Exogenous Application of Absciscic Acid Improves Cold Tolerance in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194, 449-456.
- Kwon, S. Y., Jeong, Y. J., Lee, H. S., Kim, J. S., Cho, K. Y., Allen, R. D. ve Kwak, S. S. (2002). Enhanced Tolerances of Transgenic Tobacco Plants Expressing Both Superoxide Dismutase and Ascorbate Peroxidase in Chloroplasts Against Methyl Viologen-Mediated Oxidative Stress. *Plant, Cell and Environment*, 25, 873-882.
- Laxa, M., Liebthal, M., Telman, W., Chibani, K. ve Dietz, K. J. (2019). The role of the plant antioxidant system in drought tolerance. *Antioxidants*, 8, 94.
- Leng, Y., Li, Y., Ma, Y. H., He, L. F. ve Li, S.W. (2020). Absciscic acid modulates differential physiological and biochemical responses of roots, stems, and leaves in mung bean seedlings to cadmium stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 6030-6043.
- Li, G., Zhao, J., Qin, B., Yin, Y., An, W., Mu, Z. ve Cao, Y. (2019). ABA mediates development-dependent anthocyanin biosynthesis and fruit coloration in *Lycium* plants. *BMC Plant Biology*, 19(1), 1-13.
- Li, K., Pang, C. H., Ding, F., Sui, N., Feng, Z. T. ve Wang, B. S. (2012). Overexpression of Suaeda salsa Stroma Ascorbate Peroxidase in *Arabidopsis* Chloroplasts Enhances Salt Tolerance of Plants. *South African Journal of Botany*, 78, 235-245.
- Li, S. W., Leng, Y., Feng, L. ve Zeng, X. Y. (2014). Involvement of absciscic acid in regulating antioxidative defense systems and IAA-oxidase activity and improving adventitious rooting in mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] seedlings under cadmium stress. *Environ Sci Pollut Res.*, 21, 525-537.
- Ling, Q., Huang, W. ve Jarvis, P. (2010). Use of a SPAD-502 meter to measure leaf chlorophyll concentration in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynthesis Research*, 107(2), 209-214.
- Liu, Q., Yang, J. L., He, L. S., Li, Y. Y. ve Zheng, S. J. (2008). Effect of Aluminum on Cell Wall, Plasma Membrane, Antioxidants and Root Elongation in Triticale. *Biologia Plantarum*, 52(1), 87-92.

- Liu, X. ve Hou, X. (2018). Antagonistic Regulation of ABA and GA in Metabolism and Signaling Pathways. *Front Plant Sci.*, 9, 251.
- Lombardi, L. ve Sebastiani, L. (2005). Copper Toxicity in *Prunus cerasifera*: Growth and Antioxidant Enzymes Responses of in vitro Grown Plants. *Plant Science*, 168, 797-802.
- Lombi, E., Tearall, K. L., Howarth, J. R., Zhao, F. J., Hawkesford, M. J. ve Mcgrath, S. P. (2002). Influence of iron status on calcium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology*, 128, 1359-1367.
- Lu, Q., Chen, S., Li., Y., Zheng, F., He, B. ve Gu, M. (2020). Exogenous abscisic acid (ABA) promotes cadmium (Cd) accumulation in *Sedum alfredii* Hance by regulating the expression of Cd stress response genes. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 8719-8731.
- Lu, S., Su, W., Li, H. ve Guo, Z. (2009). Absciscic Acid Improves Drought Tolerance of Triploid Bermudagrass and Involves H₂O₂- and NO-Induced Antioxidant Enzyme Activities. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 132-138.
- Lumba, S., Toh, S., Handfield, L. F., Swan, M., Liu, R., Youn, J. Y. . . . McCourt, P.A. (2014). A Mesoscale Absciscic Acid Hormone Interactome Reveals a Dynamic Signaling Landscape in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, 29, 360-372.
- Lutts, S., ve Lefèvre, I. (2015). How Can We Take Advantage of Halophyte Properties to Cope with Heavy Metal Toxicity in Salt-Affected Areas. *Annals of Botany*, 115, 509-528.
- Ma, J. F., Shen, R., Nagao, S. ve Tanimoto, E. (2004). Aluminum Targets Elongating Cells by Reducing Cell Wall Extensibility in Wheat Roots. *Plant and Cell Physiology*, 45(5), 583-589.
- Ma, Y., Cao, J., He, J. vd. (2018). Molecular mechanism for the regulation of ABA homeostasis during plant development and stress response. *Int J Mol Sci.*, 19, 1-14.
- MacMillan, C. P., Mansfield, S. D., Stachurski, Z. H., Evans, R. ve Southerton, S.G. (2010). Fasciclin-like arabinogalactan proteins: Specialization for stem biomechanics and cell wall architecture in *Arabidopsis* and *Eucalyptus*. *The Plant Journal*, 62, 689-703.
- Mahajan, S., Pveey, G. K. ve Tuteja, N. (2008). Calcium- and salt-stress signaling in plants: Shedding light on sos pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 471(2), 146-158.
- Majewska-Sawka, A. ve Nothnagel, E. A. (2000). The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant Physiology*, 122, 3-9.

- Mann, T. ve Keilin, D. (1938). Haemocuprein and hepatocuprein, copper-protein compounds of blood and liver in mammals. *Proceedings of the Royal Society of London*, 126, 303-315.
- Meloni, D. A., Oliva, M. A., Martinez, C. A. ve Cambraia, J. (2003). Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 49, 69-76.
- Meng, Y. T., Zhang, X. L., Wu, Q., Shen, R. F., Zhu, X. F. (2022). Transcription factor ANAC004 enhances Cd tolerance in *Arabidopsis thaliana* by regulating cell wall fixation, translocation and vacuolar detoxification of Cd, ABA accumulation and antioxidant capacity. *Journal of Hazardous Materials*, 436.
- Merlot, S., Mustilli, A. C., Genty, B., North, H., Lefebvre, V., Sotta, B. . . Giraudat, J. (2002). Use of infrared thermal imaging to isolate *Arabidopsis* mutants defective in stomatal regulation. *The Plant Journal*, 30(4), 601-609.
- Metwally, A., Safronova, V. I., Bellimov, A. A. ve Dietz, K. J. (2005). Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L. *Journal of Experimental Botany*, 56, 167-178.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Breusegem, F. V. ve Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: A focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*, 61(15), 4197-4220.
- Micheli, F. (2001). Pectin methylesterases: Cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *TRENDS in Plant Science*, 6(9), 414-419.
- Mirza, H., Kamrun N., Md. Mahabub A., 2, Roychowdhury R., Fujita M. (2013). Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 9643-9684.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R. D., Govindarajan, R., Kuriakose, S. V. ve Prasad, M. N. V. (2006). Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44, 25-37.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. ve Breusegem, F. V. (2004). Reactive oxygen gene network of plants, *Trends in Plant Science*, 9(10), 490-498.
- Moon, J. Y., Belloeil, C., Ianna, M. L. ve Shin, R. (2019). *Arabidopsis* cngc family members contribute to heavy metal ion uptake in plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(2), 413.
- Nambara, E. ve Marion-Poll, A. (2005). Absciscic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 165-185.

- Naqqash, T., Aziz, A., Babar, M., Hussain, S. B., Haider, G., Shahid, M., Qaisrani, M. M., Arshad, M., Hanif, M. K., Mancinelli, R., Radicetti, E. (2022). Lead-resistant *Morganella morganii* rhizobacteria reduced lead toxicity in *Arabidopsis thaliana* by improving growth, physiology, and antioxidant activities. *Agriculture*, 12(8), 1155.
- Nath, M., Bhatt, D., Bhatt, M. D., Prasad, R., ve Tuteja, N. (2018). Microbe-mediated enhancement of nitrogen and phosphorus content for crop improvement. *In Crop Improvement through Microbial Biotechnology*, 293-304.
- Neill, S., Desikan, R., ve Hancock, J. (2002). Hydrogen peroxide signalling. *Current opinion in plant biology*, 5(5), 388-395.
- Ng, S., De Clercq, I., Van Aken, O., Law, S. R., Ivanoa, A., Willems, P. . . . Whelvan, J. (2014). Anterograde and retrograde regulation of nuclear genes encoding mitochondrial proteins during growth, development, and stress. *Mol. Plant*, 7, 1075-1093.
- Nguyen, T. Q., Sesin, V., Kisiala, A. ve Neil Emerya, R. J. (2021). Phytohormonal roles in plant responses to heavy metal stress: Implications for using macrophytes in phytoremediation of aquatic ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40(1), 7-22.
- Nishimura, N., Sarkeshik, A., Nito, K., Park, S. Y., Wang, A., Carvalho, P. C. . . . Schroeder, J. I. (2010). PYR/PYL/RCAR Family members are major in-vivo ab11 protein phosphatase 2c-interacting proteins in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 61, 290-299.
- Okcu, M., Tozlu, E., Kumlay, A. M. ve Pehlivan, M. (2009). Ağır metallerin bitkiler üzerine etkileri, *Alinteri Ziraat Bilimler Dergisi*, 17(B), 14-26.
- Osakabe, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. ve Phan Tran, L. S. (2014). ABA Control of plant macroelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity. *New Phytologist*, 202, 35-49.
- Ovečka, M. ve Takáč, T. (2014). Managing heavy metal toxicity stress in plants: biological and biotechnological tools. *Biotechnology Advances*, 32, 73-86.
- Ozfidan, C., Turkan, I., Sekmen, A. H., Seckin, B. (2013). Time course analysis of ABA and non-ionic osmotic stress-induced changes in water status, chlorophyll fluorescence and osmotic adjustment in *Arabidopsis thaliana* wild-type (Columbia) and ABA-deficient mutant (*aba2*). *Environ Exp Bot.*, 86, 44-51.
- Öktüren Asri, F. ve Sönmez, S. (2006). Ağır metal toksisitesinin bitki metabolizması üzerine etkileri, akdeniz üniversitesi ziraat fakültesi toprak bölümü, *Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü*, Antalya, 23(2), 36-45.

- Özyürek, F. (2016). *Nevşehir’de farklı su kaynaklarıyla sulanan sebzelerde ağır metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn) birikimi*. Yayımlanmamış yüksek lisans tezi, Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Nevşehir.
- Paes de Melo, B., Carpinetti, P. A., Fraga, O. T., Rodrigues-Silva, P. L., Fioresi, V. S., Camargos, L. F. ve Ferreira, M. F. S. (2022). Abiotic stresses in plants and their markers: a practice view of plant stress responses and programmed cell death mechanisms. *Plants*, 11, 1100.
- Panda, S. K., Baluska, F. ve Matsumoto, H. (2009). Aluminum stress signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 4(7), 592-597.
- Pandey, S., Fartyal, D., Agarwal, A., Shukla, T., James, D., Kaul, T. . . . Reddy, M. K. (2017). Abiotic stress tolerance in plants: Myriad roles of ascorbate peroxidase, *Frontiers in Plant Science*, 8(581), 1-13.
- Parrotta, L., Guerriero, G., Sergeant, K., Cai, G., Hausman, J. F. (2015). Target or barrier? The cell wall of early- and later-diverging plants vs cadmium toxicity: differences in the response mechanisms. *Front. Plant Sci.*, 6(133), 1-4.
- Parveen, A., Ahmarb, S., Kamran, M., Malik, Z., Ali, A., Riaz, M. . . . Ali, S. (2021). Absciscic acid signaling reduced transpiration flow, regulated Na⁺ ion homeostasis and antioxidant enzyme activities to induce salinity tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Environmental Technology & Innovation*, 24.
- Peixoto, P. H. P., Cambraia, J., Sant Anna, R., Mosquim, P. R. ve Moreira, M. A. (2001). Aluminium effects on fatty acid composition and lipid peroxidation of a purified plasma membrane fraction of root apices of two sorghum cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, 24, 1061-1070.
- Persson, S., Wei, H. R., Milne, J., Page, G. P. and Somerville, C. R. (2005). Identification of genes required for cellulose synthesis by regression analysis of public microarray data sets. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 102, 8633-8638.
- Pilon, M., Ravet, K. ve Tapken, W. (2011). The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807(8), 989-998.
- Porra, R. J., Thompson, W. A. ve Kriedemann, P. E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 975, 384-394.

- Purev, M., Kim, Y. J., Kim, M. K., Pulla, R. K. ve Yang, D. C. (2010). Isolation of a novel catalase (cat1) gene from panax ginseng and analysis of the response of this gene to various stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 451-460.
- Qi, L., Liu, S., Li, C., Fu, J., Jing, Y., Cheng, J. . . Li, J. (2020). Phytochrome-interacting factors interact with the ABA receptors PYL8 and PYL9 to orchestrate ABA signaling in darkness. *Mol Plant*, 13, 414-430.
- Rady, M. M. (2011). Effect of 24-epibrassinolide on growth, yield, antioxidant system and cadmium content of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants under salinity and cadmium stress. *Scientia Horticulturae*, 129, 232-237.
- Raghavendra, A. S., Gonugunta, V. K., Christmann, A. ve Grill, E. (2010). ABA perception and signalling. *Trends in Plant Science*, 15, 395-401.
- Ramel, F., Birtic, S., Ginies, C., Soubigou-Taconnat, L., Triantaphylides, C. ve Havaux, M. (2012). Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, 5535-5540.
- Rasheed, A., Fahad, S., Aamer, M., Hassan, M. U., Tahir, M. M., Wu, Z. (2020). Role of genetic factors in regulating cadmium uptake, transport and accumulation mechanisms and quantitative trait loci mapping in rice. *Appl. Ecol. Environ. Res.*, 18, 4005-4023.
- Rattan, R. K., Datta, S. P., Chandra, S., Saharan, N. (2002). Heavy metals and environmental quality. *Fertil. News*, 47, 21-40.
- Razi, K. ve Muneer, S. (2021). Drought stress-induced physiological mechanisms, signaling pathways and molecular response of chloroplasts in common vegetable crops. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(5), 669-691.
- Rehman, S., Chattha, M. U., Khan, I., Mahmood, A., Hassan, M. U., Al-Huqail, A. A. . . El-Esawi, M. A. (2022). Exogenously applied trehalose augments cadmium stress tolerance and yield of mung bean (*Vigna radiata* L.) grown in soil and hydroponic systems through reducing cd uptake and enhancing photosynthetic efficiency and antioxidant defense systems. *Plants*, 11(6), 822.
- Richardson, A. D., Duigan, S. P., Berlyn, G. P. (2002). An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist*, 153, 185-194.
- Rivero, R. M., Mittler, R., Blumwald, E. ve Zandalinas, S. I. (2022). Developing climate-resilient crops: Improving plant tolerance to stress combination. *Plant J.*, 109, 373-389.

- Rizwan, M., Ali, S., Abbas, T., Rehman, M. Z., Hannan, F., Keller, C. . . . Ok, Y. S. (2016). Cadmium minimization in wheat: A critical review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 130, 43-53.
- Rizwan, M., Ali, S., Adrees, M., Rizvi, H., Zia-ur-Rehman, M., Hannan, F. . . . Ok, Y. S. (2016). Cadmium stress in rice: Toxic effects, tolerance mechanisms, and management: A critical review. *Environ Sci Pollut Res*, 23, 17859-17879.
- Robe, K., Gao, F., Bonillo, P., Tissot, N., Gaymard, F., Fourcroy, P. . . . Dubos, C. (2020). Sulphur availability modulates *Arabidopsis thaliana* responses to iron deficiency. *Plos One*, 15(8), e0237998.
- Roychoudhury, A., Paul, S. ve Basu, S. (2013). Cross-talk between abscisic acid-dependent and abscisic acid independent pathways during abiotic stress. *Plant Cell Rep.*, 32, 985.
- Saini, S., Kaur, N. ve Pati, P. K. (2021). Phytohormones: Key players in the modulation of heavy metal stress tolerance in plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 223, 112578.
- Saradhi, P. P. (1995). Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 209, 1-5.
- Saxena, I., Srikanth, S. ve Chen, Z. (2016). Cross talk between H₂O₂ and interacting signal molecules under plant stress response. *Front. Plant Sci.*, 7, 570.
- Schat, H., Sharma, S. S. ve Vooijs, R. (1997). Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a nontolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiol. Plant.*, 101, 477-482.
- Schopfer, P. (2001). Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: Implications for the control of elongation growth. *The Plant Journal*, 28(6), 679-688.
- Schwartz, S. H., Qin, X. ve Zeevaart, J. A. D. (2003). Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. *Plant Physiology*, 131, 1591-1160.
- Schweikert, C., Liskay, A. ve Schopfer, P. (2000). Scission of polysaccharides by peroxidase-generated hydroxyl radicals. *Phytochemistry*, 53(5), 565-570.
- Seifert, G. J., Xue, H. ve Acet, T. (2014). The *Arabidopsis thaliana* fasciclin like arabinogalactan protein 4 gene acts synergistically with abscisic acid signalling to control root growth. *Annals of Botany*, 114, 1125-1133.

- Sekmen A. H., Türkan I., Takio S. (2007). Differential responses of antioxidative enzymes and lipid peroxidation to salt stress in salt-tolerant *Plantago maritima* and salt-sensitive *Plantago media*. *Physiologia Plantarum*, 131, 399-411.
- Semane, B., Cuypers, A., Smeets, K., Van Belleghem, F., Horemans, N., Schat, H. ve Vangronsveld, J. (2007). Cadmium responses in *Arabidopsis thaliana*: Glutathione metabolism and antioxidative defence system. *Physiologia Plantarum*, 129, 519-528.
- Semida, W. M., Hemida, K. A. ve Rady, M. M. (2018). Sequenced ascorbate-proline-glutathione seed treatment elevates cadmium tolerance in cucumber transplants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 154, 171-179.
- Shah, K., Kumar, R. G., Verma, S., ve Dubey, R. (2001). Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science*, 161(6), 1135-1144.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S. ve Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 1-26.
- Shi, H., Kim, Y., Guo, Y., Stevenson, B., ve Zhu, J. K. (2003). The *arabidopsis* *sos5* locus encodes a putative cell surface adhesion protein and is required for normal cell expansion. *The Plant Cell*, 15, 19-32.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y. ve Yoshimura, K. (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1305-1319.
- Shinozaki, K. ve Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58(2), 221-227.
- Shukla, M. R., Bajwa, V. S., Freixas-Coutin, J. A. ve Saxena, P. K. (2021). Salt stress in *Arabidopsis thaliana* seedlings: Role of indoleamines in stress alleviation. *Melatonin Research*, 4(1), 70-83.
- Siddique, M. R. B., Hamid, A. ve Islam, M. S. (2000). Drought stress effects on water relations of wheat. *Bot. Bull. Acad.Sin.*, 41, 35-39.
- Silva, S., Costa, E. M., Calhau, C., Morais, R. M., ve Pintado, M. E. (2015). Anthocyanin extraction from plant tissues: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(14), 3072-3083.
- Slesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S. ve Miszalski, Z. (2007). The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochimica Polonica*, 54(1), 39-50.

- Smart, R. E. ve Bingham, G. E. (1974). Rapide estimates of relative water content. *Plant Physiology*, 53, 258-60.
- Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M. ve Vitti, A. (2015). Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 13561-13578.
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J. . . . Youngs, H. (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *American Association for the Advancement of Science*, 306, 2206-2211.
- Song, X. Q., Liu, L. F., Jiang, Y. J., Zhang, B. C., Gao, Y. P., Liu, X. L. . . . Zhou, Y. H. (2013). Disruption of secondary wall cellulose biosynthesis alters cadmium translocation and tolerance in rice plants. *Molecular Plant*, 6(3), 768-780.
- Soto, A., Ruiz, K. B., Ravaglia, D., Costa, G. ve Torrigiani, P. (2013). ABA may promote or delay peach fruit ripening through modulation of ripening- and hormone-related gene expression depending on the developmental stage. *Plant Physiology and Biochemistry*, 64, 11-24.
- Srichaikul, B., Bunsang, R., Samappito, S., Butkhup S., ve Bakker, G. (2011). Comparative study of chlorophyll content in leaves of Thai *Morus alba* Linn. Species. *Plant Science Research*, 3, 17-20.
- Suzuki, N., Koizumi, N., Sano, H. (2001). Screening of cadmium responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment*, 24, 1177-1188.
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R. ve Miller, G. (2012). ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell and Environment*, 35, 259-270.
- Swanson, S. ve Gilroy, S. (2010). ROS in plant development. *Physiologia Plantarum*, 138(4), 384-392.
- Szabados, L., Savouré, A. (2010). Proline: A multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15(2), 89-97.
- Tabuchi, A. ve Matsumoto, H. (2001). Changes in cell-wall properties of wheat (*Triticum aestivum*) roots during aluminum-induced growth inhibition. *Physiologia Plantarum*, 112, 353-358.
- TAIR, 2011. The Arabidopsis Information Resource, [Http://www.arabidopsis.org/](http://www.arabidopsis.org/).
- Tang, Y., Wang, L., Xie, Y., Yu, X., Li, H., Lin, L. . . . Tu, L. (2019). Effects of exogenous abscisic acid on the growth and cadmium accumulation of lettuce under cadmium-stress conditions. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1029-0397.

- Tang, Y., Xie, Y., Sun, G., Tan, H., Lin, L., Li, H. . . . Tu, L. (2018). Cadmium-accumulator straw application alleviates cadmium stress of lettuce (*Lactuca sativa*) by promoting photosynthetic activity and antioxidative enzyme activities. *Environ. Sci. Poll. Res.*, 25, 30671-30679.
- Teng, K., Li, J., Liu, L., Han, Y. (2014). Exogenous ABA induces drought tolerance in upland rice: the role of chloroplast and ABA biosynthesis-related gene expression on photosystem II during PEG stress. *Acta Physiol Plant*, 36, 2219-2227.
- Turupcu, A., Almohamed, W., Oostenbrink, C., Seifert, G. J. (2018). A speculation on the tandem fasciclin 1 repeat of FLA4 proteins in angiosperms. *Plant Signal Behav*, 13, 1-5.
- Tuteja, N. (2007). Absciscic acid and abiotic stress signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 2(3), 135-138.
- Upadhyaya, H., Panda S. K., Dutta, B. K. (2008). Variation of physiological and antioxidative responses in tea cultivars subjected to elevated water stress followed by rehydration recovery. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30, 457-468.
- URL-1, https://www.arabidopsis.org/servlets/Search?type=gene&action=new_search. 25 Ağustos 2022.
- Van Breusegem, F., Vranova, E., Dat, J. F., Inzé D. (2001). The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*, 161, 405-414.
- Van Oosten, M. J. ve Maggio, A. (2015). Functional biology of halophytes in the phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Environmental and experimental botany*, 111, 135-146.
- Veal, E. A., Day, A. M. ve Morgan, B. A. (2007). Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol. Cell.*, 26(1), 1-14.
- Velasquez, S. M., Ricardi, M. M., Dorosz, J. G., Fernandez, P. V., Nadra, A. D., Pol-Fachin, L. . . . Estevez, J. M. (2011). O-glycosylated cell wall proteins are essential in root hair growth. *American Association for the Advancement of Science*, 332, 1401-1403.
- Velikova, V., Yordanov, I. ve Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous poly-amines. *Plant Science*, 151, 59-66.
- Verma, S. ve Dubey, R. S. (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*, 164(4), 645-655.

- Verslues, P. E. (2016). ABA and cytokinins: challenge and opportunity for plant stress research. *Plant Mol Biol.*, 91(6), 629.
- Viehweger, K. (2014). How plants cope with heavy metals. *Botanical Studies*, 55, 35.
- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R. K. . . . Sharma, S. (2017). Absciscic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects. *Frontiers in Plant Science*, 8, 161.
- Vital S. A., Fowler R. W., Virgen A., Gossett D. R., Banks S. W., Rodriguez, J. (2008). Opposing roles for superoxide and nitric oxide in the NaCl stress-induced upregulation of antioxidant enzyme activity in cotton callus tissue. *Environmental and Experimental Botany*, 62, 60-68.
- Vuletic, M., Hadsi-Taskovic Sukalovic, V., Markovic., K., Kravic, N., Vucinic, Z. ve Maksimovic, V. (2013). Differential response of antioxidative systems of maize (*Zea mays* l.) roots cell walls to osmotic and heavy metal stress. *Plant Biology*, 16, 88-96.
- Waadt, R., Seller, C. A., Hsu, PK., Takahashi, Y., Munemasa, S. ve Schroeder, J. I. (2022). Plant hormone regulation of abiotic stress responses. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 23, 680-694.
- Wagner, D., Przybyla, D., Camp, R., Kim, C., Landgraf, F., Lee, K. P. . . . Apel, K. (2004). The genetic basis of singlet oxygen-induced stress responses of *Arabidopsis thaliana*. *American Association for the Advancement of Science*, 306, 1183.
- Walter, P., ve Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334, 1081-1086.
- Wang, J., Ding, L., Wang, K., Huang, R., Yu, W., Yan, B. ve Liu, Z. (2022). Role of endoplasmic reticulum stress in cadmium-induced hepatocyte apoptosis and the protective effect of quercetin. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 241, 11377.
- Wang, J., Lin, L., Luo, L., Liao, M., Lv, X., Wang, Z. . . . Tang, Y. (2016). The effects of absciscic acid (ABA) addition on cadmium accumulation of two ecotypes of *Solanum photeinocarpum*. *Environ Monit Assess*, 188, 182.
- Wang, W., Vinocur, B. ve Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1-14.
- Wang, Y., Wang, Y., Kai, W., Zhao, B., Chen, P., Sun, L. . . . Leng, P. (2014). Transcriptional regulation of absciscic acid signal core components during cucumber

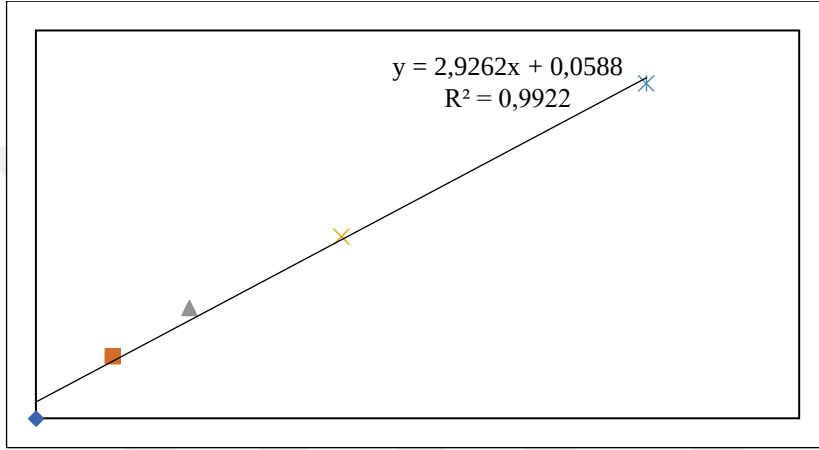
- seed germination and under Cu^{2+} , Zn^{2+} , NaCl and simulated acid rain stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 76, 67-76.
- Xia, X. J., Zhou, Y. H., Shi, K., Zhou, J., Foyer, C. H., Yu, J. Q. (2015). Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. *J Exp Bot.*, 66(10), 2839.
- Xu, Z. M., Li, Q. S., Yang, P., Ye, H. J., Chen, Z. S., Guo, S. H. . . . Zeng, E. Y. (2017). Impact of osmoregulation on the differences in Cd accumulation between two contrasting edible amaranth cultivars grown on Cd-polluted saline soils. *Environ. Pollut.*, 224, 89-97.
- Yaashikaa, P. R., Senthil Kumar, P., Jeevanantham, S. ve Saravanan, R. (2022). A review on bioremediation approach for heavy metal detoxification and accumulation in plants. *Environmental Pollution*, 301, 119035.
- Yadav, S. K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 76, 167-79.
- Yang, S. L., Lan, S. S. ve Gong, M. (2009). Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings. *J. Plant Physiol.*, 166, 1694-1699.
- Yılmaz, E., Tuna, A. L. ve Bütün, B. (2011). Bitkilerin tuz stresi etkilerine karşı geliştirdikleri tolerans stratejileri. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 7(1), 47-66.
- Yoon, Y., Seo, D. H., Shin, H., Kim, H. J., Kim, C. M. ve Jang, G. (2020). The role of stress-responsive transcription factors in modulating abiotic stress tolerance in plants. *Agronomy*, 10(788), 1-23.
- Yoshiba, Y., Kiyosue, T., Katagiri, T., Ueda, H., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. . . . Shinozaki, K. (1995). Correlation between the induction of a gene for delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant J.*, 7, 751-760.
- Zandalinas, S. I., Fritsch, F. B. ve Mittler, R. (2021). Global warming, climate change, and environmental pollution: Recipe for a multifactorial stress combination disaster. *Trends in Plant Science*, 26, 588-599.
- Zdunek-Zastocka, E., Grabowska, A., Michniewska, B. ve Orzechowski, S. (2021). Proline concentration and its metabolism are regulated in a leaf age dependent manner but not by abscisic acid in pea plants exposed to cadmium stress. *Cells*, 10, 946.

- Zhang, H., Xua, Z., Guoa, K., Huoa, Y., Hec, G., Sunc, H. . . . Sun, G. (2020). Toxic effects of heavy metal Cd and Zn on chlorophyll, carotenoid metabolism and photosynthetic function in tobacco leaves revealed by physiological and proteomics analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 202, 110856.
- Zhang, T., Cao, Y., Chen, Y., Liu G. (2015). Non-structural carbohydrate dynamics in Robinia pseudoacacia saplings under three levels of continuous drought stress. *Trees*, 29, 1837-1849.
- Zhou, B., Guo, Z. ve Lin, L. (2006). Effects of abscisic acid application on photosynthesis and photochemistry of stylosanthes guianensis under chilling stress. *Plant Growth Regulation*, 48, 195-199.
- Zhu, J. K. (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167, 313-324.
- Zhu, J., Le,e B., Dellinger, M., Cui, X., Zhang, C., Wu, S. . . . Zhu, J. K. (2010). A cellulose synthase-like protein is required for osmotic stress tolerance in arabidopsis. *The Plant Journal*, 63(1), 128-140.

EKLER

Ek 1. Protein Tayini

Protein tayini Bradford (1976) metotuna göre yapıldı. Protein miktarı için 50 µL örnek, 200 µL Commasie Brilliant Blue (G250) boyası ile karıştırıldı ve 10 dk sonra 595 nm’de absorbans okuması yapıldı. Protein konsantrasyonu mg cinsinden hesaplanarak enzim aktivitelerinin tayininde kullanıldı.



Şekil 32. Protein Standart Eğrisi (BSA)

Tablo 15. Protein Standart Eğrisi (BSA) tablosu

0	0
0.05	0.2246
0.1	0.3999
0.2	0.6551
0.4	1.2093

ÖZGEÇMİŞ

Lise eğitimini 75. Yıl Cumhuriyet Lisesi'nde tamamladı. 2017 yılında Gümüşhane Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümünde lisans eğitimini tamamladı. 2018 yılında Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 2020 yılında TÜSEB Covid19 Tanı Merkezi Laboratuvarı'nda Proje Personeli olarak görev aldı. 2021 Ekim ayından itibaren SZA Omics Biyoteknoloji Ar-Ge merkezinde Araştırmacı olarak çalışmaktadır. Bu tez 20.E3108.07.01 no'lu GÜBAP 2907: Lisansüstü Öğrenci Destek Programı projesi çıktısı olarak yapılmıştır.

Yayınlar:

Akar Z., Karakurt, A., Okumuş, F., Cinemre, S., Düzgün, Özad, A., Akar, B. ve Can, Z.

(2020). RP-HPLC-UV analysis of the phenolic compounds, antimicrobial activity against multi-drug resistant bacteria and antioxidant activity of fruit and seed of *Diospyros lotus* L.. *International Journal of Secondary Metabolite*, 7(4), 237-246.

Agaoglu, N. B., Unal, B., Akgun Dogan, O., Zolfagharian, P., Sharifli, P., Karakurt, A. . . . Doganay, L. (2022). Determining the accuracy of next generation sequencing based copy number variation analysis in hereditary breast and ovarian cancer. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 22(2), 239-246.