



**KOLZA FİDELERİNDE SELENYUM TEŞVİKLİ KROM TOLERANSININ
FİZYOLOJİK VE MOLEKÜLER ANALİZLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Haktan DOĞUŞ

**Danışman
Prof. Dr. Mustafa YILDIZ**

**İkinci Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Hakan TERZİ**

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Şubat 2023

Bu tez çalışması 20.FEN.BİL.36 numaralı proje ile Afyon Kocatepe Üniversitesi
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANSTEZİ

**KOLZA FİDELERİNDE SELENYUM TEŞVİKLİ KROM
TOLERANSININ FİZYOLOJİK VE MOLEKÜLER ANALİZLERİ**

Haktan DOĞUŞ

Danışman

Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

İkinci Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Hakan TERZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Şubat 2023

TEZ ONAY SAYFASI

Haktan DOĞUŞ tarafından hazırlanan “**Kolza Fidelerinde Selenyum Teşvikli Krom Toleransının Fizyolojik ve Moleküler Analizleri**” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 15/02/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANSTEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

İkinci Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Hakan TERZİ

Başkan : Prof. Dr. Mustafa YILDIZ
Afyon Kocatepe Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi

Üye : Prof. Dr. Ahmet SERTESER
Afyon Kocatepe Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi

Üye : Doç. Dr. Barış UZİLDAY
Ege Üniversitesi,
Fen Fakültesi

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
...../...../..... tarih ve

..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. İbrahim EROL

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

15 / 02 / 2023

Haktan DOĞUŞ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KOLZA FİDELERİNDE SELENYUM TEŞVİKLİ KROM TOLERANSININ FİZYOLOJİK VE MOLEKÜLER ANALİZLERİ

Haktan DOĞUŞ

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hakan TERZİ

Endüstriyel faaliyetler çevredeki krom (Cr) kirliliğini arttırmaktadır. Toprakta artan Cr içeriği bitkiler tarafından alınıp emilip birikebilmekte, toksisiteye yol açabilmekte, besin zinciri yoluyla doğrudan veya dolaylı olarak insan sağlığına zarar verebilmektedir. Bu nedenle, Cr ile kirlenmiş topraklarda yetişen bitkiler tarafından Cr alımını azaltacak ve böylece Cr tehditlerinden kaynaklanan sağlık risklerini azaltacak yaklaşımların bulunması gerekmektedir. Bitkiler için faydalı bir element olan selenyum (Se), çeşitli biyotik ve abiyotik stres altındaki bitkilerde olumlu roller oynamaktadır. Selenyumun Cr stresi altındaki bitkilerdeki faydalı etkileri, bitki büyümesini iyileştirme ve Cr birikimini azaltılması ile kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, kolza bitkilerinin Cr stres toleransını iyileştirmede Se'un koruyucu mekanizmasını ortaya çıkarmak için çok az bilgi bulunmaktadır. Bu çalışmada, kolza (*Brassica napus* L.) fidelerinin Cr stresine karşı tolerans oluşturmadaki Se'un rolü, fizyolojik ve biyokimyasal analizlerle kombine edilmiş jel temelli proteomik yaklaşım ile ortaya konulmuştur. Hidroponik olarak büyütülen yedi günlük kolza fideleri, 14 gün boyunca 10 µM Cr stresi ve 5 µM Se uygulamalarına maruz bırakılmıştır. Sonuçlar, Cr stresinin kolza fidelerinde büyümeyi azalttığını ve Cr birikimine ve lipid peroksidasyonuna neden olduğunu göstermiştir. Dışsal olarak uygulanan Se, Cr stresine maruz bırakılan kolza fidelerinde bitki büyümesini arttırmış, ancak lipid peroksidasyonunu ve Cr birikimini azaltmıştır. Ek olarak, Se uygulaması yapraklarda azalmış katalaz ve askorbat peroksidaz aktivitelerini

artırmış ve ayrıca yaprak süperoksit dismutaz ve guaiakol peroksidaz aktivitelerinde Cr kaynaklı artışta ilave artışa neden olmuştur. Proteomik analizde, Cr stresi altındaki yapraklarda Se toplam 60 proteinin ifadesini önemli ölçüde etkilenmiş ve kütle spektrometrisi ile 54 protein tanımlanmıştır. En büyük üç fonksiyonel kategori, fotosentez (%48,1), savunma tepkisi (%27,8) ve protein metabolizmasında (%11,1) yer alan proteinleri içermektedir. Dışsal Se, fotosentezde fonksiyon gören proteinlerin çoğunu düzenlemiştir ve bu durum CO₂ fiksasyonunda bir düzenlemeyi işaret etmektedir. Savunma cevabı ve protein metabolizmasında yer alan proteinler, Se tarafından farklı şekilde düzenlenmiştir ve bu durum Se'un stres direnci ve proteom yeniden düzenlenmesindeki rollerini göstermiştir. Selenyum, fotosentez verimini, ROT süpürme kabiliyetini, protein biyosentezi ve işlenmesini ve diğer adaptif tepkileri teşvik ederek Cr toleransını artırabilir.

2023, x + 79 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Brassica napus*, Krom, Proteomik, Selenyum.

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR ANALYSIS OF SELENIUM INDUCED CHROMIUM TOLERANCE IN RAPESEED SEEDLINGS

Haktan DOĞUŞ

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Mustafa YILDIZ

Co-Supervisor: Assist. Prof. Dr. Hakan TERZİ

Industrial activities have increased chromium (Cr) contamination in environment. Increasing content of Cr in soil can be absorbed and accumulated in plants, caused toxicity, directly or indirectly damaging human health via food chain. Therefore, it is necessary to find approaches to reduce Cr uptake by plant growing in Cr polluted soils and thus decrease health risks from Cr threats. As a beneficial element to plants, selenium (Se) plays positive roles in plants under various biotic and abiotic stresses. The beneficial effects of Se have been established in improving plant growth and reducing Cr accumulation in plant under Cr stress. However, little information can be used to reveal the protective mechanism of Se in improving Cr stress tolerance of colza plants. In the present study, the role of Se in inducing tolerance to Cr stress in colza (*Brassica napus* L.) seedlings was revealed by a gel based proteomic approach combined with physiological and biochemical analysis. Seven-day-old rapeseed seedlings grown hydroponically were exposed to 10 μ M Cr stress and 5 μ M Se treatments for 14 days. Results showed that Cr stress decreased growth and caused Cr accumulation and lipid peroxidation in colza seedlings. Exogenously applied Se enhanced plant growth, but reduced lipid peroxidation and Cr accumulation in Cr-stressed colza seedlings. Additionally, Se treatment elevated depressed catalase and ascorbate peroxidase activities in leaves and caused further increase in Cr-induced increase in leaf superoxide dismutase and guaiacol peroxidase activities. In proteomic analysis, a total of 60 proteins were

significantly influenced by Se in leaves under Cr stress, and 54 proteins were identified by mass spectrometry. The three largest functional categories included proteins involved in photosynthesis (48.1%), defense response (27.8%), and protein metabolism (11.1%). Exogenous Se regulated most identified proteins involved in photosynthesis, implying a modulation in CO₂ fixation. Proteins involved in defense response and protein metabolism were differently regulated by Se, which indicated the roles of Se in stress resistance and proteome rearrangement. Selenium could increase the Cr tolerance by promoting photosynthesis efficiency, ROS scavenging ability, protein biosynthesis and processing, and other adaptive responses.

2023, x + 79 pages

Key words: *Brassica napus*, Chromium, Proteomics, Selenium.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusunun belirlenmesi, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa YILDIZ'a ve ikinci danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hakan TERZİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışmayı 20.FEN.BİL.36 nolu proje ile destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne katkılarından dolayı en içten dileklerle teşekkür ederim.

Araştırma ve yazım süresince bilgi ve tecrübelerini paylaşan doktorant Sayın Emre PEHLİVAN'a teşekkür ederim. Tez çalışmaları sırasında yardımlarını esirgemeyen yüksek lisans öğrencileri Sayın Tuğçe DEMİRCİ, Hakan YALÇIN ve Nurgül SÖNMEZ'e teşekkür ederim.

Bu araştırma boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı özellikle sevgili aileme teşekkür ederim.

Haktan DOĞUŞ
Afyonkarahisar 2023

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ.....	3
2.1 Kolza (<i>Brassica napus</i> L.)	3
2.2 Ağır Metal Stresi	3
2.3 Krom Stresi	5
2.3.1 Kromun Kimyasal Özellikleri	5
2.3.2 Krom Alınımı ve Taşınımı	6
2.3.3 Krom Stresinin Bitki Gelişimi Üzerindeki Etkileri.....	6
2.3.4 Krom Toleransı ve Antioksidan Enzimler	9
2.4 Selenyum.....	11
2.4.1 Bitkilerde Selenyum Alınımı, Taşınması ve Metabolizması	12
2.4.2 Bitkilerde Se Asimilasyonu.....	13
2.4.3 Selenitin Selenosisteinlere (SeCys) Dönüşümü	14
2.4.4 Ağır Metal Stresinde Selenyumun İyileştirici Rolü	14
2.5 Krom Stresinin Bitki Proteom Profilleri Üzerine Etkisi	18
2.6 Krom Stresi Toleransında Rolü Olan Diğer Bileşikler	23
2.6.1 Brassinosteroidler.....	23
2.6.2 Silisyum.....	24
2.6.3 Salisilik Asit	24
2.6.4 Glutatyon.....	25
3. MATERİYAL ve METOT.....	27
3.1 Bitki Materyali ve Bitki Yetiştirme Koşulları	27
3.2 Fidelerin Yaş ve Kuru Ağırlıklarının Belirlenmesi	28
3.3 Krom Birikiminin Belirlenmesi	28
3.4 Malondialdehit İçeriğinin Belirlenmesi	29

3.5 Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	29
3.5.1 Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi	30
3.5.2 Guaiakol Peroksidaz (POD) Aktivitesi	30
3.5.3 Katalaz (CAT) Aktivitesi	30
3.6 Proteomik Analizler	31
3.6.1 Protein Ekstraksiyonu	31
3.6.2 İki-Yönlü (2-D) Poliakrilamid Jel Elektroforezi	31
3.6.3 Jelleri Boyanması ve Görüntü Analizleri	32
3.6.4 Jeldeki Proteinlerin Tripsin ile Kesimi.....	33
3.6.5 Kütle Spektrometrisi Analizleri	34
3.7 İstatistiki Analizler	35
4. BULGULAR.....	36
4.1 Selenyum Teşvikli Krom Stresinin Büyüme Üzerine Etkisi	36
4.2 Selenyum Teşvikli Krom Stresinin Cr Birikimi Üzerine Etkisi	37
4.3 Selenyum Teşvikli Krom Stresinin Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi	37
4.4 Selenyum Teşvikli Krom Stresinin Proteom Profili Üzerine Etkisi	38
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	47
6. KAYNAKLAR.....	52

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

$\cdot\text{OH}$	Hidroksil Radikali
μL	Mikrolitre
μg	Mikrogram
μM	Mikromolar
Cr	Krom
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
mM	Milimolar
ng	Nanogram
Se	Selenyum

Kısaltmalar

APX	Askorbat peroksidaz
CAT	Katalaz
CBB	Commasie brillant blue
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
GR	Glutasyon redüktaz
GS	Glutamin sentetaz
ICP/OES	İndüktif eşleşmiş plazma atomik emisyon spektroskopisi
IEF	İzoelektrik fokuslama
MDA	Malondialdehit
MS/MS	Ardışık kütle spektrometrisi
NBT	Nitroblue tetrazolium
OAS	O-asetilserin
PMSF	Fenilmetilsülfonil florür
POX	Peroksidazlar
PS I	Fotosistem I
PS II	Fotosistem II
PVP	Polivinilpirrolidon
ROT	Reaktif oksijen türleri
SAT	Asetiltransferaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
PAJE	Poliakrilamid jel elektroforezi
SOD	Süperoksit dismutaz
TCA	Trikloroasetik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Krom toleransı ve detoksifikasyon mekanizmaları	10
Şekil 2.2 Bitkilerde Se metabolizmasının yolları	14
Şekil 2.3 Se'un bitkilerdeki toksik metallerin etkilerinden bitkileri koruma şekli	16
Şekil 3.1 Cr ve/veya Se'un farklı uygulamalarına maruz bırakılmış kolza fidelerinin genel görünümü.....	28
Şekil 4.1 Cr ve/veya Se'un farklı uygulamalarından elde edilen kolza fideleri	36
Şekil 4.2 Cr ve/veya Se'un farklı uygulamalarına maruz bırakılan kolza fidelerinin proteomlarındaki değişimlere ait temsili protein profili.	39
Şekil 4.3 Farklı şekilde ifade olan proteinlerin etkileşim ağı.	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1 Gümüş boyama yöntemi.....	33
Çizelge 3.2 Protein tanımlamada seçilen tarama parametreleri	35
Çizelge 4.1 Kolza fidelerinde büyüme ve Cr birikimi üzerine Cr (10 μ M) ve Se (5 μ M)'un farklı uygulamalarının etkisi	37
Çizelge 4.2 Kolza fidelerinde büyüme ve Cr birikimi üzerine Cr (10 μ M) ve Se (5 μ M)'un farklı uygulamalarının MDA içeriği ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisi	38
Çizelge 4.4 Selenyum ve/veya Cr uygulamalarına maruz bırakılan arpa fidelerinin yaprak dokularında MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ile tanımlanmış proteinler	40

1. GİRİŞ

Bitkiler genellikle metabolizmalarında ve nihayetinde büyümelerinde önemli değişikliklere neden olabilecek birçok farklı çevresel strese maruz kalır. Topraktaki inorganik kirleticilerden ağır metaller ekosistemi bozmakta ve besin zinciri yoluyla insan sağlığını tehdit etmektedir (Kapoor vd. 2022). Kanserojen bir element olarak krom (Cr), çok sayıda antropojenik aktiviteden salınan oldukça toksik bir metal olarak kabul edilmektedir (Srivastava vd. 2021). Cr'un topraktaki oksidasyon durumu, biyoyararlanımını ve dolayısıyla toksisitesini belirler. Üç değerlikli forma kıyasla altı değerlikli Cr, oksitleyici koşullar altında çözünür, hareketli ve oldukça zararlı özelliklere sahiptir (Jiang vd. 2019). Bitkilerin Cr alımı için özel bir taşıyıcıları olmamasına rağmen, sülfat gibi besinler için taşıyıcılar aracılığıyla kökler tarafından kolayca alınır (Marieschi vd. 2015). Bitki dokularında artan Cr birikimi, ekonomik açıdan önemli bitkilerin veriminde azalmaya neden olur (Wakeel vd. 2018). Ürün verimi üzerindeki etkisinin yanı sıra kanserojen, mutajenik ve teratojenik yapısından dolayı bitki dokularında Cr birikimini azaltmak ve bitki tepkilerini iyileştirmek gereklidir. Cr'un biyoyararlanımını azaltmak veya toleransı artırmak için birçok yaklaşım kullanılmıştır. Birçok çalışma, toksik elementlerle rekabet edebildiği için besin ortamına selenyum (Se) ilave edilerek bitkilerde Cr alımının ve toksisitesinin azaltılabileceğini göstermiştir (Handa vd. 2018, Zhao vd. 2019).

Selenyum, insan ve hayvan beslenmesindeki önemi nedeniyle son yıllarda dikkatleri üzerine çeken önemli bir eser elementtir. Bununla birlikte, bitkilerde Se'un önemi hakkında şüpheye yer bırakmayacak kadar çok sayıda kanıt vardır (Jiang vd. 2021). Düşük seviyelerdeki selenyum, bitkilerde stres toleransını iyileştirmede faydalı bir unsur olarak kabul edilir. Pilon-Smits ve Quinn (2010), Se'un biyolojik aktivitesini, Se alımı ve biyomoleküllere dahil edilmesini kolaylaştıran kükürt elementine olan benzerliği ile ilişkilendirmiştir. Selenyumun birçok ağır metalin hem birikimini hem de toksisitesini azalttığı belgelenmiştir. Se'un iyileştirici etkisi, hücre altı düzeyde ağır metallerin yeniden dağılımına, antioksidan sistem ile oksidatif stresin baskılanmasına, fotosentetik sistemin uyarılmasına, hücre zarlarının restorasyonuna ve besin alımının artırılmasına bağlanmıştır (Feng vd. 2021). Önceki çalışmalar, ekzojen Se uygulamalarının bitki büyümesini ve fotosentetik pigmentleri iyileştirdiğini, antioksidan savunma sistemini

güçlendirdiğini, Cr alımını azalttığını ve kökten sürgüne Cr translokasyonunu azalttığını göstermiştir (Handa vd. 2018, 2019, Zhao vd. 2019). Dışsal Se'un Cr toleransındaki yararlı işlevleri hakkında birçok rapor olmasına rağmen, moleküler tepkiler belirsizliğini korumaktadır. Se kaynaklı Cr toleransının altında yatan moleküler tepkileri çözmek için proteomik gibi yüksek verimli yaklaşımlar gereklidir.

Proteomik, ağır metaller de dahil olmak üzere çevresel faktörlere karşı bitki tepki mekanizmalarını incelemek için etkili bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Zeng vd. (2014), Cr toleransında farklılık gösteren iki çeltik çeşidinde proteomik değişiklikleri incelemiş ve köklerde Cr'a duyarlı 64 protein bulmuştur. Kolza yapraklarının proteomik analizi, sistein tarafından artan Cr toleransının, amino asit metabolizması, savunma mekanizması ve enerji metabolizmasında yer alan yüksek protein seviyeleri ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (Yıldız ve Terzi 2021). Ek olarak, Se'un kadmiyum stresi altındaki salatalık fidelerinde ısı şok proteini STI benzeri, glutatyon S-transferaz F8, askorbat oksidaz ve peroksidaz dahil 26 proteini düzenlediği gösterilmiştir (Sun vd. 2016). Bununla birlikte, Cr stresi altındaki kolza tohumu fidelerinin büyüme özellikleri ve antioksidatif enzimleri ile birlikte proteom değişiklikleri üzerinde Se uygulamasının etkisine dair hiçbir araştırma yapılmamıştır. Bu nedenle, bu çalışmada, hücrel tepkide yer alan proteinleri tanımlamak ve Se'un Cr stresinin toksisitesini hafifletme mekanizmasını keşfetmek için, Cr stresi altındaki kolza tohumu fideleri üzerinde fizyolojik ve biyokimyasal analizle birleştirilmiş jel bazlı bir proteomik analiz verileri değerlendirilmiştir.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Kolza (*Brassica napus* L.)

Kolza bitkisi (*Brassica napus* L.), 1979 yılında ilk olarak Kanada’da geliştirilmiştir. Yağlı tohum ve kaba yem bitkisi olan kolza (kanola), Düşük Asitli Kanada Yağı (Canadian Oil Low Acid)’nın ilk harflerinin kullanılmasıyla CANOLA olarak adlandırılmıştır (Daun vd. 2011). Üretimi dünya çapında ikinci sırada yer alan kolza, Kanada, Avustralya, Çin ve Avrupa’da önde gelen yağlı tohum ürünüdür (Lu vd. 2011). Ülkemizde kolza gibi kışlık yağ bitkisi sayısı oldukça sınırlı olduğundan kolzanın önemi gittikçe artmaktadır (Bayram 2005). Yağlı tohum bitkileri arasında kolza, yüksek tohum yağı ve en düşük doymuş yağ asidi ile yemeklik yağ olarak dünyada ikinci sıradadır (Shahsavari vd. 2014). Ayrıca yan ürünleri hayvan yemi olarak kullanılmaktadır (Paula vd. 2019). Kolza hızlı büyüme, yüksek biyokütle üretimi ve doğal arı beslenmesi üzerindeki etkileri nedeniyle de yaygın olarak yetiştirilmektedir (Yu vd. 2012).

Brassica türleri, ağır metal alınımı, hızlı büyüme ve daha büyük biyokütle gibi ayırt edici özellikleri nedeniyle ağır metal stresine karşı potansiyel aday olarak kabul edilir (Farooq vd. 2016).

2.2 Ağır Metal Stresi

Ağır metaller, suyun özgül ağırlığının beş katı kadar özgül ağırlığa sahip ve yoğunluğu 5g/cm^3 ’ten daha büyük olan metaller olarak ifade edilir (Abdullateef vd. 2014). Ağır metaller biyolojik olarak parçalanamazlar ve olası hiçbir yolla çevreden doğal olarak atılamazlar. Ağır metallerin hareketsiz ya da hareketli olanları vardır. Hareketli olan ağır metaller, difüzyon, endositoz veya metal taşıyıcılar aracılığı ile bitki kök sistemi tarafından alınabilir ya da hücre dışına atılabilirler (Ali ve Jain 2004, Ashraf vd. 2010, Krzesłowska 2011, Ali vd. 2015, Sabir vd. 2015, Dehghani ve Mosaferi 2016, Alharbi vd. 2018, Basheer 2018). Fizyolojik koşullar altında ağır metaller, organizmalar için esansiyel ve esansiyel olmayan elementler olarak sınıflandırılmaktadır (Asati vd. 2016). Çinko (Zn), bakır (Cu), kobalt (Co), manganez (Mn) ve molibden (Mo) gibi esansiyel metaller, redoks reaksiyonlarında kofaktör ve ligand etkileşimleri gibi canlı

organizmaların fizyolojik süreçlerinde önemli rollere sahiptirler. Arsenik (As), kadmium (Cd), krom (Cr), kurşun (Pb) ve civa (Hg) gibi ağır metaller veya metaloidler organizmalar için gerekli değildir ve reaktiviteleri nedeniyle enzimatik reaksiyonları bozarak fizyolojik süreçleri olumsuz etkilerler (Ali vd. 2011, Rahman vd. 2012, Tchounwou vd. 2012). Cr, As, Pb, Hg ve Cd gibi esansiyel olmayan metaller, insanlar, hayvanlar ve bitkiler üzerinde çeşitli zararlı etkilere sahiptir. Bu metallerin zararlı etkileri hücrel metabolizmada yer alan esansiyel metalleri taklit ederek metabolizmayı bozma yeteneklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Li vd. 2018). Her metal benzersiz bir toksikolojik profil sergilemektedir. Bu yaygın toksik mekanizmalar; esansiyel metallerin taklit edilmesi, oksidatif hasarın indüklenmesi ve metallerin nükleik asit yapısına veya proteinlerin yapısına katılması ile kendini göstermektedir (Keil vd. 2011, Rahman vd. 2019)

Ağır metal kirliliği, birçok faktöre bağlı olarak oluşan ağır metal kirliliği dünya çapında önemli bir çevresel tehlike haline gelmiştir (Abou-Elwafa vd. 2019). Ağır metaller, hızlı kentleşme, nüfus artışı ve sanayileşme nedeniyle çevre kalitesinin bozulmasına neden olan önemli faktörlerin başında gelmektedir (Rizwan vd. 2017). Ağır metal stresi, bitkiler de dahil olmak üzere canlılar üzerinde tehlikeli etkilere yol açan başlıca abiyotik streslerden biridir (Varma ve Jangra 2021). Potansiyel bir tehlike faktörü olan toksik metaller, bitkisel verimi ve üretimi azaltabilmekte ve ayrıca güvenli gıda bulunabilirliği için endişe verici durumlara neden olabilmektedir (Sinha vd. 2018). Ağır metal kirliliği, hızlı büyüyen sanayi bölgeleri, madencilik, endüstriyel atıklar, boyalar, tarım arazilerinde tekrarlanan gübre ve pestisit uygulamaları, kompost gübreler, atık su, kanalizasyon çamuru, kömür yakan elektrik santralleri, atmosferik çökme, petrokimyasalların rafine edilmesi ve dökülmesi gibi birçok faktörden meydana gelmektedir (Gupta vd. 2016). Su, hava ve toprakta bulunan ağır metaller, besin zinciri yoluyla bitki ve insan sağlığı için tehlike oluşturmaktadır (Bertucci vd. 2018). Toprakta artan ağır metal miktarı, bitki büyümesi, biyokütle, fotosentez, mahsul verimi ve bitkideki kaliteyi azaltabilen maddelerin bitkiler tarafından daha fazla alınmasına yol açmaktadır (Ramzani vd. 2016). Ağır metallerin varlığı bitki dokularında ve hücrelerinde biyokimyasal ve moleküler değişikliklere neden olmaktadır (Gamalero vd. 2009). Ayrıca ağır metaller su alımı, taşınması, terleme, besin metabolizması ve temel metallerin alımını etkilemektedir

(Benavides vd. 2005). Bitkilerdeki protein metabolizması, fotosentez, solunum ve morfogenez gibi farklı fizyolojik aktiviteler, doğal olarak ağır metal gibi yüksek konsantrasyondaki toksik bileşiklerden etkilenmektedir (Sidhu vd. 2017). Diğer streslere benzer şekilde metal toksisitesinin de ana etkisi, ağır metaller tarafından fotosentetik işlemin bozulması nedeniyle reaktif oksijen türleri (ROT)'nin açığa çıkmasıdır (Rascio ve Navari-Izzo 2011). ROT üretimi fizyolojik seviyeleri aştığında, bunların birikmesi hücrelerde lipid peroksidasyonu, makromoleküler bozulma, membran bozulması, DNA kırılması ve bitkilerde iyon sızıntısına neden olan oksidatif strese yol açabilir (Landi vd. 2019).

2.3 Krom Stresi

2.3.1 Kromun Kimyasal Özellikleri

Krom, Cr(III) ve Cr(VI) arasında değişen bir oksidasyon numarasına sahip, geçiş grubuna (VI-B) ait bir ağır metaldir. Trivalent Cr(III) ve heksavalent Cr(VI) türleri, çevredeki en kararlı ve yaygın formlardır (Dhal vd. 2013). Ara oksidasyon durumları yarı kararlıdır ve doğal olarak oluşmaz. Cr, kabuklu kayaların yaklaşık %0,037'sini oluşturur ve nispi doğal bollukta 21. sıradadır. En yaygın doğal olarak oluşan Cr(III), toprakta ve su ortamlarında bulunan organik maddelerle kompleks oluşturur. Kromik oksitler (Cr_2O_3), hidroksitler ($\text{Cr}(\text{OH})_3$) veya sülfatlar ($\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 12(\text{H}_2\text{O})$) olarak ortaya çıkar (Gill 2014). En zararlı Cr formu olan Cr(VI), Cr(III)'dan daha hareketli olup, güçlü bir oksitleme potansiyeline sahiptir. Cr(VI) kanserojen olup, A tipi kanserojen olarak sınıflandırılır (Subrahmanyam vd. 2018). Genellikle kromat (CrO_4^{2-}) veya dikromat ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) iyonları olarak oksijen ile ilişkilidir (Sultana vd. 2014). Cr(III)'a göre Cr(VI) suda daha fazla çözündüğünden biyolojik olarak daha fazla kullanılabilir ve organik madde ile kararlı kompleksler oluşturmaktadır (Langård ve Costa 2015). Cr(VI), asidik koşullarda Cr(III)'a dönüştürülebilir. Cr(III) oksijenli ortamda Cr(VI)'a oksitlenebilir. Ortam pH'sı, çözünmüş oksijen konsantrasyonu, indirgeyici ajanların varlığı ve kompleks oluşturu faktörlerin bir fonksiyonu olarak Cr(VI)/Cr(III) oranını belirler. Anoksik koşullar altında sadece Cr(III) mevcuttur. Cr(VI) pH 7'nin üzerinde ve Cr(III) ise pH 6'nın altındaki bir pH'ta baskındır. Cr(III) nötr veya bazik pH'ta çökerken asidik ortamda çözünür. Cr(VI)

tuzları tüm pH'larda çözünür, ancak iki değerlikli katyonlarla birlikte çökeltilir (Stanin ve Pirnie 2004).

2.3.2 Krom Alınımı ve Taşınımı

Bitkilerde, Cr alımı mekanizmaları hakkında soru işaretleri devam etmektedir. Cr esansiyel olmayan bir element olduğundan, bitkilerin Cr alımı için açık mekanizmalara sahip olmadığı düşünülmektedir (Zayed ve Terry 2003, Babula vd. 2008). Bitkilerde bu elementin absorpsiyonuna hem aktif hem de pasif taşıma sistemlerinin katıldığı fikri öne sürülmüştür (Hayat vd. 2012). Aktif taşımanın, düşük konsantrasyonlarda krom iyonlarının absorpsiyonundan sorumlu olduğu öne sürülürken, pasif kolaylaştırılmış difüzyon, yüksek konsantrasyonlarda krom alınımını teşvik etmektedir (Hayat vd. 2012). Cr(VI)'un temel olarak enerjiye bağlı bir taşıma yoluyla kökler tarafından absorplandığı, Cr(III)'un ise kolaylaştırılmış difüzyon yoluyla bitki hücresine nüfuz ettiği iyi bilinmektedir (Shah vd. 2010, Oliveira 2012). Cr dağılımı ve translokasyonu bitki türüne, Cr iyonlarının oksidasyon durumuna ve büyüme ortamındaki konsantrasyonuna bağlıdır (Shahid vd. 2017).

Kromun bitki köklerindeki hareketliliği diğer ağır metallere göre düşüktür. Bu nedenle köklerdeki Cr konsantrasyonu sürgünlerdekinden 100 kat daha fazladır (Shanker vd. 2005, Gupta ve Sinha 2006). Örneğin, *Pisum sativum* ve *Spinacia oleracea* L. cv. Banarasi'de yapılan çalışmalar sonucunda bitkilerin köklerinde yapraklara ve gövdelere kıyasla daha fazla Cr biriktiği bulunmuştur. *Lolium perenne*'de yapılan başka bir çalışmada, 0,50 mM Cr(VI) uygulanması sonucunda yapraklara kıyasla köklerde daha yüksek Cr birikimi olduğu gösterilmiştir (Vernay vd. 2007).

2.3.3 Krom Stresinin Bitki Gelişimi Üzerindeki Etkileri

Doğal olarak oluşan krom (Cr) ağır metali, dünyanın mantosunda en bol bulunan 7. element olup, deri tabaklama, baskı ve boyama ve elektrokaplama yaygın olarak kullanılmaktadır (Zayed ve Terry 2003, Singh vd. 2013, Lunk 2015). Yaygın endüstriyel kullanımı nedeniyle büyük miktarda Cr atığı sıvı, katı ve gaz şeklinde çevreye salınmakta

ve sonunda ekolojik çevreye ciddi zararlar vermektedir. Birçok çalışma, Cr'un bitkilerin kökleri, gövdeleri ve yaprakları için toksik olduğunu göstermiştir (López vd. 2014). Düşük bir Cr(III) konsantrasyonunun bitki büyümesini uyarabileceği bildirilmiş olmasına rağmen, yüksek konsantrasyonlarda Cr(III) ve Cr(VI) bitki büyümesini ciddi şekilde engelleyebilir. Genel olarak bitkilerde Cr(VI), Cr(III)'dan daha toksiktir (Srivastava 2021).

Cr'un bitki biyokimyasal ve morfofizyolojik süreçlerdeki toksik etkileri üzerinde birçok rapor bildirilmiştir (Ali vd. 2015, Jabeen vd. 2016, Kamran vd. 2016, Singh vd. 2022, Zaheer vd. 2022). Cr hücre metabolizmasını değiştirerek tohum çimlenmesinin inhibisyonuna neden olan çevresel bir faktördür (Ali vd. 2011, Kushwaha ve Singh 2020). Tohum çimlenmesi, Cr'dan etkilenen ilk fizyolojik süreç olduğundan, bir tohumun Cr içeren bir ortamda çimlenme yeteneği, bu metale tolerans seviyesinin göstergesi olarak kabul edilmektedir (Peralta vd. 2001). Cr stresi altında tohumların çimlenmesinin azalması, Cr'un şeker metabolizması üzerinde olumsuz bir etkisinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Zeid 2001). Cr stresinin proteaz aktivitesini artırdığı, bu durumun da tohum çimlenmesinde azalmaya neden olan faktörlerden biri olduğu rapor edilmiştir (Zeid 2001). Yabani ot *Echinochloa colona*'nın tohum çimlenme oranı 20 ppm Cr ile %25'e düşürülmüştür (Rout vd. 2000). Topraktaki yüksek seviyelerde (500 ppm) Cr(VI), *Phaseolus vulgaris*'te çimlenme oranını %48'e kadar azaltmıştır (Parr ve Taylor 1982). Sırasıyla 20 ve 80 ppm Cr muamelesinin şeker kamışında çimlenmeyi %32 ve %57 oranlarında azalttığı gözlenmiştir (Jain vd. 2000). İki tatlı su bitkisi, *Lemna minor* ve *Pistia stratiotes*, 1,5 mg/L veya 10 mg/L Cr(VI) içeren besin çözeltilerinde yetiştirildiklerinde büyümenin engellenmesine neden olduğu gösterilmiştir (Bassi vd. 1990). *Salvia sclarea* L. tohumlarına farklı Cr(VI) konsantrasyonları uygulandığında tohum çimlenmesinin Cr tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir (Corradi vd. 1993).

Krom, bitkilerin büyüme ve gelişmeleri için zararlı, son derece toksik bir ağır metaldir (Davies vd. 2002). Cr bitki morfolojisini ve bitki büyümesini engelleyerek geri dönüşü olmayan anatomik ve ultrastrüktürel değişikliklere neden olur (Do vd. 2018). Mineral beslenmede özellikle sülfat (SO_4^{2-}) ile rekabete girerek bitkiye alınmasına engel olduğu bildirilmiştir (Gill vd. 2015). Cr, bitkilerin sürgün uzunluğunu ve biyokütlesini etkiler

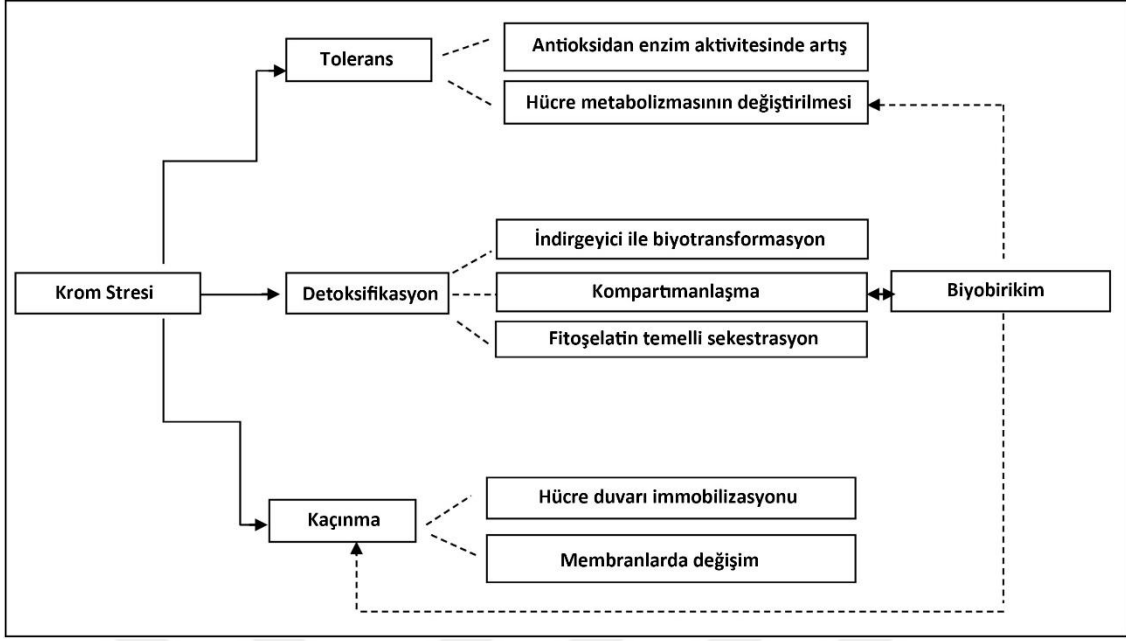
(Ding vd. 2019). Bitki kökleri Cr ile ilk temas eden organ olduğu için büyümeleri büyük ölçüde etkilenir. Birkaç çalışma, Cr (III ve VI)'un kök ve sürgün büyümesi ve biyokütle üzerindeki olumsuz etkisini göstermiştir (Harminder vd. 2013). Cr(III) stresi altında *Allium cepa*'nın kök büyümesinin azaldığı bildirilmiştir (Liu vd. 1992). *Helianthus annuus*'ta 100 μ M Cr(III)'un bitki boyu, yaprak yüzey alanı ve yaprak, sürgün, kök ve toplam bitki biyokütlesini azalttığı bulunmuştur (Davies vd. 2002). *Citrus aurantium* L.'da, 50 mg kg⁻¹ ve 200 mg kg⁻¹ Cr uygulaması toplam sürgün ağırlığının sırasıyla %39,3 ve %90,4 azalmasına neden olmuştur (Shiyab 2019). Tang vd. (2012), *Camellia sinensis* bitkisine 600 mg kg⁻¹ Cr(III) uyguladıklarında yavaş büyüme hızına sahip küçük gövde gözlemişlerdir. Cr(VI)'un hücre döngüsünü etkileyerek hücre bölünmesinin ve dolayısıyla kök büyümesinin inhibisyonuna yol açtığı bildirilmiştir (Sundaramoorthy vd. 2010). Azalan kök büyümesi, su ve besin emilimini azaltarak bitkilerin toprak üstü organlarına su ve mineral besin taşınmasının engellenmesi sürgün büyümesini de doğrudan engellemektedir (Harminder vd. 2013). Bitkinin Cr'a maruz kalmasının çap, yüzey alanı ve kök tüyü sayısı gibi belirli kök parametrelerini azalttığı ve ayrıca kök hücrelerinde solma ve plazmoliz nedeni olarak belirlendiği gösterilmiştir (Moral vd. 1995, Panda ve Choudhury 2005, Ali vd. 2011). Cr(III, VI; 500 μ g mL⁻¹) stresine maruz bırakılmış fidelerin, sert ve kırılkan dokulu, gövde ve yapraklarda kahverengi lekeler ile hipertrofi gösteren, sayısı azalmış kahverengi kök uçları, kök tüylerinin ve yan köklerin tamamen yok olduğu tespit edilmiştir (Hasnain ve Sabri 1997). Cr(VI)'un köklerde kahverengi renklenmeye, kök büyümesinin engellenmesine, kök tüylerinin oluşumunun bozulmasına ve yan kök büyümesinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Mallick vd. 2010). Cr(VI)'un sitotoksik etkilere ve DNA'da hasarlara neden olduğu belirlenmiştir (Chidambaram vd. 2009).

Krom stresi, CO₂ fiksasyonu, elektron taşınması, fotofosforilasyon ve enzim aktiviteleri açısından fotosentezi etkileyen önemli faktörlerden biridir (Clijsters ve Van Assche 1985). Bezelyeden izole edilmiş kloroplastlarda Cr(VI)'un PS II aktivitesine göre PS I üzerinde daha belirgin etkisi olduğu rapor edilmiştir (Bishnoi vd. 1993). Ayrıca Cr(VI)'a maruz kalmanın bezelye bitkilerinde hem kloroplast boyutunda hem de hacminde bir azalmaya neden olduğu gözlemlenmiştir (Rodriguez vd. 2012). Buna ek olarak, Cr kloroplastların hücre zar yapısında değişikliklere neden olarak fotosentezin

inhibisyonuna ve bitki yapraklarında nekroza neden olabileceği bildirilmiştir (Choudhury ve Panda 2005, Chidambaram vd. 2009, Tiwari vd. 2009, Ghani 2011, Scoccianti vd. 2013, Gill vd. 2015). Örneğin, 200 ve 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Cr(VI)'a maruz kalan *Brassica juncea* fidelerinden izole edilen tilakoitlerde, kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında daha fazla PSII aktivitesi gözlenmiştir (Gupta vd. 2009). 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Cr(VI)'a maruz kalan fidelerin tilakoitlerindeki PSI aktivitesi kontrollere benzerken, 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 'den fazla Cr(VI) konsantrasyonuna maruz kalan bitkilerdeki PSI aktivitesi kontrol fidelerine kıyasla daha düşük bulunmuştur (Gupta vd. 2009). Cr(VI) uygulanmış *Beta vulgaris* L.'den izole edilen kloroplastlar üzerinde yürütülen araştırmada hem PSI hem de PSII'de elektron taşıma aktivitesinin önemli bir inhibisyonu gözlemlenmiştir (Pandey vd. 2013). Cr toksisitesinin yapraklarda transpirasyon hızını %71, net fotosentez hızını %36, hücreler arası CO₂ konsantrasyonunu %36 ve stoma iletkenliğini %57 oranında önemli düzeyde azalttığı gözlemlenmiştir (Davies vd. 2002). Bu nedenle, klorofil floresansı, fotosentetik mekanizma ve PSII'nin ağır metal stresi altındaki etkisini incelemek oldukça faydalı bir araç gibi görünmektedir (Sharma vd. 2020). Arpa bitkisinde 150 μM Cr uygulamasının 30 gün sonunda fotosentetik oranı %50 kadar azalttığı bildirilmiştir (Ali vd. 2013).

2.3.4 Krom Toleransı ve Antioksidan Enzimler

Cr stresine yanıt, Cr'un detoksifikasyonunda yer alan ve dolayısıyla Cr toleransına yardımcı olan ortak yolları içermektedir. Cr stresine yanıt olarak ROT sinyali, artan antioksidan sistem, fitoşelatin üretimi, fito-sekestrasyon ve hücrelerin biyobirikim kabiliyetini kolaylaştıran farklı kompartımanlar gibi hücresel yollar tespit edilmiştir (Şekil 2.1) (Sinha vd. 2018).



Şekil 2.1 Krom toleransı ve detoksifikasyon mekanizmaları (Sinha vd. 2018’den değiştirilerek)

Cr toleranslı bitkiler, genel olarak bitkiler için inhibitör veya öldürücü olan Cr konsantrasyonları ile hayatta kalma yetenekleri temelinde kategorize edilebildiği bildirilmiştir (Singh vd. 2018). Antioksidan enzim aktivitesindeki artış, Cr stresine karşı önemli bir savunma mekanizması olarak kabul edilmektedir. Toksik seviyedeki Cr konsantrasyonu, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları yoluyla ve dolaylı olarak antioksidan enzimleri inhibe ederek ROT üretebilmektedir (Costa vd. 2010). Katalaz (CAT), peroksidazlar (POX), süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX) gibi antioksidan enzimlerin yüksek aktivitesi, Cr stresinde oluşan reaktif oksijen türlerinden (ROT) korur (Ganesh vd. 2008, Gill ve Tuteja 2010). Bu enzimler, serbest radikal zincir reaksiyonunu keserek oksidatif süreçleri inhibe eder veya yavaşlatır.

Cr tarafından indüklenen oksidatif strese yanıt olarak bitkilerde, metabolik havuzu değiştiren gen ifade seviyesinde değişiklikler olduğu bildirilmiştir (Shao vd. 2008). Glutasyon redüktaz (GR), Cr toleransında anahtar rol oynar. GR, fitoşelatin biyosentezi için bir substrat olarak, ROT süpürücü ve metal şelatör görev yapmaktadır. Bazı araştırmacılar, Cr stresinde askorbat-glutasyon yolağının ana enzimlerinden biri olan GR sentezinde artış olduğunu bildirmişlerdir (Foyer ve Noctor 2005, Anjum vd. 2012). GR proteini ($\cdot\text{OH}$ radikalının oluşumunu engelleyen) karakterize edilmiş ve bitkilerdeki ROT

yükünü azaltmak için transgenik bitkilerde kullanılmıştır (Shanker vd. 2005).

2.4 Selenyum

Selenyum (Se), kükürtün (S) kimyasal bir analogudur ve temel bir mikro besin olarak yaygın bir şekilde tanınmaktadır (Feng vd. 2013). Se'un bu özelliği, ona bitkiler tarafından alınabilme ve biyomoleküllerde kükürtün yerine kullanılabilme yeteneği verir (Handa vd. 2018a). Selenyum (Se), (+6), (+4), (0) ve (-2) oksidasyon durumlarında bulunan ve doğal olarak oluşan bir ametaldir. En oksitlenmiş formlar -selenat (SeO_4^{2-}) ve selenit (SeO_3^{2-}) suda çözünür ve bu nedenle her ikisi de çevrede yüksek derecede biyoyararlanım ve biyobirikim potansiyeline sahiptir (Saha vd. 2017).

Birçok çalışma Se'un detoksifikasyonda önemli bir rol oynayan temel bir eser element olduğunu göstermiştir. Se, antioksidan, antienflamatuar ve antiviral özelliklerine ek olarak bağışıklık artırma yeteneği ile insan, hayvan ve bitki sağlığında önemli bir rol oynar (Fang vd. 2019). Se ayrıca glutatyon peroksidaz ve tioredoksin redüktaz gibi antioksidan aktivitede görev alan önemli enzimleri oluşturan selenoproteinlerin önemli bir bileşenidir (Sabbagh ve Van Hoewyk 2012, Mangiapane vd. 2014). Se doğal olarak çoğu toprakta eser element olarak bulunmaktadır. Se'un adsorpsiyonu, translokasyonu ve dağılımı, bitkilerin türlerine, büyüme aşamalarına, Se'un türüne, dozuna ve toprağın fizyolojik koşullarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Ogra vd. 2017, Gao vd. 2018). Bitkilerde düşük Se konsantrasyonlarının, fotosentezi, ozmoproteksiyonu, oksidatif stresi, antioksidan seviyelerini ve metilglioksal detoksifikasyon sistemini değiştirerek bitkileri soğuk, sıcak, kuraklık, tuzluluk, UV-B radyasyonu ve toksik metaller dahil abiyotik streslerden koruyabileceği bildirilmiştir (Mroczek-Zdyrska vd. 2017, Zhu vd. 2017).

Se, çeşitli biyotik ve abiyotik stres altındaki bitkiler için faydalı bir element olarak, bitki büyümesini teşvik etmek, kök yapısını değiştirmek, hücresel yapı ve işlevi onarmak ve mineral beslenmeyi arttırmak gibi bitkilerde olumlu roller oynadığı gösterilmiştir (Jia vd. 2018). Se'un yapraklara uygulanmasının büyüme üzerindeki uyarıcı etkisi, çavdar (Hartikainen vd. 2000), marul (Xue vd. 2001), soya fasulyesi (Djanaguiraman vd. 2005)

ve yeşil çay yaprakları (Xu vd. 2003) üzerinde gösterilmiştir. Ek olarak, toprağa az miktarda Se ilavesi, patatesin genç yapraklarında (*Solanum tuberosum* L.) yumru verimini ve nişasta konsantrasyonunu artırmıştır (Turakainen vd. 2004). Ayrıca Brassica bitkilerinin tohum üretiminde de %43 artış olduğu gösterilmiştir (Lyons vd. 2009).

Se, çeşitli streslere karşı koruyucu rolü nedeniyle büyük önem kazanmıştır (Alyemeni vd. 2018). Se'un ağır metaller (Kumar vd. 2012), kuraklık (Hasanuzzaman ve Fujita 2011, Pukacka vd. 2011), UV-B (Yao vd. 2010), tuz (Hasanuzzaman vd. 2011), su (Wang 2011), yaşlanma (Hartikainen vd. 2000) ve yüksek sıcaklık (Djanaguiraman vd. 2005) gibi çeşitli çevresel streslerin zararlı etkilerini önlediği belirlenmiştir. Ayrıca araştırmacılar, ağır metallerin neden olduğu oksidatif stresin hafifletilmesinde Se'un faydalı rolünü göstermiştir (Filek vd. 2010, Han vd. 2015). Selenyum bir stres modülatörü olarak çalışır ve bir ROT söndürücü ve bir antioksidan olarak hareket ederek stres sırasında ROT birikimini engeller (Feng vd. 2013). Selenyum, stres altındaki bitkilerde ROT üretimini ve birikimini şu yollarla düzenleyebilir: (1) $O_2^{\bullet-}$ 'nin H_2O_2 'ye kendiliğinden dismutasyonunun uyarılması, (2) enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemlerin düzenlenmesi ve (3) Se türleri aracılığıyla ROT'un doğrudan söndürülmesi. Diğer bir olasılık, Se'un fotosentetik komplekslerin ve fotosentez makinelerinin bütünlüğü üzerindeki olumlu etkilerinde yatmaktadır ve bu da ROT üretiminde bir azalmaya yol açmaktadır (Feng vd. 2013, Chauhan vd. 2017).

2.4.1 Bitkilerde Selenyum Alınımı, Taşınması ve Metabolizması

Bitki kökleri selenyumu, selenat, selenit ve selenosistein (SeCys) ve selenometiyonin (SeMet) gibi organik selenyumlu bileşikler olarak topraktan alabilirler. Ancak bitkiler selenid türlerini veya elemental selenyumu topraktan direkt alamazlar (Chauhan vd. 2019). Bitkilerde Se alımı, Se türüne ve konsantrasyonuna ve ayrıca membran taşıyıcılarının aktivitesine bağlıdır (Zhao vd. 2005, Zhang vd. 2014). Selenat, selenyum ve sülfatın yapısal analogisinden dolayı sülfat taşıyıcılar aracılığıyla bitki hücrelerine girer (White 2016). Aslında, her tür sülfat taşıyıcısının bitkilerde Se alımı ve taşınmasında rol oynadığı varsayılmaktadır (Yoshimoto vd. 2003).

Se alındıktan sonra sülfat taşıyıcıları AtSULTR2;1, AtSULTR2;2 ve AtSULTR3;5 yardımıyla kökten sürgüne ksilem yoluyla taşınabilir (White 2016). Se'un plastidlere akışına AtSULTR3;1 aracılık edebilirken, AtSULTR4;1 ve AtSULTR4;2'nin, Se'un vakuollerden salınmasına izin veren taşıyıcılar olarak hareket ettiği önerilmiştir (Boldrin vd. 2016, White 2016). Çeltik tanelerinde Se alımı ve Se birikiminde *Oryza sativa* fosfat taşıyıcısının (OsPT2) rolünü bildirmiştir. OsPT2'nin aşırı ifadesinin Se alımını etkilediği bildirilmiştir (Zhang vd. 2014).

Se asimilasyonundaki ilk adım, inorganik Se'un selenite dönüştürülmesidir. Bilinen iki enzim olan ATP sülfürlaz (APS) ve APS redüktazın (APR) sıralı etkisini gerektirir. APS, APR tarafından selenite indirgenen adenzin fosfoselenatı oluşturmak için ATP'nin hidrolizini kataliz eder (Sors vd. 2005). Selenit daha sonra sülfid redüktaz tarafından selenide dönüştürülür. Bitkilerde bu adım glutatyon veya glutaredoksinler tarafından da azaltılabilir (Wallenberg vd. 2010). Selenid daha sonra sistein sentaz varlığında O-Asetil serin (OAS) ile birleşerek SeCys'e dönüştürülür. Sistein sentaz, sülfide kıyasla selenide daha fazla afiniteye sahiptir. Bitki türlerine ve çevre koşullarına bağlı olarak SeCys, enzim varlığında Se'a dönüştürülebilir. SeCys liyaz veya selenosistein metiltransferaz tarafından metil-SeCys'e (Me-SeCys) metillenebilir veya bir dizi enzim tarafından selenometiyonine (SeMet) dönüştürülebilir (Gupta ve Gupta 2017).

2.4.2 Bitkilerde Se Asimilasyonu

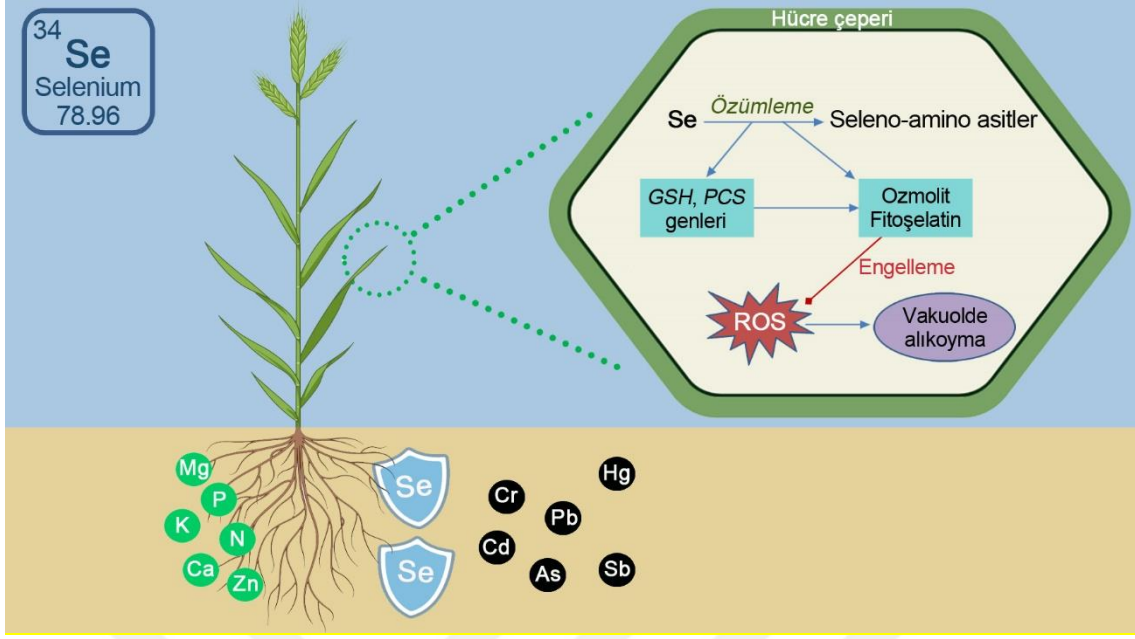
Selenyum, kök hücreleri tarafından alındıktan sonra sürgüne taşınır ve plastidlerde kükürt asimilasyon yoluyla SeCys veya SeMet'e metabolize edilir (Yu vd. 2019). Se'un asimilasyonu Şekil 2.2'de gösterilmiştir (Trippe III ve Pilon-Smits 2020).

karşın düşük konsantrasyonlarda uygulandığında önemli pozitif etkileri bildirilmiştir (Chauhan vd. 2017, Alyemeni vd. 2018). Son yıllarda, Se teşvikli abiyotik stres toleransının fizyolojik mekanizmaları incelenmiştir. Se'un abiyotik stres toleransına yönelik başlıca etkileri, fotosentez, antioksidan savunma ve daha yüksek su ve besin alımını iyileştirmesidir (Hawrylak-Nowak vd. 2018).

Bitkilerde metal toksisitesi, DNA metilasyonunu, DNA onarımını, antioksidan enzim aktivitesini, fotosentetik pigmentlerin bozunmasını ve sinyal yollarını olumsuz etkileyebilmektedir (Şekil 2.3) (Bücker Neto vd. 2017, Shahzad vd. 2018). Bitki hücrelerinde toksik metallerin absorblanabileceği ve taşınabileceği çeşitli yollar vardır (Dubey vd. 2018). Selenyumun bitkilerde Cr, Cd, As, Hg, Pb, Ni ve Sb gibi birçok toksik metali detoksifiye edebileceği bildirilmiştir (Huang vd. 2018, Li vd. 2018, Alam vd. 2019). Birçok çalışma sonucunda Se'un, antioksidan enzimlerin aktivitesinin düzenlenmesi ile oksidatif stresin azaltarak (Pereira vd. 2018), hücre zar yapısını ve işlevini yeniden düzenleyerek (Alyemeni vd. 2018), kloroplastları yeniden düzenleyerek (Alam vd. 2019), metal iyonlarının lokalizasyonunu ve türleşmesini değiştirerek (Li vd. 2018) ve topraklarda metal iyonlarının biyolojik kullanılabilirliğini sınırlandırılması ile toksik metallerin adsorpsiyonunu ve birikimini azaltarak (Huang vd. 2018) bitkileri metal toksisitesinden koruyabileceği bildirilmiştir (Łabanowska vd. 2012, Owusu-Sekyere vd. 2013, Sieprawska vd. 2015). Ağır metaller fotosentetik kapasitede azalmaya ve elektron taşıma bozukluklarına neden olduğundan, Se'un kloroplastlar üzerine koruyucu etkileri iki şekilde sağlanabilmektedir:

1) Kloroplastlarda lokalize olan protein-enzimler üzerinde doğrudan veya dolaylı olarak Se'un etkisi ile

2) Protein-enzimlerin aktivasyonunu destekleyen (sterik etkileşim ile) membran yapısının modifikasyonu (akışkanlık değişiklikleri) ile gerçekleştirir (Sieprawska vd. 2015).



Şekil 2.3 Se'un bitkilerdeki toksik metallerin etkilerinden bitkileri koruma şekli (Jiang vd. 2021'den değiştirilerek).

Hayvan hücrelerinde hem ağır metallerin hem de Se'un DNA metilasyon seviyesini etkilediği gözlemlenmiştir. Benzer olarak, bitkilere Se uygulamasının, yüksek ağır metal konsantrasyonlarının tetiklediği DNA metilasyonu önlediği gösterilmiştir (Filek vd. 2008). Diğer taraftan, Se ile uyarılan karbonhidrat konsantrasyonlarında ve Se iyonlarının mevcudiyetinde daha yüksek miktarlarda şeker sentezinde artış gözlemlenmiştir (Turakainen vd. 2004, Owusu-Sekyere vd. 2013). Bu bağlamda ağır metallerin neden olduğu oksidatif stres sonucu meydana gelen radikallerin inaktivasyonunda Se'un etkili bir iyileştirici olabileceği gösterilmiştir (Łabanowska vd. 2012).

Kromun, bitki büyümesini inhibe ederek, enzimatik fonksiyonu değiştirerek, moleküler hasara neden olarak ve mineral beslenmesini engelleyerek bitkilerde toksik etkiler oluşturduğu rapor edilmiştir (Sinha vd. 2018, Handa vd. 2019, Zhao vd. 2019a). Se'un Cr tarafından indüklenen oksidatif stresi hafifletmedeki yararlı rolü iyi bilinmektedir (Han vd. 2015, Chauhan vd. 2017, Alyemeni vd. 2018). Krom stresi altındaki *Brassica juncea* fidelerinde Se uygulamasının bitki büyümesini iyileştirdiği, pigment sistemini ve ozmotik sistemi değiştirdiği, prolin, glisin betain, trehaloz, fenoller ve flavonoidlerin içeriğini arttırdığı ve antioksidan savunma sistemini güçlendirdiği bildirilmiştir (Handa vd. 2018a, Handa vd. 2019). Ayrıca Se'un, şeker ve serbest amino asitlerin konsantrasyonlarını

yükselttiği ve dolayısıyla bitkilerde Cr'un fitotoksitesini azalttığı rapor edilmiştir. Diğer taraftan Se'un *Brassica juncea*'da Cr birikimini azaltırken, potasyum (K), sodyum (Na), kalsiyum (Ca) ve magnezyum (Mg) içeriğini artırdığı gösterilmiştir (Sinha vd. 2018). Krom stresi altındaki Çin lahanası bitkilerinde dışsal Se uygulamasının, Cr'un kök morfolojisi üzerindeki olumsuz etkilerini iyileştirdiği, köklerde Cr'un hücre içi dağılımını düzenlediği ve besin elementi alımını arttırdığı rapor edilmiştir (Zhao vd. 2019a).

Kadmiyum (Cd), bitkiler tarafından kolayca alınabilen bir ağır metaldir. Hidroponik ve saksı deneyleri, dışsal Se uygulamasının bitkilerdeki Cd içeriğini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (Shekari vd. 2019, Wu vd. 2020). Ayrıca Se'un Cd toksitesini hafifletebileceği bildirilmiştir (Ismael vd. 2019, Xu vd. 2020). Çeltikte selenitin Cd toksitesinin etkilerini azaltma yeteneği selenattan daha iyi olduğu bulunmuştur (Liao vd. 2016). Bununla birlikte, Se'un besin elementi alımı üzerine etkilerine ek olarak bitkilerin antioksidan ve fotosentetik yanıtlarını artırarak Cd toksitesini azalttığı bulunmuştur (Sepehri ve Gharehbaghli 2019, Amirabad vd. 2020). Selenyumun, toksik metallerin içsel alıkonulmasında ve detoksifikasyonunda fonksiyon gören ATP-sülfürlaz (Alyemeni vd. 2018), glutatyon (Tang vd. 2015), fitoşelatinler (Li vd. 2016) ve sistein (Khan vd. 2015a) gibi moleküllerin içeriğini arttırdığı belirtilmiştir. *Brassica napus* L. fidelerinde Se uygulaması ile fitoşelatin sentazın (*PCS1*) köklerde ve yapraklarda gen ifadesini artan yönde düzenlendiği, bu durumun da PC-Cd kompleksinin üretimini ve Cd toleransını arttırdığı bildirilmiştir (Ismael vd. 2018). Benzer şekilde, *Brassica napus* L.'de Se uygulaması, kök hücre duvarlarının pektin, hemiselüloz (Rahman vd. 2019) ve Cd içeriğini arttırmıştır (Ismael vd. 2018, Zhao vd. 2019b).

Arsenik [As(V)], fosfatın kimyasal bir analogu olduğu için bitkilerde fosfat taşıyıcıları tarafından alınmaktadır (Khalid vd. 2017). Toprağa Se uygulanmasının As(V)'in çeltik kökleri tarafından alımını engellediği bildirilmiştir (Pokhrel vd. 2020). Kumar vd. (2014), As stresi altındaki *Oryza sativa* bitkilerinde Se uygulamasının daha yüksek PC ve GSH içeriğine neden olduğunu bulmuşlardır. Bununla birlikte, yüksek seviyelerdeki GSH ve PC'nin, vakuolde depolanan toksik olmayan kompleksler (Aborode vd. 2016) oluşturmak için As ile daha verimli koordine olduğu bulunmuştur (Bakhat vd. 2017). Düşük dozlarda Se uygulaması, maş fasulyesi (*Vigna radiata*) (Alam vd. 2019) ve çeltikte çeşitli

enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanları (askorbik asit, prolin, GSH) düzenleyerek As tarafından indüklenen ROT'ların seviyesini azaltabileceği bildirilmiştir (Moulick vd. 2016, Singh vd. 2018).

Kurşun (Pb), çevredeki en yaygın ve tehlikeli toksik metaldir ve proteinlerin sülfhidril gruplarına güçlü bir şekilde bağlanabilmekte, enzimleri ve yapısal proteinleri bozabilmekte ve bitkilerde fitotoksositeye neden olabilmektedir (Nell ve Fein 2017). *Vicia faba* L. Pb toksisitesi, ROT üretimi ile güçlü bir şekilde ilişkili olan kök hücrelerin canlılığında önemli bir azalmaya yol açmıştır. Düşük dozlarda Se, çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların aktivitesini artırarak Pb tarafından indüklenen ROT seviyelerindeki artışı azaltarak köklerde hücre canlılığını iyileştirmiştir (Mroczek-Zdyrska ve Wojcik M 2012, Mroczek-Zdyrska vd. 2017).

Cıva (Hg) toksisitesi büyük ölçüde kimyasal formlarına, bu da sırasıyla taşınmasına, biyoyararlanımına ve dönüşümüne bağlıdır. Bitkilerde SeNP'ler (selenyum nanopartikül), Hg^{+2} 'nin kök stelesine erişmesini engelleyen Hg-Se ve Hg-SeNP'leri oluşturmak için Hg^{+2} ile koordine olarak rizosferde Hg iletimini ve birikimini baskıladığı rapor edilmiştir (Zhao vd. 2020). Aynı zamanda, SeNP'ler Hg^{+2} 'nin daha az toksik RS-Hg-SR ve R-Hg-R formlarına dönüşümünü de uyardığı belirtilmiştir (Zhao vd. 2020). Bu nedenle, Se'un Hg'nin toksisitesini hafiflettiği, çevrede veya rizosferde daha az biyolojik olarak kullanılabilir Hg-Se komplekslerinin oluşturarak gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Li vd. 2018, Bai vd. 2019).

Bununla birlikte, düşük dozlarda dışsal Se'un, klorofil konsantrasyonunu iyileştirdiği ve SOD, peroksidaz (POD), CAT ve glutatyon peroksidaz (GSHPx) gibi enzimlerinin aktivitelerini artırarak lahana büyümesini teşvik ettiği gösterilmiştir (Li vd. 2016). Dolayısıyla Se uygulanması, Hg'nin neden olduğu oksidatif stresi hafifletmiş ve bitkilerin Hg'ya toleransını iyileştirmiştir (Liu vd. 2016). Ayrıca Se uygulamasının, Hg-tiyollerden daha stabil olan Hg-selenol komplekslerinin oluşumunu baskılayarak, Hg'nin proteinler için toksik etkilerini azalttığı belirtilmiştir (Li vd. 2018).

2.5 Krom Stresinin Bitki Proteom Profilleri Üzerine Etkisi

Proteomik analizler, organizmaların proteomlarında biyolojik rahatsızlıkların veya dış uyaranların sonucu olarak meydana gelen varyasyonları karşılaştırırken değerli bilgiler verir, bu da farklı proteinlerin ifadesi veya hücreler içinde spesifik proteinlerin yeniden dağılımına neden olur (Tyers ve Mann 2003).

Wang vd. (2013), kısa süreli Cr(VI) uygulamasının (1, 6 ve 24 saat) mısır yapraklarında indüklediği protein ifade profilindeki değişiklikleri incelemiştir. İki boyutlu elektroforez ile tespit edilen 1200'den fazla protein beneğinden 60'ı Cr uygulaması sırasında farklı şekilde biriktirilmiş ve 58'i tandem kütle spektrometrisi ile tanımlanmıştır. Tanımlanan 58 protein, UniProtKB'de biyolojik süreçlerine göre sekiz gruba ayırmışlardır. En büyük grup, Cr stresine duyarlı proteinler olmak üzere ROT detoksifikasyonu ve savunma tepkisi (%26) ile ilgili 15, fotosentez ve kloroplast organizasyonu ile ilişkili 13 protein (%22), mRNA ve rRNA'nın transkripsiyon sonrası işlenmesinde yer alan 7 protein (%12), protein sentezi ve katlanmasıyla ilgili 6 protein (%10), DNA hasar tepkisi ile ilişkili 3 protein (%5) ve kalan üç protein grubunda mitokondriyal oksidatif fosforilasyon ve hücre iskeletinde, ayrıca çeşitli ve bilinmeyen proteinleri temsil ettiğini bildirmişlerdir.

Zeng vd. (2014)'nin pirinç üzerinde yaptığı bir çalışmada, Cr stresi altında diferansiyel olarak ifade edilen proteinlerin fotosentetik süreçlerle ilişkili olan toplam 29 protein tanımlamıştır. Farklı izoelektrik noktaları ve/veya molekül ağırlıklara sahip bu proteinlerin 25'inin ribuloz 1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz (RuBisCO) büyük alt birimleri olarak tanımlanmıştır (Zeng vd. 2014). Bu durumun nedeni, glikozilasyon ve fosforilasyon veya Cr stresi tarafından indüklenen bozunma gibi translasyon sonrası modifikasyonlara atfedilmiştir. Bu modifikasyonlar, proteinlerin izoelektrik noktaları veya molekül ağırlıklarını etkilemektedir (Hajduch vd. 2001, Li vd. 2014). Ayrıca, bu RuBisCO büyük alt birim proteinleri, Cr stresine yanıt olarak bazıları azalan yönde düzenlenirken, diğerleri artan yönde düzenlenmiştir (Zeng vd. 2014). Bu sonuçlar, Cr stresinin RuBisCO'nun yapısında ve ifadesinde önemli bir anormalliğe neden olduğu ve bunun yaprak fotosentezinde ciddi bir bozulmaya yol açacağını göstermiştir.

Sardar vd. (2022)'nin Cr ile muamele edilmiş *Helianthus annuus*'un RA-713 (S1) ve

AHO-33 (S2) çeşitlerinin tohumlarındaki protein profilinin SDS-PAGE analizi, kontrole göre önemli değişikliklerin ortaya çıktığını gözlemlenmiştir. Artan Cr konsantrasyonuna yanıt olarak ifadesinde farklılık gösteren 12 proteinden, S1 çeşidine ait beş protein (60, 48, 47, 42 ve 12 kDa) ve S2 çeşidine ait 59, 49, 27 ve 13 kDa'lık dört proteinin ifadelerinde anlamlı şekilde (>1.5 kat değişiklik) artış gözlemlenmiştir (Sardar vd. 2022). Aynı çalışmada hem S1 hem de S2 çeşidinde 52 kDa'lık bir proteinin sırasıyla 1.76 ve 1.87 olmak üzere yüksek ifade yüzdesine sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca Garcia vd. (2006), ayçiçeği yapraklarında Cr'a yanıt olarak 54 kDa protein bandı bulmuş, bu protein bandının büyük ribuloz-bisfosfat karboksilaz (RuBisCO) zinciri (54.07 kDa) ile ilişkilendirmiştir. Bu protein, yapraktaki fotosentetik süreçler sırasında Calvin döngüsüne (CO_2 fiksasyonu) katılır ve karboksilasyon oranı bu proteinin miktarına bağlıdır (Berg vd. 2002).

Sharmin vd. (2012), 500, 750 ve 1000 μM Cr stresi uygulanmış *Miscanthus sinensis* bitkisi ile yaptıkları çalışmada, ifadesinde en az 1,5 kat artış veya azalış gösteren 36 protein saptamışlardır. Mevcut çalışmada, protein benekleri farklı seviyelerde ifade edilmiştir: 13 protein artan yönde düzenlenirken, 21 protein ise azalan yönde düzenlendiği ve 2 proteinin ise yeni sentezlendiği ortaya konmuştur. Tanımlanan proteinler arasında, glikoliz yolunda yer alan iki enzim, enolaz ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH), 1000 μM Cr altında artan yönde düzenlenen GAPDH dışında önemli ölçüde azalan yönde düzenlenmiştir. Öte yandan, ATP sentaz ve dihidrolipoamid dehidrojenaz gibi mitokondriyal solunumda yer alan proteinlerin arttığı belirlenmiştir. Varsayılan bir mitokondriyal işleme peptidazı (MPP)'nın artan yönde düzenlendiği ve bu proteinin mitokondriyal protein üretiminde önemli bir rol oynadığı gözlemlenmiştir. Tüm uygulama gruplarında inositol monofosfataz (IMPaz) birikimi belirlenmiştir (Sharmin vd. 2012). Vakuolar taşıyıcıların bileşenlerini temsil eden üç protein 2 ila 25 kat artan yönde düzenlenmiştir. Azot metabolizması ile ilgili proteinlerden hem glutamin sentetaz (GS) hem de nitrat redüktaz azalan yönde düzenlenmiştir. Kitinaz ve NB-LRR proteini gibi savunmayla ilgili proteinler oldukça artmıştır. Yalnızca otlarda bulunan bir demir şelatlayıcı bileşen olan mugineik asidin (MA) biyosentezinde yer alan adenin fosforibosiltransferaz (APRT), format dehidrojenaz ve S-adenozil-1-metionin sentetazı (SAMS) temsil eden iki protein beneği azalan yönde düzenlenmiştir (Sharmin vd. 2012).

Hücre duvarı polisakkarit biyosentezi ile ilgili enzim UDP-glukoz dehidrojenaz (UDP-GlcDH) artan yönde düzenlenmiştir. Bu araştırmada proteinler varsayılan fizyolojik işlevlerine göre genel olarak birkaç gruba ayrılabilir: (1) Enerji ve metabolizma ile ilgili proteinler (2) vakuolar ATPazlar (3) ısı şok proteinleri (HSP'ler) gibi savunma ile ilgili proteinler (4) azot metabolizması proteinleri, (5) hücre bölünmesi ve (6) metal detoksifikasyonu ile bağlantılı stres sinyal proteinleridir (Sharmin vd. 2012).

Labra vd. (2006), *Zea mays* L. bitkilerine 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 900, 1200, 1500 ppm potasyum dikromat uygulayarak protein profillerinde farklı sentez durumları gösteren protein benekleri tanımlamışlardır. Toplam 22 protein, 100 ve 300 ppm potasyum dikromat ile muamele edilmiş numunelerde önemli ve tekrarlanabilir artan yönde düzenlendikleri belirtilmiştir. Bu proteinler, yapılarına göre sınıflandırılmış ve üç gruba ayrılmıştır: Antioksidan enzimler, şeker metabolizmasında rol alan proteinler ve diğer stres proteinleri. Mısırdaki, krom stresine yanıt olarak süperoksit dismutaz (SOD) ve 1-Cys peroksiredoksin/Rab 24 enzimlerinin artan yönde düzenlendiği tespit edilmiştir. Tespit edilen ikinci bir antioksidan protein olan 1-Cys peroksiredoksin/Rab 24, yalnızca bir sülfidril indirgeme sistemine bağlandığında peroksidaz olarak işlev gören tiyol spesifik bir antioksidan proteindir. Bu enzimler, hidroperoksitler ve alkil-hidroperoksitler gibi substratlar üzerinde etkilidir. Mısırdaki, 5-metiltetrahidrofolattan homosisteine bir metil grubunun transferiyle metionin oluşumunu katalize eden ve L-metionin ve ATP'den S-adenozil-L-metionini (SAM) sentezleyen S-adenozil-L-metionin sentetazlarının sentezinde artış gözlemlenmiştir. 100 ve 300 ppm potasyum dikromata maruz bırakılan bitkilerde, D-glisereldehit-3-fosfat dehidrojenaz (Martinez vd. 1989) ve alkol dehidrojenazın sentezinde artış tespit edilmiştir. Bu enzimlerin artan yönde düzenlenmesinin olası bir nedeni, kromun anaerobik duruma yol açan oksidatif strese neden olmasıdır (Labra vd. 2006).

Zemleduch-Barylska ve Lorenc-Plucińska (2016), *Salix viminalis* L. bitkisini fitotoksik seviyelerde Cr(III) (23,026 mg kg⁻¹ DW toplam ve 156 mg kg⁻¹ DW biyolojik olarak kullanılabilir Cr formları) içeren toprakta yetiştirmiştir. Uygulama grupları, kontrol ile karşılaştırılarak (iki kat değişim, p < 0,05 temelinde) yapraklarda 11 protein ve köklerde ise 30 protein tanımlamışlardır. Hem yaprak hem de köklerde, glikoliz ile ilgili

enzimlerde artış saptanmıştır. Köklerdeki mitokondriyal ATP sentaz alt birimi ve yapraklardaki inorganik pirofosfataz bolluğundaki değişiklikler, kromun oksidatif fosforilasyon süreci üzerindeki etkisini göstermiştir. Ayrıca yapraklarda, glikolizin toksik bir yan ürünü olan metilglioksalin bozunmasından sorumlu laktoilglutasyon liyaz bolluğunu da gözlemişlerdir. Çevresel stres sırasında önemli bir yol olan serin biyosentez (Muñoz-Bertomeu vd. 2009) reaksiyonlarından birini katalize eden D-3-fosfoglisarat dehidrojenazın yapraklardaki aşırı bolluğunu gözlemlemişlerdir. Krom stresine adaptasyon örneği olarak *S. viminalis*'de hücre duvarı bileşenlerinin biyosentezinde yer alan enzimlerin arttığı gözlenmiştir. Yapraklarda, duvar polisakkarit fraksiyonundaki değişiklikleri gösteren, fosfoglukozamin mutaz ailesinden fazla miktarda protein bulunmuştur. Bu durum, hücre duvarı işleyişinde, muhtemelen dış etkenlerden daha iyi korunmaya veya yapısında ksenobiyotiklerin tutulmasına yol açan değişikliklere işaret ettiğini bildirmişlerdir (Zemleduch-Barylska ve Lorenc-Plucińska 2016).

Zemleduch-Barylska ve Lorenc-Plucińska (2015), *Populus canescens* bitkisine fitotoksik seviyelerde Cr(III) (23,026 mg kg⁻¹ DW toplam ve 156 mg kg⁻¹ DW biyolojik olarak kullanılabilir Cr formları) içeren toprakta yetiştirmişlerdir. Kontrole göre uygulamalarda yapraklarda 20 protein ve ince köklerde 65 proteinin niceliksel değişiklik (1,2 kattan fazla) gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bazı PSII proteinlerinin (reaksiyon merkezi proteini psbP, oksijen çıkışı sağlayan kompleks 33 kDa alt birimi ve karbonat dehidrataz) azaldığını belirtmişlerdir. Oksijen gelişen kompleks 33 kDa alt birimi ve karbonat dehidratazdaki azalmanın CO₂ bağlanmasında bir azalmaya ve fotorespirasyon yoğunluğunun artmasına neden olabileceği bildirilmiştir (Kebeish vd. 2007, Zemleduch-Barylska ve Lorenc-Plucińska 2015). Ayrıca ABA reseptörü-CAPIP proteininin artan yönde düzenlendiğini göstermişlerdir. Yaygın olarak stres koşulları altında gözlenen ve artan enerji (ATP) ve indirgeyici maddeler (NADH) talebini gösteren fosfoglisarat kinaz, fosfoglisarat mutaz, aldoz 1 epimeraz ve triozfosfat izomeraz gibi glikolitik enzimlerin artan yönde düzenlendiğini gözlemlemişlerdir (Hossain vd. 2012, Zemleduch-Barylska ve Lorenc-Plucińska 2015). Yapraklarında ksenobiyotik detoksifiye edici enzimlerden tau ve phi sınıflarından glutasyon transferazların bolluğunu da saptamışlardır. eIF4A translayon faktörü, 40S ribozomal protein S12, 26S proteazom alt birimi ve vakuolar protein sıralama SNF7.2 ile ilişkili faktörde değişiklikler bulmuşlardır. Bu faktörlerin

çoğu, yaprak hücrelerinde protein moleküllerinin gelişmiş işlenmesini ve hareketini gösterebilecek şekilde artan yönde düzenlendiğini ifade etmişlerdir (Ghosh ve Xu 2014, Zemleduch-Barylska ve Lorenc-Plucińska 2015). Artan enerji talebinin bir sonucu olarak glikoz-1-fosfat adenililtransferazın ifadesinde azalma olduğunu bildirmişlerdir. Süksinil-CoA ligaz beta zinciri ve gama karbonik anhidraz 1'in ifadesinin artması ile muhtemelen trikarboksilik asit döngüsü ve oksidatif fosforilasyonun yoğunlaşmış olacağını ileri sürmüşlerdir. Adenozin kinaz (ADK) ve GDP-D-mannoz-30,5'-epimeraz (GME) ifadelerinin azaldığını gözlemledikleri için purin ve nükleotid şeker metabolizmasının yoğunluğunun da sınırlı olabileceğini belirtmişlerdir (Zemleduch-Barylska ve Lorenc-Plucińska 2015).

2.6 Krom Stresi Toleransında Rolü Olan Diğer Bileşikler

2.6.1 Brassinosteroidler

Brassinosteroidler (BR'ler), bitkilerde pleiotropik özelliklere sahip olan bitki steroid hormonlarının altıncı sınıfı olarak kabul edilir (Basit vd. 2021). Bitkileri çeşitli biyotik ve abiyotik stres koşullarında koruyabilirler. BR'lerin ekzojen talebi, bitkilerde stres toleransını artırır (Sirhindi 2013). Klorofil içeriğini koruyarak, antioksidan enzimleri artırarak ve strese tepki gen ifadesini artan yönde düzenleyerek bitki büyümesini iyileştirdiği bilinmektedir (Shahzad vd. 2018).

Shahzad vd. (2018) çeltik üzerinde yaptığı bir çalışma, tohumlara uygulanan brassinosteroidlerin tohum çimlenme özelliklerini iyileştirdiği ve klorofil içeriğini koruduğu, Cr alınımlı ve birikimini azaltıp mineral alınımlı artırarak, fizyo-biyokimyasal süreçleri tetikleyerek Cr'un her iki çeltik bitkisi çeşidi üzerindeki olumsuz etkilerini hafiflettiği bildirilmiştir. Brassinostreodiler antioksidan enzim aktivitelerinin yanı sıra Cr stresi altında ROT üretimini de azalttığını göstermişlerdir. Ayrıca brassinosteroidler Cr toksisitesi altında her iki çeltik çeşidinin toprak üstü organlarını iyileştirmiştir. Brassinosteroidler pirinç bitkilerinde Cr'un en kötü etkileriyle başa çıkma ve detoksifiye etme yetkinliğini sağladığını çalışmalarında bildirmişlerdir. Brassinosteroidler antioksidan enzim aktivitelerini uyarak Cr(VI) toksisitesini azaltmada önemli bir rol

oynadığını göstermektedir (Basit vd. 2021).

2.6.2 Silisyum

Silisyum (Si), bitkiler tarafından silisik asit olarak kullanan ve fazla biriktiğinde zararlı etkilere neden olmayan tek besin maddesidir (Ma ve Yamaji 2006). Si'un (silikon veya silisyum) bitkilerde çevresel streslerin etkisini azalttığı bildirilmiştir (Balakhnina vd. 2012, Farooq ve Dietz 2015). Abiyotik stres altındaki bitkilerde Si takviyesi ile çeşitli antioksidan enzimlerinin artan yönde düzenlendiği bildirilmiştir (Shi vd. 2016). Apoplastta silisik asit birikmesinin, çevresel streslere karşı bir savunma görevi gören amorf bir silika bariyeri oluşturduğu bildirilmiştir (Guerriero vd. 2016). Silisyum, pamuk (Khaliq vd. 2015), buğday (Tripathi vd. 2015) ve glayöl (Zaheer vd. 2018) gibi farklı bitkilerde ağır metallere karşı toleransı sağlamaktadır (Alam vd. 2021).

Alam vd. (2021) domates bitkilerinde krom toksisitesinin etkisini ve silisyumun hafifletici rolünü incelemek için yaptığı çalışmada, silisyum uygulaması sonucunda uygulama gruplarında bitki büyümesinin ve biyokütle veriminin arttığını göstermiştir. Krom stresine yanıt olarak yaprakta gaz değişiminin ve bağıl su içeriğinin azalması Si uygulaması sonucunda artış göstermiştir. Cr toksisitesi ile malondialdehit (MDA), hidrojen peroksit, (H_2O_2) ve elektrolit sızıntısı (EL) artarken, bunların Si uygulaması ile azaldığı belirlenmiştir. Krom stresi, metilglioksali (MG) birikimini %116,87 artırmış ancak Si takviyesi bu artışı tersine çevirmiştir. Silisyum, GlyI'yi (EC: 4.4.1.5) ve GlyII'yi (EC: 3.1.2.6) artırmış, böylece domates bitkilerine tolerans sağlamak için glioksalaz sistemini daha aktif hale getirdiğini göstermişlerdir.

2.6.3 Salisilik Asit

Fenolik bir bileşik olan salisilik asit (SA), bitkilerde biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı koruyucu etkisi olduğu bilinen doğal bir bileşiktir (Khan vd. 2015b). SA, bitki stomalarının kapanması ve terleme süreçlerinin, besin ve su alımının, protein sentezinin ve etilen biyosentezinin inhibisyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Jayakannan vd. 2015). SA uygulaması antioksidan sistemi ve prolin biyosentezini aktive

ettiği bildirilmiştir (Zewail vd. 2020). Daha spesifik olarak SA, farklı stres önleyici enzimleri indüklemek için bir sinyal molekülü olarak görevi görür ve bitkilerde Cr kaynaklı hücre zarı hasarını hafifletir (Faisal vd. 2016).

Zewail vd. (2020) malabar ıspanağına 0, 25, 50, ve 100 mg kg⁻¹ krom ve 0, 0,5, ve 1 M solüsyon salisik asit uygulayarak bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Sonuç olarak, SA antioksidan savunma sistemini indükleyerek Cr fitotoksitesini hafiflettiği bulunmuştur. En yüksek bitki uzunluğunun 1 M SA ve 0,5 M SA'da gözlemlendiğini belirtmişler. SA uygulanan bitkiler, kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında kök uzunluğunda önemli bir artış gözlenmezken, toplam taze biyokütle ve toplam kuru biyokütle ağırlıklarında artış gösterilmiştir. Cr stresi altında daha düşük SA konsantrasyonu uygulanması bile bitki büyümesinde, fotosentezde, biyokütle verimlerinde, prolin ve antioksidan enzim aktivitesinde önemli bir geri kazanım sağladıklarını göstermişlerdir. SA uygulamasının neden olduğu stres tolerans mekanizması, bitkilerin 100 mg kg⁻¹ Cr gibi daha yüksek toksik metal içeriği varlığında daha iyi hayatta kalmasına ve büyümeyi sürdürmesine yardımcı olabileceklerini söylemişlerdir.

2.6.4 Glutasyon

Glutasyon (γ -glutamatsistein-glisin, GSH), bitki oksidatif savunmasında ve metal detoksifikasyonunda önemli bir rol oynayan düşük moleküler ağırlıklı bir tiyol bileşiğidir (Seth vd. 2012). GSH, bitki hücrelerinde serbest krom içeriğini azaltan tiyol grubu (-SH) şelatlama mekanizmalarına sahip olarak Cr-GSH komplekslerinin oluşumuna yol açtığı bildirilmiştir (Hasan vd. 2016). Bir antioksidan olarak glutasyon, bitki fizyolojik aktivitesinin engellenmesini önleyen askorbat-glutasyon döngüsü (ASA-GSH döngüsü) yoluyla Cr-aracılı gelişmiş ROT oluşumunu nötralize ettiği bulunmuştur (Prado vd. 2016). Eksojen olarak glutasyon uygulamasının ağır metal stresine maruz kalmış bitki yapraklarının klorofil içeriğindeki azalmayı önemli ölçüde önleyebileceği ve toksik elementlere karşı toleransı artırabileceği bildirilmiştir (Fang vd. 2020, Nakamura vd. 2020).

Qiu vd. (2013) pirinç fidelerinde yaptığı çalışmada, eksojen glutasyon uygulamasının

krom taşınımını ve toksisitesini azalttığı gösterilmiştir. Krom stresinin, klorofilin ayrışmasını teşvik ettiğini, klorofil değerini (SPAD) düşürdüğünü, asimilasyon kabiliyetini zayıflattığını ve kuru ağırlığı azalttığını bildirmiştir. Uygulanan eksojen glutatyonun SPAD değeri ve kuru ağırlığı üzerindeki inhibisyonunun önemli ölçüde azaldığını gösterilmiştir.

Wen vd. (2022) soya fasulyesi üzerinde yaptığı çalışmada glutatyon inhibitörü (BSO) uygulayarak, iki soya fasulyesi çeşidinin köklerinde ve gövdelerinde krom tarafından indüklenen MDA, H₂O₂ ve O²⁻ içeriğini önemli ölçüde arttığını göstermişlerdir. Kromun neden olduğu reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi, genellikle MDA içeriğine yansıyan protein ve hücre zarı yıkımına yol açtığı için elde edilen sonucun önemli olduğu ifade edilmiştir. Bitkilerin toksik elementlerin stresine toleransı genellikle enzimatik (yani SOD, POD, CAT ve APX) reaksiyonun gücü ile ilgilidir (Reale vd. 2016, Wen vd. 2022). Wen vd. (2022)'nin yaptıkları çalışmada eksojen GSH, bazı çalışmalarla tutarlı olarak CAT, POD, APX ve SOD aktivitelerini kontrol koşulu altındaki seviyelere geri getirme eğiliminde olduklarını belirtmişlerdir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Bitki Materyali ve Bitki Yetiştirme Koşulları

Bu araştırmada, kolza (*Brassica napus* L.) çeşidine (Caravel) ait tohumlar ticari firmadan elde edilmiştir. Tohumlar, kapaklarında havalandırma delikleri bulunan plastik kutular içindeki ıslatılmış 2 kat filtre kağıdı üzerine yerleştirilmiş ve kontrollü koşullarda (25°C sabit sıcaklık ve karanlıkta) 48 saat süreyle çimlendirilmiştir. Yaklaşık aynı kök uzunluğuna sahip çimlenmiş tohumlar, 0.5 L Hoagland besin çözeltisi (pH'sı 0.05 M KOH kullanılarak 6.0 ± 0.1 'e ayarlanmış) içeren hidroponik kültür ortamına transfer edilmiştir. Hidroponik kültürde kullanılan 1 L'lik plastik kapların kapağında altı kesilmiş ve plastik fileden örgü ile kapatılmış 5 adet falkon tüpündeki filenin üzerine çimlenmiş tohumlar yerleştirilmiştir. Bu ortamdaki çimlenmiş tohumlar, kontrollü iklim kabininde ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, $260 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foton akış yoğunluğu, 12:12 saat fotoperiyot ve %60 nem) 7 gün boyunca büyütülmüştür.

Yedi günlük kolza fideleri, 10 μM Cr stresi [potasyum dikromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)] ve/veya 5 μM Se [sodyum selenit (Na_2SeO_3)]'un 4 farklı uygulamalarına (Şekil 3.1) 14 gün boyunca maruz bırakılmıştır. Uygulama grupları şunlardır:

- (1) Kontrol: Sadece besin çözeltisi
- (2) Se: 5 μM Se içeren besin çözeltisi
- (3) Cr: 10 μM Cr içeren besin çözeltisi
- (4) Se + Cr: 5 μM Se + 10 μM Cr içeren besin çözeltisi

Kaplardaki besin çözeltileri gün aşırı değiştirilmiştir.

Uygulamalardan sonra fide büyümesi, Cr birikimi, lipid peroksidasyonu, antioksidan enzimler ve proteom değişikliklerini belirlemek için fideler hasat edilmiştir. Lipid peroksidasyonu, antioksidan enzimler ve proteom analizleri için kolza fidelerinin 1. ve 2. yaprak dokuları örneklenmiş ve kullanılıncaya kadar -80°C 'de muhafaza edilmiştir.

Literatür taramaları dikkate alınarak etkili Cr (1-100 μM) ve Se (1-10 μM) test konsantrasyonlarını belirlemek için ön çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Cr konsantrasyonu

büyüme inhibisyonu temelinde 10 μM olarak belirlenmiştir. Etkili Se konsantrasyonu ise Cr'un neden olduğu büyüme inhibisyonunu azaltma etkisi temelinde 5 μM olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.1 Cr ve/veya Se'un farklı uygulamalarına maruz bırakılmış kolza fidelerinin genel görünümü.

3.2 Fidelerin Yaş ve Kuru Ağırlıklarının Belirlenmesi

Cr ve/veya Se'un farklı uygulamalarına maruz bırakılan kolza fidelerinin yaş ağırlıkları (YA, mg fide^{-1}) belirlendikten sonra 80°C'lik etüvde 48 sa süreyle kurutulmuş ve bu süre sonunda kuru ağırlıkları (KA, mg fide^{-1}) belirlenmiştir.

3.3 Krom Birikiminin Belirlenmesi

Cr ve/veya Se'un farklı uygulamalarına maruz kalan kolza fidelerinden örneklenen kurutulmuş toprak üstü ve kök dokularında Cr birikimi NMKL (1998)'ye göre belirlenmiştir. Fide doku örnekleri (0.5 g), 10 mL nitrik asit (HNO_3 , %65) kullanılarak mikrodalga fırında (Berghof Products + Instruments, Germany) yakılmıştır. Bu işlem sonunda doku örnekleri filtre edilmiş ve distile su ile son hacimleri 100 mL'ye tamamlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi, stok Cr çözeltisinden (1000 ppm; Inorganic Ventures, Christiansburg, Virginia, USA; CGCR(3)1-1, Lot # A2-CR03007) hazırlanan farklı konsantrasyondaki çözeltiler kullanılarak elde edilmiştir. Kalibrasyon

eğrisinin korelasyon katsayısı ($r^2 = 0.999$ ve üzeri) ve örneklerin Cr konsantrasyonları Winlab32 paket programı kullanan ICP/OES (Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry, Perkin Elmer 2100 DV) cihazı ile hesaplanmıştır. Cr için analitik belirleme limiti 0.05 mg L^{-1} olacak şekilde ayarlanmıştır. Cr birikimi $\mu\text{g g}^{-1}$ KA olarak hesaplanmıştır.

3.4 Malondialdehit İçeriğinin Belirlenmesi

Kolza fidelerinin yaprak dokularında lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) miktarının belirlenmesi Heath ve Packer (1968)'a göre yapılmıştır. Cr ve/veya Se'un farklı uygulamalarından elde edilen yaprak doku örnekleri (250 mg), trikloroasetik asit (TCA; 5 mL %5) ile homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar santrifüj ($+4^\circ\text{C}$, $12.000\times g$ ve 5 dakika) edilmiştir. Süpernatandan 250 μL alınarak üzerine tiyobarbitirik asit (TBA; %0.5) içeren TCA (%20) çözeltisi ilave edilmiştir. Bu karışım 95°C 'ye ayarlanmış sıcak su banyosunda 30 dakika tutulmuştur. Sıcak su banyosundan uzaklaştırılan örneklerdeki reaksiyonları durdurmak için tüpler buz banyosuna alınmıştır. Daha sonra test tüplerine (2 mL) alınan örnekler santrifüj ($10.000\times g$, 10 dakika) edilmiştir. Süpernatantlar kuvars küvetlere alınmış ve TU-1880 Double Beam UV-VIS spektrofotometrede 532 ve 600 nm dalga boylarında absorbanları ölçülmüştür. TBA (%0.5) içeren TCA (%20) çözeltisi kör (örnek içermeyen) olarak kullanılmıştır. Yaprak dokularının MDA içeriği molar ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak $\mu\text{mol g}^{-1}$ TA olarak belirlenmiştir.

3.5 Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Kolza fidelerinin yaprak dokularından 500 mg alınmıştır. Dokular 1 mM EDTA, %1 (w/v) polivinilpirolidon (PVP) içeren potasyum fosfat tamponunda (5 mL, 50 mM, pH 7.0) homojenize edilmiştir. Homojenat santrifüj ($+4^\circ\text{C}$, 14.000 rpm ve 20 dakika) edilmiştir. Elde edilen süpernatantlarda süperoksit dismutaz (SOD), guaiakol peroksidaz (POD) ve katalaz (CAT) aktivitesi belirlenmiştir. Süpernatantlardaki protein miktarının belirlenmesi Bradford (1976)'a göre yapılmıştır.

3.5.1 Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi

SOD (EC 1.15.1.1) aktivitesi, nitroblue tetrazolium (NBT) metoduna (Beauchamp ve Fridovich 1971) göre yapılmıştır. NBT'nin ışıktaki indirgenmesinin 560 nm'de ölçülmesi ile belirlenmiştir. Aktivite tayini için şu şekilde yapılmıştır:

- 1) 50 mM fosfat tamponu (pH 7.8), 0.1 mM EDTA, 13 mM metionin, 75 μ M NBT ve %1'lik Triton X-100 içeren karışıma 70 μ L enzim ekstraktı ilave edilmiştir.
- 2) Bu karışıma 2 μ M riboflavin eklenerek test tüpleri 10 dakika için beyaz ışık kaynağı altına yerleştirilmiş ve reaksiyon başlatılmıştır.
- 3) Örneklerin absorbans değerleri, 560 nm'de TU-1880 Double Beam UV-VIS spektrofotometre ile belirlenmiştir.
- 4) Bir ünite SOD, deneysel koşullar altında NBT indirgenmesinde %50 inhibisyona neden olan enzim miktarı olarak ifade edilmiştir.
- 5) Toplam SOD aktivitesi U mg^{-1} protein olarak hesaplanmıştır.

3.5.2 Guaiakol Peroksidaz (POD) Aktivitesi

POD (EC 1.11.1.7) aktivitesinin belirlenmesi Mika ve Lüthje (2003)'e göre yapılmıştır. Reaksiyon karışımı 25 mM sodyum-asetat-HCl (pH 5.0), 51.3 mM guaiakol, 12.5 mM H_2O_2 ve 10 μ L enzim ekstraktı içermektedir. Enzim ekstraktının ilavesiyle reaksiyon başlatılmış ve başlangıç ile 3 dakika sonundaki absorbans değerleri 470 nm'de ölçülmüştür. Toplam POD aktivitesi, guaiakolun ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein olarak belirlenmiştir.

3.5.3 Katalaz (CAT) Aktivitesi

Toplam katalaz aktivitesi (CAT; EC 1.11.1.6) Aebi vd. (1984)'ne göre belirlenmiştir.

- 1) Potasyum fosfat tamponu (50 mM, pH 7.0) ve H_2O_2 (10.6 mM) içeren reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.
- 2) Enzim ekstraktı (25 μ L) ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır.
- 3) H_2O_2 'in 3 dakika için 240 nm'de ($\epsilon = 39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bozunması ile CAT aktivitesi $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein olarak belirlenmiştir.

3.6 Proteomik Analizler

3.6.1 Protein Ekstraksiyonu

Fidelerin taze yaprak dokularından proteinlerin ekstraksiyonu aseton/TCA metoduna göre gerçekleştirilmiştir (Niu vd. 2018).

- 1) Yaprak örnekleri (1 g) sıvı azot kullanılarak havan içerisinde iyice öğütülmüş ve 10 mL ekstraksiyon tamponunda [%1 SDS, 0.1 M Tris-HCl (pH 6.8), 2 mM EDTA-Na₂, 20 mM DTT ve 2 mM PMSF (kullanımdan önce eklenmiştir)] homojenize edilmiştir.
- 2) Her bir uygulama grubu için üç tekrarlı olarak hazırlanan homojenatlar falkon tüplerine transfer edilmiştir.
- 3) Falkon tüpler 15.000×g'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatantlar yeni tüplere pipetlenmiş ve süpernatant: %20'lik soğuk TCA/aseton çözeltisi (1:1 oranında) eklenmiştir.
- 4) Karışım 30 dakika buz üzerinde tutulmuş ve sonra 3 dakika 15.000×g'de santrifüjlenmiş ve süpernatant atılmıştır.
- 5) Protein çökeltisi %80 aseton ile yıkandıktan sonra tekrar 3 dakika 15.000×g'de santrifüjlenmiştir. Yıkama adımı üç defa tekrarlanmıştır.
- 6) Yıkama sonrası elde edilen protein çökeltileri desikatörde kurutulmuş ve çalışılncaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.6.2 İki-Yönlü (2-D) Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Protein profillerindeki polimorfizmler iki-yönlü (2-D) poliakrilamid jel elektroforezi (İzoelektrik Fokuslama/Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi, IEF/SDS-PAGE) tekniği kullanılarak belirlenmiştir.

- 1) Elektroforezin birinci yönü olan IEF'de, IPG (immobilized pH gradient) stripleri (pH 4-7, 17 cm) kullanılarak proteinler Protean® i12™ IEF Cell (Bio-Rad) sisteminde izoelektrik noktalarına (pI) göre ayrıştırılmıştır.
- 2) Protein peletleri rehidrasyon tamponunda çözünmüş ve 1 saat laboratuvar koşullarında inkübe edildikten sonra 10 dakika 10.000×g'de santrifüj edilmiştir.
- 3) Görüntü analizleri için kullanılan analitik jellere 80 µg protein, kütle

spektrometrisi analizleri için kullanılan preparatif jellere 500 µg protein IPG striplerine yüklenmiştir.

- 4) Rehidrasyon işlemi, 16 sa oda sıcaklığında pasif olarak gerçekleştirilmiştir.
- 5) Rehidrasyon işlemini takiben IPG stripleri Protean IEF Cell sistemine transfer edilmiştir.
- 6) IEF işlemi toplamda 70.000 V olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

IEF'den sonra stripler 15 dakika dengeleme çözeltisi I [6 M urea, 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8, %2 (w/v) SDS, %20 (v/v) gliserol ve %2 (w/v) DTT] ve 15 dakika dengeleme çözeltisi II [6 M urea, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, %2 (w/v) SDS, %20 (v/v) gliserol ve %2.5 (w/v) iodoacetamide] ile muamele edilmiştir.

Dengeleme işleminden sonra ikinci yön olan SDS-PAGE basamağı Laemmli (1970)'ye göre gerçekleştirilmiştir:

- 1) IPG stripleri %12'lik akrilamid jelde (%30 akrilamid/bisakrilamid, 1.5 M Tris-HCl tamponu, pH 8.8, %10 SDS, %10 amonyum persülfat ve TEMED). 2-D elektroforez için PROTEAN II XL Cell (Bio-Rad) yürütülmüştür.
- 2) Protein standardı olarak 14.4-97.4 kDa aralığında SDS-PAGE standardı (Bio-Rad) kullanılmıştır.
- 3) 2-D jel elektroforezden sonra uygulamalara ait jeller boyama işlemlerine kadar fiksatif içerisinde saklanmıştır.

3.6.3 Jelleri Boyanması ve Görüntü Analizleri

Görüntü analizleri için analitik jeller gümüş boyama ile boyanmış ve protein benekleri görünür hale getirilmiştir (Çizelge 3.1) (Sinha vd. 2001).

Kütle spektrometrisi analizleri için hazırlanan preparatif jeller koloidal CBB (Coomassie Brilliant Blue) ile boyanmış ve protein benekleri görünür hale getirilmiştir (Neuhoff vd. 1988). Preparatif jeller %2 fosforik asit içeren %50'lik etil alkol çözeltisinde gece boyunca fikse edilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra jeller iki kez distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra jeller %0.12 CBB, %10 amonyum sülfat, %10 fosforik asit ve %20 metil alkol içeren çözeltide inkübe edilmiştir. Boyama işleminden sonra jel

zeminindeki fazla boyanın uzaklaştırılması için jeller birkaç kez distile su ile yıkanmıştır.

Gümüş ve CBB ile boyanmış jeller görüntüleme sistemine (ChemiDoc™ MP, Bio-Rad) yerleştirilmiş ve sentezinde farklılık gösteren (sentezi artan ve/veya azalan) proteinler PDQuest yazılımı (versiyon 8.0.1, Bio-Rad) ile saptanmış ve nispi hacimleri temelinde miktarları belirlenmiştir. Bir protein beneğinin miktarı, jel görüntüsünde beneği oluşturan tüm piksellerin toplam yoğunluğu olarak tanımlanan protein hacmi olarak ifade edilmiştir. Bununla birlikte, her bir protein beneğinin hacmi protein miktar tayini, örnek yükleme veya jel boyama basamaklarında meydana gelebilecek olası hataları telafi etmek için jelde bulunan tüm protein beneklerinin toplam hacminin yüzdesi olacak şekilde normalize edilmiştir.

Çizelge 3.1 Gümüş boyama yöntemi

Basamak	Çözelti	Süre
Hassaslaştırma	3 g/L potasyum tetratiyonat, 0.5 M potasyum asetat, %30 etanol	45 dk
Yıkama	Distile su	6 × 10 dk
Boyama	2 g/L gümüş nitrat	30 dk
Yıkama	Distile su	4 × 30 s
Geliştirme	30 g/L potasyum karbonat, 300 µL/L formaldehit (%40), 125 µL/L sodyum tiyosülfat (%10)	15-30 dk
Durdurma	40 g/L Tris, 20 mL/L asetik asit	30 dk

3.6.4 Jeldeki Proteinlerin Tripsin ile Kesimi

CBB boyalı jellerde, sentezinde farklılık gösteren (sentezi artan ve/veya azalan) protein benekleri EXQuest Spot Cutter (Bio-Rad) cihazı kullanılarak kesilmiş ve 0.6 mL'lik steril ependorf tüplere alınmıştır. Protein beneklerinin triptik kesimi için In-Gel Tryptic Digestion Kiti (Thermo Scientific) kullanılmıştır. Kesilen jel parçalarındaki fazla boyanın uzaklaştırılması için 2 g/L amonyum bikarbonat içeren %50'lik asetonitril çözeltisi kullanılmış ve bu işlem 37°C'de 30 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir. Boya uzaklaştırma çözeltisi tüplerden uzaklaştırıldıktan sonra indirgenme ve alkilasyon basamaklarına geçilmiştir. İndirgenme basamağı için jel parçacıkları 50 mM Tris(2-karboksietil) fosfin

  zeltisi içeren 2 g/L amonyum bikarbonat çözeltisi ile 60 C’de 10 dakika muamele edilmiştir. Bu periyot sonunda indirgenme çözeltisi uzaklaştırılmış ve alkilasyon için jel parçacıkları 100 mM iodoasetamid ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Alkilasyon tamponu uzaklaştırdıktan sonra jel parçaları 2 g/L amonyum bikarbonat %50 asetonitril çözeltisi ile 37 C’de 15 dakika muamele edilmiştir. Jel parçalarını dehidrate etmek için örnekler konsantre asetonitril ile oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. Asetonitril   zeltisi uzaklaştırdıktan sonra örnekler oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra kurutulmuş jel parçacıkları üzerine aktive edilmiş tripsin (10 ng/ L) eklenmiş ve 30 C’de gece boyunca inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda tüpler içerisindeki çözelti yeni bir tüpe alınmış ve vakum konsantratör (Eppendorf, Germany) ile kurutulmuştur. Daha sonra kurutulmuş örnekler 10  L %0.1’lik trifloroasetik asit (TFA) ile yeniden süspanse edilmiş ve kütle spektrometrisi analizlerinde kullanılmaya kadar –20 C’de saklanmıştır.

3.6.5 Kütle Spektrometrisi Analizleri

Kütle spektrometrisi analizleri için %0.1’lik TFA’da çözünmüş peptidler ZipTip C₁₈ (Millipore, Bedford, MA, USA) kullanılarak konsantre hale getirilmiştir. Peptid çözeltileri, %50 asetonitril ve %0.1 TFA ile doyurulmuş 10 mg L⁻¹  -siyano-4-hidroksisinnamik asit (matriks) ile karıştırılmıştır. Daha sonra yaklaşık 1  L   zelti MALDI plakasına yerleştirilmiş ve kuruması sağlanmıştır. Kütle spektrometrisi analizleri AB Sciex TOF/TOF 5800 kütle spektrometrisi cihazı (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kütle spektrumu (m/z 800–3000) pozitif iyon reflektör modunda elde edilmiştir. Bir protein beneği için MS modundan elde edilen 10 pik, MS/MS fragmentasyonu için seçilmiştir. MS/MS modu 1 kV’lık çarpışma (collision) enerjisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çarpışma teşvikli fragmentasyon için çarpışma gazı olarak hava kullanılmıştır.  nc  MS spektrumları için internal kalibrasyon olarak otolitik tripsin peptidleri kullanılmıştır. Glu-Fib fragmentleri ile elde edilen eksternal kalibrasyon ise MS/MS spektrumlarına uygulanmıştır. MS verileri GPS Explorer (Applied Biosystem) ve MASCOT (Matrix Science, London, UK) yazılımları kullanılarak veri tabanlarına karşı taranmıştır. Protein tanımlamada seçilen tarama parametreleri  izelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Protein tanımlamada seçilen tarama parametreleri

Parametre	
Enzim	Tripsin
Değişken modifikasyonlar	Metiyonin oksidasyonu
Sabit modifikasyonlar	Sistein karbamidometilasyonu
Peptid toleransı	50 ppm
MS/MS toleransı	0.4 dalton
Taksonomi	Viridiplantae (Yeşil bitkiler)
Cihaz	MALDI-TOF/TOF

Veri tabanı araması SwissProt ve NCBI'nin protein veri tabanına karşı yapılmıştır. MS/MS verilerine göre önemli düzeyde yüksek MASCOT skorlarına (güven aralığı %95'den daha büyük) sahip protein, güvenilir şekilde tanımlanmış protein olarak kabul edilmiştir.

3.7 İstatistikî Analizler

Denemeler, rastgele deneme deseninde düzenlenmiştir. Denemelerden elde edilen veriler en az üç tekrarlı olarak düzenlenmiş iki bağımsız denemeden elde edilmiştir. Analizlerden elde edilen veriler SPSS paket programı (SPSS ver. 22, Chicago, IL, USA) kullanılarak analiz edilmiştir. Proteomik analizler hariç, diğer tüm analizlerden elde edilen ortalamalar arasındaki önemli farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir ($P < 0.05$).

4. BULGULAR

Mevcut tez çalışmasında Cr stresine maruz bırakılan kolza fidelerinde Se'un iyileştirici etkisi değerlendirilmiştir. Bu bağlamda, yaş ve kuru ağırlıkları (sırasıyla YA ve KA), kök ve gövdede Cr birikimi, lipid peroksidasyonu, bazı antioksidan enzimlerin (SOD, POD, CAT ve APX) aktiviteleri ve proteom profilleri analiz edilmiş ve değerlendirilmiştir.

4.1 Selenyum Teşvikli Krom Stresinin Büyüme Üzerine Etkisi

Cr (10 μ M) ve/veya Se (5 μ M)'un farklı uygulamalarına maruz kalan kolza fideleri krom stresinden önemli düzeyde etkilenmiştir. Se'un Cr stresine karşı toleransı arttırdığı ve fide büyüme ve gelişmesini önemli düzeyde olumlu etkilediği belirlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Cr ve/veya Se'un farklı uygulamalarından elde edilen kolza fideleri.

Cr varlığında kolza fidelerinin büyümesi, yaş ve kuru ağırlıkları bakımından

değerlendirildiğinde önemli düzeyde azalmıştır (Çizelge 4.1). Cr stresi, kontrole kıyasla yaş ağırlığı %48 ve kuru ağırlığı %40 azaltmıştır. Cr stresinin fide büyümesi üzerindeki olumsuz etkileri Se uygulaması ile azaltılmıştır. Se+Cr uygulaması, Cr uygulamasına göre yaş ağırlığı %31,8, kuru ağırlığı ise %31,5 artırmıştır. Tek başına ekzojen Se takviyesi de kontrole kıyasla büyümede hafif bir artışa neden olmuştur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Kolza fidelerinde büyüme ve Cr birikimi üzerine Cr (10 μ M) ve Se (5 μ M)'un farklı uygulamalarının etkisi

Uygulamalar	Yaş ağırlık (mg fide ⁻¹)	Kuru ağırlık (mg fide ⁻¹)	Kök Cr birikimi (μ g g ⁻¹ KA)	Gövde Cr birikimi (μ g g ⁻¹ KA)
Kontrol	626 $\pm$ 41 ^a	35.2 $\pm$ 3.0 ^a	ND	ND
Se	665 $\pm$ 42 ^a	39.3 $\pm$ 1.9 ^b	ND	ND
Cr	325 $\pm$ 21 ^c	21.3 $\pm$ 0.9 ^d	1.476 $\pm$ 53 ^a	11.0 $\pm$ 1.2 ^a
Se+Cr	429 $\pm$ 33 ^b	28.0 $\pm$ 2.0 ^c	1.422 $\pm$ 131 ^a	5.23 $\pm$ 0.5 ^b

Farklı harfler DMRT'ye göre önemli düzeydeki farkı gösterir (P < 0.05). ND = Belirlenemeyen.

4.2 Selenyum Teşvikli Krom Stresinin Cr Birikimi Üzerine Etkisi

Kolza fidelerinde Cr ve/veya Se'un farklı uygulamalarının Cr birikimi üzerindeki etkileri Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Kontrol ve Se uygulanmış kolza fidelerinde, Cr seviyeleri tespit limitlerinin altında olduğu için belirlenememiştir. Bununla birlikte, fideler 10 μ M Cr'a maruz bırakıldığında, fidelerin hem köklerinde hem de gövdelerinde Cr birikimi önemli düzeyde artmıştır. Se varlığında gövdelerde Cr birikimi, tek başına Cr uygulamasına kıyasla %52 oranında önemli düzeyde azalmıştır (Çizelge 4.1).

4.3 Selenyum Teşvikli Krom Stresinin Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi

Yapraklardaki lipid peroksidasyon seviyeleri MDA içerikleri ile tahmin edilmiştir. 10 μ M Cr'un varlığı, kolza tohumu fidelerinin yapraklarındaki MDA içeriğini açıkça artırmıştır (Çizelge 4.2). Bununla birlikte, Cr kaynaklı MDA içeriğindeki artış, besine Se ilavesi ile azaltılmıştır.

Tek başına Se takviyesinin antioksidan enzimlerin aktivitelerinde önemli bir değişikliğe yol açmadığı ve istatistiksel olarak kontrollere benzer olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Kolza fidelerinde büyüme ve Cr birikimi üzerine Cr (10 μ M) ve Se (5 μ M)'un farklı uygulamalarının MDA içeriği ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisi

Parametreler	Uygulamalar			
	Kontrol	Se	Cr	Se+Cr
MDA içeriği <i>nmol g⁻¹ TA</i>	21.4 $\pm$ 0.84 ^a	21.9 $\pm$ 1.04 ^a	30.4 $\pm$ 0.62 ^b	23.7 $\pm$ 0.97 ^a
SOD aktivitesi <i>Unit mg⁻¹ protein</i>	33.2 $\pm$ 2.86 ^a	34.7 $\pm$ 4.28 ^a	44.9 $\pm$ 5.86 ^a	122.6 $\pm$ 2.97 ^b
POD aktivitesi <i>μmol min⁻¹ mg⁻¹ protein</i>	10.9 $\pm$ 0.60 ^a	11.2 $\pm$ 1.11 ^a	12.3 $\pm$ 2.42 ^a	40.6 $\pm$ 1.75 ^b
CAT aktivitesi <i>μmol min⁻¹ mg⁻¹ protein</i>	0.256 $\pm$ 0.012 ^a	0.216 $\pm$ 0.022 ^a	0.071 $\pm$ 0.015 ^b	0.246 $\pm$ 0.024 ^a
APX aktivitesi <i>μmol min⁻¹ mg⁻¹ protein</i>	3.60 $\pm$ 0.29 ^a	3.35 $\pm$ 0.43 ^a	0.79 $\pm$ 0.17 ^c	1.92 $\pm$ 0.10 ^b

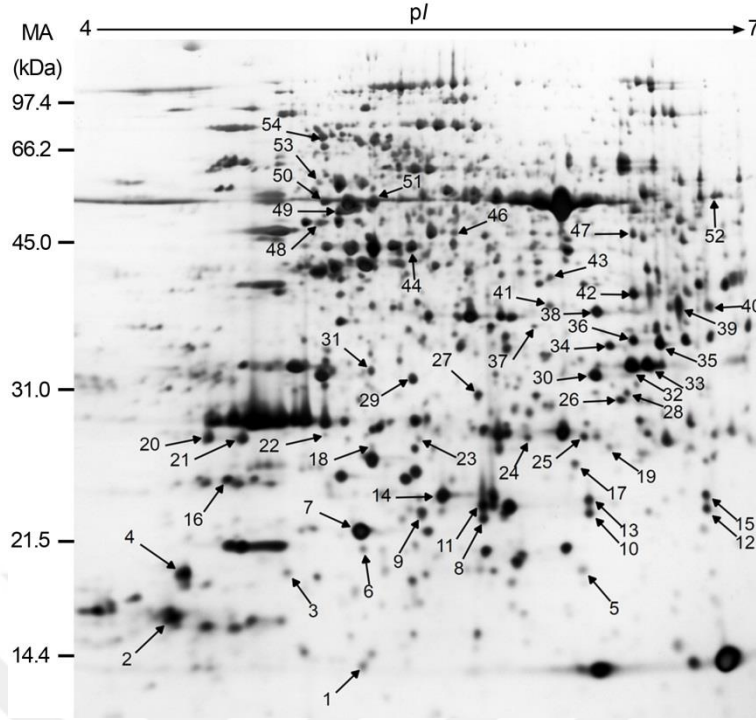
Farklı harfler DMRT'ye göre önemli düzeydeki farkı gösterir (P < 0.05).

Kontrol ile karşılaştırıldığında, Cr stresi CAT ve APX aktivitelerini önemli ölçüde azaltırken, SOD ve POD aktivitelerinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Se+Cr uygulamasında CAT aktivitesi kontrol seviyesine ulaşırken, tek başına Cr stresine kıyasla APX aktivitesinde 2.4 kat artışa neden olmuştur. Cr ile muamele edilmiş fidelerle karşılaştırıldığında, Se takviyesi SOD ve POD aktivitelerinde sırasıyla 2.7 ve 3.3 kat artışlarla sonuçlanmıştır (Çizelge 4.2).

4.4 Selenyum Teşvikli Krom Stresinin Proteom Profili Üzerine Etkisi

Kontrol, tek başına Se ilavesi, tek başına Cr stresi ve Se ve Cr'un (Se+Cr) birlikte uygulanması dahil olmak üzere dört deney grubunun proteom değişikliklerinin genel görünümünü elde etmek için jel temelli bir proteomik yaklaşım kullanılmıştır. Her jelde 500'den fazla protein benekleri tekrarlanabilir şekilde tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Artan birikim için $\geq 2,0$ kat ve azalma için $\leq 0,5$ kat değişim eşiğine sahip protein jelleri karşılaştırıldığında, 60 protein Cr ve/veya Se uygulamalarında farklı bolluk sergilemiştir. Elli dört benek

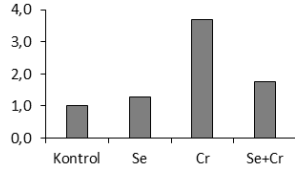
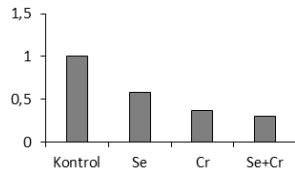
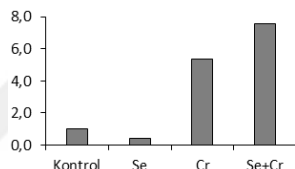
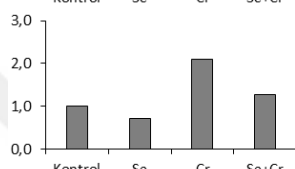
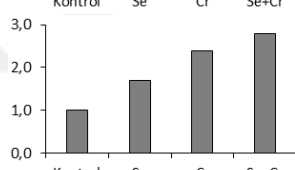
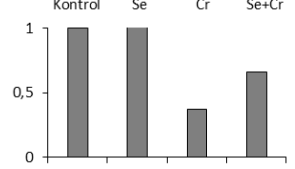
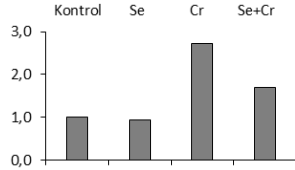
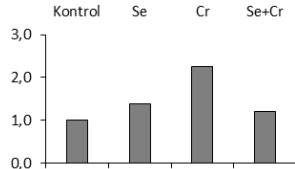
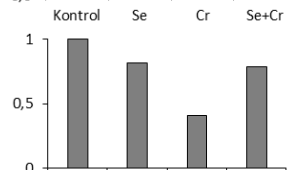
kütle spektrometrisi ile başarılı bir şekilde tanımlanmıştır (Çizelge 4.3).



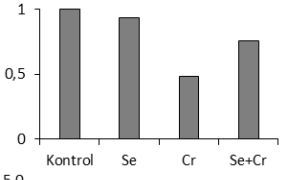
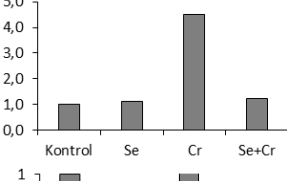
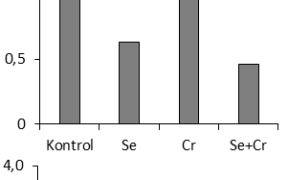
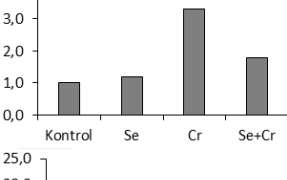
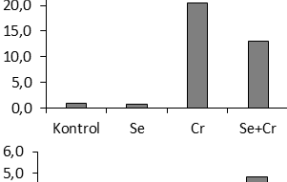
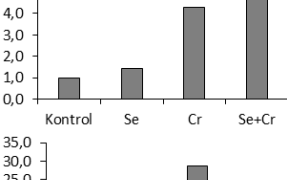
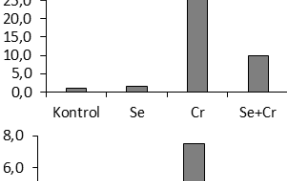
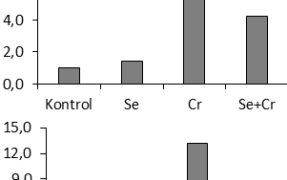
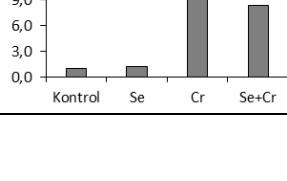
Şekil 4.2 Cr ve/veya Se'un farklı uygulamalarına maruz bırakılan kolza fidelerinin proteomlarındaki değişimlere ait temsili protein profili.

Bu proteinler arasında 44 protein artan yönde düzenlenmiş ve 10 protein Cr stresi ve/veya Se muamelesi ile azalan yönde düzenlenmiştir. Kontrol ile karşılaştırıldığında, eksojen Se, 5 proteinin seviyesini değiştirdi: Üç protein artan yönde düzenlenmiş ve ikisi azalan yönde düzenlenmiştir. Cr stresi altında, toplam 42 protein kontrole kıyasla önemli bolluk değişiklikleri sergilemiş, 35 proteinin protein seviyeleri artan yönde düzenlenmiş ve 7 protein azalan yönde düzenlenmiştir. Cr stresi ile karşılaştırıldığında, Se+Cr tedavisi 42 proteinin bolluğunu değiştirmiştir: Protein seviyelerinde 14'ü artmış, 28'i azalmıştır. Ancak Cr stresi altında bolluğu azalan 7 proteinin bolluğu eksojen Se uygulaması ile artmıştır (Şekil 4.2, Çizelge 4.3). Diferansiyel olarak ifade edilen proteinlerin farklı biyolojik süreçlerde ve moleküler fonksiyonlarda yer aldığı belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Bu proteinler, fotosentez ve karbohidrat biyosentezi (%48,1), strese yanıt (%27,8), protein metabolizması (%11,1), enerji metabolizması (%3,7), çeşitli işlevlere sahip diğer proteinler (%7,4) ve bilinmeyen fonksiyonlara sahip protein (%1,9) olmak üzere başlıca 6 gruba ayrılmıştır. Protein-protein etkileşimlerini tahmin etmek için çevrimiçi araç olarak STRING kullanılmıştır (Şekil 4.3).

Çizelge 4.4 Selenyum ve/veya Cr uygulamalarına maruz bırakılan arpa fidelerinin yaprak dokularında MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ile tanımlanmış proteinler

Benek	Protein	Aksesyon numarası	Skor	MA p1	Dizi örtüşmesi	Eşleşen peptit	İfade seviyesi
Fotosentez ve karbohidrat biyosentezi							
2	ATP sentaz epsilon altbirimi Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	ATPE_ARATH	525	14.4 5.03	%39	14	
5	Sitokrom b _{6f} kompleksi demir-kükürt altbirimi Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	UCRIA_ARATH	190	24.4 8.80	%36	10	
7	RuBisCO büyük altbirim <i>Brassica oleracea</i>	RBL_BRAOL	420	52.9 5.88	%22	16	
9	ATP sentaz delta altbirimi Kloroplastik <i>Spinacia oleracea</i>	ATPD_SPIOL	54	27.7 5.80	%5	2	
14	Klorofil a-b bağlayıcı protein 6A Kloroplastik <i>Solanum lycopersicum</i>	CB11_SOLLC	147	26.0 5.83	%15	6	
18	Klorofil a-b bağlayıcı protein 8 Kloroplastik <i>Solanum lycopersicum</i>	CB13_SOLLC	86	29.3 8.96	%13	5	
20	Klorofil a-b bağlayıcı protein 13 Kloroplastik <i>Solanum lycopersicum</i>	CB23_SOLLC	76	28.6 5.09	%11	3	
21	Klorofil a-b bağlayıcı protein 13 Kloroplastik <i>Solanum lycopersicum</i>	CB23_SOLLC	70	28.6 5.09	%6	4	
24	Ribuloz-fosfat 3-epimeraz Kloroplastik <i>Solanum tuberosum</i>	RPE_SOLTU	53	29.9 7.71	%16	6	

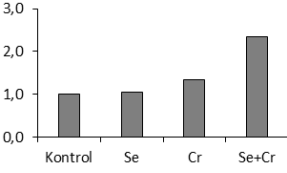
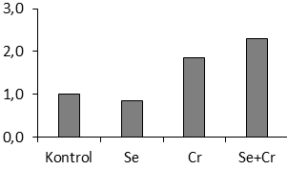
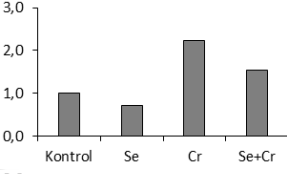
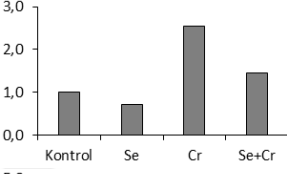
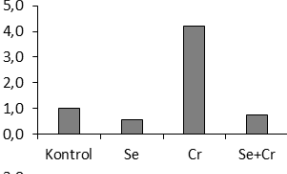
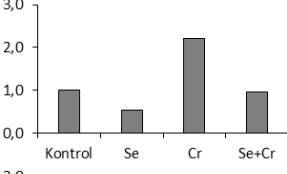
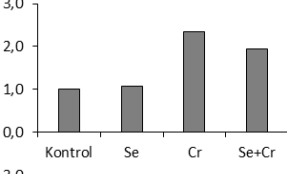
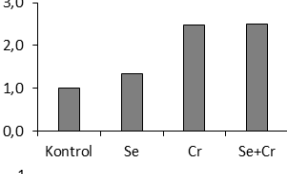
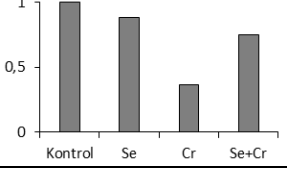
Çizelge 4.4 Devamı

Benek	Protein	Aksiyon numarası	Skor	MA pI	Dizi örtüşmesi	Eşleşen peptit	İfade seviyesi
Fotosentez ve karbohidrat biyosentezi							
25	Karbonik anhidraz Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	CAHC_ARATH	79	37.4 5.74	%19	10	
26	RuBisCO büyük altbirim <i>Brassica oleracea</i>	RBL_BRAOL	336	52.9 5.88	%26	22	
27	Karbonik anhidraz Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	CAHC_ARATH	143	37.4 5.74	%26	11	
28	RuBisCO büyük altbirim <i>Brassica oleracea</i>	RBL_BRAOL	83	52.9 5.88	%19	13	
30	RuBisCO büyük altbirim <i>Brassica oleracea</i>	RBL_BRAOL	556	52.9 5.88	%42	26	
32	RuBisCO büyük altbirim <i>Morus rubra</i>	RBL_MORRU	252	51.6 6.00	%35	17	
33	RuBisCO büyük altbirim <i>Arabidopsis thaliana</i>	RBL_ARAHI	277	52.9 5.88	%37	19	
34	RuBisCO büyük altbirim <i>Brassica oleracea</i>	RBL_BRAOL	323	52.9 5.88	%29	28	
35	RuBisCO büyük altbirim <i>Brassica oleracea</i>	RBL_BRAOL	461	52.9 5.88	%39	28	

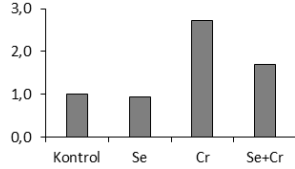
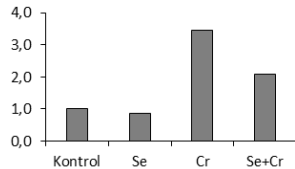
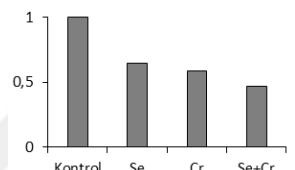
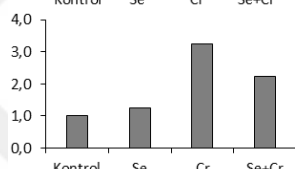
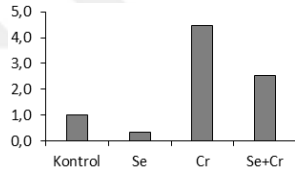
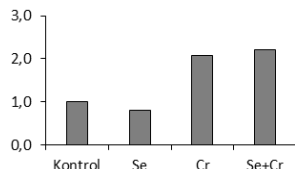
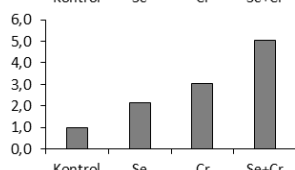
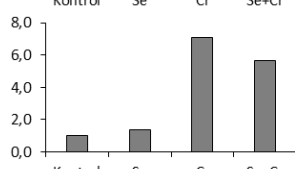
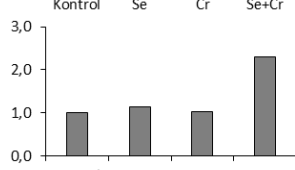
Çizelge 4.4 Devamı

Benek	Protein	Aksiyon numarası	Skor	MA pI	Dizi örtüşmesi	Eşleşen peptit	İfade seviyesi
Fotosentez ve karbohidrat biyosentezi							
36	Ferredoksin-NADP redüktaz, yaprak izozimi 2 Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	FNRL2_ARATH	429	41.1 8.51	%35	31	
38	ATP sentaz gama altbirmisi 1 Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	ATPG1_ARATH	455	40.9 8.13	%35	23	
40	Fruktoz-bifosfat aldolaz 3 Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	ALFC3_ARATH	106	42.3 8.19	%12	6	
41	Karbonik anhidraz Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	CAHC_ARATH	137	37.4 5.74	%27	9	
49	Fosfoglisarat kinaz Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	PGKH_ARATH	76	49.9 8.27	%16	5	
50	ATP sentaz beta albirimi Kloroplastik <i>Brassica napus</i>	ATPB_BRANA	892	53.7 5.21	%39	39	
51	ATP sentaz beta albirimi Kloroplastik <i>Brassica napus</i>	ATPB_BRANA	866	53.7 5.21	%60	38	
53	ATP sentaz alfa albirimi Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	ATPA_ARATH	607	55.3 5.19	%46	33	
Stres savunma							
1	Tiyoredoksin H-tip <i>Brassica rapa</i>	TRXH_BRARA	62	13.6 5.37	%43	9	

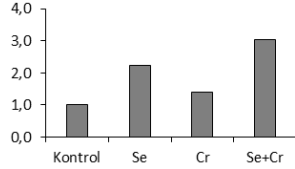
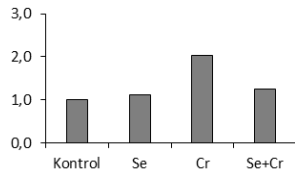
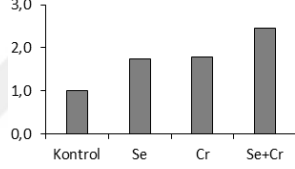
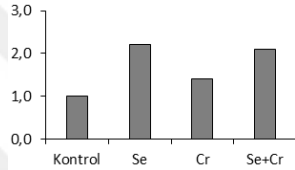
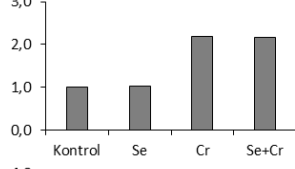
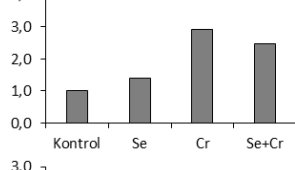
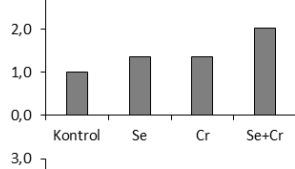
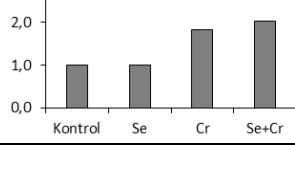
Çizelge 4.4 Devamı

Benek	Protein	Aksesyon numarası	Skor	MA pI	Dizi örtüşmesi	Eşleşen peptit	İfade seviyesi
Stres savunma							
3	Peroksiredoksin-2E Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	PRX2E_ARATH	127	24.7 9.12	%16	7	
6	Peroksiredoksin-2B <i>Arabidopsis thaliana</i>	PRX2B_ARATH	142	17.4 5.17	%19	4	
8	Germin-benzeri protein 1 <i>Sinapis alba</i>	GLP1_SINAL	336	21.9 6.27	%25	8	
10	Germin-benzeri protein altaile 3 üyesi <i>Arabidopsis thaliana</i>	GL33_ARATH	138	21.9 6.26	%16	7	
11	Germin-benzeri protein 1 <i>Sinapis alba</i>	GLP1_SINAL	385	21.9 6.27	%28	10	
13	Germin-benzeri protein altaile 3 üyesi <i>Arabidopsis thaliana</i>	GL33_ARATH	161	21.9 6.26	%16	7	
15	Germin-benzeri protein altaile 3 üyesi <i>Arabidopsis thaliana</i>	GL33_ARATH	104	21.9 6.26	%14	5	
16	2-Cys peroksiredoksin BAS1 Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	BAS1A_ARATH	266	29.1 6.91	%12	5	
17	Süperoksit dismutaz [Fe] Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	SODF_ARATH	63	23.8 6.06	%14	5	

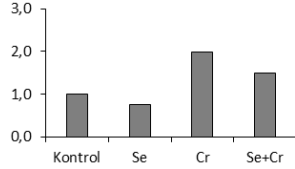
Çizelge 4.4 Devamı

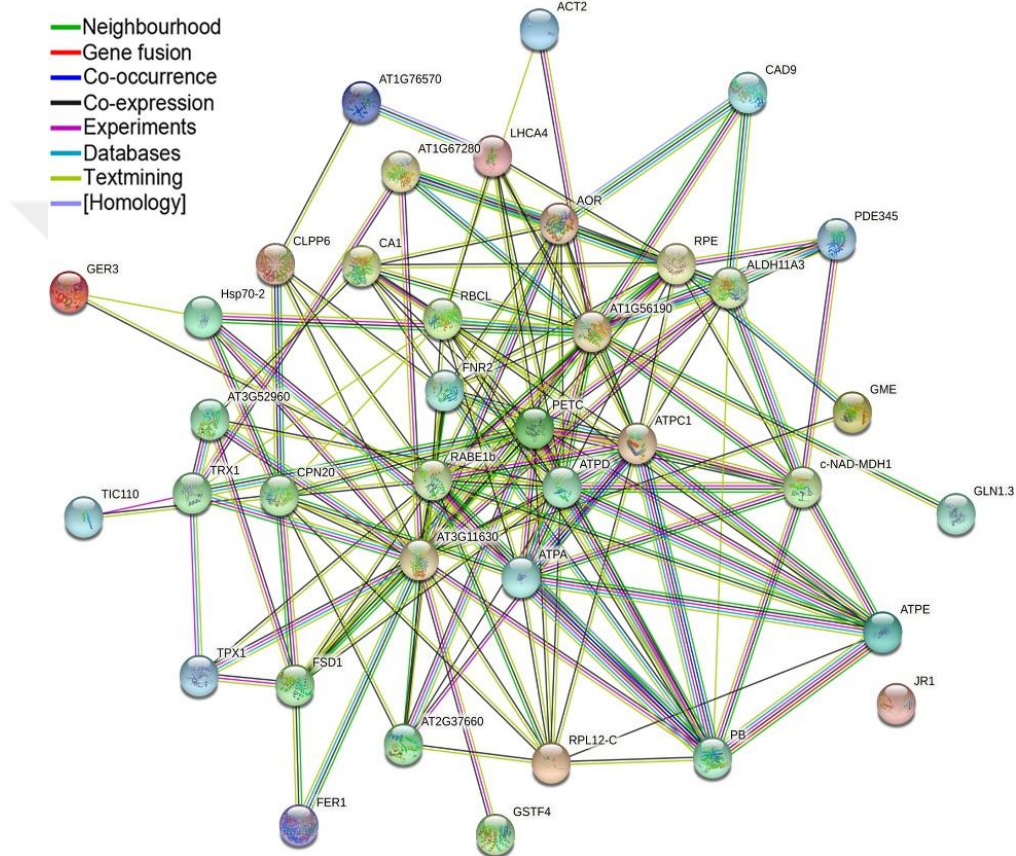
Benek	Protein	Aksesyon numarası	Skor	MA pI	Dizi örtüşmesi	Eşleşen peptit	İfade seviyesi
Stres savunma							
19	Glutasyon S-transferaz 4 <i>Zea mays</i>	GSTF4_MAIZE	41	24.6 5.77	%12	3	
31	Laktosilglutasyon liyaz Sitozolik <i>Brassica oleracea</i>	LGUL_BRAOG	150	31.6 5.16	%15	8	
37	Kinon oksidoredüktaz benzeri protein At1g23740 Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	QORL_ARATH	527	40.9 8.46	%26	14	
47	GDP-mannoz 3.5-epimeraz <i>Arabidopsis thaliana</i>	GME_ARATH	606	42.7 5.85	%49	32	
Protein metabolizması							
4	50S ribozomal protein L12-3 Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	RK123_ARATH	193	19.7 5.51	%24	7	
12	ATP-bağımlı Clp proteaz proteolitik altbirim 6 Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	CLPP6_ARATH	204	29.4 9.38	%35	13	
23	20 kDa şaperonin Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	CH10C_ARATH	175	26.8 8.86	%16	7	
39	Lon proteaz homoloğu 1 Peroksizom <i>Arabidopsis thaliana</i>	LONH1_ARATH	46	97.8 6.85	%6	2	
46	Uzama faktörü Tu Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	EFTU_ARATH	241	51.6 5.84	%34	17	

Çizelge 4.4 Devamı

Benek	Protein	Aksesyon numarası	Skor	MA pI	Dizi örtüşmesi	Eşleşen peptit	İfade seviyesi
Protein metabolizması							
54	Heat shock cognate 70 kDa protein 2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	HSP72_ARATH	724	71.3 5.03	%37	30	
Enerji metabolizması							
42	Malat dehidrogenaz Sitoplazmik <i>Arabidopsis thaliana</i>	MDHC1_ARATH	223	35.5 6.11	%37	14	
52	NADP-bağımlı gliseralehit-3-fosfat dehidrogenaz <i>Arabidopsis thaliana</i>	GAPN_ARATH	263	53.0 6.23	%18	15	
Diğer							
22	Ferritin-1 Kloroplastik <i>Brassica napus</i>	FRI1_BRANA	405	28.2 5.52	%35	13	
43	Glutamin sentetaz sitozolik izozim 1-3 <i>Arabidopsis thaliana</i>	GLN13_ARATH	187	38.6 7.52	%23	15	
44	Sinnamil alkol dehidrogenaz9 <i>Arabidopsis thaliana</i>	CADH9_ARATH	145	38.9 6.21	%25	13	
45	Aktin-2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	ACT2_ARATH	693	41.9 5.37	%59	31	
48	Mirozinaz-bağlayıcı protein-benzeri At3g16470 <i>Arabidopsis thaliana</i>	MB31_ARATH	147	48.5 5.12	%5	1	

Çizelge 4.4 Devamı

Benek	Protein	Aksesyon numarası	Skor	MA pI	Dizi örtüşmesi	Eşleşen peptit	İfade seviyesi
Bilinmeyen protein							
29	Tanımlanmamış protein At2g37660 Kloroplastik <i>Arabidopsis thaliana</i>	Y2766_ARATH	275	34.9 8.37	%17	9	



Şekil 4.3 Farklı şekilde ifade olan proteinlerin etkileşim ağı.

RuBisCO büyük alt birimi, ferredoksin-NADP redüktaz (FNR), ATP sentazları (ATPA, ATPC ve ATPD), sitokrom b6-f kompleksi demir-kükürt alt birimi, fosfoglisarat kinaz (PGK) ve 2-Cys peroksiredoksin BAS1 gibi fotosentezin ışık ve CO₂ asimilasyon reaksiyonları ve stres savunmasında yer alan proteinlerin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitki büyümesi, çevresel stres faktörlerinin ekolojik etkilerini değerlendirmek için güvenilir bir göstergedir. Selenyum, çeşitli çevresel stresler altında bitki büyümesi ve veriminin iyileştirilmesinde rol oynayan bir besin elementidir (Jiang vd. 2021). Çalışmamızda, Brassica türleri üzerinde yapılan önceki çalışmalarla uyumlu olarak Cr stresi kolza fide büyümesini önemli ölçüde azaltmıştır (Handa vd. 2019, Zhao vd. 2019a, Yıldız ve Terzi 2021). Ek olarak, Se takviyesi, Cr stresinin neden olduğu büyüme azalması üzerinde önemli iyileştirici etkilere neden olmuştur. Handa vd. (2019), Se takviyesinin, artan genel fotosentetik verimden ve dolayısıyla karbohidrat metabolizmasından kaynaklanabilecek Cr stresi altında fide büyümesini desteklediğini ortaya koymuştur. Se kaynaklı Cr toleransının antioksidan sistemi iyileştirdiği, mineral alımını artırdığı ve Cr alımını azalttığı da bildirilmiştir (Qing vd. 2015, Handa vd. 2018b, Zhao vd. 2019a).

ROT'un aşırı üretimi ve membran lipidlerinin peroksidasyonu, oksidatif stresin derecesini belirlemek için öne çıkan belirteçlerdir. Çalışmamızda, Cr stresine maruz kalan kolza fideleri, ROT'un neden olduğu hücre zarlarının bozulmasına bağlı olarak daha yüksek MDA içeriği üretimi sergilemiştir. Bununla birlikte, Cr ile Se takviyesi, Se'un Cr kaynaklı oksidatif stres üzerindeki hafifletici etkisini gösteren MDA seviyesinde önemli bir azalmaya yol açmıştır. Benzer şekilde, son çalışmalar Se'un Cr stresi altında aşırı ROT üretimini ve lipid peroksidasyonunu azalttığını göstermiştir (Qing vd. 2015, Handa vd. 2019). Se ile muamele edilmiş fidelerde lipid peroksidasyonundaki azalma, antioksidan enzimlerin farklı düzenlenmesinden kaynaklanabilir. Antioksidan savunma sistemi tarafından hücrel redoks homeostazının sürdürülmesinin, Cr stresi altında ROT'un neden olduğu toksisiteyi hafifletmek için bitkilerin direnç stratejilerinden biri olduğu bilinmektedir. Ayrıca Se, çevresel streslere maruz kalan bitkilerde redoks homeostazına katılır (Pilon-Smits 2019). CAT ve APX enzimleri, SOD ve POD aktiviteleri değişmeden kalırken, Cr stresine yanıt olarak bir düşüş göstermiştir. Bu sonuçlar Ali vd. (2015), Cr stresinin buğday fidelerinde APX ve CAT aktivitelerini azalttığını da ortaya koymuştur. Cr-stresli fidelerde APX ve CAT aktivitelerindeki azalma, ROT süpürme etkinliğinin zayıf olduğunu ve dolayısıyla bitki büyümesinin azaldığını gösterebilir. Se takviyesi ise

bu enzimlerin aktivitelerini artırarak Cr stresinin azalmasını kolaylaştırmıştır. Handa vd. (2019), Se'un SOD'un gen ifadesini modüle edebileceğini ve aktivitesini artırabileceğini bildirmiştir. Se'un SOD ve POD enzimlerini aktive ederek Cr aracılı oksidatif stresi hafiflettiği de bildirilmiştir (Qing vd. 2015). Cr stresli fidelerde Se takviyesi ile antioksidan enzimlerin güçlendirilmesi, Se aracılı Cr toleransının olası mekanizmalarından biri olabilir.

Ağır metal stresi, fotosentezin ışık reaksiyonlarında ve karbon fiksasyon yollarında yer alan proteinleri baskılayarak fotosentetik aparatı olumsuz etkileyebilir. Bu çalışmada, Cr ve/veya Se'un farklı uygulamalarına maruz kalan kolza fidelerinde ifade seviyesi önemli düzeyde değişen 26 protein fotosentez ile ilişkilendirilmiştir. Fotosentezin ilk aşaması olan ışık reaksiyonu sırasında ışık enerjisi, ATP ve NADPH dahil olmak üzere kimyasal enerjiye dönüştürülür. Kloroplastik ATP sentazları, stres koşulu sırasında CO₂ fiksasyonu için kullanılan tilakoid membran boyunca bir proton gradiyenti aracılığıyla ADP'den ATP üretir (Von Ballmoos ve Dimroth 2007). Bu çalışmada, kloroplastik ATP sentazın alt birimleri olan toplam altı protein tanımlanmıştır. Bunlara ATP sentaz epsilon (benek 2), delta (benek 9), gama (benek 38), beta (benek 50 ve 51) ve alfa (benek 53) zincirleri dahildir. Bunlar arasında Cr stresini takiben alt birim beta ve alfa bolluk düzeylerini düşürürken epsilon, delta ve gama alt birimleri bolluk düzeylerini artırmıştır. Bununla birlikte, Se+Cr uygulaması, bu azalan proteinlerin bolluğunu geri kazandırmıştır. Ek olarak, Se takviyesi önemli ölçüde daha yüksek miktarlarda klorofil a-b bağlayıcı protein 6A (benek 14) ve FNR'yi (benek 36) indüklemiştir. Fotosistem I'den NADP⁺'ye elektron transferinde yer alan FNR proteininin oksidatif stres direncine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Kozuleva vd. 2016). Bu bulgular ışığında, Se'un kolza fidelerinde fotosentezi koruyarak Cr toleransının artmasına büyük ölçüde katkıda bulunan ATP ve NADPH üretimini artırabileceğini ileri sürülmüştür.

Calvin döngüsü, CO₂ ve H₂O'yu karbohidratlara dönüştürmek için ışık aracılı ATP ve NADPH kullanır. RuBisCO, CO₂ fiksasyonunun ilk adımını katalize eden ve fotosentetik düzenlemede rol oynayan anahtar bir enzimdir. Bu çalışmada, RuBisCO büyük zincirli proteinler, Cr stresi altında farklılaşan bolluk sergilemiştir. Cr stresi altında 1 azalan yönde düzenlenen (benek 28) ve 7 artan yönde düzenlenen (benek 7, 26, 30, 32, 33, 34

ve 35) RuBisCO büyük zincir proteini belirlenmiştir. Ekzojen Se, indirgenmiş RuBisCO proteininin bolluğunu artırırken, diğer RuBisCO proteinlerinin seviyesi sadece Cr stresinde nispeten azalmıştır. Sonuçlarımız, Cr toksisitesinin, RuBisCO'nun ifadesi ve yapısında fotosentezin bozulmasına neden olabilecek önemli anormalliklere neden olabileceğini göstermiştir. Benzer sonuçlar, Cr-stresli pirinç fidelerinde de rapor edilmiştir (Zeng vd. 2014). Karbonik anhidraz (CA), CO₂ ve H₂O'nun geri dönüşümlü olarak bikarbonata dönüştürülmesinde rol oynar ve fotosentezde çok önemli bir enzimdir (Badger ve Price 1994). Cr stresi altında 1 azalan yönde düzenlenen (benek 25) ve 1 artan yönde düzenlenen (benek 41) CA proteini bulunmuştur. Ancak Se takviyesi, CA seviyesinin geri kazanılmasında kısmen hafifletici bir role sahip olduğu saptanmıştır. Ek olarak, ribuloz-fosfat 3-epimerazın azalan yönde düzenlenmesi, Calvin döngüsü sırasında ribuloz fosfat ve ksilüloz-5-fosfatın bozulmuş bir ara dönüşümü olduğunu göstermektedir. Bu bulgular ışığında Cr stresi altında Se ilavesi, fotosentezin pozitif düzenleyicisi olarak kabul edilebileceği fikrini ileri sürebilir.

Krom, hücrel redoks dengesini bozabilen ve oksidatif hasara yol açabilen ROT üretimini indükleyebilir (Shahid vd. 2017). Gelişmiş Cr toleransı oksidatif hasarı hafifletmek için ROT detoksifikasyonunun sürdürülmesi gerekir. Proteomik analiz, çoğu Cr stresi tarafından artan yönde düzenlenen stres savunmasında yer alan 13 proteinin olduğunu ortaya çıkarmıştır. Peroksiredoksinler (Prx), tiyol peroksidaz enzimleri, tiodoksinler (Trx), glutatyon ve askorbat dahil olmak üzere elektron donörleri tarafından indirgenen sisteinil kalıntısı tarafından ROT ile mücadelede yer alır (Barranco–Medina vd. 2009). Bu çalışmada, Se+Cr tedavisi önemli ölçüde daha yüksek miktarlarda peroksiredoksin-2E (Prx-2E; benek 3), peroksiredoksin-2B (benek 6) ve 2-Cys peroksiredoksin BAS1 (benek 16) proteinlerini indüklemiştir. Kim vd. (2009), kloroplastlarda 2-Cys Prx'in şaperon aktivitesini bildirmiştir. Ek olarak, Prx-2E ve 2-Cys Prx proteinlerinin Trx sisteminin bir parçası olarak detoksifikasyon ve kloroplast redoks dengesinde rol oynayabileceği gösterilmiştir (Baier ve Dietz 1997). Burada Se'un muhtemelen Prx/Trx yolu aracılığıyla Cr kaynaklı oksidatif stresi azalttığını söyleyebiliriz. Ayrıca beş germin benzeri protein (GLP'ler; benekler 8, 10, 11, 13 ve 15), Cr stresine maruz kalan kolza yapraklarında artan yönde düzenlenmiştir. GLP'lerin metal bağlayıcı histidin içeren motiflere sahip olması, ağır metaller gibi abiyotik stres

koşullarında önemli bir rol oynadıklarını düşündürmektedir (Membre vd. 2000). Ayrıca, GLP'lerin serbest radikal oluşumundaki rolünü öne süren SOD aktivitesi vardır (Davidson vd. 2009). Cr stresi altındaki fidelerde GLP'lerin bolluğundaki artış, yüksek Cr birikimi ile ilişkili olabilir.

Glutasyon S-transferaz (benek 19), glutasyon ile konjugasyon yoluyla ağır metal iyonlarını vakuolde alıkoyar (Dixit vd. 2001). Bir protein (benek 31) laktoilglutasyon liyaz (glioksalaz I) olarak tanımlanmıştır, glioksalaz sisteminin önemli bir enzimidir ve stres koşulları üzerine glikolizin artan yönde düzenlenmesi sırasında trioz-fosfat birikiminden üretilen metilglioksali detoksifiye eder (Kaur vd. 2014). GDP-mannoz-3,5-epimeraz (benek 47), bitkilerde askorbik asit biyosentezinde yer alır (Wolucka ve Montagu 2003). Çalışmamızda, Cr stresli fidelerde bu proteinlerin önemli ölçüde artan yönde düzenlenmesi, Cr stresine karşı etkili koruma lehine olabilir.

Protein metabolizmasına dahil olan altı protein, Se ve/veya Cr uygulamalarına cevap olarak artan yönde düzenlenmiştir. Se+Cr uygulaması önemli ölçüde daha yüksek miktarlarda 20 kDa şaperonin (benek 23) ve ısı şoku ısı şoku cognate 70 kDa protein 2 (benek 54) 2 şaperon proteinini ve ATP'ye bağımlı Clp proteaz proteolitik alt birim 6 (benek 12) ve lon proteaz homolog 1 (benek 39) iki proteazı teşvik etmiştir. Moleküler şaperonlar, Cr varlığında proteinlerin uygun şekilde katlanmasını kolaylaştırabilirken, proteazlar Cr stresi tarafından hasar gören proteinleri geri dönüştürebilir (Finka vd. 2016). Genel olarak, Se+Cr uygulamasında bu proteinlerin yüksek bolluğu, tek başına Cr stresine karşılaştırıldığında, Se ilavesinin Cr toksisitesinin üstesinden gelmek için protein metabolizmasına katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

Mevcut çalışmanın sonuçları, Se'un Cr birikiminde ve oksidatif streste bir azalmayı indükleyebileceği ve böylece bitki büyümesini iyileştirebileceği için çok önemli bir rol oynadığı ortaya konulmuştur. Ekzojen Se, muhtemelen Cr toksisitesinin iyileşmesine yol açan düşük oksidatif stresle ilişkili olarak SOD, CAT, POD ve APX antioksidan enzimlerinin aktivitelerini kuvvetle arttırmıştır. Ayrıca, proteomik analiz, Se aracılı Cr toleransı ile sonuçlanan Se takviyesi ile birkaç metabolik yolun düzenlendiğini göstermiştir. Fotosentez ve savunma tepki yollarında yer alan farklı protein bolluğu, Se

kaynaklı Cr toleransını artırabilir. Moleküler şaperonların ve proteazların daha yüksek bolluğu, kloroplastta fotosentezi etkileyen protein metabolizmasında önemli bir rol oynayabilir. Bu araştırma, Se ve/veya Cr stresi tarafından düzenlenen yaprak metabolizması hakkında fikir verebilir ve Se'un kolza bitkilerinin Cr toleransını arttırdığı mekanizma hakkında temel bilgileri geliştiren nitelikte olduğunu söyleyebiliriz.



6. KAYNAKLAR

- Abdullateef B, Kolo B G, Waziri I, Idris M A, 2014, Levels of Heavy Metals in Soil as Indicator of Environmental Pollution in Maiduguri, Borno State, Nigeria, *Pharmacology and Life Sciences*, 3(11), 133–136.
- Aborode F A, Raab A, Voigt M, Costa L M, Krupp E M, Feldmann J, 2016, The Importance of Glutathione and Phytochelatins on the Selenite and Arsenate Detoxification in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Environmental Sciences*, 49, 150–161.
- About-Elwafa S F, Amin A E E A Z, Shehzad T, 2019, Genetic Mapping and Transcriptional Profiling of Phytoremediation and Heavy Metals Responsive Genes in Sorghum, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 173, 366–372.
- Aebi H, 1984, Catalase in Vitro, *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- Alam M Z, McGee R, Hoque M A, Ahammed G J, Carpenter-Boggs L, 2019, Effect of Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Selenium and Biochar on Photosynthetic Pigments and Antioxidant Enzyme Activity under Arsenic Stress Inmung bean (*Vigna radiata*), *Frontiers in Physiology*, 10.
- Alam P, Balawi T H, Altalayan F H, Hatamleh A A, Ashraf M, Ahmad P, 2021, Silicon Attenuates the Negative Effects of Chromium Stress in Tomato Plants by Modifying Antioxidant Enzyme Activities, Ascorbate-glutathione Cycle and Glyoxalase System, *Acta Physiologiae Plantarum*, 43, 110.
- Alharbi O M L, Khattab R A, Ali I, Binnaser Y S, Aqeel A, 2018, Evaluation of The Heavy Metals Threat to The Yanbu Shoreline, Red Sea, Saudi Arabia, *Marine and Freshwater Research*, 69, 1557-1568.
- Ali I, Jain C K, 2004, Advances in Arsenic Speciation Techniques, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 947–964.
- Ali S, Bai P, Zeng F, Cai S, Shamsi I R H, Qiu B, vd., 2011, The Ecotoxicological and Interactive Effects of Chromium and Aluminum on Growth, Oxidative Damage and

- Antioxidant Enzymes on Two Barley Genotypes Differing in Al Tolerance, *Environmental and Experimental Botany*, 70, 185–191.
- Ali S, Chaudhary A, Rizwan M, Anwar H T, Adrees M, Farid M, vd., 2015, Alleviation of Chromium Toxicity by Glycinebetaine is Related to Elevated Antioxidant Enzymes and Suppressed Chromium Uptake and Oxidative Stress in Wheat (*Triticum aestivum* L.), *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 10669–10678.
- Ali S, Farooq M A, Jahangir M M, Abbas F, Bharwana S A, Zhang G P, 2013, Effect of Chromium and Nitrogen Form on Photosynthesis and Anti-oxidative System in Barley, *Biologia Plantarum*, 57, 758–763.
- Alyemeni M N, Ahanger M A, Wijaya L, Alam P, Bhardwaj R, Ahmad P, 2018, Selenium Mitigates Cadmium-Induced Oxidative Stress in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Plants by Modulating Chlorophyll Fluorescence, Osmolyte Accumulation, and Antioxidant System, *Protoplasma*, 255, 459–469.
- Amirabad S A, Behtash F, Vafae Y, 2020, Selenium Mitigates Cadmium Toxicity by Preventing Oxidative Stress and Enhancing Photosynthesis and Micronutrient Availability on Radish (*Raphanus sativus* L.) cv. *Cherry Belle*, *Environmental Science and Pollution Research*, 1–15.
- Anjum N A, Ahmad I, Mohmood I, Pacheco M, Duarte A C, Pereira E, vd., 2012, Modulation of Glutathione and Its Related Enzymes in Plants' Responses to Toxic Metals and Metalloids, A Review, *Environmental and Experimental Botany*, 75, 307–324.
- Asati A, Pichhode M, Nikhil K, 2016, Effect of Heavy Metals on Plants: An overview, *International Journal of Application or Innovation in Engineering and Management*, 5, 56–66.
- Ashraf M, Ozturk M, Ahmad M S A, 2010, *Toxins and Their Phytoremediation, Plant Adaptation and Phytoremediation*, Springer, Dordrecht.
- Babula P, Adam V, Opatrilova R, Zehnalek J, Havel L, Kizek R, 2008, Uncommon Heavy Metals, Metalloids and Their Plant Toxicity: A Review, *Environmental Chemistry Letters*, 6, 189–213.

- Badger M R, Price G D, 1994, The Role of Carbonic Anhydrase in Photosynthesis, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 45, 369–392.
- Bai X, Li Y, Liang X, Li H, Zhao J, Li Y F, vd., 2019, Botanic Metallomics of Mercury and Selenium: Current Understanding of Mercury-selenium Antagonism in Plant with the Traditional and Advanced Technology, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 102, 628–634.
- Baier M, Dietz K J, 1997, The plant 2-Cys Peroxiredoxin BAS1 is a Nuclear–encoded Chloroplast Protein: Its Expressional Regulation, Phylogenetic Origin, and Implications for Its Specific Physiological Function in Plants, The Plant Journal, 12, 179–190.
- Bakhat H F, Zia Z, Fahad S, Abbas S, Hammad H M, Shahzad A N, vd., 2017, Arsenic Uptake, Accumulation and Toxicity in Rice Plants: Possible Remedies for Its Detoxification, Environmental Science and Pollution Research, 24, 9142–9158.
- Balakhnina T I, Matichenkov V V, Włodarczyk T, Borkowska A, Nosalewicz M, Fomina I R, 2012, Effects of Silicon on Growth Processes and Adaptive Potential of Barley Plants under Optimal Soil Watering and Flooding, The Journal of Plant Growth Regulation, 67, 35–43.
- Barranco-Medina S, Lazaro J J, Dietz K J, 2009, The Oligomeric Conformation of Peroxiredoxins Links Redox State to Function, Federation of European Biochemical Societies Letters, 583, 1809–1816.
- Basheer A A, 2018, Chemical Chiral Pollution: Impact on the Society and Science and Need of the Regulations in the 21st Century, Chirality, 30, 402–406.
- Basit F, Chen M, Ahmed T, Shahid M, Noman M, Liu J, vd., 2021, Seed Priming with Brassinosteroids Alleviates Chromium Stress in Rice Cultivars via Improving ROT Metabolism and Antioxidant Defense Response at Biochemical and Molecular Levels, Antioxidants, 10, 1089.
- Bassi M, Corradi M G, Realini M, 1990, Effects of Chromium (VI) on Two Freshwater Plants, *Lemna minor* and *Pistia stratiotes*, 1. Morphological Observations, Cytobiosis, 62, 27–38.

- Bayram H, 2005, Isparta Koşullarında Kanola (*Brassica napus* L.) Çeşitlerinin Verim ve Kalite Özellikleri, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 9–3.
- Beauchamp C, Fridovich I, 1971, Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels, *Analytical Biochemistry*, 44, 276–287.
- Benavides M P, Gallego S M, Tomaro M L, 2005, Cadmium Toxicity in Plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 21–34.
- Berg J M, Tymoczko J L, Stryer L, 2002, *Biochemistry*, W.H Freeman and Company, New York City, NY, USA.
- Bertucci A, Pierron F, Gourves P Y, Klopp C, Lagarde G, Pereto C, vd., 2018, Whole–Transcriptome Response to Wastewater Treatment Plant and Stormwater Effluents in the Asian Clam, *Corbicula fluminea*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 165, 96–106.
- Bishnoi N R, Dua A, Gupta V K, Sawhney, S K, 1993, Effect of Chromium on Seed Germination, Seedling Growth and Yield of Peas, *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 47, 47–57.
- Boldrin P F, de Figueiredo M A, Yang Y, Luo H, Giri S, Hart J J, vd., 2016, Selenium Promotes Sulfur Accumulation and Plant Growth in Wheat (*Triticum aestivum*), *Physiologia Plantarum*, 158, 80–91.
- Bradford M M 1976, A Rapid and Sensitive Method for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Bücker-Neto L, Paiva A L S, Machado R D, Arenhart R A, Margis-Pinheiro M, 2017, Interactions Between Plant Hormones and Heavy metals Responses, *Genetics and Molecular Biology*, 40, 373–386.
- Chauhan R, Awasthi S, Srivastava S, Dwivedi S, Pilon–Smits E A H, Dhankher O P, vd., 2019, Understanding Selenium Metabolism in Plants and Its Role as a Beneficial Element, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 49, 1937–1958.

- Chauhan R, Awasthi S, Tripathi P, Mishra S, Dwivedi S, Niranjana A, 2017, Selenite Modulates the Level of Phenolics and Nutrient Element to Alleviate the Toxicity of Arsenite in Rice (*Oryza sativa* L.), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 138, 47–55.
- Chi S, Xie W, Xu W, Zhou X, Chai Y, Zhao W, vd., 2018, Differences in Selenium Uptake and Transport, and Related Gene Expression in Three Brassica vegetables, *Applied Ecology and Environmental Research*, 16, 2781–2793.
- Chidambaram A, Sundaramoorthy P, Murugan A, Ganesh K S, Baskaran L, 2009, Chromium Induced Cytotoxicity in Blackgram (*Vigna mungo* L.), *Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 6, 17–22.
- Choudhury S, Panda S K, 2005, Toxic Effects, Oxidative Stress and Ultrastructural Changes in Moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under Chromium and Lead Phytotoxicity, *Water, Air, & Soil Pollution*, 167, 73–90.
- Clijsters H, Van A F, 1985, Inhibition of Photosynthesis by Heavy Metals, *Photosynthesis Research*, 7, 31–40.
- Combs G F, Combs S B, 1984, *The role of selenium in nutrition*, Orlando, FL, USA.
- Corradi M, Bianchi A, Albasini A, 1993, Chromium toxicity in *Salvia sclarea* L. Effects of Hexavalent Chromium on Seed Germination and Seedling Development, *Environmental and Experimental Botany*, 33, 405–413.
- Costa R C C, Moura F C C, Oliveira P E F, Magalhães F, Ardisson J D, Lago R M, 2010, Controlled Reduction of Red Mud Waste to Produce Active Systems for Environmental Applications: Heterogeneous Fenton Reaction and Reduction of Cr (VI), *Chemosphere*, 78(9), 1116–1120.
- Daunl J K, Eskin N, Hickling D, 2011, *Canola: Chemistry, Production, Processing, and Utilization*, American Oil Chemists' Press, Urbana.
- Davidson R M, Reeves P A, Manosalva P M, Leach J E, 2009, Germins: A Diverse Protein Family Important for Crop Improvement, *Plant Science*, 177, 499–510.
- Davies F T, Puryear J D, Newton R J, Egilla J N, Grossi J A S, 2002, Mycorrhizal Fungi Increase Chromium Uptake by Sunflower Plants: Influence on Tissue Mineral

- Concentration, Growth, and Gas Exchange, *Journal of Plant Nutrition*, 25, 2389–2407.
- Dehghani M, Mosaferi F, 2016, Determination of Heavy Metals (Cadmium, Arsenic and Lead) in Iranian, Pakistani and Indian Rice Consumed in Hormozgan Province, Iran *Journal of Mazandaran University Medicine and Science*, 25, 363–367.
- Dhal B, Thatoi H N, Das N N, Pandey B D, 2013, Chemical and Microbial Remediation of Hexavalent Chromium from Contaminated Soil and Mining/metallurgical Solid Waste: A Review, *Journal of Hazardous Materials*, 250, 272–291.
- Ding G, Jin Z, Han Y, Sun P, Li G, Li W, 2019, Mitigation of Chromium Toxicity in *Arabidopsis thaliana* by Sulfur Supplementation, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 182, 109379.
- Dixit V, Pandey V, Shyam R, 2001, Differential Antioxidative Responses to Cadmium in Roots and Leaves of Pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad), *Journal of Experimental Botany*, 52, 1101–1109.
- Djanaguiraman M, Devi D D, Shanker A K, Sheeba J A, Bangarusamy U, 2005, Selenium an Antioxidative Protectant in Soybean during Senescence, *Plant and Soil*, 272, 77–86.
- Do J N, De A A, Barroso J P, Mangabeira P, Ahnert D, Sousa A, 2018, Physiological, Ultrastructural, Biochemical and Molecular Responses of Young Cocoa Plants to The Toxicity of Cr(III) in Soil, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 159, 272–283.
- Dubey S, Shri M, Gupta A, Rani V, Chakrabarty D, 2018, Toxicity and Detoxification of Heavy Metals During Plant Growth and Metabolism, *Environmental Chemistry Letters*, 16, 1169–1192.
- Faisal I, Tahira Y, Muhammad S A, Muhammad R, Sher M, Shahzad Q I, 2016, Combined Ability of Chromium (Cr) Tolerant Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) and Salicylic Acid (SA) in Attenuation of Chromium Stress in Maize Plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 108, 456–67.
- Fang Y, Pan X, Zhao E, Shi Y, Shen X, Wu J, vd., 2019, Isolation and Identification of

- Immunomodulatory Selenium-containing Peptides from Selenium-enriched Rice Protein Hydrolysates, *Food Chemistry*, 275, 696–702.
- Fang Z, Hu Z, Yin X, Song G, Cai Q, 2020, Exogenous Glutathione Alleviation of Cd Toxicity in Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*) by Modulation of the Cd Absorption, Subcellular Distribution and Chemical Form, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17, 8143.
- Farooq M A, Dietz K J, 2015, Silicon as Versatile Player in Plant and Human Biology: Overlooked and Poorly Understood, *Frontiers in Plant Science*, 6, 994.
- Farooq M A, Gill R A, Ali J, Wang F, Islam Ali, S Ali, 2016, Subcellular Distribution, Modulation of Antioxidant and Stress-related Genes Response to Arsenic in *Brassica napus* L., *Ecotoxicology*, 25, 350–366.
- Feng R, Wei C, Tu S, 2013, The Roles of Selenium in Protecting Plants Against Abiotic Stresses, *Environmental and Experimental Botany*, 87, 58–68.
- Feng RW, Wang LZ, Yang JG, Zhao PP, Zhu YM, Li YP, Yu Y, Liu H, Rensing C, Wu Z, Ni R, Zheng SA, 2021, Underlying Mechanisms Responsible for Restriction of Uptake and Translocation of Heavy Metals (Metalloids) by Selenium via Root Application in Plants, *Journal of Hazardous Materials*, 402, 123570.
- Filek M, Gzyl-Malcher B, Zembala M, Bednarska E, Laggner P, Kriechbaum M, 2010, Effect of Selenium on Characteristics of Rape Chloroplasts Modified by Cadmium, *Journal of Plant Physiology*, 167, 28–33.
- Filek M, Keskinen R, Hartikainen H, Szarejko I, Janiak A, Miszalski Z, 2008, The Protective Role of Selenium in Rape Seedlings Subjected to Cadmium Stress, *Journal of Plant Physiology*, 165, 833–844.
- Finka A, Mattoo R U, Goloubinoff P, 2016, Experimental Milestones in The Discovery of Molecular Chaperones as Polypeptide Unfolding Enzymes, *Annual Review of Biochemistry*, 85, 715–742.
- Foyer C H, Noctor G, 2005, Oxidant and Antioxidant Signalling in Plants: A Re-Evaluation of the Concept of Oxidative Stress in a Physiological Context, *Plant Cell and Environment*, 28, 1056–1071.

- Gamalero E, Lingua G, Berta G, Glick B R, 2009, Beneficial Role of Plant Growth Promoting Bacteria and Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Plant Responses to Heavy Metal Stress, *Canadian Journal of Microbiology*, 55, 501–514.
- Ganesh K S, Baskaran L, Rajasekaran S, Sumathi K, Chidambaram A L A, Sundaramoorthy P, 2008, Chromium Stress Induced Alterations in Biochemical and Enzyme Metabolism in Aquatic and Terrestrial Plants, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 63, 159–163.
- Gao M, Wang R, Yu F, Chen L, 2018, Evaluation of Sulfane Sulfur Bioeffects via a Mitochondria-targeting Selenium-containing Near-infrared Fluorescent Probe, *Biomaterials*, 160, 1–14.
- Garcia J S, Grato P L, Azevedo R A, Arruda M A Z, 2006, Metal Contamination Effects on Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Growth and Protein Expression in Leaves During Development, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8623-8630.
- Ghani A, 2011, Effect of Chromium Toxicity on Growth, Chlorophyll and Some Mineral Nutrients of *Brassica juncea* L., *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*, 2, 9–15.
- Ghosh D, Xu J, 2014, Abiotic Stress Responses in Plant Roots: A Proteomics Perspective. *Frontiers in Plant Science*, 5, 6.
- Gill M, 2014, Heavy Metal Stress in Plants: A Review, *International Journal of Advanced Research*, 2, 1043–1055.
- Gill R A, Zang L, Ali B, Farooq M A, Cui P, Yang S, vd., 2015, Chromium-induced Physio-chemical and Ultrastructural Changes in Four Cultivars of *Brassica napus* L., *Chemosphere*, 120, 154–164.
- Gill S S, Tuteja N, 2010, Reactive Oxygen Species and Antioxidant Machinery in Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909–930.
- Guerriero G, Hausman J F, Legay S, 2016, Silicon and the Plant Extracellular Matrix, *Frontiers in Plant Science*, 7, 463.

- Gupta A K, Sinha S, 2006, Chemical Fractionation and Heavy Metal Accumulation in the Plant of *Sesamum indicum* (L.) var. T55 Grown on Soil Amended with Tannery Sludge: Selection of Single Extractants, *Chemosphere*, 64, 161–173.
- Gupta A, Joia J, Sood A, Sood R, Sidhu C, Kaur G, 2016, Microbes as Potential Tool for Remediation of Heavy Metals: A Review, *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 223, 33–52.
- Gupta M, Gupta S, 2017, An Overview of Selenium Uptake, Metabolism, and Toxicity in Plants, *Frontiers in Plant Science*, 7, 2074.
- Gupta S, Srivastava S, Pardha S P, 2009, Chromium Increases Photosystem II Activity in *Brassica juncea*, *Biologia Plantarum*, 53, 100–104.
- Hajduch M, Rakwal R, Agrawal G K, Yonekura M, Pretova A, 2001, High-resolution Two-dimensional Electrophoresis Separation of Proteins from Metal-stressed Rice (*Oryza sativa* L.) Leaves: Drastic Reductions/fragmentation of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and Induction of Stress-related Proteins, *Electrophoresis* 22, 2824–2831.
- Han D, Xiong S L, Tu S X, Liu J C, Chen C, 2015, Interactive Effects of Selenium and Arsenic on Growth, Antioxidant System, Arsenic and Selenium Species of *Nicotiana tabacum* L., *Environmental and Experimental Botany*, 117, 12–19.
- Handa N, Kaur S, Ashwani K, Thukral K, Bhardwaj R, Alyemeni M N, 2018a, Protective Role of Selenium Against Chromium Stress Involving Metabolites and Essential Elements in *Brassica juncea* L. Seedlings, *3 Biotech*, 8, 66.
- Handa N, Kohli S K, Sharma A, Thukral A K, Bhardwaj R, Alyemeni M N, vd., 2018b, Selenium Ameliorates Chromium Toxicity Through Modifications in Pigment System, Antioxidative Capacity, Osmotic System, and Metal Chelators in *Brassica juncea* Seedlings, *South African Journal of Botany*, 119, 1–10.
- Handa N, Kohli S K, Sharma A, Thukral A K, Bhardwaj R, AbdAllah E F, vd., 2019, Selenium Modulates Dynamics of Antioxidative Defence Expression, Photosynthetic Attributes and Secondary Metabolites to Mitigate Chromium Toxicity in *Brassica juncea* L. *Plants, Environmental and Experimental Botany*,

161, 180–192.

- Harminder P S, Priyanka M S K, Daizy R B, Ravinder K K, 2013, Chromium Toxicity and Tolerance in Plants, *Environmental Chemistry Letters*, 11, 229–254.
- Hartikainen H, Xue T, Piironen V, 2000, Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass, *Plant and Soil*, 225, 193–200.
- Hasan M K, Liu C, Wang F, Ahammed G J, Zhou J, Xu M X, 2016, Glutathione-mediated Regulation of Nitric Oxide, S-nitrosothiol and Redox Homeostasis Confers Cadmium Tolerance by Inducing Transcription Factors and Stress Response Genes in Tomato, *Chemosphere*, 161, 536–545.
- Hasanuzzaman M, Fujita M, 2011, Selenium Pretreatment Upregulates the Antioxidant Defense and Methylglyoxal Detoxification System and Confers Enhanced Tolerance to Drought stress in Rapeseed Seedlings, *Biological Trace Element Research*, 143, 1758–76.
- Hasanuzzaman M, Hossain M A, Fujita M, 2011, Selenium-induced Up-regulation of the Antioxidant Defense and Methylglyoxal Detoxification System Reduces Salinity-Induced Damage in Rapeseed Seedlings, *Biological Trace Element Research*, 143, 1704–21.
- Hasnain S, Sabri A N, 1997, Growth Stimulation of *Triticum aestivum* Seedlings under Cr-stresses by Non-rhizospheric Pseudomonad Strains, *Environmental Pollution*, 97, 265–273.
- Hawrylak-Nowak B, Hasanuzzaman M, Matraszek-Gawron R, 2018, *Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance*, Springer, 611s, Singapore.
- Hayat S, Khalique G, Irfan M, Wani A S, Tripathi B N, Ahmad A, 2012, Physiological Changes Induced by Chromium Stress in Plants: An overview, *Protoplasma*, 249, 599–611.
- Heath R L, Packer L, 1968, Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts: I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189–198.

- Hossain M A, Piyatida P, Teixeira da Silva J A, 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*, 37.
- Huang Q, Xu Y, Liu Y, Qin X, Huang R, Liang X, 2018, Selenium Application Alters Soil Cadmium Bioavailability and Reduces Its Accumulation in Rice Grown in Cd-contaminated Soil, *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 31175–31182.
- Ismael M A, Elyamine A M, Moussa M G, Cai M, Zhao X, Hu C, 2019, Cadmium in Plants: Uptake, Toxicity, and Its Interactions with Selenium Fertilizers, *Metallomics*, 11, 255–277.
- Ismael M, Elyamine A, Zhao Y, Moussa M, Rana M, Afzal J, vd., 2018, Can Selenium and Molybdenum Restrain Cadmium Toxicity to Pollen Grains in *Brassica napus*, *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 2163.
- Jabeen N, Abbas Z, Iqbal M, Rizwan M, Jabbar A, Farid M, vd., 2016, Glycinebetaine Mediates Chromium Tolerance in Mung Bean Through Lowering of Cr Uptake and Improved Antioxidant System, *Archives of Agronomy and Soil Science*, 62, 648–662.
- Jain R, Srivastava S, Madan V K, Jain R, 2000, Influence of Chromium on Growth and Cell Division of Sugarcane, *Indian Journal of Plant Physiology*, 5, 228–231.
- Jayakannan M, Bose J, Babourina O, Shabala M S, Poschenrieder A, Rengel Z, 2015, NPR1-dependent Salicylic Acid Signaling Pathway is Pivotal for Enhanced Salt and Oxidative Stress Tolerance in *Arabidopsis*, *Journal of Experimental Botany*, 10, 1093–105.
- Jia H F, Song Z P, Wu F Y, Ma M, Li Y T, Han D, vd., 2018, Low Selenium Increases the Auxin Concentration and Enhances Tolerance to Low Phosphorous Stress in Tobacco, *Environmental and Experimental Botany*, 153, 127–134.

- Jiang B, Gong Y, Gao J, Sun T, Liu Y, Oturan N, Oturan MA, 2019, The Reduction of Cr(VI) to Cr(III) Mediated by Environmentally Relevant Carboxylic Acids: State-of-the-Art and Perspectives, *Journal of Hazardous Materials*, 365, 205–226.
- Jiang H, Lin W, Jiao H, Liu J, Chan L, Liu X, vd., 2021, Uptake, Transport, and Metabolism of Selenium and Its Protective Effects Against Toxic Metals in Plants: A Review, *Metallomics*, 13, 7.
- Kamran M A, Bibi S, Xu R K, Hussain S, Mehmood K, Chaudhary H J, 2016, Phyto-extraction of Chromium and Influence of Plant Growth Promoting Bacteria to Enhance Plant Growth, *Journal of Geochemical Exploration*, 182, 269–274.
- Kapoor RR, Mfarrej MFB, Alam P, Rinklebe J, Ahmad P, 2022, Accumulation of Chromium in Plants and Its Repercussion in Animals and Humans, *Environmental Pollution*, 301, 119044.
- Kaur C, Ghosh A, Pareek A, Sopory S K, Singla-Pareek S L, 2014, Glyoxalases and Stress Tolerance in Plants, *Biochemical Society Transactions*, 42, 485–490.
- Kebeish R, Niessen M T K, Bari R H J, Rosenkranz R, Stabler N, Schonfeld B, vd., 2007, Chloroplastic Photorespiratory Bypass Increases Photosynthesis and Biomass Production in *Arabidopsis thaliana*, *Nature Biotechnology*, 25, 593–599.
- Keil D E, Berger-Ritchie J, McMillin G A, 2011, Testing for Toxic Elements: A Focus on Arsenic, Cadmium, Lead, and Mercury, *Laboratory Medicine*, 42, 735–742.
- Khalid S, Shahid M, Niazi N, Rafiq M, Bakhat H, Imran M, vd., 2017, Biogeochemical Reactions and Chemical Speciation Influences, In Anjum N A, Gill S S, Tuteja N (eds.), *Enhancing Cleanup of Environmental Pollutants*.
- Khaliq A, Ali S, Hameed A, Farooq M A, Farid M, Shakoor M B, vd., 2016, Silicon Alleviates Nickel Toxicity in Cotton Seedlings through Enhancing Growth, Photosynthesis, and Suppressing Ni Uptake and Oxidative Stress, *Archives of Agronomy and Soil Science*, 62, 633–647.
- Khan M I R, Fatma M, Per T S, Anjum N A, Khan N A, 2015a, Salicylic acid induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants, *Frontiers in Plant Science*, 6, 1–17.

- Khan M I R, Nazir F, Asgher M, Per T S, Khan N A, 2015b, Selenium and Sulfur Influence Ethylene Formation and Alleviate Cadmium-induced Oxidative Stress by Improving Proline and Glutathione Production in Wheat, *Journal of Plant Physiology*, 173, 9–18.
- Kim S Y, Jang H H, Lee J R, Sung N R, Lee H B, Lee D H, vd., 2009, Oligomerization and Chaperone Activity of a Plant 2-Cys Peroxiredoxin in Response to Oxidative Stress, *Plant Science*, 177, 227–232.
- Kozuleva M, Goss T, Twachtmann M, Rudi K, Trapka J, Selinski J, vd., 2016, Ferredoxin: NADP(H) Oxidoreductase Abundance and Location Influences Redox Poise and Stress Tolerance, *Plant Physiology*, 172, 1480–1493.
- 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.
- Kumar M, Bijo A J, Baghel R S, Reddy C R K, Jha B, 2012, Selenium and Spermine Alleviates Cadmium Induced Toxicity in the Red Seaweed *Gracilaria Dura* by Regulating Antioxidant System and DNA Methylation, *Plant Physiology and Biochemistry*, 51, 129–38.
- Kushwaha B K, Singh V P, 2020, Glutathione and Hydrogen Sulfide are Required for Sulfur-mediated Mitigation of Cr (VI) Toxicity in Tomato, Pea and Brinjal Seedlings, *Physiologia Plantarum*, 168, 406–421.
- Łabanowska M, Filek M, Kościelniak J, Kurdziel M, Kuliś E, Hartikainen H, 2012, The Effects of Short-term Selenium Stress on Polish and Finnish Wheat Seedlings EPR, Enzymatic and Fluorescence Studies, *Journal of Plant Physiology*, 169, 275–284,
- Labra M, Gianazza E, Waitt R, Eberini I, Sozzi A, Regondi S, vd., 2006, *Zea mays* L. Protein Changes in Response to Potassium Dichromate Treatments, *Chemosphere*, 62, 1234–1244.
- Laemmli U K, 1970, Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680–685.

- Landi M, Cotrozzi L, Pellegrini E, Remorini D, Tonelli M, Trivellini A, vd., 2019, When “Thirsty” Means “Less Able to Activate the Signalling Wave Triggered by A Pulse of Ozone”: A Case of Study in Two Mediterranean Deciduous Oak Species with Different Drought Sensitivity, *Science of the Total Environment*, 657, 379–390.
- Langård S, Costa, M, 2015, Handbook on the Toxicology of Metals, Chapter 33–Chromium, Nordberg G F, Bruce A. Fowler B A, Nordberg M (Eds.), Handbook on the Toxicology of Metals (Fourth Edition), Academic Press, 717–742.
- Li M Q, Hasan M K, Li C X, Ahammed G J, Xia X J, Shi K, vd., 2016, Melatonin Mediates Selenium-induced Tolerance to Cadmium Stress in Tomato Plants, *Journal of Pineal Research*, 61, 291–302.
- Li W, Tang X, Xing J, Sheng X, Zhan W, 2014, Proteomic Analysis of Differentially Expressed Proteins in *Fenneropenaeus chinensis* Hemocytes upon White Spot Syndrome Virus Infection, *PLoS ONE*, 9, e89962.
- Li Y, Li H, Li Y F, Zhao J, Guo J, Wang R, vd., 2018, Evidence for Molecular Antagonistic Mechanism Between Mercury and Selenium in Rice (*Oryza sativa* L.): a combined study using 1, 2-dimensional Electrophoresis and SR-XRF Techniques, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 50, 435–440.
- Liao G, Xu Y, Chen C, Wu Q, Feng R, Guo J, vd., 2016, Root Application of Selenite can Simultaneously Reduce Arsenic and Cadmium Accumulation and Maintain Grain Yields, but Show Negative Effects on the Grain Quality of Paddy Rice, *Journal of Environmental Management*, 183, 733–741.
- Liu D, Jiang W, Li M, 1992, Effects of Trivalent and Hexavalent Chromium on Root Growth and Cell Division of *Allium cepa*., *Hereditas*, 117, 23–29.
- Liu X, Lai Y, Sun H, Wang Y, Zou N, 2016, The Interactive Effects of Mercury and Selenium on Metabolic Profiles, Gene Expression and Antioxidant Enzymes in Halophyte *Suaeda salsa*, *Environmental Toxicology*, 31, 440–451.
- López B J, Hernández M F, Cervantes C, Ortiz C R, Carreón A Y, Martínez T M, 2014, Phosphate Relieves Chromium Toxicity in *Arabidopsis thaliana* Plants by Interfering with Chromate Uptake, *Biometals*, 27, 363–370.

- Lu C, Napier J A, Clemente T E, Cahoon E B, 2011, New Frontiers in Oilseed Biotechnology: Meeting the Global Demand for Vegetable Oils for Food, Feed, Biofuel, and Industrial Applications, *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 252–259.
- Lunk H J, 2015, Discovery, Properties and Applications of Chromium and Its Compounds, *ChemTexts*, 1, 1–17.
- Lyons G H, Genc Y, Soole K, Stangoulis J C R, Liu F, Graham R D, 2009, Selenium Increases Seed Production in Brassica, *Plant Soil*, 318, 73–80.
- Ma J F, Yamaji N, 2006, Silicon Uptake and Accumulation in Higher Plants, *Trends in Plant Science*, 11, 392–397.
- Mallick S, Sinam G, Mishra R K, Sinha S, 2010, Interactive Effects of Cr and Fe Treatments on Plants Growth, Nutrition and Oxidative Status in *Zea mays* L., *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 987–995.
- Mangiapane E, Pessione A, Pessione E, 2014, Selenium and Selenoproteins: An Overview on Different Biological Systems, *Current Protein Peptide Science*, 15, 598–607.
- Marieschi M, Gorbi G, Zanni C, Sardella A, Torelli A, 2015, Increase of Chromium Tolerance in *Scenedesmus acutus* after Sulfur Starvation: Chromium Uptake and Compartmentalization in Two Strains with Different Sensitivities to Cr(VI), *Aquatic Toxicology*, 167, 124–133.
- Martinez P, Martin W, Cerff R, 1989, Structure, Evolution and Anaerobic Regulation of a Nuclear Gene Encoding Cytosolic Glyceraldehyde–3–phosphate Dehydrogenase from Maize, *Journal of Molecular Biology*, 208, 551–565.
- Membre N, Bernier F, Staiger D, Berna A, 2000, *Arabidopsis thaliana* Germin-like Proteins: Common and Specific Features Point to a Variety of Functions, *Planta*, 211, 345–354.
- Mika A, Luthje S, 2003, Properties of Guaiacol Peroxidase Activities Isolated from Corn

- Root Plasma Membranes, *Plant Physiology*, 132, 1489–1498.
- Moral R, Navarro P J, Gomez I, Mataix J, 1995, Effects of Chromium on the Nutrient Element Content and Morphology of Tomato, *Journal of Plant Nutrition*, 18, 815–822.
- Moulick D, Ghosh D, Santra S C, 2016 Evaluation of Effectiveness of Seed Priming with Selenium in Rice During Germination under Arsenic Stress, *Plant Physiology Biochemistry*, 109, 571–578.
- Mroczek-Zdyrska M, Strubinska J, Hanaka A, 2017, Selenium Improves Physiological Parameters and Alleviates Oxidative Stress in Shoots of Lead-exposed *Vicia faba* L. Minor Plants Grown under Phosphorus-deficient Conditions, *Journal Plant Growth Regulation*, 36, 186–199.
- Mroczek-Zdyrska M, Wójcik M, 2012, The Influence of Selenium on Root Growth and Oxidative Stress Induced by Lead in *Vicia faba* L. minor Plants, *Biological Trace Element Research*, 147, 320–328.
- Muñoz-Bertomeu J, Cascales-Miñana B, Mulet J M, Baroja-Fernández E, Pozueta-Romero J, Kuhn J M, vd., 2009, Plastidial Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Deficiency Leads to Altered Root Development and Affects the Sugar and Amino Acid Balance in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 151, 541–558.
- Nakamura S, Suzui N, Yin Y, Ishii S, Fujimaki S, Kawachi N, 2020, Effects of Enhancing Endogenous and Exogenous Glutathione in Roots on Cadmium Movement in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Science*, 290, 110304.
- Nell R M, Fein J B, 2017, Influence of Sulfhydryl Sites on Metal Binding by Bacteria, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 199, 210–221.
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W, 1988, Improved Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels Including Isoelectric Focusing Gels with Clear Background at Nanogram Sensitivity Using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250, *Electrophoresis*, 9, 255–262.
- Niu L, Yuan H, Gong F, Wu X, Wang W, 2018, Protein Extraction Methods Shape Much of the Extracted Proteomes, *Frontiers in Plant Science*, 9, 802.

- Ogra Y, Ogihara Y, Anan Y, 2017, Comparison of the Metabolism of Inorganic and Organic Selenium Species between Two Selenium Accumulator Plants, Garlic and Indian Mustard, *Metallomics*, 9, 61–68.
- Oliveira H, 2012, Chromium as an Environmental Pollutant: Insights on Induced Plant Toxicity, *Journal of Botany*, 2012, 375843.
- Owusu-Sekyere A, Kontturi J, Hajiboland R, 2013, Influence of Selenium (Se) on Carbohydrate Metabolism, Nodulation and Growth in Alfalfa (*Medicago sativa* L.), *Plant Soil*, 373, 541–552
- Panda S K, Choudhury S, 2005, Chromium Stress in Plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 95–102.
- Pandey V, Dikshit V, Shyam R, 2013, Hexavalent Chromium Induced Inhibition of Photosynthetic Electron Transport in Isolated Spinach Chloroplasts, In: Dubinsky, Z. (Ed.), *Photosynthesis*, InTech.
- Parr P D, Taylor F G, 1982, Germination and Growth Effects of Hexavalent Chromium in Orocol T L (A Corrosion inhibitor) on *Phaseolus vulgaris*, *Environment International*, 7, 197–202.
- Paula E M, da Silva L G, Brandao V L N, Dai X, Faciola A P, 2019, Feeding Canola, Camelina, and Carinata Meals to Ruminants, *Animals*, 9, 704.
- Peralta J R, Gardea Torresdey J L, Tiemann K J, Gomez E, Arteaga S, vd., 2001, Uptake and Effects of Five Heavy Metals on Seed Germination and Plant Growth in Alfalfa (*Medicago sativa* L.), *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 66, 727–734.
- Pereira A S, Dorneles A O S, Bernardy K, Sasso V M, Bernardy D, Possebom G, vd., 2018, Selenium and Silicon Reduce Cadmium uptake and Mitigate Cadmium Toxicity in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen Plants by Activation Antioxidant Enzyme System, *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 18548–18558.
- Pilon-Smits EA, Quinn CF, 2010, Selenium Metabolism in Plants. In: *Cell Biology of Metals and Nutrients*, Heidelberg: Springer, Berlin, pp 225–241.

- Pilon–Smits E A, 2019, On the Ecology of Selenium Accumulation in Plants, *Plants*, 8, 197.
- Pokhrel G R, Wang K T, Zhuang H, Wu Y, Chen W, Lan Y, vd., 2020, Effect of Selenium in Soil on the Toxicity and uptake of Arsenic in Rice Plant, *Chemosphere*, 239, 124712.
- Prado C, Ponce S C, Pagano E, Prado F E, Rosa M, 2016, Differential Physiological Responses of Two *Salvinia* Species to Hexavalent Chromium at a Glance, *Aquatic Toxicology*, 175.
- Pukacka S, Ratajczak E, Kalembe E, 2011, The Protective Role of Selenium in Recalcitrant *Acer saccharum* L. Seeds Subjected to Desiccation, *Journal of Plant Physiology*, 168, 220–5.
- Qing X, Zhao X, Hu C, Wang P, Zhang Y, 2015, Selenium Alleviates Chromium Toxicity by Preventing Oxidative Stress in Cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *Pekinensis*) Leaves, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114, 179–189.
- Qiu B, Zeng F, Cai S, Wu X, Haider S I, Wu F, 2013, Alleviation of Chromium Toxicity in Rice Seedlings by Applying Exogenous Glutathione, *The Journal of Plant Physiology*, 170, 772–779.
- Rahman M M, Hossain K F B, Banik S, Sikder M T, Akter M, Bondad S E C, vd., 2019, Selenium and Zinc Protections Against Metal-(loids)-induced Toxicity and Disease Manifestations, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 168, 146–163.
- Rahman S H, Khanam D, Adyel T M, Islam M S, Ahsan M A, Akbor M A, 2012, Assessment of Heavy Metal Contamination of Agricultural Soil Around Dhaka Export Processing Zone (DEPZ), Bangladesh: Implication of Seasonal Variation and Indices, *Applied Sciences*, 2, 584–601.
- Ramzani P M A, Iqbal M, Kausar S, Ali S, Rizwan M, Virk Z A, 2016, Effect of Different Amendments on Rice (*Oryza sativa* L.) Growth, Yield, Nutrient Uptake and Grain Quality in Ni–contaminated Soil, *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 18585–18595.

- Rascio N, Navari-Izzo F, 2011, Heavy Metal Hyperaccumulating Plants: How and Why Do They Do It? And What Makes Them so Interesting?, *Plant Science*, 180, 169–181.
- Reale L, Ferranti F, Mantilacci S, Corboli M, Aversa S, Landucci F, vd., 2016, Cyto–histological and Morpho–physiological Responses of Common Duckweed (*Lemna minor* L.) to Chromium, *Chemosphere*, 145, 98–105.
- Rizwan M, Ali S, Abbas F, Adrees M, Zia–ur–Rehman M, Farid M, vd., 2017, Role of Organic and Inorganic Amendments in Alleviating Heavy Metal Stress in Oil Seed Crops, *Oil Seed Crops: Yield and Adaptations under Environmental Stress*, 12, 224–35.
- Rodriguez E, Santos C, Azevedo R, Moutinho–Pereira J, Correia C, Dias M C, 2012, Chromium (VI) Induces Toxicity at Different Photosynthetic Levels in Pea, *Plant Physiology and Biochemistry*, 53, 94–100.
- Rout G R, Sanghamitra S, Das P, 2000, Effects of Chromium and Nickel on Germination and Growth in Tolerant and Non–tolerant Populations of *Echinochloa colona* (L.), *Chemosphere*, 40, 855–859.
- Sabbagh M, Van Hoewyk D, 2012, Malformed Selenoproteins are Removed by the Ubiquitin–proteasome Pathway in *Stanleya pinnata*, *Plant Cell Physiology*, 53, 555–564.
- Sabir M, Waraich E A, Hakeem K R, Öztürk M, Ahmad H R, Shahid M, 2015, Phytoremediation: Mechanisms and adaptations, *Soil Remediat Plants*, 4, 85–105
- Saha U, Fayiga A, Sonon L, 2017, Selenium in the Soil–plant Environment: A Review, *International Journal of Applied Agricultural Sciences*, 3, 1–18.
- Sardar R, Zulfiqar A, Ahmed S, Shah A A, Iqbal R K, Hussain S, vd., 2022, Proteomic changes in Various Plant Tissues Associated with Chromium Stress in Sunflower, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29, 2604–2612.
- Scoccianti V, Iacobucci M, Speranza A, Antognoni F, 2013, Over–accumulation of Putrescine Induced by Cyclohexylamine Interferes with Chromium Accumulation

- and Partially Restores Pollen Tube Growth in *Actinidia deliciosa*, *Plant Physiology and Biochemistry*, 70, 424–432.
- Sepehri A, Gharehbaghli N, 2019, Selenium Alleviate Cadmium Toxicity by Improving Nutrient uptake, Antioxidative and Photosynthetic Responses of Garlic, *Russian Journal of Plant Physiology*, 66,152–159.
- Seth C S, Remans T, Keunen E, Jozefczak M, Gielen H, Opdenakker K, vd., 2012, Phytoextraction of Toxic Metals: A Central Role for Glutathione, *Plant Cell Environmental*, 35, 334–346.
- Shah F U R, Ahmad N, Masood K R, Peralta–Videa J R, Ahmad F D, 2010, Heavy Metal Toxicity in Plants, *Plant Adaptation and Phytoremediation*, 71–97, Dordrecht: Springer Netherlands.
- Shahid M, Shamshad S, Rafiq M, Khalid S, Bibi I, Niazi N K, vd., 2017, Chromium Speciation, Bioavailability, Uptake, Toxicity and Detoxification in Soil–plant System: A Review, *Chemosphere*, 178, 513–533.
- Shahsavari N, Jais H M, Shirani Rad A H, 2014, Effect of Zeolite and Zinc on The Biochemical Characteristics of Canola Upon Drought Stress, *Sains Malaysiana*, 43(10), 1549–1555.
- Shahzad B, Tanveer M, Che Z, Rehman A, Cheema S A, Sharma A, vd., 2018, Role of 24-epibrassinolide (EBL) in Mediating Heavy Metal and Pesticide Induced Oxidative Stress in Plants: A Review, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147, 935–944.
- Shanker A K, Cervantes C, Loza–Tavera H, Avudainayagam S, 2005, Chromium Toxicity in Plants, *Environment International*, 31, 739–753.
- Shao H B, Chu L Y, Shao M, Jaleel C A, Mi H, 2008, Higher Plant Antioxidants and Redox Signaling under Environmental Stresses, *Comptes Rendus Biologies*, 331, 433–441.
- Sharma A, Kapoor D, Wang J, Shahzad B, Kumar V, Bali A S, vd., 2020, Chromium Bioaccumulation and Its Impacts on Plants: An Overview, *In Plants*, 9, 100.

- Sharmin S A, Alam I, Kim K H, Kim Y G, Kim P J, Bahk J D, Lee B H, 2012, Chromium–induced Physiological and Proteomic Alterations in Roots of *Miscanthus sinensis*, *Plant Science*, 17, 113–126.
- Shekari L, Aroiee H, Mirshekari A, Nemati H, 2019, Protective Role of Selenium on Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Exposed to Cadmium and Lead Stress During Reproductive Stage Role of Selenium on Heavy Metals Stress, *Journal of Plant Nutrition*, 42, 529–542.
- Shi Y, Zhang Y, Han W, Feng R, Hu Y, Guo J, vd., 2016, Silicon Enhances Water Stress Tolerance by Improving Root Hydraulic Conductance in *Solanum lycopersicum* L., *Frontiers in Plant Science*, 7, 196.
- Shiyab S, 2019, Morphophysiological Effects of Chromium in Sour Orange (*Citrus aurantium* L.), *Hort Science*, 54, 829–834.
- Sidhu G P S, Singh H P, Batish D R, Kohli R K, 2017, Tolerance and Hyperaccumulation of Cadmium by a Wild, Unpalatable Herb *Coronopus didymus* (L.) Sm. (Brassicaceae), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 135, 209–215.
- Sieprawska A, Kornas A, Filek M, 2015, Involvement of Selenium in Protective Mechanisms of Plants under Environmental Stress Conditions-Review, *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 57, 9–20.
- Singh D, Singh C K, Singh D, Sarkar S K, Prasad S K, Sharma N L, 2022, Glycine Betaine Modulates Chromium (VI)–Induced Morpho-physiological and Biochemical Responses to Mitigate Chromium Toxicity in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Cultivars, *Scientific Reports*, 12, 8005.
- Singh H P, Mahaja, P, Kaur S, Batish D R, Kohli R K, 2013, Chromium Toxicity and Tolerance in Plants, *Environmental Chemistry Letters*, 11, 229–254.
- Singh R, Upadhyay A, Singh D, 2018, Regulation of Oxidative Stress and Mineral Nutrient Status by Selenium in Arsenic Treated Crop Plant *Oryza sativa*, *Ecotoxicology Environmental Safety*, 148, 105–113.
- Sinha P, Poland J, Schnölzer M, Rabilloud T, 2001, A New Silver Staining Apparatus and Procedure for Matrix–Assisted Laser Desorption/Ionization–time of Flight

- Analysis of Proteins After Two-dimensional Electrophoresis, *Proteomics*, 1, 835–840.
- Sinha V, Pakshirajan K, Chaturvedi R, 2018, Chromium Tolerance, Bioaccumulation and Localization in Plants: An Overview, *Journal of Environmental Management*, 206, 715–730.
- Sirhindi G, 2013, Brassinosteroids: Biosynthesis and Role in Growth, Development, and Thermotolerance Responses, In *Molecular Stress Physiology of Plants*, 309–329.
- Sors T G, Ellis D R, Na G N, Lahner B, Lee S, Leustek T, 2005, Analysis of Sulfur and Selenium Assimilation in *Astragalus* Plants with Varying Capacities to Accumulate Selenium, *The Plant Journal*, 42, 785–797.
- Srivastava D, Tiwari M, Dutta P, Singh P, Chawda K, Kumari M, vd., 2021, Chromium Stress in Plants: Toxicity, Tolerance and Phytoremediation, *Sustainability*, 13, 4629.
- Staninzayed F T, Pirnie M, 2004, The Transport and Fate of Cr (VI) in the Environment, *Chromium (VI) Handbook*, 161–212.
- Subrahmanyam G, Sharma R K, Kumar G N, Archana G, 2018, *Vigna radiata* var. GM4 Plant Growth Enhancement and Root Colonization by a Multi-Metal-Resistant Plant Growth-Promoting Bacterium *Enterobacter* sp. C1D in Cr (VI)-Amended Soils, *Pedosphere*, 28, 144–156.
- Sultana M Y, Akratos C S, Pavlou S, Vayenas D V, 2014, Chromium Removal in Constructed Wetlands: A Review, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 96, 181–190.
- Sun H, Dai H, Wang X, Wang G, 2016, Physiological and Proteomic Analysis of Selenium-Mediated Tolerance to Cd Stress in Cucumber (*Cucumis sativus* L.), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 133, 114–126.
- Sundaramoorthy P, Chidambaram A, Ganesh K S, Unnikannan P, Baskaran L, 2010, Chromium Stress in Paddy: (i) Nutrient Status of Paddy Under Chromium Stress; (ii) Phytoremediation of Chromium by Aquatic and Terrestrial Weeds, *Comptes Rendus Biologies*, 333, 597–607.

- Tang H, Liu Y, Gong X, Zeng G, Zheng B, Wang D, vd., 2015, Effects of Selenium and Silicon on Enhancing Antioxidative Capacity in Ramie (*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.) under Cadmium Stress, *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 9999–10008.
- Tang J, Xu J, Wu Y, Li Y, Tang Q, 2012, Effects of High Concentration of Chromium Stress on Physiological and Bio-chemical Characters and Accumulation of Chromium in Tea Plant (*Camellia sinensis* L.), *African Journal of Biotechnology*, 11, 2248–2255.
- Tchounwou P B, Yedjou C G, Patlolla A K, Sutton D J, 2012, Heavy Metal Toxicity and the Environment, *International Journal of Exlibris*, 101, 133–164.
- Tiwari K K, Dwivedi S, Singh N K, Rai U N, Tripathi R D, 2009, Chromium (VI) Induced Phytotoxicity and Oxidative Stress in Pea (*Pisum sativum* L.): Biochemical Changes and Translocation of Essential Nutrients, *Journal of Environmental Biology*, 30, 389–394.
- Tripathi D K, Singh V P, Prasad S M, Chauhan D K, Dubey N K, Rai A K, 2015, Silicon-mediated Alleviation of Cr (VI) Toxicity in Wheat Seedlings as Evidenced by Chlorophyll Florescence, Laser Induced Breakdown Spectroscopy and Anatomical Changes, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 133–144.
- Trippe III R C, Pilon-Smits E A, 2020, Selenium Transport and Metabolism in Plants: Phytoremediation and Biofortification Implications, *Journal of Hazardous Materials*, 404, 124178.
- Turakainen M, Hartikainen H, Seppanen M M, 2004, Effects of Selenium Treatments on Potato (*Solanum tuberosum* L.) Growth and Concentrations of Soluble Sugars and Starch, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5378–5382.
- Tyers M, Mann M, 2003, From Genomics to Proteomics, *Nature*, 422, 193–197.
- Varmas S, Jangra M, 2021, Heavy Metals Stress and Defense Strategies in Plants: An Overview, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 10, 608–614.

- Vernay P, Gauthier–Moussard C, Hitmi A, 2007, Interaction of Bioaccumulation of Heavy Metal Chromium with Water Relation, Mineral Nutrition and Photosynthesis in Developed Leaves of *Lolium perenne* L., *Chemosphere*, 68, 1563–1575.
- Von Ballmoos C, Dimroth P, 2007, Two Distinct Proton Binding Sites in the ATP Synthase Family, *Biochemistry*, 46, 11800–11809.
- Wakeel A, Ming Xu, 2020, Chromium Morpho-Phytotoxicity, *Plants*, 9 (5), 564.
- Wallenberg M, Olm E, Hebert C, Björnstedt M, Fernandes A P, 2010, Selenium Compounds are Substrates for Glutaredoxins: A Novel Pathway for Selenium Metabolism and a Potential Mechanism for Selenium–Mediated Cytotoxicity, *Biochemical Journal*, 429, 85–93.
- Wang C Q, 2011, Water–stress Mitigation by Selenium in *Trifolium repens* L., *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174, 276–82.
- Wang J, Cappa J J, Harris J P, Edger P P, Zhou W, Pires J C, vd., 2018, Transcriptome-wide Comparison of Selenium Hyperaccumulator and Nonaccumulator *Stanleya* Species Provides New Insight into Key Processes Mediating the Hyperaccumulation Syndrome, *Plant Biotechnology Journal*, 16, 1582–1594.
- Wang R, Gao F, Guo B Q, Huang J C, Wang L, Zhou Y J, 2013, Short–term Chromium–stress–induced Alterations in the Maize Leaf Proteome, *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 11125–11144.
- Wen K, Li X, Huang R, Nian H, 2022, Application of Exogenous Glutathione Decreases Chromium Translocation and Alleviates Its Toxicity in Soybean (*Glycine max* L.), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 234, 113405.
- White P J, 2016, Selenium Accumulation by Plants, *Annals of Botany*, 117, 217–235.
- Wolucka B A, Montagu M V, 2003, GDP–mannose 3',5'–epimerase Forms GDP–L–Gulose, a Putative Intermediate for the de Novo Biosynthesis of Vitamin C in Plants, *Journal of Biological Chemistry*, 278, 47483–47490.
- Wu C, Dun Y, Zhang Z, Li M, Wu G, 2020, Foliar Application of Selenium and Zinc to Alleviate Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cadmium Toxicity and Uptake from Cadmium-contaminated Soil, *Ecotoxicology Environmental Safety*, 190, 110091.

- Xu H, Yan J, Qin Y, Xu J, Shohag M, Wei Y, vd., 2020, Effect of Different Forms of Selenium on the Physiological Response and The Cadmium Uptake by Rice under Cadmium Stress, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17, 6991.
- Xu J, Yang F, Chen L, Hu Y, Hu Q, 2003, Effect of Selenium on Increasing the Antioxidant Activity of Tea Leaves Harvested During the Early Spring Tea Producing Season, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1081–1084
- Xue T L, Hartikainen H, Piironen V, 2001, Antioxidative and Growth–promoting Effect of Selenium on Senescing Lettuce, *Plant Soil*, 237, 55–61.
- Yao X Q, Chu J Z, Ba C J, 2010, Antioxidant Responses of Wheat Seedlings to Exogenous Selenium Supply under Enhanced Ultraviolet–B, *Biological Trace Element Research*, 136, 96–105.
- Yıldız M, Terzi H, 2021, Exogenous Cysteine Alleviates Chromium Stress via Reducing Its Uptake and Regulating Proteome in Roots of *Brassica Napus* L. Seedlings, *South African Journal of Botany*, 139, 114–121.
- Yoshimoto N, Inoue E, Saito K, Yamaya T, Takahashi H, 2003, Phloem–localizing Sulfate Transporter, Sult1; 3, Mediates Re–distribution of Sulfur from Source to Sink Organs in Arabidopsis, *Plant Physiology*, 131, 1511–1517.
- Yu R, Ji J, Yuan X, Song Y, Wang C, 2012, Accumulation and Translocation of Heavy Metals in the Canola (*Brassica napus* L.) Soil System in Yangtze River Delta, China, *Plant Soil*, 353, 33–45.
- Yu Y, Liu Z, Luo L, Fu P, Wang Q, Li H, 2019, Selenium Uptake and Biotransformation in *Brassica rapa* Supplied with Selenite and Selenate: A Hydroponic Work with HPLC Speciation and RNA-sequencing, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67, 12408–12418.
- Zaheer M M, Yasin N A, Ahmad S R, Khan W U, Ahmad A, Ali A, vd., 2018, Amelioration of Cadmium Stress in Gladiolus (*Gladiolus grandiflora* L.) by Application of Potassium and Silicon, *Journal of Plant Nutrition*, 41, 461–476.
- Zaheer I E, Ali S, Saleem M H, Yousaf H S, Malik A, Abbas Z, vd., 2022, Combined

Application of Zinc and Iron-lysine and Its Effects on Morpho-physiological Traits, Antioxidant Capacity and Chromium Uptake in Rapeseed (*Brassica napus* L.), PLOS ONE 17, e0262140.

Zeid I M, 2001, Responses of *Phaseolus vulgaris* to Chromium and Cobalt Treatments, Biologia Plantarum, 44, 111–115.

Zemleduch–Barylska A, Lorenc–Plucińska G, 2015, *Populus canescens* Grown on Cr–Rich Tannery Waste: Comparison of Leaf and Root Biochemical and Proteomic Responses, Plant Physiology and Biochemistry, 90, 1–13.

Zemleduch–Barylska A, Lorenc–Plucińska G, 2016, Response of Leaf and Fine Roots Proteomes of *Salix viminalis* L. to Growth on Cr-rich Tannery Waste, Environmental Science and Pollution Research, 23, 18394–18406.

Zeng F, Wu X, Qiu B, Wu F, Jiang L, Zhang G, 2014, Physiological and Proteomic Alterations in Rice (*Oryza sativa* L.) Seedlings under Hexavalent Chromium Stress, Planta, 240, 291–308.

Zewail R M Y, El–Deseoukey H S, Islam K R, 2020, Chromium Stress Alleviation by Salicylic Acid in Malabar Spinach (*Basella alba*), Journal of Plant Nutrition, 43, 1268–1285.

Zhang L, Hu B, Li W, Che R, Deng K, Li H, vd., 2014, OsPT2, a Phosphate Transporter, is Involved in the Active Uptake of Selenite in Rice, The New Phytologist, 201, 1183–1191.

Zhao C, Ren J, Xue C, Lin E, 2005, Study on the Relationship Between Soil Selenium and Plant Selenium Uptake, Plant and Soil, 277, 197–206.

Zhao J, Liang X, Zhu N, Wang L, Li Y, Li Y F, vd., 2020, Immobilization of Mercury by Nano-elemental Selenium and the underlying Mechanisms in Hydroponic-cultured Garlic Plant, Environmental Science: Nano, 7, 1115–1125.

Zhao Y, Hu C, Wang X, Qing X, Wang P, Zhang Y, vd., 2019a, Selenium Alleviated Chromium Stress in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *Pekinensis*) by Regulating Root Morphology and Metal Element Uptake, Ecotoxicology Environmental Safety, 173, 314–321.

- Zhao Y, Hu C, Wu Z, Liu X, Cai M, Jia W, vd., 2019b, Selenium Reduces Cadmium Accumulation in Seed by Increasing Cadmium Retention in Root of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.), *Environmental and Experimental Botany*, 158, 161–170.
- Zhu Z, Chen Y, Shi G, Zhang X, 2017, Selenium Delays Tomato Fruit Ripening by Inhibiting Ethylene Biosynthesis and Enhancing the Antioxidant Defense System, *Food Chemistry*, 219, 179–184.

