



**KURŞUN STRESİNE MARUZ KALAN MISIR (*Zea mays* L.)
FİDELERİNDE TİYOÖRE UYGULAMASININ
İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet TÜRKMEN

Danışman

Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

İkinci Danışman

Doç.Dr. Hakan TERZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

2025

Bu tez çalışması 24.FEN.BİL.05 numaralı proje ile Afyon Kocatepe Üniversitesi
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KURŞUN STRESİNE MARUZ KALAN MISIR (*Zea mays* L.)
FİDELERİNDE TİYOÖRE UYGULAMASININ İYİLEŞTİRİCİ
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mehmet TÜRKMEN

Danışman

Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

İkinci Danışman

Doç. Dr. Hakan TERZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

2025

TEZ ONAY SAYFASI

Mehmet TÜRKMEN tarafından hazırlanan “Kurşun Stresine Maruz Kalan Mısır (*Zea mays* L.) Fidelerinde Tiyore Uygulamasının İyileştirici Etkilerinin Araştırılması” adlı tez çalışması lisansüstü eēitim ve ēretim ynetmeliēinin ilgili maddeleri uyarınca 03.10.2025 tarihinde ařaēıdaki jüri tarafından **oy birliēi** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

İkinci Danışman : Doç. Dr. Hakan TERZİ

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

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

ye : Dr. ēr. Üyesi Cem KARAOSMANOēLU
Afyonkarahisar Saēlık Bilimleri Üniversitesi,
Atatürk Saēlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun

...../...../..... tarih ve

..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Bekir YALÇIN

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.

03.10.2025

Mehmet TÜRKMEN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KURŞUN STRESİNE MARUZ KALAN MISIR (*Zea mays* L.) FİDELERİNDE TİYOÜRE UYGULAMASININ İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mehmet TÜRKMEN

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

İkinci Danışman: Doç. Dr. Hakan TERZİ

Bu çalışmada, mısır (*Zea mays* L. cv. Capuzi) fidelerinde büyüme, klorofil içeriği, kurşun birikimi, lipid peroksidasyonu, antioksidan enzim aktiviteleri ve transkriptom değişimleri üzerine kurşunun (Pb) olumsuz etkilerinin yanı sıra bu olumsuz etkilerin tiyoüre (TÜ) ile iyileştirilme potansiyeli araştırılmıştır. Mısır fideleri kontrol, TÜ, Pb ve TÜ+Pb uygulamalarına maruz bırakılmış ve fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler parametreler değerlendirilmiştir. Pb, fidelerin hem gövde hem de kök taze ve kuru ağırlıklarında önemli düzeyde ($p < 0.05$) azalmalara neden olmuştur. Pb teşvikli bu azalma, TÜ uygulaması ile önemli düzeyde hafifletilmiş, özellikle kök kuru ağırlığında %65.50 oranında iyileşme belirlenmiştir. Pb stresine maruz kalan mısır fidelerinin gövdelerine göre köklerinde daha yüksek düzeyde Pb birikimi belirlenmiştir. Bu Pb birikimi, TÜ uygulaması ile yalnızca gövde dokularında önemli düzeyde (%18.77) azalmıştır. Ayrıca, Pb stresi klorofil içeriğini önemli düzeyde (%63.4) azaltmış, bu azalmanın TÜ uygulaması ile önemli düzeyde arttığı (%60.0) belirlenmiştir. Lipid peroksidasyonu göstergesi olan malondialdehit (MDA) içeriği Pb uygulamasıyla artmış, ancak TÜ uygulaması MDA içeriğini kontrol seviyesine düşürmüştür. Pb uygulaması, katalaz (CAT) hariç diğer antioksidan enzimlerin [süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), guaiakol peroksidaz (POD)] aktivitelerini artırmıştır. Diğer taraftan, Pb'a göre TÜ+Pb uygulamasında SOD, CAT ve APX aktivitelerinde azalma ve POD aktivitesinde artma belirlenmiştir. Bu çalışmada kontrol, Pb ve TÜ+Pb uygulamalarına

maruz bırakılan mısır fidelerinin yaprak dokularında RNA-seq analizi gerçekleştirilmiş ve Pb toksisitesine karşı yanıt mekanizmaları ile T  uygulamasının iyileştirici etkileri araştırılmıştır. Analizler sonucunda, kontrol ile Pb karşılaştırmasında 204 artan ve 357 azalan yönde; kontrol ile T +Pb karşılaştırmasında 1.037 artan ve 718 azalan yönde; Pb ile T +Pb karşılaştırmasında ise 171 artan ve 175 azalan yönde diferansiyel olarak ifade edilen gen (DEG) belirlenmiştir. Uygulamalar arasında ortak olarak ifade edilen 253 DEG, Pb stresine karşı T 'n n düzenleyici rolünü ortaya koyan önemli adaylar olarak öne çıkmıştır. Fonksiyonel zenginleştirme analizleri, Pb uygulamasının fotosentez, karbon fiksasyonu ve enerji metabolizmasıyla ilişkili genleri baskıladığını, buna karşılık T +Pb uygulamasının özellikle kükürt ve glutatyon metabolizması, küçük molekül süreçleri ve antioksidan savunma ile ilişkili yolakları uyardığını göstermiştir. RNA-seq sonuçlarının g venilirliğı, on genin qRT-PCR analiziyle doğırlanmış ve elde edilen ifade profillerinin RNA-seq verileriyle uyumlu olduğı gösterilmiştir. Biyod zenleyici olan T 'n n Pb stresinin olumsuz etkisini büyüme, pigment düzeyi ve oksidatif stres gibi parametreler üzerinde koruyucu ve düzenleyici bir etkiye sahip olarak iyileştirdiğı ve mısırın erken büyüme ve gelişme evresini olumlu yönde etkilediğı saptanmıştır. Bu bulgular, T  uygulamasının Pb toksisitesine karşı mısır fidelerinde büyüme, pigment düzeyi ve oksidatif stres parametreleri üzerinde koruyucu ve düzenleyici bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

2025, x + 86 sayfa

Anahtar Kelimeler: Mısır, Kurşun, Tiyo re, Büyüme, Antioksidan enzim, Transkriptomik.

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

INVESTIGATION OF THE AMELIORATIVE EFFECTS OF THIOUREA APPLICATION ON MAIZE (*Zea mays* L.) SEEDLINGS EXPOSED TO LEAD STRESS

Mehmet TÜRKMEN

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Mustafa YILDIZ

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Hakan TERZİ

In this study, the adverse effects of lead (Pb) on growth, chlorophyll content, lead accumulation, lipid peroxidation, antioxidant enzyme activities, and transcriptome changes in maize (*Zea mays* L. cv. Capuzi) seedlings were investigated, along with the potential of thiourea (TU) to alleviate these negative effects. Maize seedlings were subjected to four treatments: control, TU, Pb, and TU+Pb, and physiological, biochemical, and molecular parameters were evaluated. Pb exposure caused significant reductions ($p < 0.05$) in both fresh and dry weights of shoots and roots. This Pb-induced reduction was significantly mitigated by TU application, with a particularly notable 65.50% improvement in root dry weight. Pb accumulated at higher levels in roots than in shoots of maize seedlings exposed to Pb stress. This Pb accumulation was significantly reduced (18.77%) only in shoot tissues with TU application. Furthermore, Pb stress significantly decreased chlorophyll content (63.4%), whereas TU application substantially improved chlorophyll levels (60.0%). Malondialdehyde (MDA), an indicator of lipid peroxidation, increased with Pb treatment but was reduced to control levels with TU application. Pb exposure increased the activities of antioxidant enzymes [superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), and guaiacol peroxidase (POD)] except for catalase (CAT). In contrast, in the TU+Pb treatment compared to Pb alone, activities of SOD, CAT, and APX decreased, while POD activity increased.

Differentially expressed genes (DEGs) were identified in the leaf tissues of maize under control, Pb, and TU+Pb treatments. In this study, RNA-seq analysis was performed on the leaf tissues of maize seedlings exposed to control, Pb, and TU+Pb treatments to investigate the response mechanisms to Pb toxicity and the ameliorative effects of thiourea (TU). The analysis identified 204 upregulated and 357 downregulated differentially expressed genes (DEGs) in the control vs. Pb comparison; 1,037 upregulated and 718 downregulated DEGs in the control vs. TU+Pb comparison; and 171 upregulated and 175 downregulated DEGs in the Pb vs. TU+Pb comparison. Among these, 253 DEGs were commonly expressed across treatments and highlighted as important candidates reflecting the regulatory role of TU in alleviating Pb stress. Functional enrichment analyses revealed that Pb stress suppressed genes associated with photosynthesis, carbon fixation, and energy metabolism, whereas TU+Pb treatment activated pathways related to sulfur and glutathione metabolism, small molecule processes, and antioxidant defense. The reliability of RNA-seq results was confirmed by qRT-PCR analysis of ten genes, showing expression profiles consistent with RNA-seq data. Overall, TU, as a bioregulator, was found to mitigate the adverse effects of Pb stress by exerting protective and regulatory impacts on growth, pigment levels, and oxidative stress parameters, thereby promoting early growth and development in maize seedlings. These findings demonstrate that TU application plays a significant role in enhancing maize tolerance to Pb toxicity by supporting growth, pigment stability, and redox homeostasis.

2025, x + 86 pages

Key words: Maize, Lead, Thiourea, Growth, Antioxidan enzyme, Transcriptomics.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusunun belirlenmesi, deneysel tasarım, bulguların analizi ve tezin yazılması süreçlerinde göstermiş oldukları değerli rehberlik ve destekleri için tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa YILDIZ'a ve ikinci danışmanım Sayın Doç. Dr. Hakan TERZİ'ye şükranlarımı sunarım.

Araştırmanın finansmanını sağlayan 24.FEN.BİL.05 numaralı proje kapsamında Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Ayrıca, bu süreçte her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mehmet TÜRKMEN
Afyonkarahisar 2025

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER ve KISMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	1
2.1 Mısır (<i>Zea mays</i> L.).....	3
2.2 Bitkilerde Kurşun Toksisitesi.....	3
2.3 Kurşunun Bitkiler Tarafından Alınımı	4
2.4 Kurşunun Bitkilerde Taşınımı	5
2.5 Kurşunun Bitkiler Üzerindeki Etkileri	7
2.6 Kurşun Toleransında Genetik Çeşitlilik ve Epigenetik Değişiklikler.....	11
2.7 Kurşun Stresinin Bitki Transkriptom Profili Üzerine Etkileri	13
2.8 Ağır Metal Stresi ve İyileştiricilerin Bitki Transkriptom Profili Üzerine Etkileri	17
3. MATERYAL ve METOT	24
3.1 Bitki Materyali ve Bitki Yetiştirme Koşulları.....	24
3.2 Fidelerin Yaş ve Kuru Ağırlıklarının Belirlenmesi.....	25
3.3 Kadmiyum Birikiminin Belirlenmesi.....	25
3.5 Klorofil İçeriğinin belirlenmesi.....	25
3.6 Malondialdehit İçeriğinin Belirlenmesi	26
3.7 Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	26
3.7.1 Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi.....	27
3.7.2 Guaiakol Peroksidaz (POD) Aktivitesi.....	27
3.7.3 Katalaz (CAT) Aktivitesi.....	27
3.7.4 Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi.....	28
3.8 Transkriptomik Analizler	28
3.8.1 RNA Ekstraksiyonu	28

3.8.2 RNA-seq Analizleri	30
3.8.3 RNA–Seq Verilerinin Validasyonu	33
3.9 İstatistiki Analizler	34
4. BULGULAR	35
4.1 Büyüme Üzerine TÛ Uygulaması ve Pb Stresinin Etkisi	35
4.2 TÛ Uygulamasının Pb Birikimi Üzerine Etkisi	35
4.3 Klorofil İçeriği Üzerine TÛ Uygulaması ve Pb Stresinin Etkisi.....	36
4.4 Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri TÛ Uygulaması ve Pb Stresinin Etkisi	37
4.5 Transkriptomik Analizler	38
4.5.1 Diferansiyel Olarak İfade Edilen Genlerin Belirlenmesi.....	39
4.5.2 Moleküler Fonksiyon ve Yolak Analizleri	41
4.5.2.1 Fotosentez ile İlişkili DEG’lerin Analizleri.....	46
4.5.2.2 Transmembran Taşınımı ile İlişkili DEG’lerin Analizleri	48
4.5.2.3 Stres Savunma ile İlişkili Genlerin Analizleri	49
4.5.2.4 Transkripsiyon Faktörleri ile İlişkili DEG’lerin Analizleri	51
4.5.2.5 Enerji Metabolizması ile İlişkili DEG’lerin Analizleri	53
4.5.2.6 Protein Metabolizması ile İlişkili DEG’lerin Analizleri.....	55
4.5.2.7 Hormon ile İlişkili DEG’lerin Analizleri	57
4.5.2.8 Sekonder Metabolitlerin Biyosentezi ile İlişkili DEG’lerin Analizleri	59
4.5.3 RNA–Seq Verilerinin qPCR ile Doğrulanması	60
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	62
KAYNAKLAR.....	82
ÖZGEÇMİŞ.....	119

SİMGELER ve KISMALAR DİZİNİ

Simgeler	
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
mL	Mililitre
mM	Milimolar
Kısaltmalar	
ABC	ATP–bağlayıcı kaset taşıyıcıları
ABA	Absisik asit
AsA	Askorbat
APX	Askorbat peroksidaz
ZIP	Çinko/demirle düzenlenen taşıyıcı protein
DEG	Diferansiyel olarak ifade edilen gen
PAL	Fenilalanin amonyum liyaz
PC	Fitoşelatin
PCS	Fitoşelatin sentaz
GSH	Glutatyan
GR	Glutasyon redüktaz
GST	Glutasyon S–transferaz
IAA	İndol–3–asetik asit
JA	Jasmonik asit
CAT	Katalaz
MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinaz
MT	Metallotioneinler
NO	Nitrik oksit
POD	Peroksidaz
PDR	Pleiotropik ilaç direnci
PEG	Polietilen glikol
POD	Peroksidaz
ROT	Reaktif oksijen türü
RuBisCO	Rubiloz 1,5–bifosfat karboksilaz/oksijenaz
SA	Salisilik asit
Cys	Sistein
SRG	Strese yanıt veren genler
SOD	Süperoksit dismutaz
TA	Taze ağırlık
TÜ	Tiyoüre
TCA	Trikloroasetik asit
TF	Transkripsiyon faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 4.1 Tüm örnekler için PCA grafiği.	39
Şekil 4.2 Kontrol, TU (25 µM), Pb (150 µM) ve TU+Pb (25 µM + 150 µM) uygulamalarına maruz kalan mısır fidelerinin yaprak dokularından elde edilen DEG'lerin sayısı	40
Şekil 4.3 Her karşılaştırmadan elde edilen DEG'lerin birleşimine dayalı olarak örneklerin ve genlerin gruplandırılmasını gösteren ısı haritası.	41
Şekil 4.4 Kontrole göre Pb uygulamasında tespit edilen DEG'lerin GO zenginleştirme analizi sonuçları.....	43
Şekil 4.5 Kontrole göre TÛ+Pb uygulamasında tespit edilen DEG'lerin GO zenginleştirme analizinin sonuçları	44
Şekil 4.6 Pb'a göre TÛ+Pb uygulamasında tespit edilen DEG'lerin GO zenginleştirme analizinin sonuçları.....	46
Şekil 4.7 Fotosentez ile ilişkili DEG'leri gösteren ısı haritası.	47
Şekil 4.8 Transmembran taşınımı ile ilişkili DEG'lerin ısı haritası.	49
Şekil 4.9 Stres savunma sistemi ile ilişkili DEG'lerin ısı haritası.	50
Şekil 4.10 Transkripsiyon faktörleri ile ilişkili DEG'lerin ısı haritası.	52
Şekil 4.11 Enerji ve karbohidrat metabolizması ile ilişkili DEG'lerin ısı haritası.....	54
Şekil 4.12 Protein metabolizması ile ilişkili DEG'lerin ısı haritası.	56
Şekil 4.13 Hormon biyosentezi ile ilişkili DEG'lerin ısı haritası.	58
Şekil 4.14 Sekonder metabolitlerin biyosentezi ile ilişkili DEG'lerin ısı haritası.	60
Şekil 4.15 Kontrol, Pb ve TÛ+Pb uygulamalarına maruz bırakılan mısır fidelerinin yapraklarında ifade edilen ve RNA-seq analizi ile elde edilen FPKM değerleri ve RT-qPCR kullanılarak doğrulanan 10 genin ifade profili.....	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 4.1 Mısır fidelerinde gövde ve kök dokularının büyümesi üzerine Pb (150 µM) ve TÛ (25 µM) uygulamalarının etkisi	35
Çizelge 4.2 Mısır fidelerinde gövde ve kök dokularının Pb içeriği üzerine Pb (150 µM) ve TÛ (25 µM) uygulamalarının etkisi	36
Çizelge 4.3 Mısır fidelerinde yaprak dokularının klorofil içeriği üzerine Pb (150 µM) ve TÛ (25 µM) uygulamalarının etkisi	36
Çizelge 4.4 Mısır fidelerinin yaprak dokularında MDA içeriği ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerine Pb (150 µM) ve TÛ (25 µM)'nin farklı uygulamalarının etkisi	37
Çizelge 4.5 RNA-seq analizlerine ait istatistikler.	38
Çizelge 4.6 Uygulamalar arası karşılaştırmalar sonucunda elde edilen gen sayıları.	40

1. GİRİŞ

Ağır metallerin çevresel kirliliği ve toprakta birikimi, tarımsal üretimde bitki gelişimini olumsuz yönde etkilemesi nedeniyle önemli bir endişe kaynağıdır. Hızlı sanayileşme, uygunsuz metal kullanımı, atıkların çevreye bırakılması ve depolanması ile aşırı gübre ve pestisit uygulamaları sonucunda ağır metaller tarımsal alanlarda birikmekte ve bu durum hem insan sağlığı hem de çevre için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır (Amel vd. 2016). Bitkiler, bu metalleri absorbe ettiklerinde strese maruz kalarak metabolik sistemlerini ve gen ekspresyonlarını yeniden düzenlemektedir (Dixit vd. 2016). Ağır metaller arasında kurşun (Pb), yaygın kullanımı, yüksek toksisitesi, kalıcılığı ve toprak ile su ekosistemlerinde biyobirikim özelliği nedeniyle en ciddi çevresel kirleticilerden biridir. Kurşun dalış ağırlıkları, pigmentler, mühimmat, kristal cam, kablo kaplamaları, otomobil aküleri, radyasyon koruması ve korozyon sıvılarının depolanması gibi birçok endüstriyel amaç için yaygın biçimde kullanılmaktadır (Collin vd. 2022). Kurşun, kökler tarafından pasif olarak absorbe edilip biriktirildikten sonra apoplastik yollar aracılığıyla taşınmakta ve vasküler akış sistemi ile bitki içinde dağıtılmaktadır. Ancak, Pb'nin yalnızca küçük bir kısmı transpirasyona bağlı apoplastik ve simplastik taşıma yolları üzerinden yapraklara ulaşmaktadır (Wang vd. 2021). Absorbe edilen Pb çoğunlukla köklerde depolanırken, bir kısmı bitkinin üst aksamlarına da taşınmaktadır (Kumar vd. 2017). Pb stresine maruz kalındığında, reaktif oksijen türlerinin (ROT) aşırı üretimi hücrel organellere zarar vermektedir (Hasan vd. 2019). Savunma sisteminin ilk mekanizması Pb'nin hücrelere girişini engellemekken, ikinci mekanizma ise Pb iyonlarının neden olduğu yüksek ROT düzeyleri ile başa çıkabilmek için antioksidanların ve aktivitelelerinin devreye girmesidir (Maia vd. 2022).

Besin zinciri yoluyla insan sağlığını tehdit etmesi nedeniyle, tarımsal bitkilerde Pb birikiminin azaltılması gerekmekte ve bu doğrultuda çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir. Mineral besin elementlerinin veya biyoregülatörlerin uygulanması, metabolik ve bitki düzeyinde birçok fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmayı kontrol ederek bitkilerin abiyotik strese karşı doğal savunmasını güçlendirmektedir (Luqman vd. 2023). Tiyoüre ($\text{NH}_2\text{-CS-NH}_2$; TÜ), kükürt bakımından zengin bir bitki gelişim düzenleyicisi olup bitki gelişimini düzenlemenin yanı sıra, abiyotik stresin yol açtığı oksidatif hasara karşı

etkin bir koruma sağlamaktadır (Patade vd. 2020). T 'n n etki mekanizmasının redoks durumunun dengelenmesi ve buna bağlı biyokimyasal ile moleküler değişiklikler olduğu ileri sürülmektedir (Srivastava vd. 2021). Çeşitli  alışmalar, T  uygulamasının farklı abiyotik stres koşullarına karşı morfo–fiziyojik ve biyokimyasal yolakları iyileştirerek bitki savunmasında önemli bir rol oynadığını rapor etmiştir (Haider vd. 2022, Zahid vd. 2024).

Günümüzde transkriptomik yaklaşım, bitkilerin abiyotik streslere karşı verdiği tepkilerin araştırılmasında güçlü bir yöntem olarak kabul edilmekte ve Pb stresine maruz bırakılan mısır bitkilerinde başarıyla kullanılmıştır (Zhang vd. 2024, Feng vd. 2025). Meng vd. (2022), *Trifolium pratense* L.'de farklı Pb konsantrasyonlarına karşı transkriptomik ve metabolomik yanıtları incelemiş ve bitki hormon sinyal iletimi ile nişasta–sükroz metabolizmasının iki önemli yolak olduğunu ortaya koymuştur. Mısırdaki yapılan transkriptom analizleri ise flavonoid metabolizmasının Pb stresine verilen yanıtta köklerde kritik bir rol oynadığını göstermektedir (Guo vd. 2024, Han vd. 2024). Bununla birlikte, transkriptom dizilemesi ile belirlenen genlerin başlıca transmembran taşınımı, oksidoredüktaz aktivitesi, karbon ve azot metabolizması, MAPK sinyal yolu ve bitki hormon sinyalleşmesi ile ilişkilendirilmiş ve fenilpropanoid biyosentezi ile nişasta ve sükroz metabolizmasının mısırdaki Pb stresine verdiği yanıtta kritik yollar olduğunu ortaya koymuştur (Zhang vd. 2024). Bununla birlikte, T –teşvikli Pb toleransı altında yatan moleküler mekanizmalar henüz aydınlatılamamıştır. Bu nedenle, mevcut çalışmada T  uygulamasının Pb stresi altındaki mısır (*Zea mays* L.) fidelerinde büyüme, Pb birikimi, klorofil içeriği, lipid peroksidasyonu, antioksidan enzim aktiviteleri ve gen ifadesi üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Mısır (*Zea mays* L.)

Mısır (*Zea mays* L.), Poaceae familyasına ait önemli bir tahıl ürünüdür. *Zea mays* toplam $2n = 20$ kromozoma sahip tek yıllık bitkidir. Mısır genomu ortaya çıkarılmış olan ilk tahıl türüdür (Köseoğlu 2019). *Zea* cinsi, en önemlisi *Zea mays* L. olmak üzere 8 türe sahiptir ve geri kalan *Zea* türleri çoğunlukla Meksika ve Orta Amerika'ya endemik yabani bitkilerdir. Buğday ve çeltikten sonra dünyanın en önemli üçüncü ürün bitkisidir (Sandhu vd. 2007). Kültürü yapılan en eski bitkilerden birisi olan mısır, her zaman en önemli kültür bitkilerinden birisi olmuştur. Bunun nedeni, insan gıdası ve hayvan yemi olarak kullanılmasının yanı sıra çok sayıda endüstri ürünlerinde de kullanılmasıdır (Öz vd. 2013).

2.2 Bitkilerde Kurşun Toksisitesi

Ağır metal kirliliği dünyadaki en yaygın stres faktörleri arasındadır ve insan dahil doğadaki diğer canlıların sağlığı için potansiyel riskleri nedeniyle önemli bir problem haline gelmiştir. Kurşun (Pb) dahil ağır metaller, toprak ve suda kolayca bulunabileceği ancak doğal olarak uzaklaştırılması veya parçalanması zor olduğu için en ağır kirleticiler arasında yer almaktadır Pb'un daha geniş çevreye yayılma kaynağı endüstriyel uygulamalar, fosil yakıt yakma ve kurşunlu benzin kullanımındır. Pb, havada, suda ve ayrıca tüm büyüme ortamlarının toprağında mevcuttur. Pb, bitkiler için gerekli olmayan bir elementtir ve bitkiler için en toksik ağır metallerden biri olarak bildirilmiştir (Prasad 1999).

Bitkiler tarafından alınan Pb, çeşitli proteinlerin sülfidril gruplarına bağlanarak metabolizmayı olumsuz etkiler. Bu durum, yapısal bozunmaya veya aktivite inhibisyonuna yol açar ve bazı durumlarda temel elementlerin yer değiştirmesine neden olarak bazı elementlerin eksikliklerine yol açar (Van Assche ve Clijsters 1990, Luna vd. 1994). Pb gibi ağır metal iyonlarının oluşturduğu süperoksit radikalleri ($O_2^{\bullet -}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikalleri (OH) ve lipid peroksitler (LPO) gibi yüksek reaktif

oksijen türlerinin (ROT) üretiminin proteinler, membran lipitleri ve nükleik asitler dahil olmak üzere çeşitli hücrel bileşenlere zarar verdiği bilinmektedir (Halliwell ve Gutteridge 1989).

2.3 Kurşunun Bitkiler Tarafından Alınımı

Endüstriyel faaliyetlerin yoğun olarak sürdürüldüğü bölgelere yakın konumda bulunan alanlarda kültüre alınmış bitkiler için geçerli olan özel koşullar dışında, metallerin bitki dokularında birikim göstermesine neden olan temel mekanizma köklerle gerçekleştirilen alınımdır (Uzu vd. 2010). Pb'un düşük çözünürlüğe sahip olduğu ve normal koşullarda bitki rizosferinde meydana gelen fosfatlar ve sülfatlar olarak çökelmeye uğrayarak bitki tarafından emildiği için daha az kullanılabilir olduğu bildirilmiştir (Blaylock vd. 2000).

Pb bitki kökleri tarafından önemli miktarlarda alınır, fakat toprak üstü kısımlara taşınmasının büyük ölçüde sınırlandığı ileri sürülmüştür (Lane ve Martin 1977). Ancak Miller ve Koeppe (1971), *Zea mays* L. bitkilerinin konsantrasyona bağlı olarak yapraklara önemli miktarlarda Pb'un taşınabileceğini ve yapraklarda biriktirebileceğini göstermiştir. Ağır metaller tüylü yapraklar tarafından atmosferden absorbe edilebilir. Bu bağlamda, Pb'un yapraklar aracılığıyla bitkilere alınabilmesinin yaprak morfolojisine bağlı olduğu gösterilmiştir (Godzik 1993). Diğer taraftan, bitki kökleri tarafından alınan Pb'un büyük bir kısmının köklerde lokalize olduğu kabul edilmektedir (Kumar vd. 1995). Topraktaki Pb'un kullanılabilirliği büyük ölçüde toprak koşullarına bağlıdır. Pb, topraktaki organik maddeye bağlanır. Pb'un alımı ve kullanılabilirliği, toprak parçacık boyutu ve katyon değişim kapasitesi, kök yüzey alanı, kök eksüdatları, mikoriza ve transpirasyon hızı gibi bitkisel faktörler tarafından etkilenir (Davies 1995). Pb'un toprakta absorpsiyonu (Pb olarak) Langmuir ilişkisini takip eder ve 3.0 ila 8.5 arasındaki artan pH ile artar (Lee vd. 1998). Ancak Blaylock vd. (1997), pH'ı 5.5 ila 7.5 arasında olan toprakta Pb çözünürlüğünün fosfat veya karbonat çökeltileri tarafından kontrol edildiğini ve bitkilerin genetik olarak biriktirme kapasitesine sahip olsalar bile çok az miktarda Pb'a erişebildiğini bildirmiştir. Topraktaki Pb'un, zayıf bir Lewis asidi olarak sınıflandırılması, topraklarda ve bitkilerde oluşturduğu iyonik bağların çoğunun güçlü kovalent bir karaktere sahip olduğunu ifade eder. Toprakta bulunan Pb hemen

hemen her zaman organik veya kolloidal maddelere sıkı sıkıya bağlı veya çökelmiş halde bulunduğundan Pb'un bitki kökleri tarafından absorpsiyonunu azaltmaktadır (Sharma ve Dubey 2005).

Toprak suyunda oluşan Pb'un bir kısmı köklerde adsorbe olur daha sonra uronik asitin karboksil gruplarına veya doğrudan rizoderm hücre yüzeyi polisakkaritlerine bağlanır (Seregin ve Ivamov 2001). Pb rizoderm hücre yüzeyine adsorpsiyonundan sonra, pasif yöntemle köklere nüfuz eder ve su translokasyon kanallarını takip eder. Ancak Pb alımı, metalin kök tepesinden ölçülebilen konsantrasyon gradienti nedeniyle bitkinin kökleri boyunca bile gerçekleşmez. Bununla birlikte, kök apekslerinde daha büyük oranda Pb gözlenir, çünkü burada bulunan kök hücreleri gençtir ve köklerin emilimini destekleyen ince hücre duvarlarına sahiptir (Seregin vd. 2004).

Pb'un köklere nasıl girdiği konusunda moleküler seviyede yeterli bilgi bulunmamaktadır. Ancak Pb'un köklere özellikle katyon kanallarını kullanarak girdiği belirlenmiştir. Bitki kökleri tarafından Pb alınımı seçici olmayan bir süreç olmasına rağmen, rizoderm hücrelerinde kuvvetli bir negatif membran potansiyeli sağlayan H^+ -ATPaz pompalarının fonksiyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir (Hirsch vd. 1998, Wang vd. 2007). Köklerle gerçekleşen Pb alınımının kalsiyum iyonları tarafından inhibe edildiği ve bunun kalsiyum kanalları için iki katyon arasındaki rekabetten kaynaklandığı belirlenmiştir (Huang ve Cunningham 1996, Kim vd. 2002). Birçok araştırmacı kalsiyum kanallarının Pb iyonlarının köklere girmesi için gerekli olduğunu bildirmiştir (Wang vd. 2007, Pourrut vd. 2008). Transgenik bitkilerin kullanımı ile Pb'un bitki köklerine siklik nükleotid iyon kanalları veya düşük afiniteli katyon taşıyıcıları gibi seçici olmayan alternatif mekanizmalarla alınabileceği ortaya çıkarılmıştır (Arazi vd. 1999, Kohler vd. 1999, Wojas vd. 2007).

2.4 Kurşunun Bitkilerde Taşınımı

Bitki dokularındaki Pb dağılımı, köklerden bitkinin toprak üstü kısımlarına Pb translokasyonunu içermektedir. Diğer eser metallerin aksine, Pb translokasyon kısıtlaması gösterir (Doğan vd. 2018). Pb Genellikle köklerde yoğunlaşır (%95) ve

sadece küçük bir miktarının (%5) toprak üstü kısımlara aktarılır (Zhou vd. 2016). Pb köklerde, hücre duvarlarındaki iyon bağlayıcı bölgelere bağlanarak hücre dışında çökelebilmektedir. Rucińska–Sobkowiak vd. (2013) tarafından bildirildiği gibi birikmiş Pb, kök başlığına bitişik apikal meristemin genişlemesine yol açarak hücre duvarı kalınlaşmasına ve vakuol boyutunda artışa neden olabilmektedir. Çökmemiş veya bağlanmamış Pb, muhtemelen pleiotropik ilaç direnci (PDR), mitokondriyal iç zar (ATP) proteini ve ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıları yoluyla hücrenin diğer kısımlarına taşınabilir (Lee vd. 2005). P tipi pompalar olarak bilinen bu taşıyıcılar, plazma membranı boyunca eser metallerin mobilizasyonunda kilit bir rol oynamaktadır. Pb veya Pb içeren toksik moleküllerin plazma membranı boyunca aktif akışında ve ardından Pb kaynaklı toksisiteden kaçınmak için inaktif organellere ayrılma rol oynamaktadırlar (Jiang vd. 2017). Pb'un hücre dışına taşınmasını düzenleyerek Pb direncine katkıda bulunan PDR12 ve ATM1 (Lee vd. 2005) ve lösün bakımından zengin tekrar (LRR) proteini (Zhu vd. 2013) gibi birçok taşıyıcı tanımlanmıştır.

Bitkilerde Pb toprak üstü kısımlara göre kökte daha yüksek oranda birikmekte, sadece küçük bir kısmı bitkilerin toprak üstü kısmına taşınabilmektedir (Kiran ve Prasad 2017). Çalışmalar, negatif yüklü lignin ve pektinler tarafından taşınma veya çökeltme veya hücre duvarlarındaki müsilağ üronik asitlerin karboksilik grubuna bağlanma (Islam vd. 2007, Arias vd. 2010) veya hücreler arası boşluklarda (Malecka vd. 2008) veya kortikal ve rizodermal hücrelerde vakuolar sekestrasyon (Pourrut vd. 2011) dahil olmak üzere bu kökten sürgüne taşınımın kısıtlanmasında çeşitli faktörlerin sorumlu olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, endoderm de fiziksel bir bariyer görevi görmektedir ve bu mekanizmada kilit bir rol oynamaktadır. Genel olarak, biriken Pb, kaspari şeridi tarafından endodermiste çökelebilmekte ve ardından Pb'un büyük bir kısmının bitki detoksifikasyon sistemleri tarafından tutulduğu simplastik taşıma gerçekleşmektedir (Kaur vd. 2013). Daha yoğun siyah bir granül olarak Pb'un varlığı, bir transmisyon elektron mikroskobu kullanılarak doğrulanmıştır (Li vd. 2016). Araştırmacılar, biriken bu Pb partiküllerinin plazmolize, hücre membran yapısında hasara ve membranın vakumlanmasına neden olduğunu belirtmişlerdir. Leadmium™ Green AM moleküler probu ve in vivo floresan mikroskobu kullanılarak Pb kompartmanlaşması üzerine bir başka çalışmada, Pb'un *Iris lactea* köklerinde hücre duvarı, epidermis, stele ve vasküler

dokuların yakınında biriktiği gösterilmiştir. Öte yandan, yaprak dokusunda Pb en çok sklerenkima hücresi yakınında, ardından ksilem, floem ve mezofil hücrelerinde tespit edilmiştir (Yuan vd. 2015). Verbruggen vd. (2009), köklerden toprak üstü kısımlara metal taşınmasının ksilem yoluyla translokasyon gerektirebileceğini ileri sürmüştür. Ksileme ek olarak, bazı çalışmalar bu metal translokasyonunun floem yoluyla da gerçekleşebileceği bildirilmiştir (Rascio ve Navari-Izzo 2011). Bu olgu, Pb ile muamele edilmiş *Prosopis* bitkisinin ksilem ve floem hücrelerinin yakınında daha yüksek oranda Pb birikiminin meydana geldiği tespit edilen bir X-ışını haritalama çalışmasıyla doğrulanmıştır (Arias vd. 2010, Zheng vd. 2012). Çalışmalar ayrıca Pb'un ksilem dokularından geçerken minerallerle (fosfor, sülfür ve kalsiyum) (Zheng vd. 2012) ve organik veya amino asitle (Maestri vd. 2010) kompleksler oluşturabileceğini öne sürmüştür.

2.5 Kurşunun Bitkiler Üzerindeki Etkileri

Pb'un tohumun çimlenme oranı, fide büyümesi, kuru kök ve sürgün kütlesi, fotosentez, solunum, bitki-su ilişkisi, mineral beslenme ve çeşitli enzimatik aktiviteler gibi bitkinin çeşitli yönleri üzerinde zararlı etkileri olduğu bilinmektedir (Munzuroğlu ve Geckil 2002).

Genel olarak, Pb'un etkileri daha yüksek seviyelerde ve süreklilikte daha belirgindir. Ancak, metalin daha az konsantrasyonu bile bazı biyolojik süreçleri tetikleyebilmektedir (Gomes 2011). Bu zararlı etkiler genellikle kloroz, yaprak yüzeyinde nekroz, yaprak yaşlanması ve kısıtlı büyüme gibi belirli semptomlar olarak tanımlanmaktadır. Daha yüksek seviyelerde, tohum çimlenmesi ciddi şekilde etkilenir, ayrıca yüksek Pb konsantrasyonları sonunda hücre ölümüne yol açabildiği belirlenmiştir (Seregin ve Ivanov 2001). Hücresel düzeyde Pb, aktiviteleri için gerekli olan sülfidril (-SH) grupları içeren enzimlerin aktivitelerini inhibe etmektedir (van Assche ve Clijsters 1990). Köklerin bu etkiye karşı daha hassas olduğu bitkicik aşamasında kök ve sürgün büyümesi de engellenirken Ca, Fe, Mg, P ve Zn gibi mineral besin maddelerinin emilimini ve translokasyonunu azaltarak ve iyonların iyon taşıyıcılara bağlanmasıyla köklerden yapraklara alım ve hareket için kullanılamamasına neden olarak büyümeyi

olumsuz yönde etkilemektedir (Xiong 1997). Bu nedenle, en önemlisi fotosentez olmak üzere çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerin, Pb'dan büyük ölçüde etkilendiği bildirilmiştir (Gomes 2011).

Bitkiler mikromolar seviyesinde bile Pb'a maruz kaldıklarında tohum çimlenmesi ve büyüme üzerindeki olumsuz etkileri gözlenebilmektedir (Kopittke vd. 2007). Çimlenme olayının çok düşük Pb konsantrasyonlarında bile inhibe olduğu bildirilmiştir (Tomulescu vd. 2004, Islam vd. 2007). Kurşun toksisitesinin tohum çimlenmesi üzerindeki inhibe edici etkisi *Hordeum vulgare*, *Elsholtzia argyi*, *Spartina alterniflora*, *Pinus halepensis*, *Oryza sativa* ve *Zea mays*'da rapor edilmiştir (Tomulescu vd. 2004, Islam vd. 2007, Sengar vd. 2009, Zhang vd. 2018). Pb'un tohum çimlenmesi üzerindeki inhibe edici etkisinin, Pb'un amilaz ve proteaz enzimleri üzerindeki olumsuz etkilerinden kaynaklandığı belirtilmiştir (Sengar vd. 2009). Pb toksisitesi bitkilerde fide büyümesini ve gelişmesini de belli oranda inhibe etmektedir (Dey vd. 2007, Gopal ve Rizvi 2008, Ghani vd. 2016). Pb düşük konsantrasyonlarda bile bitkilerde kök ve gövde büyümesini inhibe etmektedir (Islam vd. 2007). Bu inhibisyonun özellikle köklerde çok daha belirgin olduğu belirlenmiş bunun nedeni olarak da köklerdeki yüksek Pb birikimi gösterilmiştir (Liu vd. 2008, Jiang ve Liu 2010). Pb toksisitesine 48–72 saat maruz bırakılmış *Allium cepa* köklerindeki mitokondrilerde şişme, kristallerin kaybolması, endoplazmik retikulum ve diktiozomlarda vakuolizasyon, plazma membranında fiziksel hasarlar ve nukleusda renk koyulaşması gibi semptomların ortaya çıktığı rapor edilmiştir. Yüksek Pb konsantrasyonları aynı zamanda bitkilerde biyokütleyi de olumsuz yönde etkilemektedir (Gopal ve Rizvi 2008, Piotrowska vd. 2009, Singh vd. 2010). Şiddetli Pb toksisitesi altında hem bitkilerde yaprak sayısı ve boyutları azalmakta, hem de morumsu renge sahip olan daha kırılgan yapraklar oluşmaktadır (Gupta vd. 2009). Pb toksisitesi altındaki bitkilerde büyüme hızında gözlenen azalmanın nedeni olarak mineral madde beslenmesinin bozulması ve fotosentetik aktivitenin yavaşlaması olduğu rapor edilmiştir (Gopal ve Rizvi 2008, Islam vd. 2008).

Fotosentez oranındaki azalma, Pb'a bağlı fitotoksitenin ana örneğidir ve bitkisel üretimin azalmasına neden olur (Singh vd. 2010). Bu metalin plastokinon, karotenoidler ve elektron taşıma zinciri üretimini engellediği, aynı zamanda karbondioksit

fiksasyonunda rol oynayan enzimlerin çalışmasına zarar verirdiği de tespit edilmiştir (Mishra vd. 2006, Qufei ve Fashul 2009). Pb stresi koşullarında geliştirilen bitkilerde hem stomatal hem de stomatal olmayan kısıtlamaların karbondioksit fiksasyonunu azalttığı bilinmektedir (Qufei ve Fashul 2009). Ayrıca, Pb'a bağlı toksik etkiler bitkilerde oksidatif stresi uyarır ve fotosentez sürecinin azalmasına neden olan klorofilin kesilmesinden sorumlu olan klorofilaz enziminin üretimini ve etkisini daha da artırır (Liu vd. 2008). Genellikle, klorofil a, klorofil b'ye kıyasla daha az duyarlıdır (Xiong vd. 2006).

Klorofilin ayırt edici yeşil renginin zarar görmesi sadece porfirin halkasının parçalanması ile gerçekleşir (Harpaz–Saad 2007). Pb, Mg, Fe gibi önemli minerallerin daha az emilmesine neden olur ve bu da klorofil moleküllerinin oluşumunu etkiler. Pb'un N– ve S–ligand proteinlerine empatisi nedeniyle tilakoid yapı etkilenmektedir (Ahmed ve Tajmir–Rahi 1993).

Toprak ortamındaki yüksek Pb konsantrasyonları, büyüyen bitkilerde mineral besin dengesizliğine neden olur. Pb'un gözlemlenen etkilerinin çoğu, dokulardaki mineral dengesizliğinin bir sonucu olarak dolaylı görünmektedir. Çoğu durumda Pb, kök sistemine katyonların (K^+ , Ca, Mg, Mn, Zn, Cu, Fe^{3+}) ve anyonların (NO_3^-) girişini engeller. Pb toksisitesi altında mikro ve makro besin alımının azalmasına ilişkin iki mekanizma önerilmiştir. Fiziksel olarak adlandırılan ilk mekanizma, metal iyon yarıçaplarının büyüklüğüne dayanırken, kimyasal olan ikinci mekanizma, hücre metabolizmasında metal kaynaklı bozukluğa dayanır ve bu da membran enzim aktivitelerinde ve membran yapısında değişikliklere yol açar. Köklerden K^+ 'un dışarı atılması, görünüme göre hücre membran proteinlerinin K^+ –ATPaz ve –SH gruplarının Pb'a karşı aşırı duyarlılığından kaynaklanmakta ve ikinci tip mekanizmaya bir örnektir (Sharma ve Dubey 2005).

Pb, köklerin emilim bölgelerinden birçok iyonun erişimini fiziksel olarak engeller (Godbold ve Kettner 1991). Kök uçlarındaki ve bazal kökteki Pb seviyeleri benzer görülmüş, Pb köklerdeki mineral element seviyelerini değiştirir. Kök uçlarında Ca, Fe, Zn seviyeleri Pb'a maruz kaldıktan sonra azalır. Norveç ladininin kök uçlarında alınan

Ca'un %40'ı kök ucu büyümesinde kullanılmıştır. Pb'a maruz kaldıktan sonra kök büyümesinin inhibisyonu, kök uçlarındaki Ca'un azalmasından kaynaklanmakta ve bu da hücre bölünmesinde veya hücre uzamasında bir azalmaya yol açmaktadır (Haussling vd. 1988). Norveç ladin iğnelerinde, Ca ve Mn seviyeleri Pb uygulamasıyla azalır ve bu, kök uçlarının sayısının ve endodermisten apoplastik çözünen madde akışının olduğu yerlerin azalmasının bir sonucu olabilmektedir. Pb, bitkinin farklı organlarındaki besin elementlerinin genel dağılımını etkilemekte Mn ve S'ün genel dağılım oranı, Pb toksisitesi altında kök aşırı sürgün oluşumunun olduğu gözlemlenmiştir, bu da bu iyonların kökte tutulduğunu göstermektedir. Fosfor içeriğinin toprak Pb'u ile negatif korelasyonlu olduğu belirlenmiştir (Paivoke 2002). Kök azot içeriği ve nitrat alımı Pb toksisitesi altında önemli ölçüde azalmıştır. Pb'a maruz kalan bitkilerde, bununla birlikte nitrat redüktaz aktivitesi düşmekte ve azot metabolizması bozulmaktadır (Burzynski ve Gabrowski 1984).

Kloroplasttaki genel hücre metabolizması reaktif oksijen türlerinin üretimiyle sonuçlanır. Süperoksit radikalleri ve hidrojen peroksit gibi ROT'lar çevrenin belirgin ajanlarına maruz kaldıktan sonra üretilir. Çeşitli ROT'lar arasında hidrojen peroksit hücre zarından geçme yeteneğine sahiptir ve bunun sonucunda hücre sinyalizasyonunda doğrudan rol oynamaktadır (Pitzschke vd. 2006). Bitki hücrelerinde oksidatif strese neden olan bu ROT üretimi, Pb'u da içeren toksik ağır metallerin ortak bir özelliğidir (Grover vd. 2010, Singh vd. 2010). ROT, hücre antioksidan depolarını tükettikten sonra hızla saldırılabilmekte ve nükleik asitler, proteinler ve lipitler gibi çeşitli biyomolekülleri oksitleyebilmektedir (Wang vd. 2007, Yadav 2010). Bu saldırılar kalıcı metabolik işlev bozukluğuna ve hücre ölümüne neden olabilir. Pb, çeşitli hücre zarlarının lipid bileşiminde önemli değişikliklere neden olmaktan sorumlu olduğu belirlenmiştir (Singh vd. 2010, Yan vd. 2010). Çoklu doymamış yağ asidi ve lipitlerde meydana gelen esterler ROT'a karşı oldukça hassastır (Gupta vd. 2010). Kuşkusuz, ROT doymamış yağ asitlerinden hidrojenin uzaklaştırılmasına neden olur ve hassas olan lipit radikalleri ve aldehitleri üretir, sonuçta lipit çift tabakasının bozulmasıyla sonuçlanmaktadır (Mishra vd. 2006). Pb, plazma membranındaki lipidlerin sıkı bir şekilde modifikasyonuna neden olup (Grover vd. 2010, Yan vd. 2010) anormal hücre yapısının gelişmesine yol açmaktadır (Gupta vd. 2009). *Zea mays* bitkisinde, Pb'a bağlı olarak lipid bileşiminde ve

K⁺ iyonu sızıntısında değişiklikler tanımlanmıştır (Malkowski vd. 2002). Pb iyonlarının çeşitli bitki türlerinde lipid peroksidasyonuna neden olduğu, doymuş yağ asitlerinin miktarını düşürdüğü ve hücre zarlarının doymamış yağ asidi seviyesini yükselttiği bulunmuştur (Singh vd. 2010).

Pb'un bitkilerdeki toksisitesi belirli oranda sahip olduğu antimitotik etkisinden kaynaklanmaktadır (Shahid vd. 2011, Lyu vd. 2020). Pb'un *Allium cepa* kök hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak antimitotik etkiye sahip olduğu uzun süre önce Hammet (1928) tarafından ortaya çıkarılmış, daha sonra ise ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır (Patra vd. 2004). *Vicia faba* köklerinde Pb'un mitotik evreyi kısalttığı, interfazın ve hücre siklusunun uzamasına yol açtığı belirlenmiştir (Patra vd. 2004). Bitkilerde Pb toksisitesinin ilk evresi Pb iyonlarının hücresel membranlara ve çeperlere bağlanmasıdır. Böylece bu yapılar mekanik olarak daha katı bir hale dönüşür ve hücre bölünmesi belli oranda inhibe edilir. İkinci basamak ise mitoz için oldukça önemli olan mikrotübüllerin bozulmasıdır. Pb toksisitesi aynı zamanda hücre bölünmesinin G2 ve M evrelerini inhibe ederek anormal hücrelerin oluşumuna neden olur. Bu durum Pb iyonlarının siklinler gibi hücre siklusu ile ilgili olan proteinlerle doğrudan veya dolaylı etkileşimlerinden kaynaklanmaktadır. Antimitotik mekanizmanın tersine Pb genotoksik etkilere yol açtığı mekanizmalar oldukça komplekstir ve tam olarak anlaşılamamıştır. Pb'un düşük konsantrasyonlarda mitoz bölünme üzerinde belirgin bir etkisi yoktur. Ancak anafaz evresinde kromozomal köprülerin oluşumu (aberasyon), mayoz sırasında asentrik fragmentlerin kaybı, kromozomal fragmentasyon ve mikronukleus oluşumu gibi etkileri olduğu belirlenmiştir (Patra vd. 2004, Marcato vd. 2009, Barbosa vd. 2010). Pb'un bitki hücrelerinde mikrotübül ağını bozarak kromozom aberasyonlarına yol açtığı sanılmaktadır. Yapılan in vitro araştırmalar Pb'un DNA zincirlerinde kırılmalara yol açtığını da ortaya çıkarılmıştır (Rucinska vd. 2004, Gichner vd. 2008, Shahid vd. 2011). Malecka vd. (2008), Pb'un nükleusa girerek direkt olarak DNA'ya ya da dolaylı olarak proteinlere bağlandığını belirlemiştir. Pb iyonları DNA'ya bağlandıktan sonra DNA'nın onarım ve replikasyon mekanizmasını bozmaktadır.

2.6 Kurşun Toleransında Genetik Çeşitlilik ve Epigenetik Değişiklikler

Pb toksisitesi gibi çevresel stres faktörlerine karşı bitki adaptasyonunun temelini genetik

çeşitlilik oluşturmaktadır. Bitki popülasyonları, doğal seçilim ve genetik çeşitlilik yoluyla Pb toksisitesine karşı duyarlılıktan toleransa kadar değişebilen bir tepki sergilemektedir. Bitkiler, artan Pb seviyesine bağlı olarak metal taşıyıcıları, detoksifikasyon enzimleri ve strese duyarlı proteinleri kodlayan genlerdeki değişiklikleri kapsayan Pb toleransının genetik belirleyicileri olabilecek çok sayıda genetik varyasyona maruz kalmaktadır. Artan Pb toleransı ile ilgili aday genlerin ve alellerin tanımlanmasının doğrulanması, Pb'a toleranslı ürün çeşitlerinin geliştirilmesini amaçlayan hedefli ıslah programları ve genetik mühendisliği yaklaşımlarının yolunu açabileceği bildirilmiştir (Lu vd. 2023).

Pb stresine yanıtta epigenetik değişiklikler önemli bir rol oynamakta ve bu durum Pb varlığında genlerin ifadesinde yer alan süreci anlamayı sağlamaktadır. Epigenetik değişiklikler, Pb ile kontamine olmuş bitkilerde yönlendirici olabilmekte ve genlerin nasıl performans göstereceğini hassas bir şekilde ayarlayabilmektedir. Ayrıca, epigenetik değişiklikler, doğru genlerin doğru zamanda aktive edildiğini veya inhibe edildiğini doğrularak, genetik durumu etkilemeden çevresel streslere uyumlu bir tepki oluşturmaktadır (Agarwal vd. 2020, Abdulraheem vd. 2024). DNA metilasyonu, genellikle genlerin inhibe edilmesine yol açan yaygın bir epigenetik mekanizmadır. DNA metilasyonu, Pb stresi sırasında çevrede Pb'un mevcudiyetine yanıt olarak hangi genlerin ifade olup olmayacağını etkileyebilmektedir (Dhar vd. 2021). Histon modifikasyonları, DNA'nın ne kadar sıkı veya gevşek paketlenildiğini etkileyerek gen ifadesini etkilediği, belirli genlerin erişilebilirliğini değiştirebildiği ve Pb stresi sırasında bitkinin Pb kontaminasyonuna verdiği tepkiyi etkileyebildiği bildirilmiştir (Ueda vd. 2020, Nitsch vd. 2021). Küçük RNA (sRNA) aracılı gen düzenlenmesi, belirli genleri hedef alabilmekte ve bunların ifadesini teşvik edebilmekte veya inhibisyonuna neden olabilmektedir (Chen vd. 2022). sRNA'lar, Pb stresi altında bitkinin stres faktörüne verdiği tepkinin ayarlanmasında önemli bir rol oynayabilmektedir. Pb stresinin epigenetik görünümü, Pb stresine maruz kalan bitkilerde meydana gelen epigenetik varyasyonların genel modelini ifade etmektedir (Chhatwal vd. 2024). Bu görünüm, DNA metilasyon modelleri, histon modifikasyonları ve sRNA aktivitesini içermekte ve bunların tümü birlikte bitkilerin Pb stresine adaptasyon mekanizmasını etkilemektedir. Epigenetik değişikliklerin gen ifadesini nasıl etkilediğini anlamak, bitkilerin Pb'un

neden olduğu strese nasıl tepki verdiklerini çözmek için önem taşımaktadır (Chen vd. 2025). Epigenetik süreçler genlerin aktivasyonu ve inhibisyonunu ayarlarken, bitkinin Pb toksisitesini yönetme ve zorlu ortama uyum sağlama yeteneğini düzenleyebilmektedir. Pb stresinin bir sonucu olarak, kromatin yapısında değişiklikler olabilmekte ve bu da bitkilerin stres faktörüne etkili bir tepki geliştirme yeteneğini etkileyebilmektedir. Bunun yanı sıra, bu epigenetik değişiklik, Pb toksisitesine maruz kalan bitkilerde fenotipik plastisitenin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı ve bunun da büyüme profilleri, kök gelişimi ve stres toleransı gibi özellikleri etkilediği bildirilmiştir (Chang vd. 2020). Bitkilerdeki epigenetik yolları manipüle etmek, Pb toksisitesine karşı toleransı artırabilmekte ve bu durum kirlenmiş ortamlarda sürdürülebilir büyüme için hedefli bir strateji sunmaktadır (Gupta vd. 2024).

2.7 Kurşun Stresinin Bitki Transkriptom Profili Üzerine Etkileri

Pb'un oluşturduğu stres, doğal koşullarda bitkiler için önemli bir tehdit olup, bitkilerin hücrel faaliyetlerini bozarak zarara yol açmaktadır (Yadav vd. 2020, Yadav vd. 2023). Pb, bitki gelişimini olumsuz etkileyen, besin eksikliğine yol açan, klorofil sentezini engelleyen, fotosentezi azaltan ve büyümeyi engelleyen son derece toksik bir maddedir (Arsova vd. 2018). Pb stresine yanıt olarak, bitki köklerinde çeşitli fizyolojik ve moleküler düzeyde değişimler meydana gelmektedir. Bu yanıtlar, gen ifadesinde değişiklikler, artan antioksidan aktivite ve sinyal molekülleri arasındaki karmaşık çapraz haberleşmeyi içermektedir (Moeen–Ud–Din 2023). Pb stres tepkisi nedeniyle bitkilerde moleküler düzeyde karmaşık bir gen düzenleyici olaylar ağının düzenlendiği bilinmektedir (Wu vd. 2021).

Pb'un bitkiler üzerindeki etkileri bitki türlerine ve toksisite konsantrasyonlarına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Bitkilerde Pb stresi ve bunun fizyolojik ve hücrel detoksifikasyon mekanizmaları üzerinde çalışmalar olmasına rağmen Pb'un moleküler düzeydeki etki mekanizmaları hakkında çok az şey bilinmekte ve Pb toksisitesinin gen ifadesi üzerindeki etkisi hakkında daha da az şey anlaşılmıştır (Xiong 1997, Ma vd. 2001). Transkriptom dizileme teknolojisi (RNA–seq), birçok bitkinin çevresel stres tepkilerinin moleküler çalışmalarında kullanılmaktadır.

Transkripsiyonel profillemeye analizi, Pb stresi altındaki bitkilerde stres algısı, sinyal iletimi ve stres toleransı yollarında yer alan genlerin farklı ifadesini göstermektedir. Bunlar arasında transkripsiyon faktörlerini (örneğin, *AP2/ERF*, *WRKY*, *NAC*), strese duyarlı proteinleri (örneğin, dehidrinler, *LEA* proteinleri) ve detoksifikasyon enzimlerini (örneğin, metalotiyoninler, glutatyon S-transferazlar) kodlayan genler yer almaktadır (Yang vd. 2023). Dahası Pb stresi, aşağı akış yönünde stres tepkilerini koordine eden MAPK'lar ve kalsiyum bağımlı protein kinazlar (CDPK'lar) dahil olmak üzere çok sayıda sinyal yolunun aktivasyonunu tetikleyebilmektedir (Hotamisligil ve Davis 2016, Yip Delormel vd. 2019). MAPK kaskadı, fosforilasyon ve defosforilasyon gibi mekanizmalar aracılığıyla hücre zarı reseptörlerinden bitki hücrelerinin çekirdeğine çevresel sinyalleri iletmektedir (Li vd. 2022). Bu kaskad, sonunda bitkilerde stres tepkisine yol açan çeşitli efektör proteinleri ve transkripsiyon faktörleri (TF'leri) hedef almaktadır. Bitki hormonları, nitrik oksit (NO) ve ROT, gen ifadesini etkileyerek, antioksidan sistemleri aktive ederek ve farklı sinyal molekülleri arasındaki iletişimi kolaylaştırarak MAPK kaskadını aktive ettiği belirlenmiştir (Dvořák vd. 2021) MAPK tarafından düzenlenen 123 azalan yönde TF'leri, bitki toleransını ve Pb birikimini artırmaktadır. MAPK kaskadı, bitkilerin kuraklığa verdiği tepkilerdeki rolüyle iyi bilinmektedir (Li vd. 2022). Ayrıca epigenetik modifikasyonlar (DNA metilasyonu ve histon asetilasyonu) da Pb stres ortamlarında gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli rol alıp bitkilerin çevresel zorluklarla başa çıkma konusundaki adaptasyon potansiyelini düzenlemektedir (Lucibelli vd. 2022, Abdulraheem vd. 2024).

WRKY genleri, bitkilerde bulunan ve DNA bağlama alanındaki korunan bir amino asit dizisi olan *WRKYGQK*'dan adını alan bir TF ailesidir (Liu vd. 2023). Bu genler, bitkilerde çeşitli fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli rol oynamakta ve özellikle bitki stres tepkilerindeki işlevlerinde yer almaktadırlar (Tang vd. 2023). *WRKY* TF, W-kutuları (TTGACC/T) olarak bilinen belirli DNA dizilerine bağlanmaktadır. Bu bağlanma olayları, *WRKY* proteinlerinin hedef genlerin transkripsiyonunu, ifadelerini aktive ederek veya baskılayarak düzenlemesine olanak tanımaktadır. Bu genler, bitkilerin çeşitli biyotik (patojenler gibi canlı organizmalar) ve abiyotik (kuraklık, tuzluluk ve sıcaklık gibi cansız faktörler) streslere verdiği tepkilerde rol oynamaktadır. Strese yanıt veren genlerin temel düzenleyicileri olarak hareket

etmektedirler. Patojen saldırılarına yanıt olarak, *WRKY* genleri savunma mekanizmalarını aktive etmede rol oynadığı bildirilmiştir (Wani vd. 2021). Antimikrobiyal bileşiklerin üretimi de dahil olmak üzere patojen tanıma, sinyalleme ve savunma tepkisiyle ilişkili genlerin ifadesini düzenleyen *WRKY* genleri ayrıca bitkilerin abiyotik streslere verdiği tepkilerde de rol oynamaktadır (Rasheed vd. 2023). Li vd. tarafından (2020) yapılan bir çalışmada, Al stresi altındaki *Arabidopsis thaliana*, *WRKY47*'nin Al stresi altındaki bitkilerin hücre duvarı yeniden şekillenmesini iyileştirmesine yardımcı olarak önemli bir TF olarak hareket ettiği, bunun da köklerin büyümesini artırdığı ve ayrıca bitkilerin Al toksisitesinden kaynaklanan stresi aşmalarına yardımcı olduğu bildirilmiştir. Önemli genler olan *ELP* ve *XTH17*, *WRKY47* tarafından düzenlenmiş ve ayrıca kök hücrelerinde Al'un dengeli dağılımına katkıda bulunmuştur (Li vd. 2020). *Arabidopsis*'te *WRKY12*, doğrudan *GSH1*'i hedef alarak ve dolaylı olarak PC senteziyle ilgili gen ifadesini azaltarak Kadmiyum (Cd) birikimini ve toleransını engellemektedir (Han vd. 2019). Bu genler jasmonik asit (JA), salisilik asit (SA) ve etilen (ET) gibi bitki hormonlarıyla etkileşime girerek düzenlenmektedir. Bu hormonlar stres tepkilerini sinyalleme için gerekli olup, belirli *WRKY* genlerinin ifadesini teşvik edebilmektedir. Bu genler karmaşık sinyalleme ağlarının bir parçasıdır ve MAPK kaskadları ve diğer stresle ilişkili yollar dahil olmak üzere diğer TF'ler ve yollarla çapraz iletişim kurmaktadır (Wani vd. 2021). Bu, bitkilerin stres tepkilerini ince ayarlamasına olanak tanımaktadır. *WRKY* gen ailesi, değişen DNA bağlama özgüllükleri ve afiniteleri olan birden fazla üyeden (izoform) oluşmaktadır (Abdullah–Zawawi vd. 2021). Farklı *WRKY* izoformları, belirli stres faktörlerine yanıt olarak aktive edilebilmekte ve bu da özel bir stres tepkisine yol açabilmektedir. Bu nedenle, araştırmacılar *WRKY* genlerinin hem patojenlere karşı savunmada hem de olumsuz çevre koşullarına uyumda bitki stres tepkilerinde kilit rol oynadığını bildirmişlerdir (Abdullah–Zawawi vd. 2021).

Antioksidan savunma sisteminin aktivasyonu, kurşunun neden olduğu oksidatif stresin zararlı düzeylerine karşı koymanın başlıca stratejilerinden biridir (Li vd. 2024). Antioksidanlar, Pb stresi altında oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROT) temizlenmesinde önemli bir role sahiptir ve bu da hücrel bileşenlere verilen oksidatif hasarı durdurmaktadır (Das ve Roychoudhury 2014). ROT'ların nispeten zararsız

moleküllere dönüştürülmesi, antioksidan savunma sisteminin süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD) ve katalaz (CAT) enzimleri tarafından sağlanmaktadır (Collin 2022). Ek olarak askorbik asit, glutatyon, karotenoidler ve tokoferoller gibi çeşitli enzimatik olmayan antioksidanların da önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Gidlow vd. 2004). Peroksizomlar ve mitokondri gibi organeller ROT metabolizmasında önemli rol oynamaktadır (Navarro–Espíndola vd. 2020). Antioksidan savunma sistemi regülasyonu mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal yolağını ve WRKY ve NAC TF'lerini içermektedir (Collin 2022).

Zhang vd. (2024), mısırın Pb stresine toleransının moleküler mekanizmaları araştırmak için çeşitli Pb konsantrasyonlarına (0, 500 1000, 2000 ve 3000 mg/L) maruz kalan mısır köklerinin transkriptom analizini gerçekleştirmiştir. Araştırmacılar, analiz sonucunda kontrole göre Pb500, Pb1000, Pb2000 ve Pb3000'nin karşılaştırması sonucu sırasıyla 2688, 4753, 5867 ve 6423 artan yönde düzenlenmiş ve 1239, 2438, 4900 ve 9029 azalan yönde düzenlenmiş DEG tespit etmişlerdir. Bu DEG'ler, ABC taşıyıcıları, metal–nikotianamin taşıyıcıları, çinko iyon transmembran taşıyıcıları, sülfat taşıyıcıları, ağır metal taşıma/detoksifikasyon, süperfamilya proteini, amino asit taşıyıcısı, katyon/Ca²⁺ değiştirici, HIPP ve NRAMP taşıyıcıları gibi çeşitli taşıyıcı tipleri ile ilişkilendirilmiştir.

RNA–seq yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada, Pb stresine maruz kalan *Platanus acerifolia*'da yaklaşık 16246 farklı şekilde ifade edilen unigen tanımlanmıştır (Wang vd. 2015). Tanımlanan genlerin çoğu antioksidan enzimler, metal taşıyıcılar ve bitki şelat bileşikleriyle ilişkilendirilmiştir. Dahası, ifade edilen genler fotosentez, gibberellinler ve glutatyon metabolizmasında da önemli bir role sahiptir ve bitki savunma ve detoksifikasyon mekanizmalarında yer almaktadır (Wang vd. 2015). Benzer şekilde, soğuk mevsim bitkisi olan *Festuca arundinacea*'nın moleküler tepkileri, Pb stresi sırasında toplam 25415 unigenin farklı şekilde ifade edildiğini ortaya koymuştur (Li vd. 2017). Analiz, bu genlerin karbohidrat, terpenoidler, poliketidler ve enerji gibi temel yollarda ve hücrel metabolizmalarda yer aldığını göstermiştir. Gen ifadelerindeki farklılıklar, Pb birikiminde ve bitki tolerans tepkilerinde doğrudan veya dolaylı rollerini gösterebilmektedir (Li vd. 2017).

Tian vd. (2015), Pb toksisitesine maruz kalan *Louisiana iris* kök transkriptomunu analiz etmişler ve Pb birikimi ve toleransı ile ilgili mekanizmayı keşfetmek için birçok önemli aday gen ve yolak tanımlamışlardır. Pb stresi altındaki mısır köklerinde, bZIP, ERF ve GARP dahil olmak üzere bir dizi transkripsiyon TF ailesinin artan yönde düzenlendiği belirlenmiştir (Gao vd. 2015). Başka bir çalışmada, ABA biyosentez yolunda yer alan birkaç genin, Pb uygulanan *Hirschfeldia incana*'nın köklerinde ve sürgünlerinde artan yönde düzenlendiği gösterilmiş ve bunun da ABA teşvikli sinyallemenin bitkinin Pb'a verdiği yanıtta potansiyel olarak yer aldığı ifade edilmiştir (Auguy vd. 2016). *Platanus acerifolia*'nın RNA-seq analizleri, antioksidan enzimler, metal taşıyıcılar ve şelat proteinleri dahil olmak üzere Pb maruziyetiyle ilişkili 16246 DEG tanımlanmıştır (Wang vd. 2015). Bu sonuçlar, düzenleyici ağın ve savunma sisteminin, Pb stresi altındaki farklı bitkilerde karmaşık ve benzersiz özgülüklere sahip olduğunu göstermektedir (Wang vd. 2020).

Gao vd. (2023), Pb stresine maruz bıraktıkları Çin lahanasında transkriptomik yanıtları analiz etmişlerdir. Pb stresine maruz kalan bitkilerde Pb alınımlı ve taşınmasıyla ilişkili ABC taşıyıcıları, katyon/ Ca^{2+} değiştirici ve *HIPP* genleri gibi çok sayıda aday genin varlığını göstermiştir (Gao vd. 2023). Mısır bitkisinde, ZmHIPP'nin hücre duvarındaki Pb'un sekestrasyonuna yardımcı olduğu, hücre içi organellerde birikmesini önlediği ve böylece mısır fidelerindeki Pb toksisitesini azalttığı bildirilmiştir (Ma vd. 2022). Çeltik köklerinde OsNRAMP5'in Pb'un önemli bir taşıyıcısı olarak görev yaptığı belirlenmiştir (Chang vd. 2022). Bu sonuçlar, bitkilerin moleküler düzeyde gen ifadesini düzenleyerek Pb stresine uyum sağlama yeteneğine sahip olduğunu ve bunun bitki büyümesi ve gelişimi için çok önemli olduğunu göstermektedir. KEGG analizleri, bu araştırmada tanımlanan DEG'lerin fenilpropanoid biyosentezi, nişasta ve sakaroz metabolizması, flavonoid biyosentezi ve diğer ilgili biyolojik süreçler gibi ortak yollarda yer aldığını ileri sürmüştür.

2.8 Ağır Metal Stresi ve İyileştiricilerin Bitki Transkriptom Profili Üzerine Etkileri

Nitrik oksit (NO), bitki büyümesini ve abiyotik stresi düzenlemede rol oynayan çok işlevli bir sinyal molekülüdür (Cao vd. 2024). Birçok çalışma NO'nin protein kinaz ve

antioksidan enzim aktivitelerinin modülasyonu, flavonoidlerin ve SA, ET, IAA, ABA ve JA gibi diğer sekonder metabolitlerin mobilizasyonu ve Cd alımını artırmak için ABC taşıyıcı, GST'ler ve sitokrom P450'yi kodlayan ilgili genlerin ifadesinin aktivasyonu yoluyla bitki stres yanıtında kritik roller oynadığını göstermiştir (Courtois vd. 2008, Neill vd. 2008, BessonBard vd. 2009, Simontacchi vd. 2013, Wang vd. 2015).

Hibiscus cannabinus L. (kenaf, Deccan keneviri veya Java jüt) ile yapılan bir çalışmada, dışsal nitrik oksit (NO 150 µM) uygulamasının Cd (200 µM) toksisitesini hafifletmedeki moleküler mekanizmaları araştırılmıştır (Cao vd. 2024). Analizler sonucunda, diferansiyel olarak ifade olan genler (DEG'ler) bakımından kontrole göre Cd stresinde 6211 ve Cd'a göre NO+Cd uygulamasında ise 671 gen tespit edilmiş ve bu genlerin bitki hormonu sinyal iletimi, karbohidrat metabolizması ve hücre duvarı biyosentezi gibi temel biyolojik süreçlerde yer aldığı bildirilmiştir. Transkripsiyon faktörleri (WRKY, ERF, MYB vb.) analizinde, NO'nun bu transkriptler üzerindeki düzenleyici etkisi belirlenmiş ve *HcERF.C3* geninin inhibe edilmesinin Deccan keneviri Cd toleransını önemli düzeyde azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca, NO uygulaması ile azot ve sülfat metabolizmasında görev alan genlerin (*NRT*, *AMT*, *SUOX*, *SULTR*) ifade seviyelerinin artmış olması, NO'nun Cd stresinde besin element dengesini iyileştirmede rol oynadığını göstermektedir. Cd taşınımı ile ilişkili ZIP, ABC, CAX, VIT ve HIPP taşıyıcılarının ifadeleri NO ile düzenlenerek, Cd'un hücre duvarında fiksasyonu ve vakuollerde sekestrasyonu sağlanmış, bu durum Deccan kenevirinin Cd stresine karşı toleransını artırmada önemli bir adaptasyon stratejisi olarak değerlendirilmiştir (Cao vd. 2024).

Uzun çayır otu (*Festuca arundinacea*) bitkisinde Cd (50 ppm) stresi üzerine NO'nun (200 µM) hafifletici etkilerini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, yüksek verimli transkriptom analizi (RNA-seq) gerçekleştirilmiş toplam 12 RNA-seq kütüphanesi hazırlanarak dizilenmiş ve de novo analiz yöntemiyle 2.005.577 transkript ile 968.924 unigen elde edilmiştir. Farklı gen ifadesi analizleri sonucunda, Cd stresine yanıt olarak 1.482 diferansiyel olarak ifade olan gen (DEG) belirlenmiş NO uygulaması ile karşılaştırmalı analizlerde sırasıyla 904 ve 118 DEG'in ifade düzeylerinde değişiklikler olduğu bildirilmiştir. Fonksiyonel zenginleştirme (GO) analizleri, NO uygulamasının

başlıca metabolik süreçler, oksidoredüktaz aktivitesi ve metal iyonu bağlanma ile ilişkili genlerde anlamlı değişikliklere yol açtığını göstermektedir. KEGG analizi ise NO'nin Cd detoksifikasyonunda özellikle fenilpropanoid biyosentezi, kükürt metabolizması ve ABC taşıyıcı protein yollarını hedef aldığını ortaya koymaktadır. NO uygulaması, lignin biyosentezinde görev alan genlerin ifadesinin azalmasına sebep olarak Cd alımını dolaylı yoldan azaltmakta, bununla birlikte ABC taşıyıcılarının (özellikle ABCB1 ve ABCC10) ifadesinin artmasını sağlayarak Cd'un hücre içi bölmelere taşınmasını ve detoksifikasyonunu kolaylaştırmaktadır (Zhu vd. 2020). Bhati vd. (2015), ABC taşıyıcılarının önemli rolleri olduğunu ve biyolojik etkilerinin daha fazla karakterize edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Çok işlevli bir sinyal molekülü olan NO'nin, Cd taşınması ve detoksifikasyonunu iyileştirmek için ABC taşıyıcılarını düzenlemede hayati bir rol oynadığı düşünülmektedir (Zhu vd. 2020). Ek olarak NO, bitkileri Cd stresine karşı korumak için azot metabolizmasında yer alan genlerin ve metabolitlerin ifadesini düzenleyebilmekte ve CAT, GLT1, GST'ler ve ADH1 kodlayan genlerin ifadesini artırmaktadır. NO'nin Cd kaynaklı fitotoksisteyi sekonder metabolitlerin biyosentezinin yeniden düzenlenmesi ve aktif taşıma sistemlerinin (ABC taşıyıcıları) aktivasyonu yoluyla hafiflettiğini ortaya koymaktadır. Sonuç, olarak Cd toleransının artırılması için genetik mühendisliği çalışmalarında değerlendirilebilecek potansiyel gen hedeflerini belirlemenin, ağır metal ile kirlenmiş çevrelerde fitoremediasyon uygulamaları açısından moleküler düzeyde önemli veriler sağlayacağı ileri sürülmüştür (Zhu vd. 2020).

Çeltik (*Oryza sativa* ssp. *indica*) bitkisinde NO'nin (30 μ M) As (25 μ M) stresi üzerindeki hafifletici etkisinin moleküler mekanizmaları transkriptomik analiz yoluyla araştırılmıştır (Singh vd. 2017). As stresi üzerine NO uygulamasının metal taşınımı, stres yanıtı, hormon metabolizması ve transkripsiyonel düzenleme ile ilişkili genlerin ifadelerini önemli ölçüde değiştirdiği bildirilmiştir. Bulgular, NO uygulaması ile As alımından sorumlu aquaporin genlerinin ifadesini azaltarak As birikiminin azaltıldığını göstermektedir. Aynı zamanda, glutatyon S-transferazlar, glutaredoksinler, sitokrom P450 enzimleri, ısı şoku proteinleri ve peroksidazlar gibi detoksifikasyonla ilişkili genlerin NO tarafından ifadesi artırılarak antioksidan savunmayı güçlendirmektedir. Ayrıca, NO, azot asimilasyonu ve hormon sinyalleriyle ilişkili genlerin ifadesini

düzenleyerek ederek, stres altında gelişim ve adaptasyonu desteklemektedir. MYB, WRKY ve ERF ailelerine ait transkripsiyon faktörleri ile ikincil metabolit ve kalsiyum sinyali ile ilişkili genlerin de NO uygulamasından etkilendiği bildirilmiştir. NO'nun metal taşınımı, antioksidan aktivite, hormonal denge ve transkripsiyonel düzenlemeyi içeren karmaşık bir gen düzenleme ağı yoluyla As kaynaklı oksidatif stres ve toksisitenin hafifletilmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Sonuç olarak, As stresine karşı NO'nun koruyucu etkisinin ortaya konulmasıyla birlikte, As ile kirlenmiş ortamlarda tarımsal ürünlerin toleransını artırmaya yönelik stratejilerin geliştirilmesine ışık tutabileceği bildirilmiştir (Singh vd. 2017).

Hidrojen sülfür (H_2S) uygulanan bitkilerde, Cd, Zn gibi ağır metaller ve nitrat fazlalığına karşı yüksek toleransın gösterilmesi antioksidan gen ifadesinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Cui vd. 2014, Liu vd. 2016, Guo vd. 2018, Liang vd. 2018). Aşırı nitrat (100 mM) stresi altındaki domates (*Solanum lycopersicum*) bitkilerinde dışsal NaHS (hidrojen sülfür verici, 100 μM) uygulamasının büyüme üzerindeki olumlu etkilerini ve bu etkinin moleküler mekanizmalarını ortaya koymak amacıyla kapsamlı bir transkriptom analizi gerçekleştirilmiştir (Guo vd. 2018). Affymetrix Tomato GeneChip kullanılarak yapılan mikrodizi analizi, aşırı nitrat stresine göre NaHS+aşırı nitrat stresinde 5349 transkriptin yukarı yönde düzenlenirken 5536 transkriptin azalan yönde regüle edildiği bildirilmiştir. Belirlenen yukarı yönde düzenlenmiş 213 ve azalan yönde düzenlenmiş 271 diferansiyel olarak ifade olan gen (DEG) (log 2 kat değişim >2 veya <-2) işlevsel olarak açıklanmış ve 9 işlevsel kategoride sınıflandırılmıştır. Bu kategoriler metabolizma, sinyal iletimi, savunma yanıtı, transkripsiyon faktörü, protein sentezi, taşıyıcı, hücre duvarı ile ilişkili, hormon yanıtı, hücre ölümü, enerji ve bilinmeyen proteinleri içermektedir. NaHS uygulaması, özellikle reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türleri homeostazının sağlanmasında kritik rol oynayan savunma yanıtı genlerinin (SOD, CAT, GPX, HSP vb.) ifadesini artırırken, sinyal iletiminde yer alan MAPK kaskadı, fosfolipazlar (PLD, PLC), kalsiyum bağımlı protein kinazlar ve transkripsiyon faktörleri (*MADS-box*, *WRKY*, *TCP*) gibi genlerin ifadesini azaltmaktadır. Sonuç olarak, dışsal NaHS'nin, ROT ve reaktif azot türleri sinyallemesini ve savunma yanıtı, sinyal iletimi ve transkripsiyon faktörleri gibi azalan yöndeki transkripsiyonel ayarlamayı düzenleyerek domates bitkilerinin aşırı nitrat stres

toleransını artırabileceği ileri sürülmüştür (Guo vd. 2018).

Köpek üzümü (*Solanum nigrum*) bitkisi çinkonun (Zn) farklı konsantrasyonlarına (0, 25, 50, 100, 200 ve 400 μ M) maruz bırakılmış ve bu koşullarda H₂S (50, 100, 200 ve 400 μ M) uygulanmalarının iyileştirici etkileri moleküler düzeyde incelenmiştir (Liu vd. 2016). Aşırı Zn (400 μ M) stresi, köklerde *ZRT*, *IRT*, *NRAMP*, *MTP* ve *HMA4* gibi önemli Zn taşıyıcı genlerinin ifadesini artırarak Zn birikimini artırdığı ve artan H₂O₂ miktarının strese yol açtığı bildirilmiştir. Aksine Liu vd. (2016), H₂S uygulamasının Zn taşıyıcı genlerinin ifade seviyelerini azaltarak Zn alım ve birikimini azalttığını bildirmişlerdir. Zn taşıyıcı genleri, Zn alımı ve düzenlenmesindeki kritik rolleri nedeniyle ağır metal birikimi veya toleransına katkıda bulunan aday genler olarak kabul edilmektedir (Halimaa vd. 2014). SOD, hücreleri oksidatif strese karşı koruyan anahtar bir enzim olarak, O₂⁻'nin H₂O₂ ve oksijene dönüşümünü katalize etmektedir. CSD2, FSD1, FSD2 ve FSD3, Arabidopsis yapraklarında aşırı Zn tarafından ifadesi aşağı yönde düzenlenmiştir (Remans vd. 2012). H₂S antioksidan enzim genlerinin ifadelerini düzenlemekte ve H₂O₂'in temizlenmesinde rol alan *CAT2* geninin ifadesini artırırken, *CSD*, *FSD* ve *pAPX* genlerinin ifadesini azaltarak Zn stresi altındaki oksidatif hasarı azaltmaktadır (Liu vd. 2016). Ayrıca, metal detoksifikasyonunda kritik rol oynayan metal bağlayıcı proteinler olan metallothioneinlerin hem transkripsiyonel hem de translasyonel seviyelerde H₂S uygulamasıyla belirgin şekilde arttığı ve Zn'nun detoksifikasyonuna katkı sağladığı bildirilmiştir (Liu vd. 2016). H₂S'ün Zn taşıyıcı genlerin ifadesini azaltarak Zn alımını azaltması, metallothioneinlerin ifadesini artırması ve antioksidan savunma sistemlerini düzenleyerek ederek reaktif oksijen türlerinin birikimini azaltmasıyla *Solanum nigrum* köklerinde aşırı Zn toksisitesini hafiflettiği tespit edilmiştir (Liu vd. 2016). Sonuç olarak bu araştırmacılar, H₂S'ün ağır metal toleransında potansiyel bir sinyal molekülü olduğunu ve fitoremediasyon stratejilerinin geliştirilmesinde önemli olabileceğini bildirmişlerdir.

Biyokömür, önemli miktarda karbona, yüksek derecede elektronegatifliğe ve ağır metaller de dahil olmak üzere çeşitli bileşikleri adsorbe edebilen bol miktarda fonksiyonel gruba sahiptir (Li vd. 2022). Biyokömür uygulaması, kimyasal özellikleri nedeniyle topraktaki ağır metal toksisitesini ortadan kaldırmak için mükemmel bir

tekniktir (Guo vd. 2020). Dahası, biyokömür NRAMP3, MTP3, ZIP1 ve ABC gibi taşıyıcı proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunu düzenleyebilmekte ve böylece bitkilerde ağır metal elementlerinin emilimini azaltabilmektedir (Wang vd. 2021, Sun vd. 2023). Xu vd. (2024), pamukta (Çin geleneksel erken olgunlaşan pamuk hattı LAT-61) ağır metallerin Cd (4.46 mg.kg^{-1}), Pb (375 mg.kg^{-1}) ve As (1980 mg.kg^{-1}) toksisitesinin biyokömür uygulaması ile hafifletilmesi üzerine yaptıkları çalışmada, biyokömürün ağır metal alımını önemli düzeyde azalttığı, biyokütle birikimini iyileştirdiği, RNA-seq analizi sonucunda ise ABC, HIPP, NRAMP3, PCR ve ZIP gibi metal taşıyıcı proteinlerin ve karbon iskeleti ve plazma membranı ile ilgili genlerin ifadesini düzenleyerek iyonik homeostazı koruduğunu bildirmişlerdir. Biyokömür fotosentezle ilgili genleri azalan yönde düzenleyerek fotosentezi artırdığı, sinyal iletimini aktive ederek pamukta redoks homeostazını yeniden tesis ettiği ve hem antioksidan enzimlerin (POD, SOD ve CAT) aktivitesini hem de ilgili genlerin ifadesini düzenlediği belirlenmiştir (Xu vd. 2024).

Cd stresine maruz bırakılan misk kavununda (*Cucumis melo*) biyokömür kompozitinin (%1, 3 ve 5) Cd (400 mg/kg) stresi üzerindeki hafifletici etkilerinin moleküler mekanizmaları transkriptomik analizlerle araştırılmıştır (Cheng vd. 2013). Çalışmada, yüksek kaliteli RNA-seq verileri 15 örnekten elde edilmiş ve Cd ve biyokömür kompozit uygulamalarının etkisini değerlendirmek için DEG'lerin analizleri gerçekleştirilmiştir. Cd stresinin fenilpropanoid biyosentez yolunu aktive ederek, bitkinin stres tepkileri ve antioksidan savunmasında rol oynayan özellikle Cd'un hücreye girişini engelleyen önemli bir hücre duvarı bileşeni olan ligninin sentezi, sitokrom P450 proteinleri, anneksinler, WRKY TF'leri ve bitki hormon metabolizması (sitokinin ve gibberellin yolları) ile ilişkili genlerin ifadesini artırdığı belirlenmiştir. Biyokömür kompozit uygulaması, Cd tarafından ifadesi artan genlerin ifadelerini genel olarak düşürerek stresi hafifleten bir etki göstermekte ve özellikle %5 biyokömür, Cd toprakta bağlayarak misk kavununda dokularındaki Cd birikimini önemli ölçüde azaltmaktadır. Daha düşük konsantrasyonlar (%1 ve %3) ise Cd alımını sınırlı ölçüde etkilemekte ve bazı durumlarda besin alımını artırarak Cd alımını da teşvik etmektedir. Gen Ontolojisi (GO) ve KEGG zenginleştirme analizleri DEG'lerin metabolik süreçler, hücresel bileşenler ve katalitik aktivitelerle ilişkili olduğunu göstermektedir.

Fenilpropanoid biyosentez yolunun, tüm uygulama gruplarında sürekli olarak zenginleşen kilit bir yol olarak öne çıktığı ve PAL, 4CL, CCR, POD, sitokrom P450, WRKY ve anneksin gibi Cd stresine toleransta rol oynayabilecek aday genlerin belirlendiği bildirilmiştir (Cheng vd. 2013).

Bitki biyolojisi araştırmalarında, birçok bitki türünde uygulanan TÜ'nün büyüme evresine bakılmaksızın büyümeyi artırdığı bildirilmiştir (Chang ve Sung 2000, El-Keblawy, 2013). Bununla birlikte, TÜ'nün çevresel olarak stres altındaki bitkilere uygulanması, normal koşullar altında yetiştirilen bitkilere uygulanmasından daha etkilidir. Tomurcuk dormansisinin kırılması ve mahsul veriminin artırılmasında büyüme uyarıcısı olarak kabul edilen TÜ'nün oksidatif stres toleransı, gen ifadesinin modülasyonu, sinyal mekanizmalarının düzenlenmesi ve indüksiyonunda büyük rolleri olduğu bilinmektedir (Ratnakumar vd. 2016). Arpada (*Hordeum vulgare*) Cd stresi koşullarında dışsal TÜ uygulamasının oksidatif stresi azalttığı ve nispi taze ve kuru ağırlık temelinde büyümeyi iyileştirdiği belirlenmiştir (Ikram vd. 2014). Srivastava vd. (2014), ağır metal stresine karşı tolerans kazandırmak için redoks homeostazını düzenleyen TÜ teşvikli As uygulamasında As seviyelerini %56 oranında azaltan Lsi2'nin (As translokasyonu için taşıyıcılar) azalan yönde düzenlenmesini tetiklediği bildirilmiştir. Aynı zamanda, Sultr1;1 ve 1;2'nin (sülfat taşıyıcıları) yukarı yönde düzenlenmesi, As stresinin olumsuz etkilerini iyileştirmek için sülfür metabolizmasını geliştirdiği ifade edilmiştir (Srivastava vd. 2014). Bu mekanizmalar sayesinde, TÜ sürgünlere ağır metal translokasyonunu kısıtlar ve onları köklerde hapsetmektedir. TÜ takviyesi ile köklerden sürgünlere ksilemdeki metal iyonlarının yüklenmesinin azalmasının bir diğer olası mekanizması, metal iyonlarının sitozoldeki tiyollerle (TÜ tiyol- grubu içerir) şelasyonudur. Tiyollerin varlığı, metal toleransının biyobelirteçleri olarak SH içeren bileşiklerin etkin kullanımını kolaylaştırmaktadır (Borisova vd. 2016, Meng vd. 2019). Sonuç olarak, literatür taramaları sonucunda araştırmamızın başlangıcından tez yazım aşamasına kadar mısırdaki Pb toksisitesine karşı TÜ teşvikli toleransın moleküler mekanizmalarını inceleyen transkriptom çalışmalarına rastlanmamıştır. Bu nedenle, mevcut tez çalışmada Pb stresine maruz bırakılan mısır fidelerinde TÜ teşvikli tolerans mekanizmaları hem fizyolojik ve biyokimyasal hem de transkriptom analizleri yapılarak değerlendirilmiştir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Bitki Materyali ve Bitki Yetiştirme Koşulları

Bu araştırmada, mısır (*Zea mays* L.) çeşidine (Capuzi) ait tohumlar ticari firmadan elde edilmiştir. Tohumlar, kapaklarında havalandırma delikleri bulunan plastik kutular içindeki ıslatılmış 2 kat filtre kâğıdı üzerine yerleştirilmiş ve kontrollü koşullarda (25°C sabit sıcaklık ve karanlıkta) 48 saat çimlendirilmiştir. Yaklaşık aynı kök uzunluğuna sahip fideler, 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 fideler yerleştirilmiştir. Fidler, 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) 5 gün boyunca büyütülmüştür.

Beş günlük mısır fideleri, 150 μM Pb stresi [kurşun II nitrat, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$] ve/veya 25 μM TÜ ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$)'in 4 farklı uygulamalarına 10 gün boyunca maruz bırakılmıştır. Literatür taramaları dikkate alınarak etkili Pb (100, 150 ve 200 μM) ve TÜ (25 ve 50 μM) test konsantrasyonlarını belirlemek için ön çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Pb konsantrasyonu büyüme inhibisyonu temelinde 150 μM olarak belirlenmiştir. Etkili TÜ konsantrasyonu ise Pb'un neden olduğu büyüme inhibisyonunu azaltma etkisi temelinde 25 μM olarak belirlenmiştir. Uygulama grupları şunlardır:

- (1) Kontrol: Sadece besin çözeltisi
 - (2) TÜ: 25 μM TÜ içeren besin çözeltisi
 - (3) Pb: 150 μM Pb içeren besin çözeltisi
 - (4) TÜ + Pb: 25 μM TÜ + 150 μM Pb içeren besin çözeltisi
- Kaplardaki besin çözeltileri gün aşırı değiştirilmiştir.

Uygulamalardan sonra fide büyümesi, Pb birikimi, lipid peroksidasyonu, antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi yanı sıra RNA–Seq analizleri için fideler hasat edilmiştir. Lipid peroksidasyonu, antioksidan enzimlerin aktivitelerinin belirlenmesi ve

transkriptomik analizler için mısır fidelerinin tam gelişmiş 2. yaprak dokuları örneklenmiş ve kullanılıncaya kadar -80°C 'de muhafaza edilmiştir.

3.2 Fidelerin Yaş ve Kuru Ağırlıklarının Belirlenmesi

Pb ve/veya Tü'nün farklı uygulamalarına maruz bırakılan mısır 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 Kadmiyum Birikiminin Belirlenmesi

Pb ve/veya Tü'nün farklı uygulamalarına maruz kalan mısır fidelerinden örneklenen kurutulmuş toprak üstü ve kök dokularında Pb 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 Pb 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 Pb konsantrasyonları Winlab32 paket programı kullanan ICP/OES (Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry, Perkin Elmer 2100 DV) cihazı ile hesaplanmıştır. Pb için analitik belirleme limiti 0.05 mg L^{-1} olacak şekilde ayarlanmıştır. Pb birikimi $\mu\text{g g}^{-1}$ KA olarak hesaplanmıştır.

3.5 Klorofil İçeriğinin belirlenmesi

Kontrol, Tü, Pb ve Tü+Pb uygulamalarına maruz bırakılan mısır fidelerinin yaprak dokularından toplam klorofil (Klo a + b) içeriği Wellburn (1994)'e göre belirlenmiştir. Uygulamalara ait fidelerin yapraklarından yaklaşık 50 mg taze yaprak dokusu alınmıştır. Küçük parçalara ayrılan dokular, 10 mL soğutulmuş metanol içeren ağzı kapaklı cam test tüplerine alınmıştır. Pigmentlerin tamamen metanole geçmesi için

tüpler 48 sa süresince +4°C ve karanlıkta bekletilmiştir. Her uygulamaya ait çözeltinin Klorofil a ve Klorofil b absorbansları sırasıyla 666 ve 653 nm dalga boylarında, spektrofotometre kullanılarak belirlenmiş ve aşağıdaki formüllere göre taze ağırlık (TA) temelinde mg g⁻¹ TA olarak hesaplanmıştır (Wellburn 1994):

$$\text{Klorofil a (Klo a)} = 15.65A_{666} - 7.34A_{653} \times S^*$$

$$\text{Klorofil b (Klo b)} = 27.05A_{653} - 11.21A_{666} \times S$$

* S: Seyreltme katsayısı

3.6 Malondialdehit İçeriğinin Belirlenmesi

Kontrol, Tü, Pb ve Tü+Pb uygulamalarına maruz bırakılan mısır fidelerinin yaprak dokularında lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) miktarının belirlenmesi Heath ve Packer (1968)'a göre yapılmıştır. Yaprak doku örnekleri (250 mg), trikloroasetik asit (TCA, 5 mL %5) ile homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar santrifüj (+4°C, 12.000 ×g ve 5 dakika) edilmiştir. Süpernatandan 250 µL alınarak üzerine tiyobarbitürik 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 ×g, 10 dakika) edilmiştir. Süpernatantlar kuvars küvetlere alınmış ve TU-1880 Double Beam UV-VIS spektrofotometrede 532 ve 600 nm dalga boylarında absorbansları ölçülmüştür. Tiyobarbitürik asit (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 µmol g⁻¹ TA olarak belirlenmiştir.

3.7 Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Kontrol, Tü, Pb ve Tü+Pb uygulamalarına maruz bırakılan mısır fidelerinin yaprak dokularından örnekler (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°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.

3.7.1 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. 50 mM fosfat tamponu (pH 7.8), 0.1 mM EDTA, 13 mM metionin, 75 µM NBT ve %1'lik Triton X-100 içeren karışıma 70 µL enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Bu karışıma 2 µM riboflavin eklenerek test tüpleri 10 dakika için beyaz ışık kaynağı altına yerleştirilmiş ve reaksiyon başlatılmıştır. Örneklerin absorbans değerleri, 560 nm'de TU-1880 Double Beam UV-VIS spektrofotometre ile belirlenmiştir. Bir ünite SOD, deneysel koşullar altında NBT indirgenmesinde %50 inhibisyona neden olan enzim miktarı olarak ifade edilmiştir. Toplam SOD aktivitesi U mg⁻¹ protein olarak hesaplanmıştır.

3.7.2 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 H₂O₂ ve 10 µL 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 µmol min⁻¹ mg⁻¹ protein olarak belirlenmiştir.

3.7.3 Katalaz (CAT) Aktivitesi

Toplam katalaz aktivitesi (CAT; EC 1.11.1.6) Aebi (1984)'e göre belirlenmiştir. Potasyum fosfat tamponu (50 mM, pH 7.0) ve H₂O₂ (10.6 mM) içeren reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Enzim ekstraktı (25 µL) ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır.

H₂O₂'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.

3.7.4 Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi

Askorbat peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11) aktivitesi Nakano ve Asada (1987)'ya göre belirlenecektir. Reaksiyon karışımı 50 mM fosfat tamponu (pH 7.0), 0.1 mM EDTA, 0.25 mM askorbat, 5 mM H₂O₂ ve enzim ekstraktından hazırlanmıştır. Askorbik asidin oksidasyon oranı, spektrofotometre kullanılarak 3 dakika için 290 nm'de absorbanstaki azalmayı takiben belirlenmiştir. Toplam APX aktivitesi, askorbatın ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak EU dk⁻¹ mg⁻¹ protein olarak hesaplanmıştır.

3.8 Transkriptomik Analizler

3.8.1 RNA Ekstraksiyonu

Kontrol, Tü, Pb ve Tü+Pb uygulamalarına maruz bırakılan mısır fidelerinin yaprak dokularından toplam RNA izolasyonu ticari kit (Norgen Biotek Corp. Total RNA Purification Kit) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

- 1) Çalışmaya başlamadan önce tüm çözeltiler, steril odada ve oda sıcaklığında hazır hale getirilmiştir.
- 2) Tüm santrifüjleme işlemleri oda sıcaklığında ve aksi belirtilmedikçe 14.000 rpm'de mikrosantrifüj (Hettich Mikro 20, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.
- 3) 2-Merkaptoetanol içeren lizis tamponu C (Lysis Buffer C) hazırlanmıştır. Her 1 mL lizis tamponu C için 10 μL 2-merkaptoetanol eklenmiştir. Lizis tamponu C'ye 2-merkaptoetanol eklenmesi opsiyonel olmasına karşın çoğu bitki dokusu için eklenmesi önerilmektedir.
- 4) Yıkama çözeltisi A (Wash Solution A), 38 mL konsantre yıkama çözeltisi A'ya 90 mL %96–100 etanol eklenerek hazırlanmıştır.
- 5) Yaprak dokularından lizat hazırlanması aşağıdaki gibidir:
 - a) -80°C 'den alınan yaprak dokuları çözülmeden havan içerisinde sıvı azotla

ince bir toz haline getirilmiştir. Yaprak dokuları (yaklaşık 50 mg), sıvı azotla soğutulmuş 1.5 mL'lik santrifüj tüpüne (RNaz içermeyen) yine sıvı azot ile soğutulmuş spatül ile aktarılmıştır.

- b) Toz haline getirilen dokuların çözülmesine izin verilmeden sıvı azotun havandan buharlaşması sağlanmıştır.
 - c) Her bir tüpe 600 µL lizis tamponu C eklenmiş ve karışım vorteks ile homojenize edilmiştir.
 - d) Homojenize edilen dokular ısıtıcı bloğa yerleştirilerek 55°C'de 5 dakika inkübe edilmiş ve bu süre zarfında tüpler ara sıra vortekslenmiştir.
 - e) İnkübasyon sonrasında bir filtre kolonu (beyaz halkalı) temiz 1.5 mL'lik toplama tüpüne takılarak elde edilen lizat kolona yüklenmiş ve kolonun hücre kalıntısını tutması için 2 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
 - f) Filtre kolonu atılarak tüpte toplanan lizatın hacmine eşit hacimde (her 100 µL lizata 100 µL etanol) %96–100'lük etanol eklenmiş (toplam hacim 1.2 mL) ve tüp vortekslenerek bir sonraki basamağa (6a) geçilmiştir.
- 6) RNA'nın kolona bağlanması işlemleri aşağıdaki şekilde yapılmıştır:
- a) Kit içerisinde çıkan toplama tüplerinden birine bir spin kolon (gri halkalı) yerleştirilmiştir.
 - b) Kolon üzerine 600 µL lizat eklenmiş ve 6.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Bu aşamada, lizatın tamamının toplama tüpüne geçmesi sağlanmalı, aksi takdirde lizat içeren kolon 14.000 rpm'de bir dakika daha santrifüjlenmelidir.
 - c) Toplama tüpündeki süzüntü atılarak kalan 600 µL lizat mevcut spin kolona tekrar yüklenmiş ve 6.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Bu aşamada, lizatın tamamının toplama tüpüne geçmesi sağlanmalı, aksi takdirde lizat içeren kolon 14.000 rpm'de bir dakika daha santrifüjlenmelidir.
 - d) Lizat hacmine bağlı olarak, 6b ve 6c iki kez tekrarlanmıştır.
- 7) Spin kolonunun yıkama çözeltisi A (Wash solution A) ile yıkanması işlemleri aşağıdaki gibidir:
- a) Spin kolona 400 µL yıkama çözeltisi A eklenerek 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Bu aşamada, lizatın tamamının toplama tüpüne geçmesi sağlanmalı, aksi takdirde lizat içeren kolon 14.000 rpm'de bir dakika daha

santrifüjlenmelidir.

- b) Toplama tüpündeki süzüntü atılır ve spin kolon, aynı toplama tüpüne yeniden yerleştirilmiştir.
 - c) Tekrar 400 µL yıkama çözeltisi A mevcut spin kolona eklenmiş ve 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenerek spin kolon ikinci kez yıkanmıştır. Ardından toplama tüpündeki süzüntü atılarak spin kolon aynı toplama tüpüne yeniden yerleştirilmiştir.
 - d) Tekrar 400 µL yıkama çözeltisi A mevcut spin kolona eklenmiş ve 14.000 rpm'de 1 dakika daha santrifüjlenerek kolon üçüncü kez yıkanmıştır. Toplama tüpündeki süzüntü atılarak spin kolon aynı toplama tüpüne yeniden yerleştirilmiştir.
 - e) Kolonu tamamen kurutmak için kolon 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüjlenmiş ve toplama tüpü atılmıştır.
- 8) Spin kolondaki RNA'nın elüsyon çözeltisi A (Elution Solution A) ile elüsyonu işlemleri aşağıdaki gibidir:
- a) Spin kolon, RNaz içermeyen 1.7 mL'lik elüsyon tüpüne yerleştirilmiş ve kolona 75 µL elüsyon çözeltisi A eklenmiştir.
 - b) 2.000 rpm'de 2 dakika ve ardından 14.000 rpm'de 1 dakika daha santrifüjleme işlemi yapılmıştır. Eğer elüsyon tüpünde, spin kolona yüklenen 75 µL elüsyon çözeltisinin tamamı süzülmemiş ise toplama tüpündeki spin kolon tekrar 14.000 rpm'de 1 dakika daha santrifüjlenmiştir.
- 9) Elüe edilen RNA'nın depolanması aşağıdaki gibidir:
- Elüsyon tüpünde toplanan ve -80°C'de muhafaza edilen saf RNA örnekleri RNA-Seq analizlerde kullanılmıştır.

3.8.2 RNA-seq Analizleri

- 1) Wet Lab aşamasındaki işlemler aşağıdaki gibidir:
 - a) Elde edilen RNA'nın kalitesi, Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent RNA 6000 Nano Kit) kullanılarak tespit edilmiştir.
 - b) RNA sekanslama için öncelikle hedef RNA'ya göre depleksiyon yapılmıştır. Böylece hedef RNA'dan rRNA ve miRNA'lar uzaklaştırılmıştır.

- c) Daha sonra poli-T oligoya bağılı manyetik boncuklar kullanılarak poli-A içeren mRNA molekülleri saflaştırılmıştır.
- d) RNA depleksiyonunun ardından, mRNA yüksek sıcaklık altında iki değerklikli katyonlar kullanılarak küçük parçalara ayrılmıştır.
- e) Bölünmüş RNA fragmanları, ters transkriptaz ve rastgele primerler kullanılarak tek zincirli cDNA'ya dönüştürülmüştür.
- f) Daha sonra DNA Polimeraz I ve RNaz H kullanılarak ikinci iplikçik olan cDNA sentezlenmiştir.
- g) Manyetik boncuklarla toplanan cDNA parçalarının uçları onarılmış (son onarım) ve 3' uçlarına adenin eklenmiştir.
- h) Bir sonraki adımda ligasyon temelli olarak fragmanlara adaptörler ve barkodlar eklenmiş ve PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.
- i) Standart teknolojilerin aksine, ikinci PCR aşaması, DNA'yı "daireelleştirme" adı verilen bir aşama ile yuvarlak bir zincire dönüştürerek aynı zincir üzerinde DNA Nanoball (DNB) oluşturulmuş ve böylece PCR hataları en aza indirilmiştir.
- j) Oluşturulan her bir DNB, Illumina Novaseq 6000 dizileme platformunda akış hücresindeki (Pattern Array) noktalara yerleştirilmiştir.
- k) Akış hücresinde (Flow Cell) sekans işlemi gerçekleştirilmiştir. Farklı boyalarla işaretlenmiş modifiye dNTP'leri içeren reaksiyon çözeltisi akış hücresine yüklenmiştir.
- l) Illumina Novaseq 6000 cihazı ile cPAS teknolojisi kullanılarak her Nanoball'daki bazların okunması gerçekleştirilmiştir.

2) Verilerin değerkendirilmesi aşağıdaki gibidir:

- a) Örnek başı +30 milyon çift yönlü (paired-end) 2x100 bp'lik okuma elde edilmiştir.
- b) Okuma işlemi sonrasında, elde edilen verilerin kalite kontrolü ve düzeltme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmada verilerin kalite kontrolünün sağlanması amacıyla FASTQC programı kullanılmıştır (www.bioinformatics.babraham.ac.uk) (Andrews, 2010).
- c) Dizileme sürecinde, fastq okuma verilerindeki düşük kalitedeki baz

okumaları, sonraki analiz basamaklarında sapmalara neden olmaması için okumalardan kırpılmıştır. Kalite filtreleri ve adaptör kırpma işlemleri için Trimmomatic uygulaması (sürüm 0.39) kullanılmıştır (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>). Buna göre Phred puanı 20'den az olan okumalar kırpılmış ve 20 bazdan daha kısa okumalar filtrelenmiştir (Bolger vd. 2014).

- d) Gen seviyesindeki ifade değerleri Kallisto aracı (sürüm 0.46.1) (Bray vd. 2016) ve tximport R paketi kullanılarak elde edilmiştir. *Zea mays* cDNA (komplementer DNA), ncRNA (kodlanmayan RNA) ve GTF (gen aktarım formatı) dosyaları Ensembl Plants veri tabanından (sürüm 56) yüklenmiştir. cDNA ve ncRNA, Kallisto aracı ile birleştirilmiş ve indekslenmiştir. Transkript düzeyindeki ham değerler kallisto quant fonksiyonu ile elde edilmiştir. Gen seviyesindeki ham değerler tximport aracı ile hesaplanmıştır.
- e) Elde edilen kısa transkript dizileri, HISAT2 (Hierarchical Indexing for Spliced Alignment of Transcripts) programı kullanılarak referans genoma hizalanmıştır.
- f) Karşılaştırılan tüm uygulamalarda diferansiyel olarak ifade edilen genler (DEG'ler), DESeq2 R paketi (sürüm 1.38.0) kullanılarak tespit edilmiştir (Love vd. 2014). İstatistiki analizlerden önce ham değerler DESeq2 ile normalleştirilmiştir. DESeq2 ile normalleştirmeden önce sıfır sayımlı genler hesaplamalardan çıkarılmıştır. Anormal değerler temel bileşen analizi (PCA) ile tespit edilmiştir. DESeq2 ile normalleştirilmiş gen sayıları, otomatik ölçeklendirmeden (ortalama merkezleme ve ardından birim standart sapmaya ölçeklendirme) sonra PCA için kullanılmıştır.
- g) Veri setindeki her gen için p-değerleri (p-value), düzeltilmiş (Benjamini-Hochberg düzeltmeli) p-değerleri (padj, p-adjusted) ve kat değişimleri (FC, fold changes) DESeq2 paketi ile hesaplanmıştır. Anlamlı DEG'ler, düzeltilmiş p-değerine ($p < 0,05$) göre seçilmiştir. FC değeri 1'in altında olan DEG'ler azalan yönde düzenlenen (down-regulated) genler olarak kategorize edilirken, FC değeri 1'in üzerinde olan genler artan yönde düzenlenen (up-regulated) genler olarak sınıflandırılmıştır.
- h) Karşılaştırılan uygulamalar arasında DEG'lere ait ontoloji analizleri, Gen

Ontolojisi (GO) veri bankası (<http://www.geneontology.org>) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

- i) Gen Ontolojisi (GO) ve Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi (KEGG) yollarının fonksiyonel zenginleştirme analizleri g:Profiler2 R paketi (sürüm 0.2.1) ile gerçekleştirilmiştir (Kolberg vd. 2020). Anlamlı terimleri p-değeri ($p < 0.05$) eşiğine göre filtrelemek için g:Profiler2 tarafından uygulanan çoklu test düzeltmesi kullanılmıştır. Tüm DEG'ler, artan yönde düzenlenen DEG'ler ve azalan yönde düzenlenen DEG'ler için zenginleştirme analizi ayrı ayrı uygulanmıştır.

3.8.3 RNA–Seq Verilerinin Validasyonu

Kontrol, Pb, ve TÛ+Pb uygulamalarına maruz bırakılan mısır fidelerinin yaprak dokularında gerçekleştirilen RNA–seq analizlerinden elde edilen veriler arasından; bitki stres savunma yanıtı (Osmotin–benzeri protein OSM34), iyon taşınımı (ABC taşıyıcı G ailesi üyesi 34), sinyal iletimi (Mitojenle–kative olmuş protein kinaz 17), detoksifikasyon ve antioksidan savunma (Glutasyon transferase, EC 2.5.1.18), transkripsiyonel düzenleme (MYB transkripsiyon faktörü), metal bağlama ve homeostaz (Metallothionein–benzeri protein), enerji metabolizması (Fosfoenolpirüvat karboksilaz kinaz 3), karbon metabolizması (Nişasta sentaz, EC 2.4.1.21), amino asit metabolizması (Tryptofan sentaz, EC 4.2.1.20) ve gelişimsel düzenleme (Homeobox–lösüm zipper protein, HD–ZIP protein) ile ilişkili 10 gen seçilmiş ve qPCR analizi ile doğrulanmıştır. Yaprak dokularından total RNA izolasyonu ticari kit (Norgen Biotek Corp. Total RNA Purification Kit) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen total RNA’lardan, Xpert cDNA Synthesis Supermix kiti (GRiSP, Porto) kullanılarak cDNA’nın birinci ipliği sentezlenmiştir. Belirlenen 10 gen için primerler, Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>) aracı kullanılarak varsayılan parametrelerle tasarlanmış, benzersizlikleri BLAST aracıyla NCBI nr (non–redundant) veri tabanında doğrulanmış ve erime eğrisi analizleriyle kontrol edilmiştir. qPCR analizleri, β –aktin genine göre normalize edilmiş ve relatif gen ifade düzeyleri Livak ve Schmittgen (2001) metoduna göre ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) hesaplanmıştır.

3.9 İstatistiki Analizler

Denemeler uygulama grubu başına üç biyolojik tekrar içerecek şekilde tasarlanmıştır. Analizlerden elde edilen veriler SPSS paket programı (SPSS ver. 26, Chicago, IL, USA) kullanılarak analiz edilmiştir. Fizyolojik ve biyokimyasal analizlerden elde edilen ortalamalar arasındaki önemli düzeydeki ($p < 0.05$) farklılıklar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi (DMRT) ile belirlenmiştir.



4. BULGULAR

4.1 Büyüme Üzerine Tü Uygulaması ve Pb Stresinin Etkisi

Mısır fideleri kontrol, Tü (25 µM), Pb (150 µM) ve Tü+Pb uygulamalarına maruz bırakılmıştır. Kontrole göre Pb uygulamasında gövde ve kökün taze ve kuru ağırlıkları önemli düzeyde azalmıştır (Çizelge 4.1). Bu azalmalar, gövde taze ve kuru ağırlığı için sırasıyla %54.47 ve %49.13 oranında belirlenirken, kök taze ve kuru ağırlığı için sırasıyla %51.80 ve %45.10 oranında belirlenmiştir. Pb uygulamasına göre Tü+Pb uygulamasında hem gövde taze ve kuru ağırlığı hem de kök taze ve kuru ağırlığını önemli düzeyde artırmıştır. Bu artışlar, gövde taze ve kuru ağırlığı için sırasıyla %32.05 ve %30.12 oranında belirlenirken, kök taze ve kuru ağırlığı için sırasıyla %30.20 ve %65.50 oranında belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Mısır fidelerinde gövde ve kök dokularının büyümesi üzerine Pb (150 µM) ve Tü (25 µM) uygulamalarının etkisi

Uygulamalar	Gövde Taze ağırlık (mg fide ⁻¹)	Gövde Kuru ağırlık (mg fide ⁻¹)	Kök Taze ağırlık (mg fide ⁻¹)	Kök Kuru ağırlık (mg fide ⁻¹)
Kontrol	3.24 ± 0.19 ^{a*}	211.0 ± 13.8 ^a	968.7 ± 15.1 ^a	51.0 ± 1.6 ^a
Tü	2.99 ± 0.19 ^a	189.3 ± 11.9 ^a	920.3 ± 58.4 ^a	48.0 ± 2.6 ^a
Pb	1.48 ± 0.10 ^c	107.3 ± 9.0 ^c	467.0 ± 22.5 ^c	28.0 ± 2.3 ^b
Tü+Pb	1.95 ± 0.06 ^b	139.7 ± 4.3 ^b	608.0 ± 11.2 ^b	46.3 ± 1.8 ^a

*Her bir parametre için farklı harfler (a–c), Duncan çoklu karşılaştırma testine göre ortalamalar arasında önemli düzeydeki farkı gösterir ($p < 0.05$). Tüm veriler ortalama ± standart hata (SE) olarak ifade edilmiştir.

4.2 Tü Uygulamasının Pb Birikimi Üzerine Etkisi

Kontrol, Tü, Pb ve Tü+Pb uygulamalarına maruz kalan mısır fidelerinin gövde ve kök dokularında Pb içeriği belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Kontrol ve Tü uygulanmış mısır fidelerinde Pb seviyeleri tespit limitlerinin altında olduğu için belirlenememiştir. Bununla birlikte, Pb stresine maruz bırakılan mısır fidelerinin gövde ve köklerinde önemli düzeyde Pb birikimi belirlenmiştir. Pb'a göre Tü+Pb uygulamasında Pb birikimi

gövde dokularında önemli düzeyde azalırken (%18.77), kök dokularında ise önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Mısır fidelerinde gövde ve kök dokularının Pb içeriği üzerine Pb (150 µM) ve TÛ (25 µM) uygulamalarının etkisi

Uygulamalar	Gövde Cd birikimi (mg kg ⁻¹ KA)	Kök Cd birikimi (mg kg ⁻¹ KA)
Kontrol	ND	ND
TÛ	ND	ND
Pb	250.3 ± 23.6 ^{a*}	7403.3 ± 276.3 ^a
TÛ+Pb	203.3 ± 3.5 ^b	6985.3 ± 78.2 ^a

*Her bir parametre için farklı harfler (a–b) Duncan çoklu karşılaştırma testine göre ortalamalar arasında önemli düzeydeki farkı gösterir ($p < 0.05$). Tüm veriler ortalama ± standart hata (SE) olarak ifade edilmiştir.

4.3 Klorofil İçeriği Üzerine TÛ Uygulaması ve Pb Stresinin Etkisi

Kontrol, TÛ, Pb ve TÛ+Pb uygulamalarına maruz kalan mısır fidelerinin yaprak dokularında klorofil içerikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Buna göre, kontrole göre Pb ve TÛ+Pb uygulamalarında klorofil içeriği önemli düzeyde azalma gösterirken, Pb uygulamasına göre TÛ+Pb uygulamasında klorofil içeriği önemli düzeyde artmıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Mısır fidelerinde yaprak dokularının klorofil içeriği üzerine Pb (150 µM) ve TÛ (25 µM) uygulamalarının etkisi

Uygulamalar	mg/g TA
Kontrol	5.73 ± 0.38 ^{a*}
TÛ	5.66 ± 0.41 ^a
Pb	2.10 ± 0.18 ^c
TÛ+Pb	3.35 ± 0.20 ^b

*Her bir parametre için farklı harfler (a–c) Duncan çoklu karşılaştırma testine göre ortalamalar arasında önemli düzeydeki farkı gösterir ($p < 0.05$). Tüm veriler ortalama ± standart hata (SE) olarak ifade edilmiştir.

4.4 Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri T  Uygulaması ve Pb Stresinin Etkisi

Mısır fidelerinin yapraklarındaki lipid peroksidasyon seviyeleri malondialdehit (MDA) içeriklerinin bir ölçüsü olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.4). MDA içeriği bakımından kontrol ile T  uygulaması arasındaki fark önemsizdir. Kontrole göre Pb uygulaması lipid peroksidasyonunu önemli düzeyde artırırken, T +Pb uygulamasında T 'nün lipid peroksidasyonunu önemli düzeyde azalttığı belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Kontrole göre T  uygulamasında yalnızca APX aktivitesi önemli düzeyde artmıştır (Çizelge 4.4). Kontrole göre Pb uygulamasında, SOD, POD, CAT ve APX aktivitesi önemli düzeyde artmıştır. Kontrole göre T +Pb uygulamasında SOD, POD ve APX aktiviteleri önemli düzeyde artarken, CAT aktivitesi önemli düzeyde azalmıştır. Pb uygulamasına göre T +Pb uygulamasında SOD ve APX aktiviteleri önemli düzeyde azalmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 Mısır fidelerinin yaprak dokularında MDA içeriği ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerine Pb (150 µM) ve T  (25 µM)'nin farklı uygulamalarının etkisi

Parametreler	Uygulamalar			
	Kontrol	T�	Pb	T�+Pb
MDA içeriği <i>nmol g⁻¹ TA</i>	46.70 ± 0.57 ^a	44.4 ± 2.24 ^a	72.3 ± 1.08 ^b	47.2 ± 1.90 ^a
SOD aktivitesi <i>Unit mg⁻¹ protein</i>	6.45 ± 0.99 ^a	4.79 ± 0.41 ^a	15.23 ± 0.29 ^c	10.83 ± 1.12 ^b
POD aktivitesi <i>µmol min⁻¹ mg⁻¹ protein</i>	21.49 ± 1.39 ^a	24.53 ± 2.06 ^a	40.47 ± 3.98 ^b	42.13 ± 3.18 ^b
CAT aktivitesi <i>µmol min⁻¹ mg⁻¹ protein</i>	0.33 ± 0.03 ^a	0.296 ± 0.013 ^{ab}	0.341 ± 0.033 ^b	0.254 ± 0.023 ^b
APX aktivitesi <i>µmol min⁻¹ mg⁻¹ protein</i>	1.40 ± 0.19 ^a	3.65 ± 0.14 ^b	6.66 ± 0.77 ^d	4.70 ± 0.51 ^c

*Her bir parametre için farklı harfler (a–c), Duncan çoklu karşılaştırma testine göre ortalamalar arasında önemli düzeydeki farkı gösterir (*p* < 0.05). Tüm veriler ortalama ± standart hata (SE) olarak ifade edilmiştir.

4.5 Transkriptomik Analizler

Illumina paired-end dizileme yöntemi (Illumina Novaseq 6000) kullanılarak kontrol, Pb 177.104.013 (yaklaşık 177 milyon) ham dizileme okuması elde edilmiştir. RNA-seq analizlerinde gruplar arasında okuma sayıları ve hizalanma oranları açısından belirgin farklılıklar gözlenmiştir. Kontrol grubunda ortalama 17.6 milyon okuma elde edilmiş olup, pseudo-hizalanma oranı ortalama %54.5 olarak hesaplanmıştır. Pb uygulamasında ortalama okuma sayısı 12.5 milyon, pseudo-hizalanma oranı ise %41.7 bulunmuştur. TÛ+Pb kombinasyonunda ortalama okuma sayısı 29.9 milyon ile en yüksek düzeye ulaşmış, pseudo-hizalanma oranı ise ortalama %60.0 olmuştur. Protein kodlayan okuma oranları genel olarak yüksek seyretmiş ve ortalama olarak kontrol grubunda %96.6, Pb uygulamasında %90.2, TÛ+Pb kombinasyonunda ise %96,0 bulunmuştur. Non-kodlayan okuma oranları ise sırasıyla kontrol için %3.4, Pb için %9.1 ve TÛ+Pb için %4.0 olarak belirlenmiştir. Sekanslama kalitesi tüm gruplarda oldukça yüksektir; ortalama Q20 değerleri %99.4 ve Q30 değerleri %95.7 olarak tespit edilmiştir. GC içerikleri gruplar arasında küçük farklılıklar göstermiş olup, kontrol grubunda ortalama %47, Pb uygulamasında %49, TÛ+Pb kombinasyonunda ise %47 düzeyinde bulunmuştur (Çizelge 4.5).

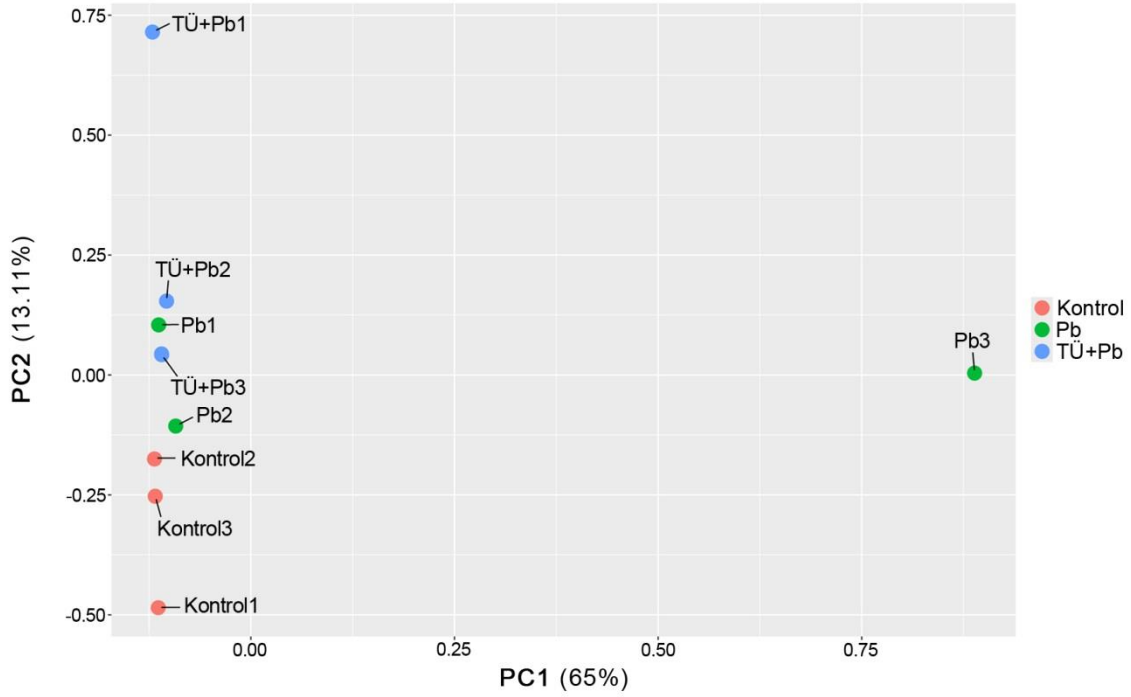
Çizelge 4.5 RNA-seq analizlerine ait istatistikler.

Grup	Toplam ham okuma (baz)	Hizalanmış okuma sayısı (baz)	Hizalama (%)	Protein kodlayan okuma (%)	Q20*	Q30**	% GC
Kontrol	17.297.356	9.539.212	54.6	96.6	99.6	96.6	46.7
Pb	13.358.792	7.649.369	57.4	96.0	98.8	94.8	46.0
TÛ+Pb	29.245.288	16.950.833	60.7	96.0	99.5	96.4	47.7

*Q20, ortalama Phred kalite puanı ≥ 20 olan toplam okumaların yüzdesi, %99 baz doğruluğunu ifade eder.

**Q30, ortalama Phred kalite puanı ≥ 30 olan toplam okumaların yüzdesi, %95 baz doğruluğunu ifade eder.

DESeq2 ile normalize edilmiş gen sayımları, otomatik ölçeklendirme (ortalama merkezleme ve ardından birim standart sapmaya göre ölçekleme) sonrasında PCA analizinde kullanılmıştır. Şekil 4.1’de tüm örneklerle ait PCA analiz sonuçları verilmiştir. Hizalanma oranının düşük olması ve PCA analizinde diğer örneklerden farklı bir profil sergilemesi nedeniyle Pb3 örneği DEG analizine dahil edilmemiştir.



Şekil 4.1 Tüm örnekler için PCA grafiği.

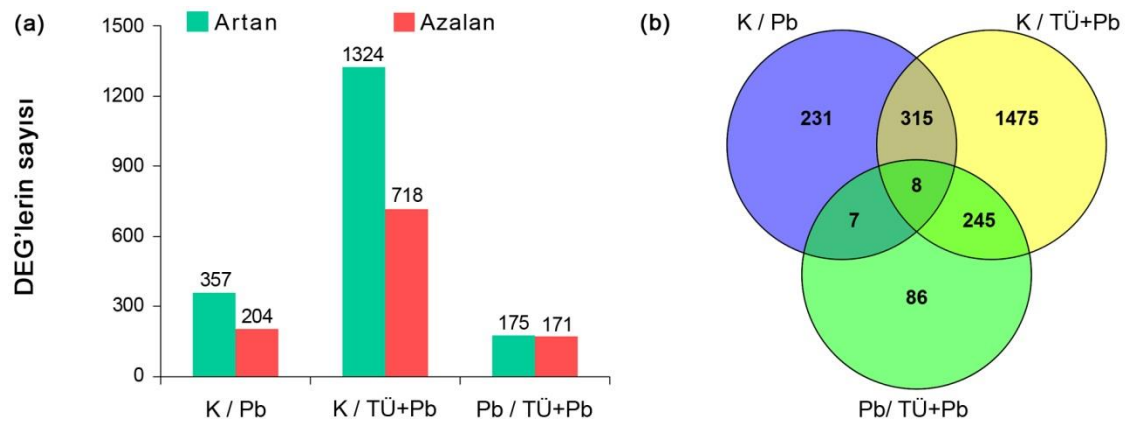
4.5.1 Diferansiyel Olarak İfade Edilen Genlerin Belirlenmesi

Kontrol, Pb ve TÛ+Pb uygulamalarına maruz bırakılan mısır fidelerinin yaprak dokularından elde edilen toplam RNA'ların RNA-seq analizlerine göre sınıflandırma ve karşılaştırma sonrası elde edilen DEG'lere ait veriler Çizelge 4.6'de verilmiştir. Pb stresinin mısır yapraklarındaki gen ifadesi üzerindeki ve TÛ uygulamasının Pb toksisitesi üzerindeki etkilerini incelemek için ikili karşılaştırmalar gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.2). DEG'ler $|\log_2(\text{kat değişimi})| \geq 1$ ve $P < 0,05$ koşullarıyla belirlenmiştir. Kontrole göre Pb uygulamasında 38.572 gen analiz edilmiştir. Buna göre, artan yönde düzenlenen DEG'lerin sayısı 204, azalan yönde düzenlenen DEG'lerin sayısı 357 olarak belirlenmiştir. Kontrole göre TÛ+Pb uygulamasında 37.965 gen analiz edilmiştir. Buna göre, artan yönde düzenlenen DEG'lerin sayısı 1.037, azalan yönde düzenlenen DEG'lerin sayısı 718 olarak belirlenmiştir. Son olarak, Pb uygulamasına göre TÛ+Pb uygulamasında 38.478 gen analiz edilmiştir. Buna göre, artan yönde düzenlenen DEG'lerin sayısı 171 ve azalan yönde düzenlenen DEG'lerin sayısı 175 olarak belirlenmiştir. Uygulamalar arasında ortak olarak ifade olan DEG'ler venn şeması analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.2). Buna göre, Pb ile TÛ+Pb uygulaması arasındaki

253 DEG daha ileri araştırmalar için değerli adaylar olarak kabul edilmiştir.

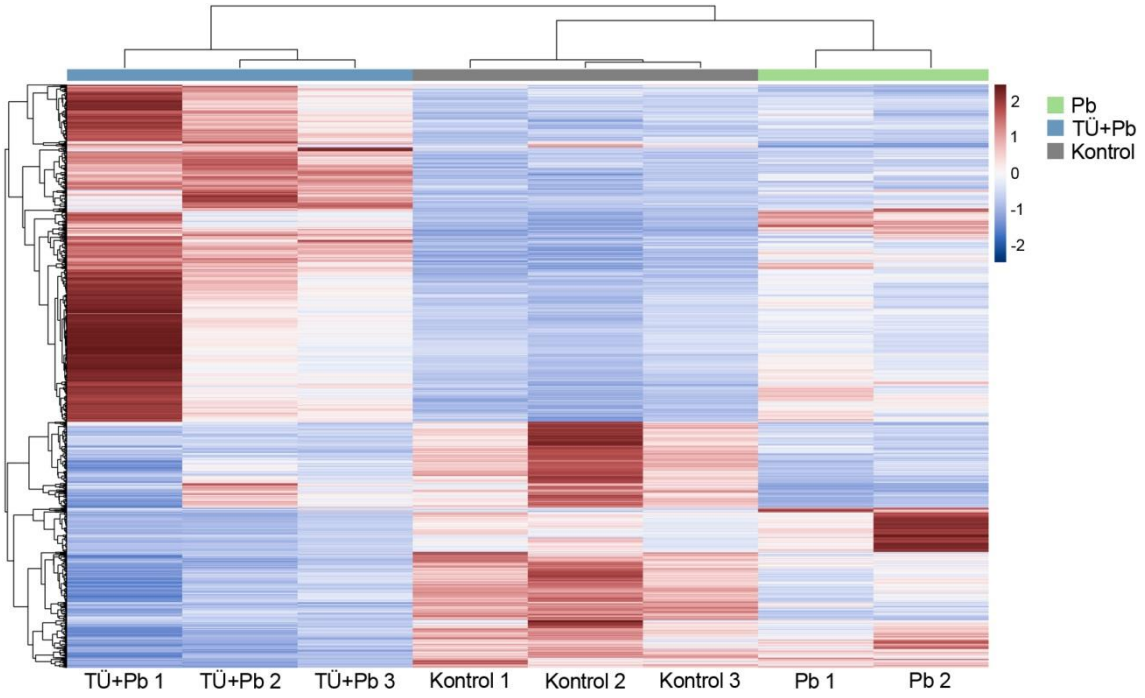
Çizelge 4.6 Uygulamalar arası karşılaştırmalar sonucunda elde edilen gen sayıları.

Karşılaştırılan uygulamalar	Analiz edilen toplam gen sayısı	Artan yönde düzenlenen genlerin sayısı (FC>1, padj<0,05)	Azalan yönde düzenlenen genlerin sayısı (FC<1, padj<0,05)
Kontrol/Pb	38.572	204	357
Kontrol/TÜ+Pb	37.965	1324	718
Pb/TÜ+Pb	38.478	171	175



Şekil 4.2 Kontrol, TU (25 µM), Pb (150 µM) ve TU+Pb (25 µM + 150 µM) uygulamalarına maruz kalan mısır fidelerinin yaprak dokularından elde edilen DEG'lerin sayısı. a) Artan ve azalan yönde düzenlenen DEG'lerin histogramı, b) DEG'lerin Venn diyagramı.

Her bir karşılaştırmadan elde edilen DEGs, tek bir listede birleştirilmiş ve bu genler temel alınarak pheatmap R paketi (sürüm 1.0.12) (Kolde 2019) kullanılarak bir ısı haritası oluşturulmuştur (Şekil 4.3). Isı haritasında örnekler arasındaki gen ifadesini normalize etmek amacıyla satır bazlı ölçeklendirme yöntemi uygulanmıştır. Örnek gruplarının ve DEGs'lerin kümelenmesini kolaylaştırmak için ısı haritası görselleştirmesinde, iki profil arasındaki doğrusal korelasyonu ölçen bir metrik olan Pearson korelasyonu kullanılmıştır.



Şekil 4.3 Her karşılaştırmadan elde edilen DEG'lerin birleşimine dayalı olarak örneklerin ve genlerin gruplandırılmasını gösteren ısı haritası.

4.5.2 Moleküler Fonksiyon ve Yolak Analizleri

Kontrol, Pb ve TÛ+Pb uygulamalarına maruz bırakılan mısır fidelerinin yaprak dokularından elde edilen toplam RNA'ların RNA-seq analizlerine göre tüm karşılaştırılan uygulamalarda (kontrol/Pb, kontrol/TÛ+Pb ve Pb/TÛ+Pb) tespit edilen DEG'lerin zenginleştirildikleri GO ve KEGG terimlerine ait sayısal veriler Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Kontrole göre Pb uygulamasında DEG'ler, GO ve KEGG yolaklarında zenginleştirilmiş ve zenginleştirilen terimler aşağıda verilmiştir (Şekil 4.4). GO teriminde zenginleştirilen DEG'ler anlamlı olarak ($p < 0.05$) 10 farklı biyolojik süreç (GO:0009314; radyasyona yanıt, GO:0009416; ışığa uyarısına tepki, GO:0009991; hücre dışı uyarıya yanıt, GO:0031667; besin seviyelerine yanıt, GO:0015977; karbon fiksasyonu, GO:0006091; öncül metabolitlerin ve enerjinin üretimi, GO:0009768; fotosentez, fotosistem1'de ışık yakalama, GO:0009765; fotosentez ışık yakalama, GO:0019684; fotosentez ışık reaksiyonları ve GO:0015979; fotosentez), 10 farklı hücresel bileşen (GO:0031968; organel dışı membranı, GO:0055035; plastit tilakoid membranı, GO:0009534; kloroplast

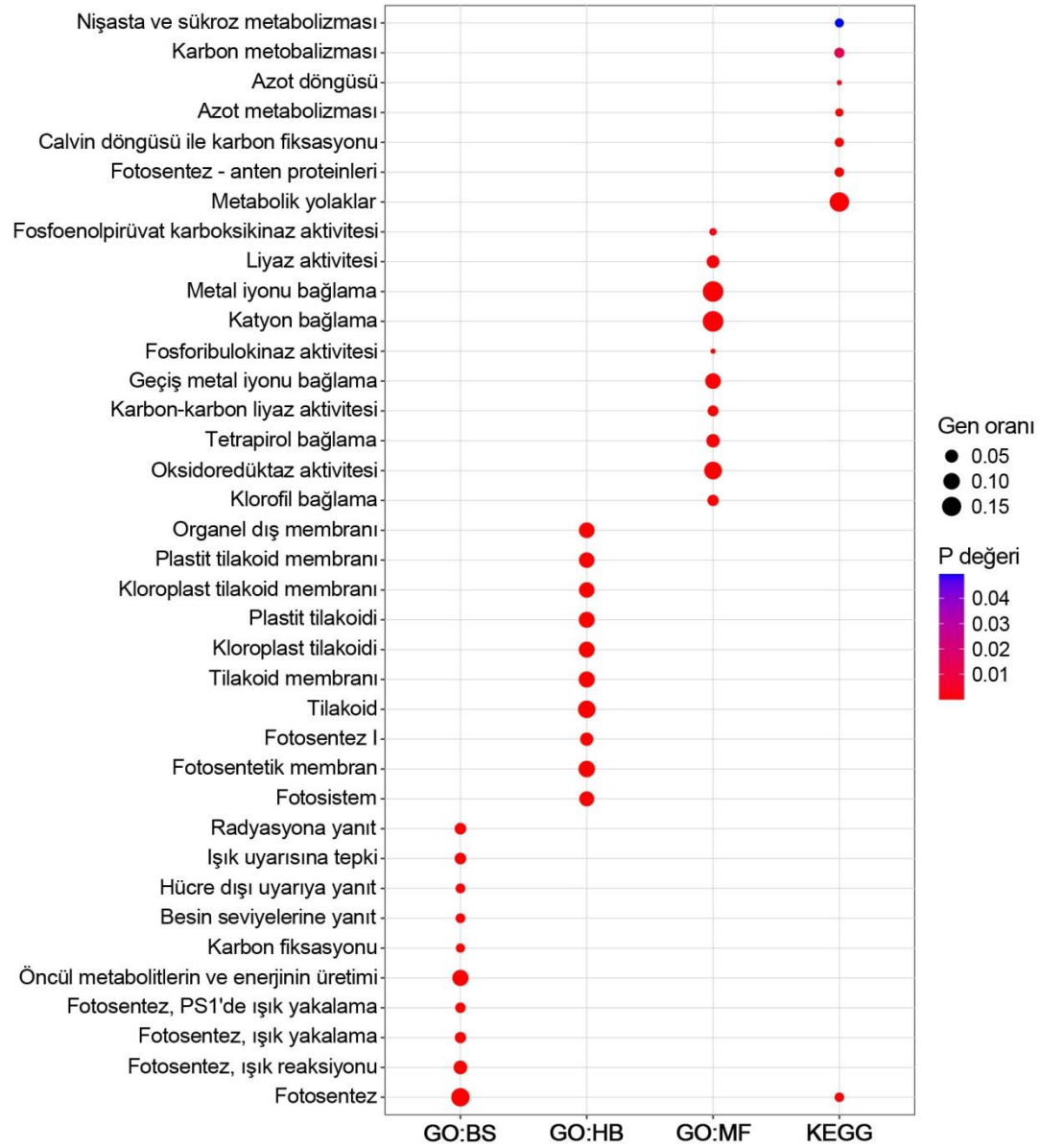
tilakoid membranı, GO:0031976; plastit tilakoidi, GO:0009579; tilakoid, GO:0031976; kloroplast tilakoidi, GO:0009522; fotosistem 1, GO:0034357; fotosentetik membran ve GO:0009521; fotosistem) ve 10 farklı metabolik fonksiyon (GO:0004611; fosfoenolpiruvat karboksikinas aktivitesi, GO:0016829; liyaz aktivitesi, GO:0046872; metal iyonu bağlama, GO:0043169; katyon bağlama, GO:0008974; fosforibulokinaz aktivitesi, GO:0046914; geçiş metal iyonu bağlama, GO:0016830; karbon–karbon liyaz aktivitesi, GO:0046906; tetrapirel bağlama, GO:0016491; oksidoredüktaz aktivitesi ve GO:0016168; klorofil bağlama) terimlerine zenginleştirilmiştir (Şekil 4.4).

Çizelge 4.7 GO ve KEGG yollarında kontrol, Pb ve Tü+Pb uygulamalarının karşılaştırılmasıyla elde edilen zenginleştirilmiş terim sayıları ($p < 0,05$).

Karşılaştırılan uygulamalar	Kaynak	Zenginleştirilen tüm terimler	Zenginleştirilen artan terimler	Zenginleştirilen azalan terimler
Kontrol–Pb	GO:BS*	84	51	42
	GO:HB*	36	1	45
	GO:MF*	31	5	30
	KEGG	8	3	5
Kontrol–Tü+Pb	GO:BS	75	73	30
	GO:HB	9	13	21
	GO:MF	19	38	7
	KEGG	4	7	6
Pb–Tü+Pb	GO:BS	41	2	32
	GO:HB	4	TE	17
	GO:MF	24	9	38
	KEGG	1	1	1

*BS: Biyolojik Süreç, HB: Hücresel Bileşen, MF: Metabolik Fonksiyon, TE: Tespit Edilemeyen

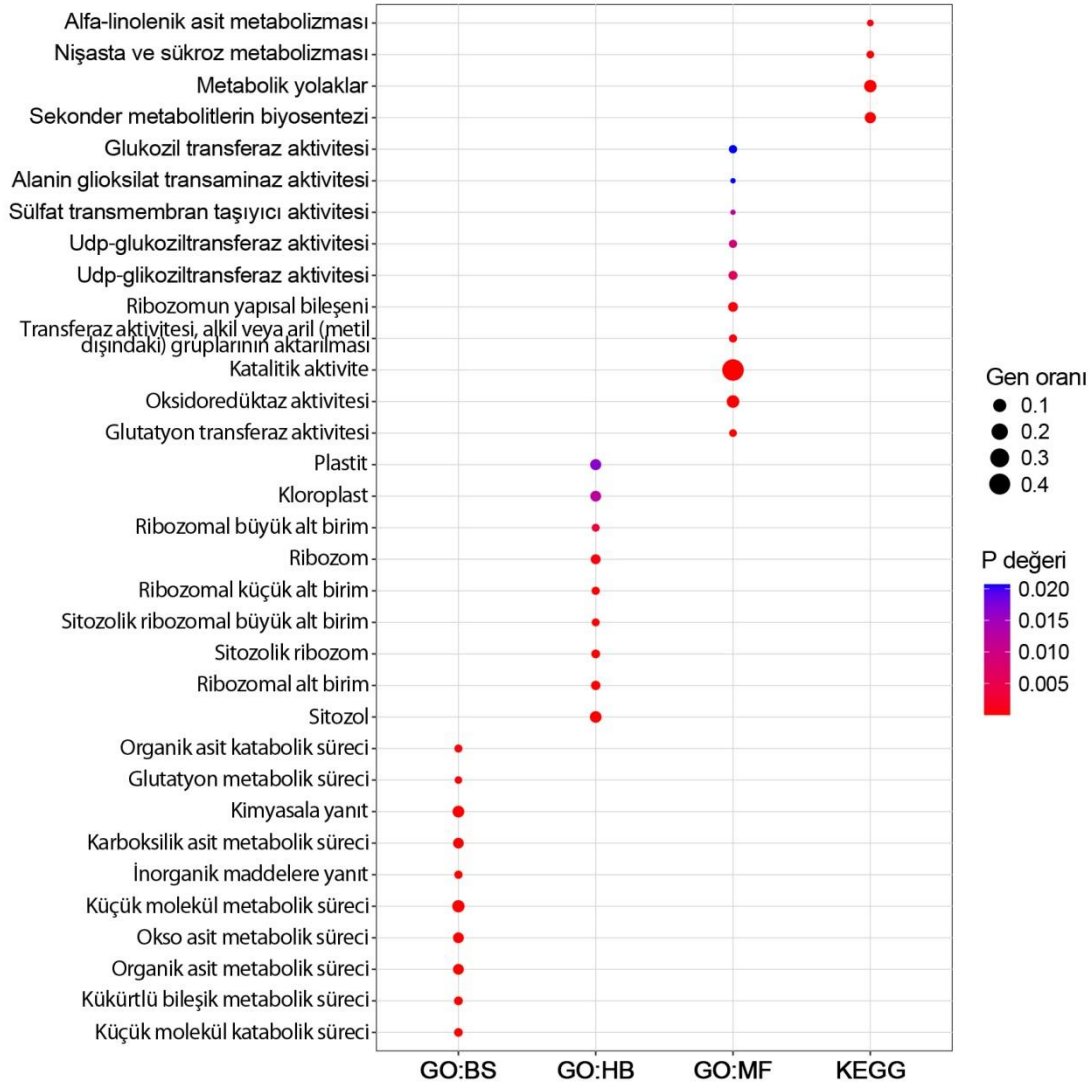
KEGG zenginleştirme analizi sonucunda DEG’ler anlamlı olarak ($P < 0,05$) 7 farklı KEGG yolağında (KEGG: 00500; nişasta ve şeker metabolizması, KEGG: 01200; karbon metabolizması, KEGG: 01310; azot döngüsü, KEGG: 00910; azot metabolizması, KEGG: 00710; Calvin döngüsü ile karbon fiksasyonu, KEGG: 00196; fotosentez–anten proteinleri ve KEGG: 01100; metabolik yollar) zenginleştirilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Kontrole göre Pb uygulamasında tespit edilen DEG'lerin GO zenginleştirme analizi sonuçları. BS=Biyolojik Süreç, HB=Hüresel Bileşen, MF=Moleküler Fonksiyon.

Kontrole göre TÜ+Pb uygulamasında DEG'ler, GO ve KEGG yollarında zenginleştirilmiş ve zenginleştirilen terimler aşağıda verilmiştir (Şekil 4.5). GO teriminde zenginleştirilen DEG'ler anlamlı olarak ($p < 0.05$) 10 farklı biyolojik süreçte (GO:0016054; organik asit katabolik süreci, GO:0006749; glutatyon metabolik süreci, GO:0042221; kimyasala yanıt, GO:0019752; karboksilik asit metabolik süreci, GO:0010035; inorganik maddelere yanıt, GO:0044281; küçük molekül metabolik süreci, GO:0043436; okso asit metabolik süreci, GO:0006082; organik asit metabolik

süreci, GO:0006790; kükürtlü bileşik metabolik süreci, GO:0044282; küçük molekül katabolik süreci) zenginleştirilmiştir (Şekil 4.5).

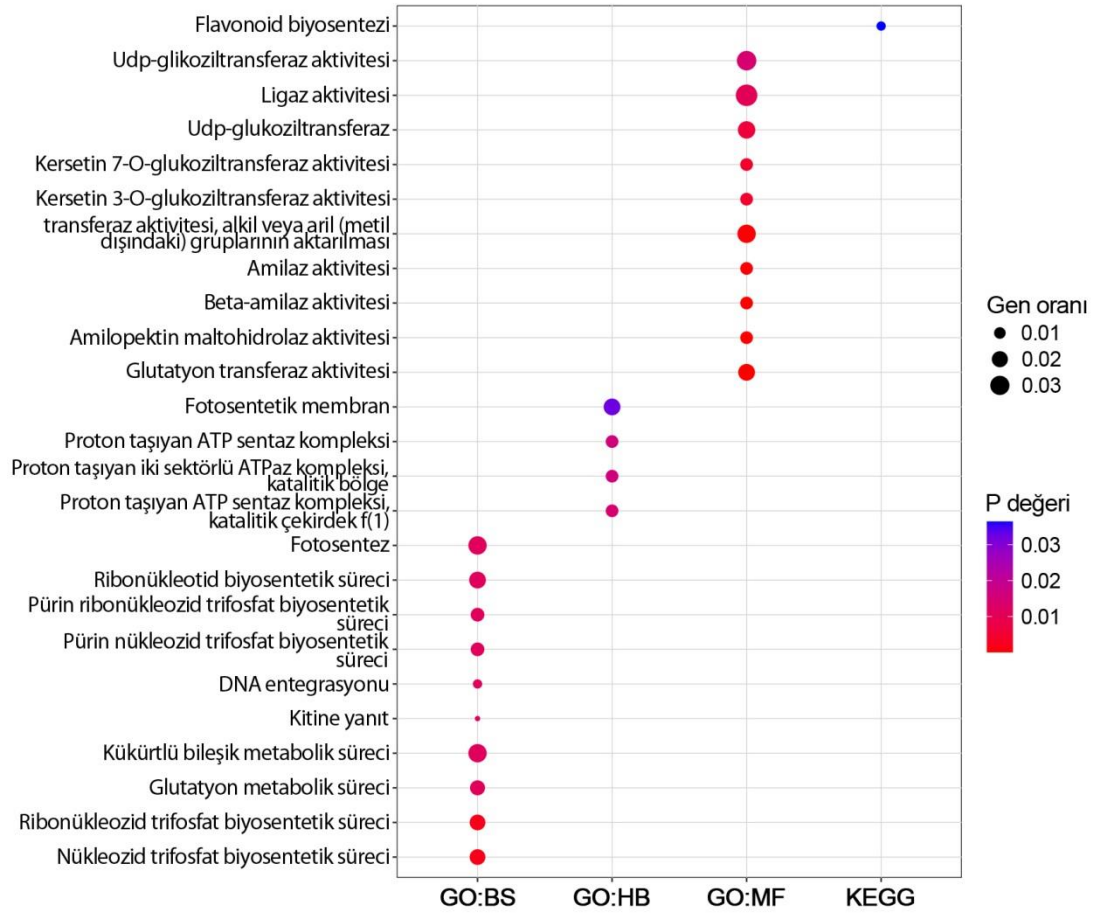


Şekil 4.5 Kontrole göre TÛ+Pb uygulamasında tespit edilen DEG'lerin GO zenginleştirme analizinin sonuçları. BS=Biyolojik Süreç, HB=Hücresel Bileşen, MF=Moleküler Fonksiyon.

GO teriminde zenginleştirilen DEG'ler anlamlı olarak ($p < 0.05$) 9 farklı hücresel bileşen [GO:0009536; plastid, GO:0009507; kloroplast, GO:0015934; ribozomal büyük alt birim, GO:0005840; ribozom, GO:0015935; ribozomal küçük alt birim, GO:0022625; sitozolik ribozomal büyük alt birim, GO:0022626; sitozolik ribozom, GO:0044391; ribozomal alt birim, GO:0005829; sitozol] ve 10 farklı metabolik fonksiyon [GO:0046527; glukozil transferaz aktivitesi, GO:0008453; alanin glioksilat transaminaz aktivitesi, GO:0015116; sülfat transmembran taşıyıcı aktivitesi,

GO:0035251; Udp-glukoziltransferaz aktivitesi, GO:0008194; Udp-glikoziltransferaz aktivitesi, GO:0003735; ribozomun yapısal bileşeni, GO:0016765; transferaz aktivitesi, alkil veya aril (metil dışındaki) gruplarının aktarılması, GO:0003824; katalitik aktivite, GO:0016491; oksidoredüktaz aktivitesi ve GO:0004364; glutatyon transferaz aktivitesi) terimlerine sınıflandırılmıştır. KEGG zenginleştirme analizi sonucunda DEG'ler anlamlı olarak ($p < 0.05$) 4 farklı KEGG yolağında (KEGG: 00592; alfa-linolenik asit metabolizması, KEGG: 00500; nişasta ve sükroz metabolizması, KEGG: 01100; metabolik yolak ve KEGG: 01110; sekonder metabolitlerin biyosentezi) zenginleştirilmiştir (Şekil 4.5).

Pb uygulamasına göre TÛ+Pb uygulamasında DEG'ler, GO ve KEGG yollarında zenginleştirilmiş ve zenginleştirilen terimler aşağıda verilmiştir (Şekil 4.6). GO teriminde zenginleştirilen DEG'ler anlamlı olarak ($p < 0.05$) 10 farklı biyolojik süreç (GO:0015979; fotosentez, GO:0009260; ribonükleotid biyosentetik süreci, GO:0009206; pürin ribonükleozid trifosfat biyosentetik süreci, GO:0009145; pürin nükleozid trifosfat biyosentetik süreci, GO:0015074; DNA entegrasyonu, GO:0010200; kitine yanıt, GO:0006790; kükürtlü bileşik metabolik süreci, GO:0006749; glutatyon metabolik süreci, GO:0009201; ribonükleozid trifosfat biyosentetik süreci, GO:0009142; nükleozid trifosfat biyosentetik süreci, 4 farklı hücresel bileşen (GO:0034357; fotosentetik membran, GO:0045259; proton taşıyan ATP sentaz kompleksi, GO:0033178; proton taşıyan iki sektörlü ATPaz kompleksi, katalitik bölge, GO:0045261; proton taşıyan ATP sentaz kompleksi, katalitik çekirdek f(1)), 10 farklı metabolik fonksiyon [GO:0008194; Udp-glikoziltransferaz aktivitesi, GO:0016874, ligaz aktivitesi; GO:0035251; Udp-glukoziltransferaz aktivitesi, GO:0080044; kersetin 7-O-glukoziltransferaz aktivitesi, GO:0080043; kersetin 3-O-glukoziltransferaz aktivitesi, GO:0016765; transferaz aktivitesi, alkil veya aril (metil dışındaki) gruplarının aktarılması, GO:0016160; amilaz aktivitesi, GO:0016161; beta-amilaz aktivitesi, GO:0102229; amilopektin maltohidrolaz aktivitesi, GO:0004364; glutatyon transferaz aktivitesi] terimlerine sınıflandırılmıştır. KEGG zenginleştirme analizi sonucunda DEG'ler anlamlı olarak ($P < 0,05$) 1 farklı KEGG yolağında (KEGG: 00941; flavonoid biyosentezi) zenginleştirilmiştir (Şekil 4.6).



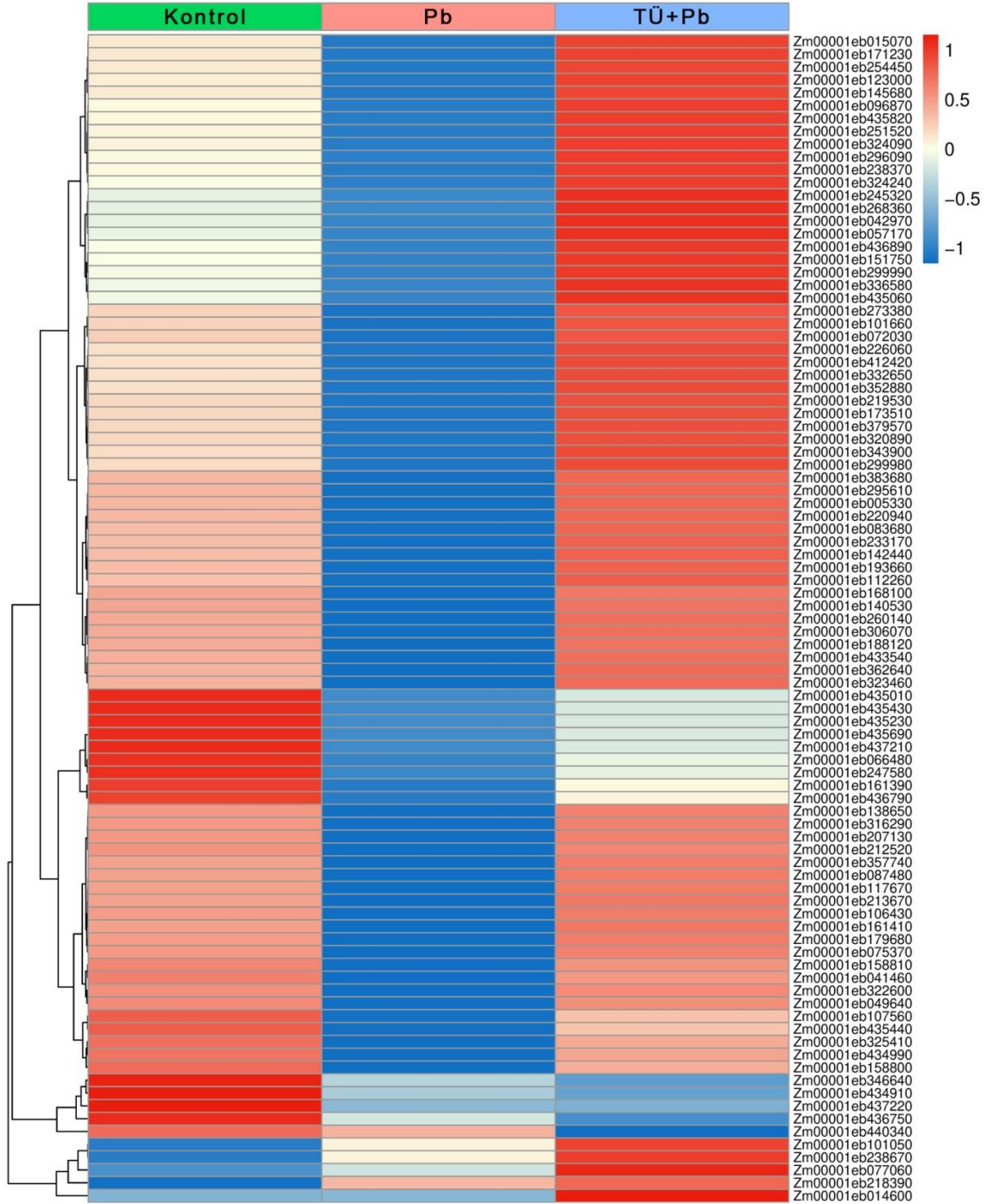
Şekil 4.6 Pb'a göre Tü+Pb uygulamasında tespit edilen DEG'lerin GO zenginleştirme analizinin sonuçları. BS=Biyolojik Süreç, HB=Hücreyel Bileşen, MF=Moleküler Fonksiyon.

4.5.2.1 Fotosentez ile İlişkili DEG'lerin Analizleri

KEGG zenginleştirme analizine göre fotosentez ile ilişkili genlerin transkripsiyonu K/Pb ve Pb/Tü+Pb uygulamalarında önemli düzeyde değişiklik göstermiştir (Şekil 4.7). Fotosistem II (FSII) bileşenleri, özellikle OEC 23 kDa altbirim, FSII D1 proteini ve FSII 10 kDa proteini, Pb altında kontrol koşuluna kıyasla belirgin bir düşüş göstermiştir. Benzer şekilde, klorofil a–b bağlayıcı proteinler de çoğunlukla Pb stresi ile azalırken, bazı alt birimler (örneğin OEE1 ve OEE3) azalan yönde düzenlenmiştir.

Fotosistem I (FSI) bileşenleri, özellikle P700 klorofil a apoproteinleri (A1 ve A2) ve FSI reaksiyon merkezi alt birimleri, Pb altında azalma göstermiş, bu da elektron taşıma zincirinde potansiyel aksamalara işaret etmektedir. Ferredoksin ve ferredoksin–NADP⁺ redüktaz (FNR) gibi elektron taşıyıcıları da Pb ile azalmıştır. Ayrıca, karbon

fiksasyonunda görevli enzimler olan rubiloz bisfosfat karboksilaz (Rubisco) büyük alt birimi ve fosforibulokinaz enzimlerini kodlayan genlerin ifadesi Pb stresi koşullarında azalmıştır. Ayrıca, karbonik anhidraz ve malik enzimi (ME) proteinlerini kodlayan bazı izoformlar Pb stresi koşullarında artarken bazıları azalmıştır (Şekil 4.7).



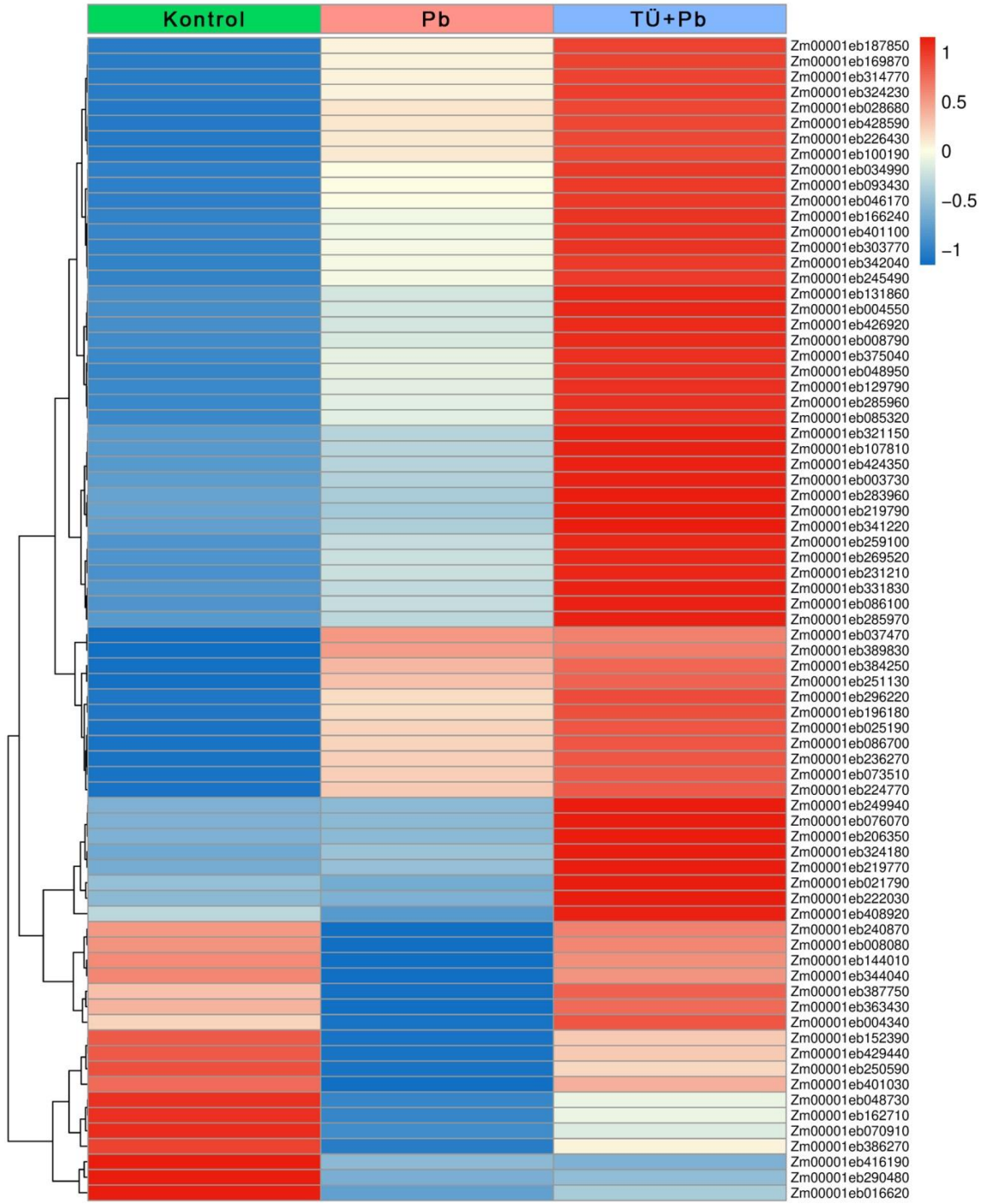
Şekil 4.7 Fotosentez ile ilişkili DEG'leri gösteren ısı haritası.

Diğer taraftan, TÛ+Pb uygulaması, Pb stresinin olumsuz etkilerini kısmen hafifletmiştir. FSII ve FSI bileşenlerinin çoğu, TÛ+Pb ile ifade seviyelerini artırmış, bazı klorofil a–b bağlayıcı proteinler ve OEE alt birimleri kontrol seviyelerinin üzerine çıkmıştır. Karbon fiksasyon enzimleri de TÛ+Pb ile artış göstermiştir. Örneğin, Rubisco büyük alt birimi ve fosforibulokinaz genlerinin ifade seviyeleri, Pb uygulamasına kıyasla artış göstermiştir. Benzer şekilde, KA ve ME enzimlerini kodlayan genler de Pb uygulamasına göre TÛ+Pb uygulamasında artmıştır (Şekil 4.7).

4.5.2.2 Transmembran Taşınımı ile İlişkili DEG'lerin Analizleri

KEGG zenginleştirme analizine göre transmembran taşınımı ile ilişkili genlerin transkripsiyonu K/Pb ve Pb/TÛ+Pb uygulamalarında çoğunlukla azalan yönde düzenlemiştir (Şekil 4.8). ABC taşıyıcılarını kodlayan birçok gen genellikle Pb uygulamasında artış göstermiştir. Özellikle ABC transporter A ailesi üyesi 7, ABC transporter B ailesi üyesi 21 ve bazı C ve G aile üyeleri, Pb uygulaması ile önemli seviyede artış göstermiştir. Ancak bazı üyeler, örneğin ABC transporter B ailesi üyesi 19'in, Pb uygulamasında ifade seviyesi azalmıştır. Diğer taşıyıcı proteinler ve kanal proteinleri de Pb stresinden etkilenmiştir. Amino acid transporter ANT1, aquaporin PIP ve TIP aileleri, bidirectional sugar transporters (SWEET) genlerinin ifade seviyeleri Pb uygulamasında artış göstermiştir.

Diğer taraftan, TÛ+Pb uygulaması, Pb'nin olumsuz etkilerini kısmen hafifletmiş ve çoğu transmembran taşınım geninde ifade artışı sağlamıştır. Örneğin, ABC transporter A ailesi üyesi 7, ABC transporter B ailesi üyesi 15 ve birçok C ve G alt aile üyesini kodlayan genlerin ifade seviyeleri Pb uygulamasına göre TÛ+Pb uygulamasında artış göstermiştir. Aquaporinler (PIP, TIP, NIP), amino asit taşıyıcıları, H⁺/Pi kotransporter ve CSC1–benzeri proteinlerin de TÛ+Pb uygulamasında belirgin şekilde artış gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, metal taşınımı ile ilişkili genlerin (HMA domaini–içeren proteinler, vakuolar demir taşıyıcısı, metal–nikotianamin taşıyıcısı YSL6 ve YSL7) Pb uygulamasında arttığı ve TÛ+Pb uygulaması ile ifade seviyelerinin daha da arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.8).

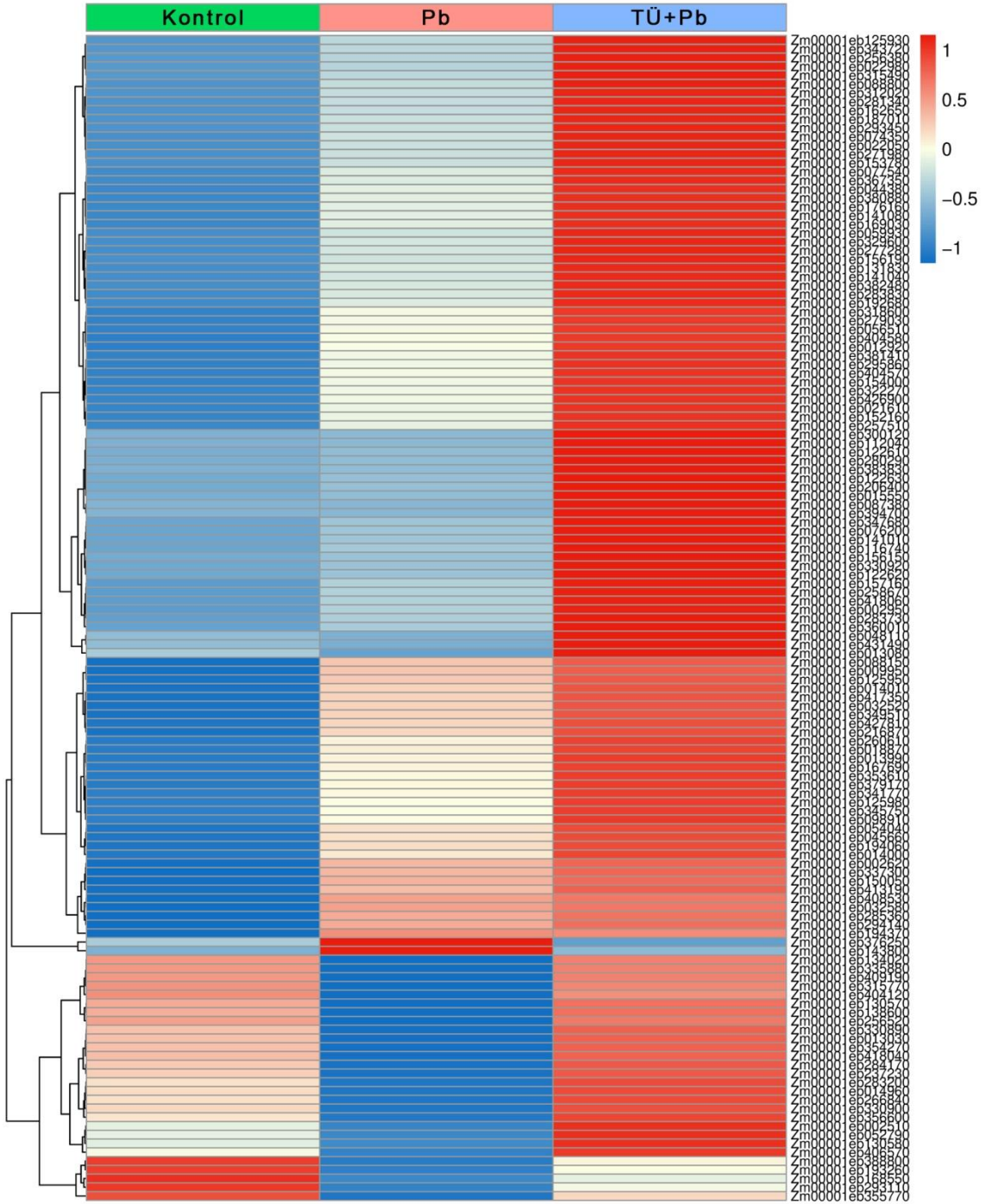


Şekil 4.8 Transmembran taşıyıcı ile ilişkili DEG'lerin ısı haritası.

4.5.2.3 Stres Savunma ile İlişkili Genlerin Analizleri

KEGG zenginleştirme analizine göre stres savunma ile ilişkili genlerin transkripsiyonu K/Pb ve Pb/TÜ+Pb uygulamalarında farklı şekilde düzenlenmiştir (Şekil 4.9). Mevcut araştırmada, Pb uygulaması dehidrinler (DHN1, DHN3 ve DHN13) ve kuraklık–teşvikli

proteinler gibi genlerin ifade seviyesinde belirgin şekilde artışa neden olmuştur. Benzer şekilde, hastalık direnci proteinler (RPM1, PIC17) ve patojenle-ilişkili proteinleri (PR10, PR3) kodlayan genlerin ifadesi de Pb stresi ile artış göstermiştir (Şekil 4.9).



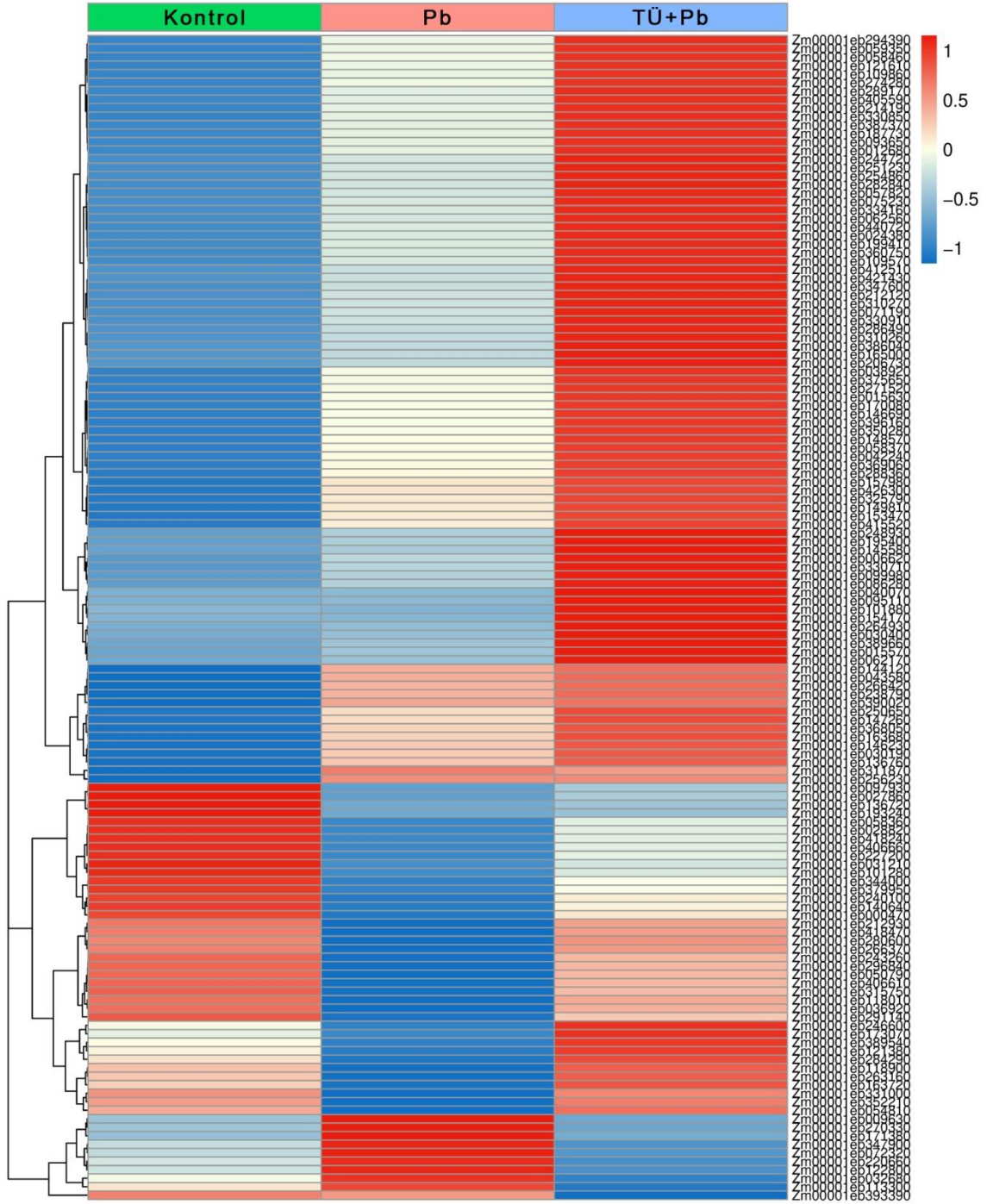
Şekil 4.9 Stres savunma sistemi ile ilişkili DEG'lerin ısı haritası.

Stres savunma ile ilişkili bazı genlerin ifade seviyelerinin Pb stresi altında azaldığı gözlenmiştir. Örneğin katalaz ve bazı alkol dehidrogenaz (ADH) isoformları değişken yanıtlar vermiştir. Ayrıca düşük sıcaklık and tuza yanı proteinin OSR8'i kodlayan genlerin de Pb stresi ile baskılandığı belirlenmiştir (Şekil 4.9).

Bununla birlikte, TÛ+Pb uygulamasının, çoğu stres yanıt geninde ek bir artışa neden olduğu belirlenmiştir. Araştırmamızda, DHN1, DHN3, kuraklık–teşvikli proteinler, PR proteinleri, GST ailesi, peroksidazlar (peroksidaz, L–askorbat peroksidaz) ve tiyoredoksin domaini–içeren proteinler gibi genler Pb uygulamasına göre TÛ+Pb uygulamasında artan ifade seviyesi sergilemiştir. Ayrıca birçok tiyoredoksin proteinini kodlayan genin ifade seviyeleri TÛ+Pb uygulamasında artış göstermiştir. Bununla birlikte, ozmotin–benzeri proteinler (OSM34), germin–benzeri proteinler, trehaloz–6–fosfat sentaz (TPS) izoformları ve glutatyon S–transferaz (GST) aile üyelerini kodlayan birçok genin ifade seviyesi Pb uygulaması ile artarken, TÛ+Pb uygulaması daha da fazla artmıştır (Şekil 4.9).

4.5.2.4 Transkripsiyon Faktörleri ile İlişkili DEG'lerin Analzileri

KEGG zenginleştirme analizine göre transkripsiyon faktörleri ile ilişkili genlerin transkripsiyonu K/Pb ve Pb/TÛ+Pb uygulamalarında farklı şekilde düzenlenmiştir (Şekil 4.10). AP2/ERF ailesi üyelerinden AP2/ERF domain–containing protein gibi genlerin ifade seviyesi Pb uygulamasında artış göstermiştir. Benzer şekilde DREB1 ve DREB1c gibi genler de Pb uygulamasında indüklenmiştir. BZIP faktörleri içinde G–box binding factor 4 ve TGA4 genlerinin ifade seviyesi Pb uygulamasında güçlü şekilde artmıştır. Bazı WRKY ailesi üyelerine ait genlerin ifade seviyeleri de Pb uygulamasında artan yönde düzenlenmiştir. Örneğin, WRKY9, WRKY30 ve WRKY46 genlerinin ifade seviyesi Pb stresi koşullarında artış göstermiştir. NAC transkripsiyon faktörlerini (NAC2 ve NAC77) ile MYB üyeleri (MYB ve MYB78) gibi TF'lerin de Pb uygulamasında arttığı belirlenmiştir. Diğer taraftan, TF'lerini kodlayan bazı genlerin ifade seviyesinin Pb stresi koşullarında azalan yönde düzenlendiği belirlenmiştir. Örneğin, GATA22 ve HD–ZIP proteinlerinin ifade seviyesi Pb uygulamasında azalmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Transkripsiyon faktörleri ile ilişkili DEG'lerin ısı haritası.

Bununla birlikte, Pb uygulamasına göre TÛ+Pb uygulamasında bazı TF'lerin ifade seviyelerinde önemli farklılıklar belirlenmiştir (Şekil 4.10). Özellikle AP2/ERF ailesinde AP2/ERF domaini-içeren protein, RAP2-2 ve DREB1c proteinini kodlayan genlerin ifade seviyeleri TÛ+Pb uygulamasında daha da artmıştır. BZIP genleri içinde

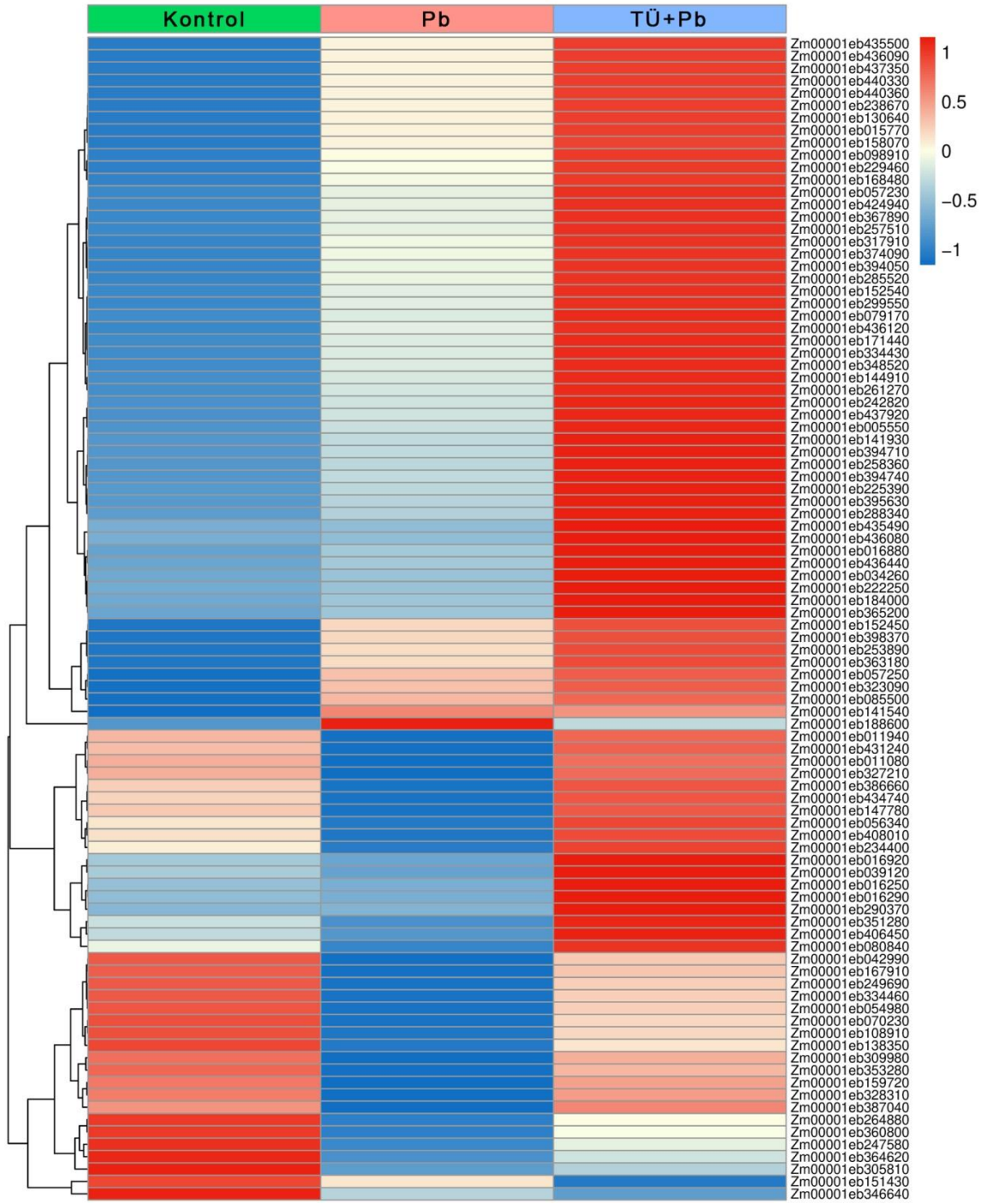
G-box bağlayıcı faktör 4 ve TGA4 genlerinin ifadesi T +Pb uygulamasında belirgin bir artış göstermiştir. WRKY ailesinde yer alan WRKY30 ve WRKY11 genlerinin ifadesi T +Pb uygulamasında daha da artış göstermiştir. Ayrıca NAC ailesinden NAC2 ve NAC77 ile MYB78 TF'lerini kodlayan genlerin ifade seviyesi T +Pb uygulamasında daha yüksek seviyelere ulaşmıştır. Diğer taraftan, Pb ile baskılanan GATA22 ve HD-ZIP proteinlerini kodlayan genlerin T +Pb uygulamasında kontrol seviyesine ulaşmıştır (Şekil 4.10).

4.5.2.5 Enerji Metabolizması ile İlişkili DEG'lerin Analizleri

KEGG zenginleştirme analizine göre enerji metabolizması ile ilişkili genlerin transkripsiyonu K/CPb ve Pb/T +Pb uygulamalarında farklı şekilde düzenlenmiştir (Şekil 4.11). Nişasta ve şeker metabolizmasında fonksiyon gören beta-amilaz izoformlarının ifade seviyeleri Pb stresi koşullarında artış gösterirken, bir izoform azalmıştır. Fruktoz-bifosfataz ve nişasta sentaz gibi nişasta sentezine katkı sağlayan bazı enzimleri kodlayan genlerin ifadesi Pb uygulamasında azalmıştır. Buna karşılık, beta-glukozidaz genlerinin ifade seviyeleri Pb uygulamasında önemli düzeyde artmıştır.

Glikoliz ve glukoneogenez yollarında da benzer değişimler saptanmıştır. Fosfogliserat mutaz ve fruktoz-bifosfat aldolaz gibi enzimleri kodlayan genlerin ifade seviyeleri Pb stresinde artış gösterirken, fosfoenolpirüvat karboksikinas ve fosfoenolpirüvat karboksilaz kinaz gibi bazı düzenleyici enzimler azalış göstermiştir. Ayrıca, izositrat dehidrogenaz [NADP] ve izositrat liyaz gibi TCA döngüsü ile ilişkili enzimleri kodlayan genlerin ifade seviyelerinin de Pb stresine yanıt olarak belirgin şekilde arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.11).

Solunum zinciri ile ilişkili genlerden NADH:ubikinon oksidoredüktaz-benzeri proteinin kodlayan gen Pb stresi altında güçlü bir şekilde baskılanırken, süksinat dehidrogenaz ve sitokrom c oksidaz altbirim 3 gibi bazı genlerin ifadesinde artış gözlenmiştir. Ayrıca, sitokrom c biyogenez FC geninin ifade seviyesi Pb stresinde güçlü bir şekilde indüklenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 Enerji ve karbohidrat metabolizması ile ilişkili DEG'lerin ısı haritası.

Mevcut araştırmada, TÜ+Pb uygulaması, Pb'nin neden olduğu değişimleri kısmen dengelemiş ve bazı genlerde ek artış sağlamıştır. Beta-amilaz genlerinin ifade seviyeleri Pb uygulamasında göre TÜ+Pb uygulamasında daha yüksek seviyelere ulaşmıştır. Benzer şekilde beta-glukozidaz genlerinin ifade seviyeleri TÜ+Pb uygulamasında daha da artmıştır. Sükroz sentaz izoformlarını kodlayan genlerin de ifade seviyeleri TÜ+Pb

uygulamasında altında artış göstermiştir (Şekil 4.11).

Glikoliz ve TCA döngüsü genlerinde TÛ+Pb uygulamasıyla birlikte genel bir artış eğilimi gözlenmiştir. Örneğin fosfogliserat mutaz, pirüvat kinaz, izositrat liyaz ve malat sentaz gibi enzimleri kodlayan genler Pb'ye göre TÛ+Pb uygulamasında artmıştır. Ayrıca, trehaloz-6-fosfat sentaz ve trehaloz-6-fosfat fosfataz genlerinde de TÛ+Pb uygulamasında artış gözlenmiştir. Diğer taraftan, solunum zincirindeki NADH:ubikionon oksidoredüktaz-benzeri proteininin ifade seviyesi Pb uygulamasında baskılanmasına rağmen TÛ+Pb uygulamasıyla güçlü bir artış göstermiştir. Benzer şekilde sitokrom c ve süksinat dehidrogenaz altbirimlerinin ifadesi TÛ+Pb uygulamasında yüksek seviyelere ulaşmıştır (Şekil 4.11).

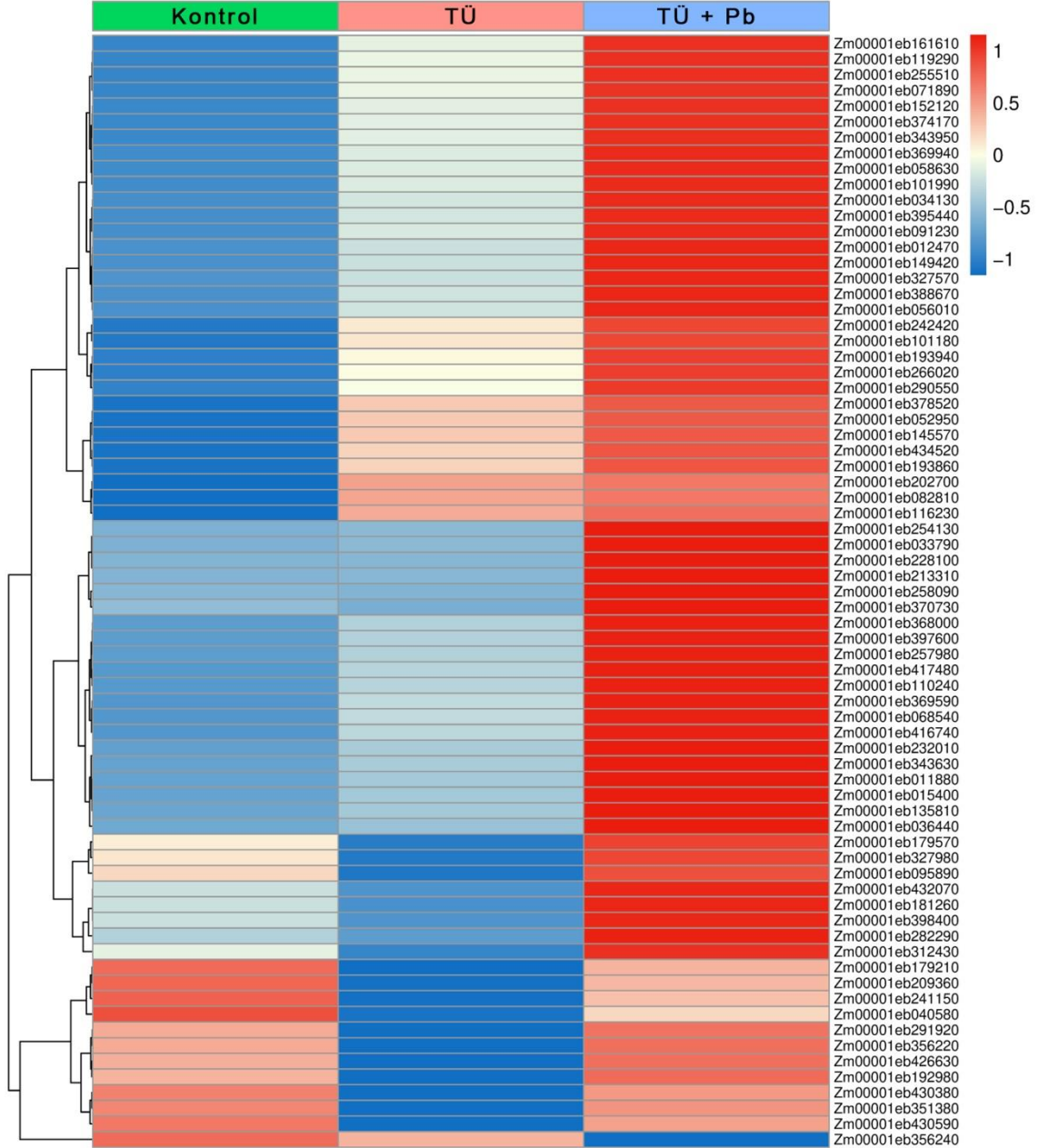
4.5.2.6 Protein Metabolizması ile İlişkili DEG'lerin Analizleri

KEGG zenginleştirme analizine göre protein metabolizması ile ilişkili genlerin transkripsiyonu K/Pb ve Pb/TÛ+Pb uygulamalarında önemli düzeyde değişiklik göstermiştir (Şekil 4.12). Pb stresi özellikle ısı şoku proteinlerinin (HSP'ler) ifade seviyesinde önemli farklılıklara neden olmuştur. Örneğin küçük HSP'ler (17.4 kDa HSP'ler) ve mitokondriyal 23.6 kDa HSP genleri Pb uygulamasında artmıştır. Ancak bazı küçük HSP'lerde (örneğin 21.7 kDa class VI HSP) azalma gözlenmiştir. Diğer taraftan, HSP70 ailesi üyeleri Pb stresinde genel olarak yükselmiştir. Örneğin HSP70-5 ve HSP90-2'yi kodlayan genlerin ifadesi Pb koşullarında artmıştır.

Şaperon ve proteaz sistemleri de fonksiyon gören bazı genlerin ifade seviyeleri Pb stresi koşullarında değişiklik göstermiştir. Şaperon protein dnaJ'lardan bazılarının ifadesi Pb uygulamasında baskılanırken, diğerlerinki (örneğin dnaJ 20 kloroplastik, dnaJ 8 kloroplastik) artış göstermiştir. Clp proteaz sistemi içerisinde ClpD geni Pb koşullarında güçlü şekilde artmıştır, buna karşılık ClpS adaptör proteini azalmıştır (Şekil 4.12).

Proteolizle ilgili genlerde de belirgin farklılıklar belirlenmiştir. Aspartik proteinaz A1 ve aspartyl protease APCB1Pb gibi genlerin ifade seviyesi Pb stresi koşullarında artmıştır. Benzer şekilde, peptidazlar (örneğin, peptidaz metallopeptidaz domaini

protein) ve ubiquitin–proteazom sisteminde fonksiyon gören birçok genin ifadesi de Pb koşullarında artmıştır. E3 ubiquitin ligaz RMA ve RING–tip E3 ubiquitin transferaz genlerinden birçoğunun ifadesi belirgin şekilde Pb uygulaması ile artmıştır. Buna ek olarak, proteazom altbirim beta geninin ifade seviyesi Pb altında artan yönde düzenlenmiştir (Şekil 4.12).

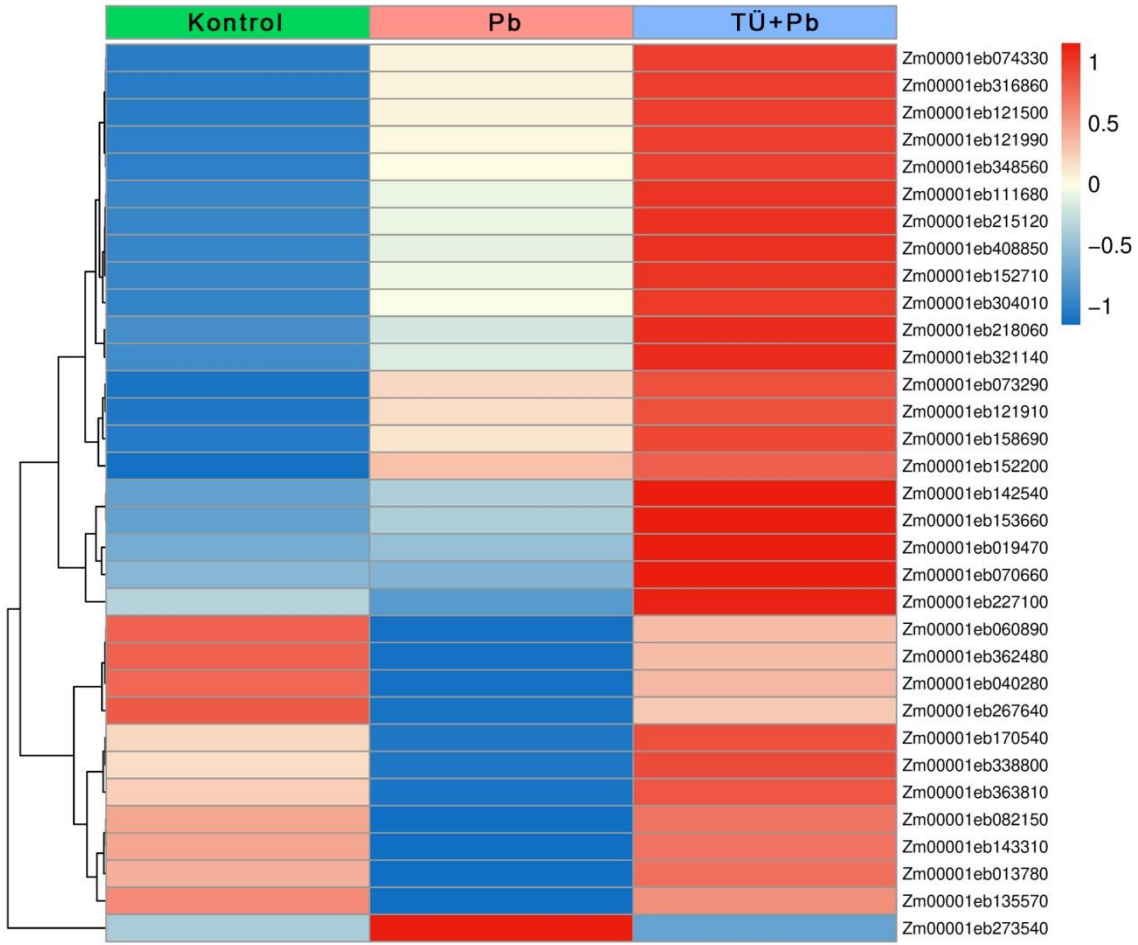


Şekil 4.12 Protein metabolizması ile ilişkili DEG'lerin ısı haritası.

Mevcut araştırmada, TÛ+Pb uygulaması 17.4 kDa HSP'ler, HSP70, HSP90-2 ve mitokondriyal HSP70-9 genlerinin ifade seviyesinde belirgin şekilde artmıştır. Şaperon yanıtında da benzer bir durum gözlenmiştir. Şaperon protein dnaJ 20 ve dnaJ 11 genlerinin ifade seviyesi Pb uygulamasına göre TÛ+Pb uygulamasında artan yönde düzenlenmiştir. Benzer şekilde, ClpD proteini ve ClpS adaptor proteinin TÛ+Pb uygulamasında artış gösterdiği belirlenmiştir. Proteolizle ilişkili enzimler olan aspartik proteinaz A1, aspartik proteinaz-benzeri protein 2 ve peptidase S26 kloroplastik genlerinin ifade seviyeleri TÛ+Pb uygulamasında Pb'ye göre daha yüksek bulunmuştur. Benzer şekilde, ubiquitin-proteazom sistemi bileşenlerinden RING-type E3 ubiquitin transferaz genlerinin büyük çoğunluğu Pb'ye kıyasla TÛ+Pb uygulamasında artış göstermiştir (Şekil 4.12).

4.5.2.7 Hormon ile İlişkili DEG'lerin Analizleri

KEGG zenginleştirme analizine göre hormon ile ilişkili genlerin transkripsiyonu K/Pb ve Pb/TÛ+Pb uygulamalarında farklı şekilde düzenlenmiştir (Şekil 4.13). ACC sentaz ve ACC oksidaz enzimlerinin ifadesi kontrole göre Pb uygulamasında belirgin derecede artmıştır. Benzer olarak, EIN3-benzeri transkripsiyon faktörleri ve etilen-yanıt ABR1'in Pb koşullarında daha yüksek ifade göstermiştir. Oksin ile ilişkili genlerde ise farklı yönlerde değişimler gözlenmiştir. Bazı oksin-yanıt proteinlerinin (SAUR16, SAUR32, SAUR61) ifade seviyeleri Pb uygulamasında azalırken, oksin çıkış taşıyıcı proteinleri ve oksin yanıt faktörü (ARF) genlerinde artış belirlenmiştir. GH3 ailesi oksin-konjugasyon enzimlerini kodlayan genlerin Pb stresi koşullarında artan yönde düzenlendiği belirlenmiştir. Sitokinin metabolizmasında fonksiyon gören sitokinin dehidrogenaz ve cis-zeatin O-glukoziltransferaz gibi yıkım ve modifikasyondan sorumlu genlerin Pb uygulamasında artış gösterdiği belirlenmiştir. Absisik asit (ABA) ile ilişkili genlerden PYL5 reseptörünün Pb koşullarında azalan yönde düzenlendiği, ABA-yanıt proteinleri ve absisik stres-olgunlaşma protein 3'ün artan yönde düzenlendiği belirlenmiştir. Jasmonat sinyalinde rol oynayan TIFY/JAZ proteinleri ve JAR1 gibi JA-amido sentaz genlerinin Pb stresi altında arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.13).



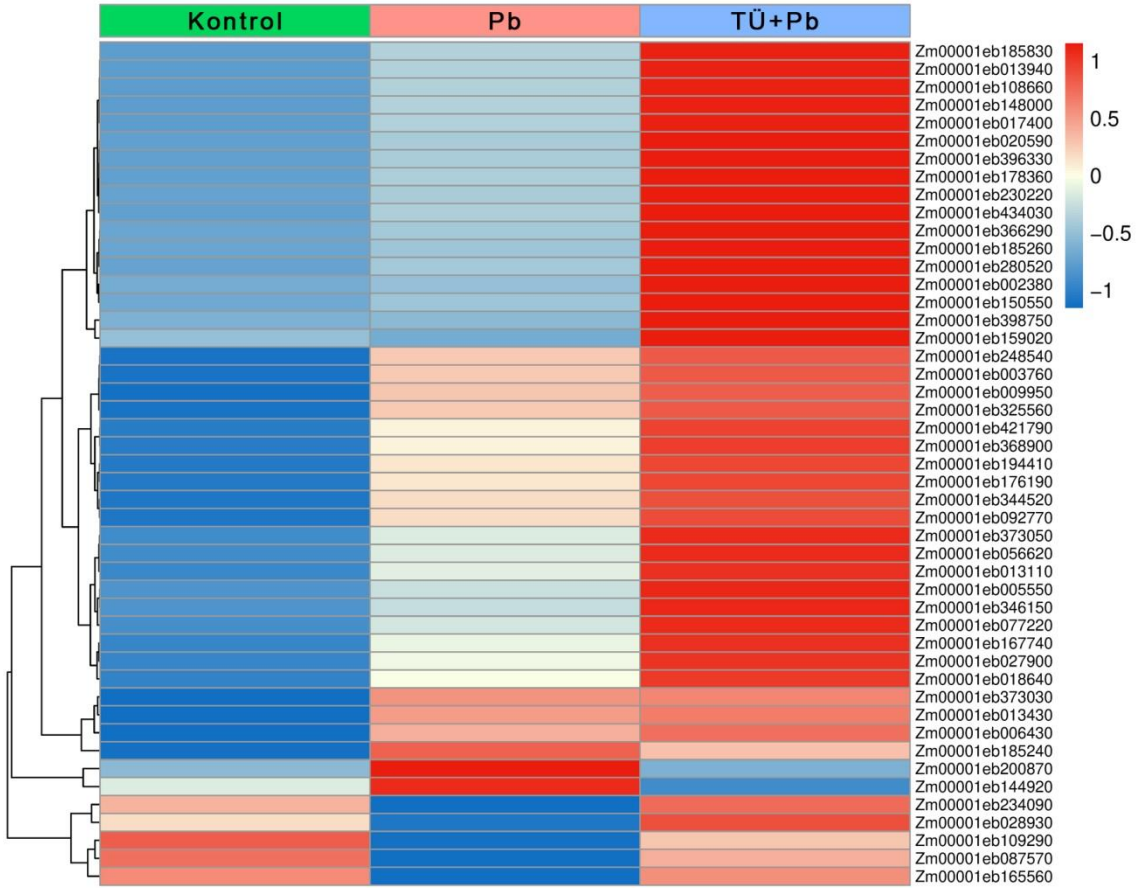
Şekil 4.13 Hormon biyosentezi ile ilişkili DEG'lerin ısı haritası.

TÜ+Pb uygulaması, genel olarak Pb'nin yol açtığı değişimleri dengeleyici bir rol üstlenmiştir. ACC sentaz ve oksidaz genleri TÜ+Pb koşullarında daha da yüksek seviyelere ulaşarak Pb'ye bağlı etilen artışının sürdüğünü göstermiştir. Aynı zamanda EIN3-like ve ABR1 transkripsiyon faktörlerinde Pb'ye göre daha güçlü bir artış gözlenmiştir. Oksin yanıt genlerinin (SAUR32, SAUR61 ve ARF üyeleri) TÜ+Pb koşullarında Pb uygulamasına kıyasla belirgin artış sergileyerek auxin sinyalinin güçlendiğini ortaya koymuştur. Özellikle GH3 ailesi oksin-konjugasyon enzimleri ve auxin çıkış taşıyıcı proteinlerini kodlayan genlerin ifade seviyesi TÜ+Pb uygulamasıyla daha yüksek seviyelere çıkmıştır. Sitokinin metabolizmasında da benzer şekilde, sitokinin dehidrogenaz ve N-glukoziltransferaz genlerinin ifade seviyeleri TÜ+Pb uygulamasında artmıştır. ABA ilişkili genlerden ABA-yanıt proteinleri ve absisik stres-olgunlaşma protein 3 ile jasmonat yolunda rol oynayan TIFY/JAZ proteinleri ve JAR1 genlerinin ifade seviyeleri TÜ+Pb uygulaması ile artış göstermiştir (Şekil 4.13).

4.5.2.8 Sekonder Metabolitlerin Biyosentezi ile İlişkili DEG'lerin Analizleri

KEGG zenginleştirme analizine göre, Pb ve T +Pb uygulamalarının sekonder metabolizma ile ilişkili genlerin transkripsiyonu farklı şekilde düzenlenmiştir. (Şekil 4.14). Pb uygulaması sekonder metabolitlerle ilişkili birçok gende anlamlı artışa yol açmıştır. Özellikle monoterpen metabolizmasında önemli bir enzim olan (+)-neomentol dehidrogenaz gen ailesinin Pb stresi koşullarında artış gösterdiği belirlenmiştir. Benzer şekilde, (Z)-3-hekzen-1-ol asetiltransferaz, 12-okso-fitodienoik asit redüktaz 1 ve 2'nin Pb koşullarında artışı, jasmonat biyosentezinin öncü basamaklarının stres altında güçlendiğini ortaya koymuştur. Fenilpropanoid yolunun merkezi enzimlerinden fenilalanin amonyum-lilaz (PAL) ve 4-kumarat-KoA ligaz (4CL) üyeleri Pb uygulamasında genel olarak artış göstermiştir. Ayrıca hidrokssinnamoiltransferaz (HCT) ve trans-sinamat 4-monooksijenaz (CYP73A) enzimlerinin ifade seviyeleri Pb stresi koşullarında artmıştır. Flavonoid biyosenteziyle ilişkili dihidroflavonol-4-redüktaz (DFR) genlerinden birinin ifade seviyesi Pb uygulamasında azalırken, diğeri artış göstermiştir. Ayrıca flavonol üretiminde fonksiyon gören flavonol sentaz (FLS) geninin ifade seviyesinin Pb stresi koşullarında arttığı gözlenmiştir. Ayrıca allelokimyasal savunma mekanizmaları ile ilişkili bir gen olan benzoksazinon sentez (Bx) genlerinin de ifade seviyeleri Pb uygulamasında artmıştır (Şekil 4.14).

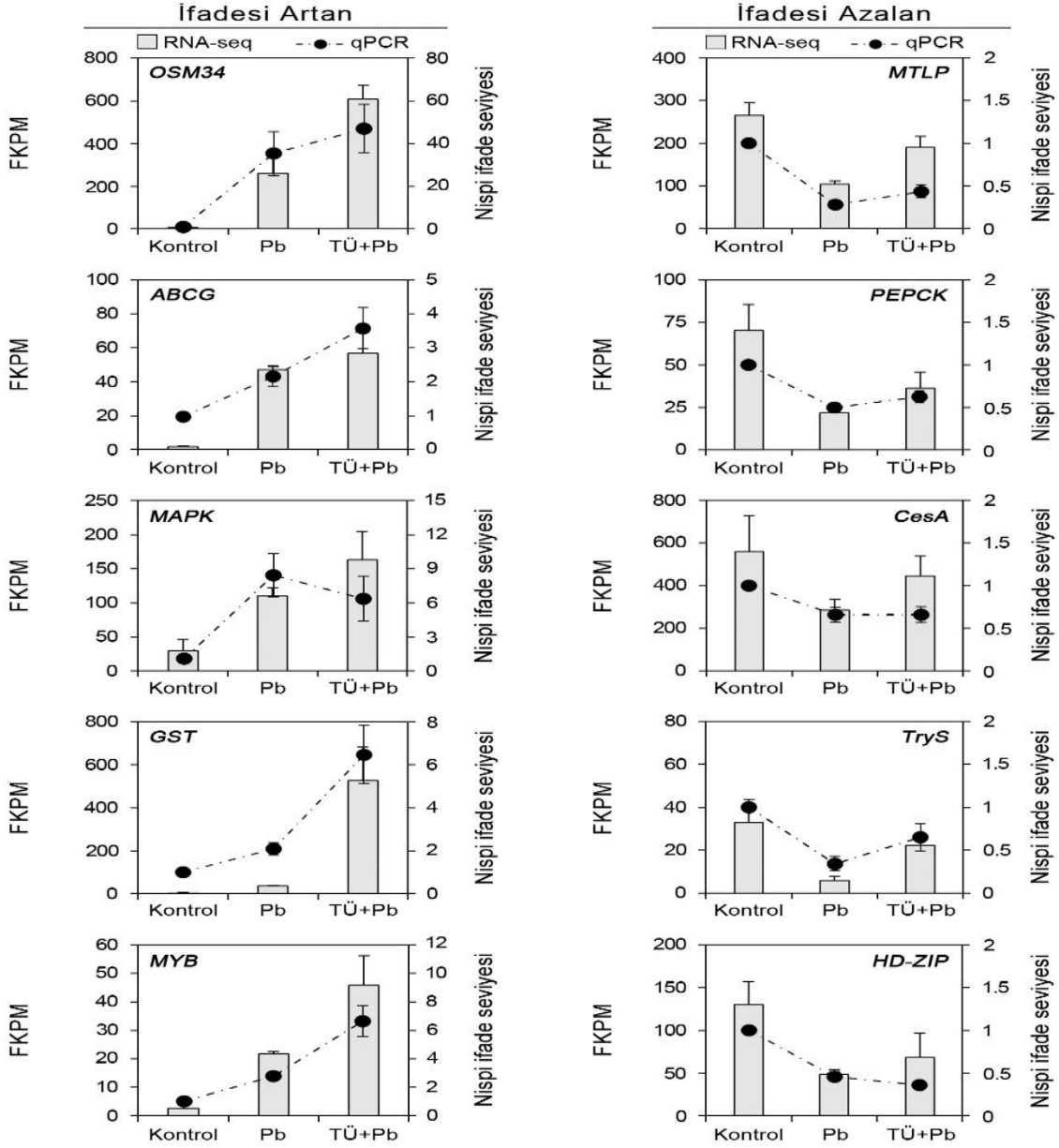
T +Pb uygulaması, Pb stresinin fenilpropanoid, flavonoid, terpenoid ve benzoksazin metabolizmasında neden olduğu artışlara ek olarak bazı genlerin ifadesinde ilave artışlara neden olmuştur. Özellikle neomentol dehidrogenaz ailesi ve (Z)-3-hekzen-1-ol asetiltransferaz genlerinin ifadesi Pb uygulamasına göre T +Pb uygulamasında kıyasla daha yüksek seviyelere ulaşmıştır. Benzer olarak, JA biyosentezinde rol oynayan 12-okso-fitodienoik asit redüktaz 1 ve 2 ile fenilpropanoid yolağındaki PAL, 4CL, HCT ve CYP73A genlerinin Pb uygulamasına göre T +Pb uygulamasında belirgin şekilde artan yönde düzenlenmiştir. Flavonoid biyosentezinde fonksiyon gören DFR ve FLS genlerinin ifade seviyeleri T +Pb uygulamasında artan yönde düzenlenmiştir.



Şekil 4.14 Sekonder metabolitlerin biyosentezi ile ilişkili DEG'lerin ısı haritası.

4.5.3 RNA–Seq Verilerinin qPCR ile Doğrulanması

Kontrol, Pb ve TŪ+Pb uygulamalarına maruz bırakılan mısır fidelerinin yapraklarında ifade edilen ve RNA–seq analizi ile elde edilen milyon haritalanmış okuma başına transkriptin kilobaz başına parça sayısı (FPKM) değerlerinin güvenilirliğini doğrulamak için 10 genin ifade seviyeleri qRT–PCR ile test edilmiştir. Bu genlerin kontrol, Pb ve TŪ+Pb uygulamaları arasındaki ifade seviyelerindeki artışlar ölçülmüştür. Uygulamalara bağlı olarak bu genlerin transkriptom dizileme sonuçları (FPKM) ile qRT–PCR ile elde edilen gen ifade profillerinin benzer davranış gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuç, transkriptom verilerinin güvenilirliğini destekler yöndedir. Her bir DEG için RNA–seq sonuçları ve RT–qPCR analizi ile elde edilen gen ifade seviyeleri Şekil 4.15'de verilmiştir.



Şekil 4.15 Kontrol, Pb ve Tü+Pb uygulamalarına maruz bırakılan mısır fidelerinin yapraklarında ifade edilen ve RNA-seq analizi ile elde edilen FPKM değerleri ve RT-qPCR kullanılarak doğrulanan 10 genin ifade profili. OSM34: Osmotin benzeri protein OSM34, ABCG: ABC taşıyıcı G, MAPK: Mitogenle aktive olan protein kinaz 17, GST: Glutasyon S-transferaz, MYB: MYB transkripsiyon faktörü, MTLP: Metalotiyonin benzeri protein, PEPCK: Fosfoenolpiruvat karboksilaz kinaz 3, CesA: Nişasta sentaz, TryS: Tryptofan sentaz HD-ZIP: Homeobox-lösin fermuar proteini.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Pb ile kirlenmiş topraklar, tüm canlılar için en ciddi tehditlerden biridir (Arshad vd. 2008, Ma vd. 2016). Pb bitki metabolizması için gerekli bir element olmamasına rağmen, bitki hücresinde su ve mineral durumunda değişiklikler, kloroplast yapısı, pigmentler, enzimler ve fotosentezin ışık bağımlı/bağımsız reaksiyonlarında ve redoks homeostazı (Kaur 2014, Tripathi vd. 2016, Alamri vd. 2018, Zhou vd. 2018) dahil olmak üzere çok çeşitli olumsuz etkilere neden olmaktadır. *Arabidopsis thaliana* (Corpas ve Barroso 2017), *Spinacia oleracea* (Khan vd. 2016), *Amaranthus viridis* ve *Portulaca oleracea* (Javed vd. 2018) ve *Triticum aestivum*'da (Tripathi vd. 2016, Alamri vd. 2018) oksidatif stresin kurşun tarafından uyarıldığı belirlenmiştir. Bu çalışmalarda, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi hücrelerin nötralize edemeyeceği seviyelere ulaştığında, redoks homeostazının kaybolması nedeniyle lipidler, nükleik asitler ve proteinlerin kontrolsüz olarak oksidasyona uğradığı bildirilmiştir.

Tiyoüre (TÜ), bitki gelişimini düzenleyen ve bitkileri abiyotik stresin neden olduğu oksidatif hasardan etkili bir şekilde koruyan kükürt açısından zengin bir bitki büyüme düzenleyicisidir (Li vd. 2023, Patade vd. 2020). TÜ, kükürt (S) ve azot (N) içeren fizyolojik olmayan tiyol bazlı bir ROT temizleyicisi olup (Ahmad vd. 2023), stres kaynaklı redoks dengesizliği ve bitkinin çeşitli yaralanmalarını azaltabilir (Ahmad vd. 2022, Srivastava vd. 2017). Farklı bitki türlerinin büyümesini olumlu yönde etkileyen TÜ'nün (Ratnakumar vd. 2016) tohumla ön uygulama, yaprağa spreyleme ve bitki yetiştirme ortamına köklerden uygulanarak etkisinin araştırıldığı görülmektedir (Aldasoro vd. 1981, Sahu ve Singh 1995, Burman vd. 2004, Nadeem vd. 2012, Perveen vd. 2016). Dışsal TÜ'nün mahsullerin stres toleransını artırdığı bildirilmiştir (Zhang vd. 2022, Ahmad vd. 2023). Büyüme ve mahsul verimliliği, membran stabilitesi, antioksidan potansiyeli ve fotosentez verimliliğinde artışa neden olmaktadır (Singh vd. 2017, Haroon vd. 2023). Birçok çalışmada, abiyotik streslere maruz bırakılan buğday (Wahid vd. 2017, Yadav vd. 2020, Naz vd. 2021), mısır (Baqer vd. 2020), kanola (Haider vd. 2022) gibi çeşitli ürün bitkilerinde TÜ uygulamasının morfo-fizyolojik, biyokimyasal ve verim üzerinde olumlu etkileri olduğu ve stresle başa çıkmada önemli bir rol oynadığı (Zahid vd. 2024) bildirilmiştir.

Mevcut araştırmada, dışsal T  (25  M) uygulaması mısır fidelerinin gövde ve kök büyümesindeki Pb (150  M) kaynaklı inhibisyonu etkili bir şekilde hafifletebildiği belirlenmiştir. Benzer olarak, buğday (*Triticum aestivum* L.)  eşitlerinde (FSD–2008 ve Zincol–2016) kobalt stresi (300  M) ve yaprakdan T  (500  M) uygulaması yapılan bir çalışmada morfolojik özellikleri önemli  l de etkilemiştir (Zahid vd. 2024). Kobalt stresi   T  uygulamaları   buğday  eşitleri arasındaki etkileşim morfolojik özellikler için önemli olmamıştır. Bununla birlikte, kontrol grubuna göre kobalt stresi gövde taze ağırlığı (%32), kök taze ağırlığı (%37), gövde kuru ağırlığı (%24) ve kök kuru ağırlığını (%50) azalttığı bildirilmiştir. Kobalt stresinin zararlı etkisini azaltmada iyileştirici rol oynayan T  uygulamasının buğday bitkilerinde gövde taze ağırlığını %15 ve kök taze ağırlığını %14 oranında iyileştirdiği bildirilmiştir (Zahid vd. 2024). As (30  M) stresi uygulanmış mercimek  eşitlerinde (L 9, Pusa 4, K 75, PL 234) kontrole kıyasla kök ve gövde kuru ağırlıklarının önemli düzeyde azaldığı saptanmıştır (Talukdar 2016). Aynı  alışmada, As stresine maruz bırakılan mercimek çeşitlerine T 'n n iki farklı konsantrasyonunun (6.5 ve 13 mM) uygulanması ile birlikte L 9 ve Pusa 4'te gövde kuru ağırlığı ve kök kuru ağırlığı sadece 13 mM T  uygulamasında kontrole göre yaklaşık 1.5 kat artarken, K 75 ve PL 234  eşitlerinde ise T  konsantrasyonunun artmasıyla birlikte artma gösterdiği bildirilmiştir (Talukdar 2016).

Bitki kökleri tarafından kolaylıkla alınan Pb çoğunlukla köklerde biriktirilirken yaprak, gövde ve tohumlarda daha az miktarda biriktiği bildirilmiştir (Sharma ve Dubey 2005). Benzer olarak araştırmamızda da Pb (150  M) uygulamasına maruz bırakılan mısır fidelerinin gövdelerine göre köklerinde daha fazla miktarda Pb biriktiği belirlenmiştir. Hücrelere kurşun girişi fitoşelatinler aracılığıyla azaltılmakta (Mishra vd. 2006), hücre zarı ve hücre duvarı, Pb'nin hücreyle temas etmesini önlemektedir. Gövde ve kökteki Pb birikimi, T  (25  M) + Pb (150  M) uygulaması ile birlikte sadece gövde dokularında önemli düzeyde azalmıştır. Kaya vd. (2022), Pb (100  M) stresine maruz bırakılan buğday bitkilerinde T  (400 mg/L) uygulamasının hem kök hem de gövde dokularında Pb birikimini önemli düzeyde azalttığını rapor etmişlerdir. Keza, Pb (1200 ppm) toksisitesi altında 3 mM T  uygulaması ile  emen otu (*Trigonella foenum–graecum* L.) bitkisinde kök ve sürgün Pb içeriğinin önemli düzeyde azaldığı bildirilmiştir (Xalxo ve Keshavkant 2019).

Fotosentezde rol oynayan klorofil, ışık enerjisini kimyasal enerjiye dönüştürülmesinde rol oynayan bir pigmenttir (Björn vd. 2009). Ağır metaller fotosentezi olumsuz etkilemektedir (Shu vd. 2012). Pb toksisitesi kloroplast gelişimini ve dolayısıyla fotosentetik süreçleri olumsuz etkilemektedir (Gupta vd. 2010, Bharwana 2013). Pb'un fotofosforilasyonda elektron transfer zincirini bozduğu ve Calvin döngüsü enzimlerini inhibe ettiği bildirilmiştir. Pb, oksidatif stres nedeniyle artan reaktif oksijen türleri (ROT) biyomoleküllere zarar vermekte ve metabolik bozukluklara yol açmaktadır (Sharma ve Dubey 2005, Singh vd. 2010). Mevcut araştırmamızda, mısır fidelerinin yaprak dokularındaki yüksek Pb birikimi klorofil içeriğinde önemli düzeyde azalmaya neden olurken, klorofil içeriğindeki Pb kaynaklı azalma dışsal TÛ uygulaması ile önemli düzeyde artırılmıştır. Benzer sonuçlar, Pb (100 µM Pb) ve TÛ (4 ppm) uygulamalarına maruz bırakılan ekmeklik buğday çeşidinde (*Triticum aestivum* L. cv. Pandas) belirlenmiştir (Kaya vd. 2022). Pb stresi altındaki *Phaseolus vulgaris* (Haroun vd. 2010) ve *Camelina sativa* (Ahmad vd. 2021) bitkilerinde TÛ'nün iyileştirici etkisi klorofil seviyeleriyle ilişkilendirilmiş ve bu iyileştirici etkinin büyümeyi olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir.

Pb stresi altındaki bitkiler belirgin şekilde reaktif oksijen türleri (ROT) üretmektedir (Huihui vd. 2020). Oluşan ROT, zar moleküllerine zarar vererek biyolojik zar bütünlüğüne zarar verebilmektedir (Khan vd. 2020). Lipid peroksidasyonu genellikle ROT aracılı hasar veya stres göstergesi için bir biyokimyasal belirteç olarak kabul edilmektedir. ROT molekülleri, hücre zarı lipidlerinin çoklu doymamış yağ asitlerine zarar vererek hücre zarlarının yapısı ve işlevinde değişikliğe neden olabilmektedir. Bu nedenle, lipid peroksidasyonu olarak bilinen bir zincirleme reaksiyonu başlatabilmektedir (Hattab vd. 2016). Lipid peroksidasyon indeksini belirlemek için tiyobarbitürik asit reaktif maddelerinden biri olan malondialdehitin (MDA) ölçümü yaygın olarak kullanılmaktadır (Huang vd. 2012). Yapılan mevcut araştırmada, mısır bitkilerinin yapraklarındaki MDA içerikleri Pb uygulamasıyla birlikte önemli düzeyde artış gösterirken, TÛ+Pb uygulamasında ise MDA içeriğinin önemli derecede azaldığı belirlenmiştir. Benzer olarak, Pb stresi ve asit yağmurları etkisi altında bırakılan *Trigonella foenum-graecum* L. (Xalxo ve Keshavkant 2019) ve As stresi altındaki *Vigna radiata* (Talukdar vd. 2014) bitkilerine dışsal TÛ uygulamasının MDA içeriğini

azalttığı rapor edilmiştir. T  ayrıca Cd stresine maruz kalmış *Hordeum vulgare* L.'de oksidatif hasarı telafi ederek, büyümeyi ve stres toleransını artırmıştır (Ikram vd. 2014). T  uygulamasının MDA seviyelerini düşürdüğü bulunmuştur. T 'n n stresi azaltma mekanizması, bitkilerin redoks durumunu düzenleme ve ROT üretimini azaltmadaki rolleriyle ilişkilendirilmektedir (Wahid vd. 2017, Patade vd. 2020, Yıldız vd. 2025).

Ağır metal toksisitesi altında biriken ROT'ları temizlemede rol oynayan antioksidan ağı, peroksidaz (POX), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi enzimatik antioksidanlar ve tokoferoller, askorbik asit ve glutatyon gibi enzimatik olmayan antioksidanları içermektedir (Mishra ve Choudhary 1998, Mittler 2002). Antioksidan ağlarına ek olarak, prolin gibi ozmolit bileşiklerinin birikimi, ozmotik potansiyeli koruyarak ve hücresel yapıları koruyarak stresli koşullar altında bitkinin toleransını iyileştirmektedir (Ali vd. 2014, Ghorbani vd. 2019b).

Mevcut araştırmamızda, kontrole göre Pb uygulamasında SOD, POD, CAT ve APX aktivitesi önemli düzeyde artmıştır. Kontrole göre T +Pb uygulamasında SOD, POD ve APX aktiviteleri önemli düzeyde artarken, CAT aktivitesi önemli düzeyde azalmıştır. Çalışmamıza benzer olarak Pb (15 mM) uygulanmış *T. aestivum* L. bitkilerinde SOD, POD ve CAT aktivitesi önemli düzeyde artmış, T +Pb uygulamasında da SOD, POD ve CAT aktiviteleri benzer şekilde artış göstermiştir (Maqbool vd. 2025). Bununla birlikte, Pb stresine maruz bırakılan *Acalypha indica* L. bitkilerinde de SOD, CAT ve APX aktiviteleri önemli düzeyde artış göstermiştir (Venkatachalam vd. 2017). Çalışmamızda kontrole göre Pb uygulaması ile artan CAT aktivitesi T +Pb uygulaması ile azalırken Pb uygulamasına göre T +Pb uygulamasında SOD ve APX aktiviteleri önemli düzeyde azalmıştır. Bulgumuza zıt olarak Pb (100  M) uygulanan buğday (*Triticum aestivum* L.) bitkisinde kontrole göre T +Pb uygulamasında CAT aktivitesi önemli düzeyde artarken Pb uygulamasına göre T +Pb uygulamasında da SOD ve APX aktiviteleri benzer şekilde artış göstermiştir (Kaya vd. 2022).

Bitkiler, ağır metal/metaloid stresine karşı çevrelerini algılayarak ve metabolik sistemlerini düzenleyerek metal homeostazını sürdürebilmek için  zg n stratejiler geliştirmiştir. Bu adaptif yanıt, stresin algılanmasından başlayıp çok sayıda stres ilişkili

genin aktive edilmesine kadar uzanan ve hücrenel, biyokimyasal, fizyolojik ve moleküler süreçleri yöneten bir olaylar zincirini kapsamaktadır. Son yıllarda, özellikle yüksek metal konsantrasyonlarına sahip ortamlarda bitkilerin hayatta kalmasını sağlayan tolerans mekanizmaları üzerine ilgi giderek artmıştır. Genomik, transkriptomik, metabolomik ve proteomik gibi disiplinlerdeki gelişmeler, ağır metal detoksifikasyonunda rol oynayan transkripsiyon faktörleri, metabolitler ve fonksiyonel genlerin karakterizasyonuna önemli katkılar sağlamıştır. Mısır yapraklarında Pb stresine verilen yanıtların, birden fazla fonksiyonel gen ve metabolitin yer aldığı karmaşık bir detoksifikasyon ve adaptasyon ağı içerdiği düşünülmektedir. Nitekim, bu çalışmada da Pb ve T +Pb uygulamaları altında mısır yapraklarında çok sayıda genin farklı şekilde düzenlendiği belirlenmiş olup, bunların detoksifikasyon sürecinin ve adaptif yanıtların düzenlenmesinde kilit bir rol üstlendiği görülmektedir.

Kurşun stresi fotosentez sürecini doğrudan hedef alarak klorofil biyosentezini baskılamakta, elektron taşınım zincirini bozmakta ve sonuç olarak fotosentetik kapasitede azalmaya yol açmaktadır (Zulfiqar vd. 2019, Shah vd. 2020). Bu durum genellikle kloroplast yapısında deformasyon, fotosistem bileşenlerinde hasar ve elektron akışında düzensizlik ile ilişkilendirilmektedir. Çalışmamızda da Pb stresinin fotosentezin ışık reaksiyonları üzerine baskılayıcı etkileri gen düzeyinde belirgin şekilde ortaya çıkmıştır. Bitkilerde ışık hasatlayıcı klorofil protein kompleksleri (LHC) içinde yer alan anten proteinleri, ışık enerjisinin etkin bir şekilde absorbe edilmesinde ve fotosistemlere iletilmesinde kritik rol oynamaktadır. Bu proteinler, fotosistemlerin çevresinde yer alan periferik anten sistemleri olarak işlev görmekte ve ışık toplama verimliliğini belirgin şekilde artırmaktadır (Nield vd. 2000). Bulgularımızda da Pb stresi altında klorofil a–b bağlayıcı protein genlerinin ifade seviyelerinde belirgin bir azalma gözlenmiştir. Bu durum, anten komplekslerinin verimliliğinin Pb toksisitesi altında zayıfladığını ve ışık toplama kapasitesinin sınırlanabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, T +Pb uygulamasında bu genlerin ifade seviyelerinin yeniden artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuç, T  uygulamasının Pb stresinin fotosentezin ışık reaksiyonları üzerindeki olumsuz etkilerini kısmen hafifleterek anten proteinlerinin fonksiyonunu desteklediğine işaret etmektedir.

Fotosistem II'nin oksijen artırıcı kompleksine ait 23 kDa ve 33 kDa alt birimlerinin (OEC altbirim 23 ve OEE1), Pb koşullarında kontrol gruplarına kıyasla daha düşük düzeyde ifade edildiği, buna karşın TÛ+Pb uygulamasında tekrar yükselerek kontrole yakın ya da daha yüksek seviyelere ulaştığı görülmektedir. Benzer şekilde PSII'ye ait D1 proteini, Pb altında hafif bir düşüş sergilese de TÛ+Pb uygulamasıyla belirgin bir artış göstermiştir. Bu durum, ağır metal stresinin PSII çekirdek kompleksinde yapısal bozulmalara neden olurken, TÛ uygulamasının bu bozulmayı kısmen engellediğini düşündürmektedir. Elektron taşıma zincirinde görev yapan plastosiyanin ve plastokinol-plastosiyanin redüktaz genleri de Pb altında azalmış, ancak TÛ+Pb uygulaması ile belirgin şekilde artış göstermiştir. Ayrıca PSI'ye ait *PsaA*, *PsaB* ve diğer reaksiyon merkezi alt birimlerinin Pb koşullarında baskılandığı, TÛ+Pb uygulamasında ise kontrole yakın düzeylere çıktığı belirlenmiştir. Ferredoksin ve ferredoksin-NADP+ redüktaz gibi terminal elektron taşıyıcılarının Pb stresi koşullarında ifadelerinin azalması, Pb stresi nedeniyle elektron akışının kesintiye uğradığı ve buna karşılık TÛ+Pb uygulamasında artış göstermeleri durumunda ise bu akışın yeniden sağlandığı söylenebilir. Bu bulgular, literatürde de belirtildiği gibi Pb stresinin ışık reaksiyonlarını doğrudan hedef alarak elektron taşınımını bozduğu (Gomes vd. 2014), ancak TÛ uygulamasının bu bozulmayı hafifleterek fotosentetik verimliliğin korunmasına yardımcı olduğunu destekler yöndedir.

Çeşitli çalışmalar, Pb kirliliğinin fotosentetik aktiviteyi azalttığını, bunun da Calvin döngüsü ve CO₂ asimilasyon kapasitesi dahil olmak üzere fotosentetik aparatın farklı bileşenlerinin bozulmasından kaynaklandığını ortaya koymuştur (Yang vd. 2020). Bu bağlamda, karbon fiksasyonu ile ilişkili enzimleri kodlayan genlerin ifade seviyeleri incelenmiş ve Pb stresi ile TÛ uygulamasının bu süreçler üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. İlk olarak, karbonik anhidraz izoformlarının Pb stresi altında farklı tepkiler verdiği görülmüştür. Bir izoform Pb uygulaması ile artış göstermiş, bir diğeri ise baskılanmıştır. TÛ+Pb koşulunda ise tüm izoformlarda yeniden bir artış gözlenmiştir. Karbonik anhidraz, CO₂ ve HCO₃⁻ dönüşümünü katalize eden bir metalloenzimdir ve bitki karbonik anhidrazlarının stres yanıtı enzimler olduğu, olumsuz çevre koşullarına adaptasyonda rol alabileceğine dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır (Polishchuk 2021). Bulgular, TÛ uygulamasının Pb stresi altında karbon

özümleme kapasitesini desteklediğini ortaya koymaktadır. Fosfoenolpirüvat karboksilaz (PEPC) ve ilişkili enzimler incelendiğinde, Pb uygulamasının PEPC izoformlarında farklı yönlerde etkiler yarattığı görülmüştür. Bir izoform Pb varlığında baskılanırken, diğerinde artış gözlenmiştir. TÛ+Pb koşulunda özellikle artış gösteren izoformun ifade seviyesi daha da yükselmiştir. Ayrıca PEPC kinaz 3 Pb stresinde belirgin şekilde azalmış, ancak TÛ uygulaması ile kısmen bu etki iyileştirilmiştir. PEPC, karbon ve azot metabolizmasında merkezi rol oynayan, fotosentez, solunum, amino asit sentezi ve tohum gelişiminde görev alan temel bir enzimdir ve özellikle C4 ve CAM fotosentezindeki işlevi ile bilinmektedir (Nimmo 2000). Ayrıca, belirli PEPC izoenzimlerinin ağır metal stresine yanıt verdiği rapor edilmiştir (Pérez–López vd. 2023). Benzer şekilde, malik enzim Pb altında sınırlı bir azalma göstermiş, TÛ+Pb koşulunda yeniden artmıştır. Malat dehidrogenaz (MDH) ise Pb varlığında önemli derecede azalmış, TÛ uygulaması ile kontrol seviyesine yaklaşmıştır. Bu sonuçlar, Pb stresinin karbon akışını baskıladığını, TÛ uygulamasının ise bu baskıyı azaltarak metabolizmayı yeniden düzenlediğini göstermektedir. Son olarak, RuBisCO ve Calvin döngüsü enzimleri değerlendirildiğinde, Pb uygulaması altında RuBisCO ve ilişkili alt birimlerinde azalma gözlenmiştir. Bu durum Pb stresinin karbon fiksasyonunu doğrudan baskıladığını göstermektedir. Ancak TÛ+Pb koşulunda bazı izoformlarda ifadesinin kontrol seviyesinin üzerine çıktığı dikkat çekicidir. *Vicia faba* bitkilerinde Pb stresinin neden olduğu fotosentez azalmasını daha yüksek RuBisCO aktivitesini koruyarak hafiflettiği bildirilmiştir (Soliman vd. 2025). Ayrıca, RuBisCO gen ifadesi topraklardaki ağır metal kirliliğini izlemek için güvenilir bir belirteç olarak önerilmiş ve Zn, Pb ve Cd streslerinde konsantrasyon ve tür bazlı olarak azalan yönde düzenlendiği rapor edilmiştir (Jaskulak vd. 2018). Tüm bu bulgular, Pb stresinin fotosentezin karbon özümleme reaksiyonlarını baskıladığını; ancak TÛ uygulamasının karbonik anhidraz, PEPC, RuBisCO ve Calvin döngüsü enzimlerinin ifadesini yeniden düzenleyerek fotosentetik kapasitenin korunmasına katkı sağladığını göstermektedir.

ABC taşıyıcı proteinleri, bitkilerde hücrel osmotik homeostazın korunmasından toksinlerin vakuollerde biriktirilmesi ve stomatal hareketlerin düzenlenmesine kadar çok sayıda işlevi olan büyük ve fonksiyonel açıdan çeşitli bir aile oluşturmaktadır (Pinkett vd. 2007). Literatür, ABC ailesinin Pb taşınımı ve detoksifikasyonunda merkezi

olduğunu, bu nedenle çeşitli bitkilerde Pb toleransının düzenlenmesinde kilit rol oynadığını göstermektedir (Wang vd. 2019). Mevcut araştırmada, birçok ABC üyesinin ifade seviyesi Pb uygulamasıyla teşvik edilmiş ve TÛ+Pb uygulamasında daha da artmıştır. Örneğin, ABC taşıyıcı A familya üyesi 7 genin ifadesi Pb ve TÛ+Pb uygulamasında kademeli olarak artış göstermiştir. Benzer şekilde, ABCC ve ABCG genlerinin ifadesi TÛ+Pb uygulamasında belirgin artış göstermiştir. Bu sonuçlar literatürdeki bulgularla örtüşmekte ve ABC tip taşıyıcıların vakuoler alıkonmada rol alabileceği ifade edilmiştir (Ma vd. 2018, Manne vd. 2024). Diğer taraftan, Zhang vd. (2024), Pb stresine maruz kalan mısır köklerinde ABC ailesine ait genlerin genel olarak baskılandığını bildirmiştir. Bununla birlikte, Manne vd. (2024) ve Ma vd. (2018), ABCC tipi vakuoler taşıyıcıların kükürt takviyesi ile teşvik edildiğini ve Pb-PC komplekslerinin vakuole yönlendirilmesiyle metal içsel alokonulmasını güçlendirdiği bildirilmiştir. Benzer olarak, çalışmamızda TÛ+Pb uygulamasıyla ABCC benzeri üyelerin daha yüksek ifade seviyelerine ulaşması, TÛ uygulamasının dolaylı olarak Pb içsel alıkonulması/mobilizasyon mekanizmalarını ve/veya kükürt-bağlı şelatlama yollarını destekleyebileceğini ileri sürmektedir. Pb taşınımı ve detoksifikasyonunda yer alan ABC taşıyıcılarına ait genlerin ifade seviyelerindeki artış literatürdeki bulgularla örtüşmekte ve Pb stresi koşullarında TÛ uygulamasının vakuoler alıkonmada önemli rol oynadığı ileri sürülebilir.

Plazma membranı intrinsik proteinleri (PIP'ler) hücre zarından su ve küçük moleküllerin taşınmasında ana kolaylaştırıcılar olup, PIP ailesi hem *PIP1* hem de *PIP2* izoformlarını içerir; *PIP2* alt ailesinin genelde *PIP1*'e göre daha yüksek su geçirgenliğine sahip olduğu bilinmektedir (Chaumont ve Tyerman 2014, Maurel vd. 2015, Liu vd. 2020). Ağır metal streslerinde aquaporinlerin düzenlenmesi hem su/çözünen akışının hem de metallerin hücre içi transportunun dolaylı belirleyicisi olarak önem kazanmıştır (Fitzpatrick ve Reid 2009). Mevcut araştırmada, aquaporin ailesine ait genlerin Pb ve TÛ+Pb uygulamalarına güçlü ve izoform-spesifik tepkiler verdiği görülmektedir. Örneğin, aquaporin *NIP1-3*, *PIP1-2*, *PIP2-2* ve *TIP1-1* genlerinin ifade seviyeleri TÛ+Pb uygulamasında artan yönde düzenlenmiştir. Bu sonuçlar, TÛ uygulamasının sinyal/oksidatif denge veya S-bağımlı yollarda yaptığı düzenlemelerle aquaporin transkripsiyonu ve/veya stabilitesini artırdığını

göstermektedir. Özellikle *PIP2*-2'nin T $\ddot{U}$ +Pb uygulamasında yüksek ifade seviyesi, *PIP2* alt ailesinin Pb birikimi/taşınımında rol oynayabileceği hipotezini desteklemektedir. Bu sonuç, *ZmPIP2*;5'in Pb toleransını ve birikimini pozitif etkilediğini gösteren önceki çalışmayla tutarlıdır (He vd. 2023). Ayrıca *TIP1*-1'in (tonoplast) TUPb ile belirgin artışı, vakuolar alıkonma ve tonoplast aracılı taşımının Pb detoksifikasyonunda rol oynayabileceğini ileri sürmektedir. Ayrıca NIP ailesinin (*NIP1*-3) teşvik edilmesinin ise, NIP/NIP-benzeri kanalların bor ve diğer küçük nötr çözünenleri taşıyabildiğini gösteren raporlarla paralellik taşır (Fitzpatrick ve Reid 2009) ve NIP'lerin Pb ile ilişkili komplekslerin hareketinde dolaylı rol alabileceğini ileri sürmektedir. Çalışmamızda akuaporin genlerinin K/Pb uygulamasındaki artışlarının yanı sıra Pb/T $\ddot{U}$ +Pb uygulamasındaki ilave artışlar, bitki kökleri tarafından Pb'un alınması, taşınması ve vakuoler alıkonması süreci ile uygunluk gösterdiği ileri sürülebilir.

Ağır metal taşıyıcıları, bitkilerin Pb gibi toksik metallere karşı tolerans ve detoksifikasyon mekanizmalarında merkezi role sahiptir. Özellikle ağır metal ATPaz (HMA) ailesi ATP hidroliziyle ağır metal iyonlarının zarlar üzerinden taşınmasında görev alır ve bu motif bakterilerden bitkilere kadar geniş bir şekilde korunmuştur (Tehseen vd. 2010, Zhu vd. 2016, Chaudhary vd. 2018, Takahashi vd. 2012, Tang vd. 2021). Çalışmamızda HMA domaini-içeren proteinler Pb uygulaması altında belirgin şekilde indüklenmiş, T $\ddot{U}$ +Pb koşullarında ise daha da yüksek seviyelere ulaşmıştır. Bu bulgular, HMA'ların Pb taşınımında aktif rol oynadığını ve T $\ddot{U}$ uygulamasının bu yanıtı pekiştirdiğini göstermektedir. Özellikle HMA domainiyle birlikte anotlanan HIPP27 proteini, Pb koşullarında düşük seviyeden güçlü bir şekilde aktive olmuş, T $\ddot{U}$ +Pb'de daha da artış göstermiştir. Bu durum, mısırdaki *ZmHIPP* geninin hücre duvarında Pb depolayarak tolerans sağladığını rapor eden çalışmayla (Ma vd. 2022) doğrudan paralellik göstermektedir. Bunun yanı sıra, NRAMP (Natural Resistance Associated Macrophage Protein) taşıyıcıları da ağır metal alımı ve taşınımında önemli rol oynamaktadır (Liu vd. 2023). Bulgularımızda *Nramp6* geni Pb maruziyetinde düşük düzeyde indüklenmiş, ancak T $\ddot{U}$ +Pb ile güçlü bir ifade artışı göstermiştir. Benzer şekilde, *Nramp* aluminum transporter1 geninin ifade seviyesi hem Pb hem de T $\ddot{U}$ +Pb uygulamalarında belirgin şekilde yükselmiştir. Bu sonuçlar, NRAMP ailesinin Pb alım

ve taşınımındaki rolünü desteklemekte ve T  uygulamasının bu süreci kuvvetlendirdiğini göstermektedir.

MATE (Multidrug and toxic compound extrusion) taşıyıcı ailesi, bitki hücrelerinden toksik bileşiklerin uzaklaştırılmasında önemli görevler üstlenmekte ve bu aile  yeleri bakteri, mantar, hayvan ve bitkilerde geniş çapta bulunmaktadır (Omote vd. 2006). MATE genleri tarafından kodlanan proteinler, hücre içi ksenobiyotiklerin ve metabolik atık ürünlerin taşınmasına aracılık eder (Moriyama vd. 2008).  nceki çalışmalarda mısırd  ZmMATE1 ve ZmMATE2 proteinlerinin (Maron vd. 2010) ve sorgum MATE proteinlerinin (Sivaguru vd. 2013) alüminyum stresinde işlev gördüğü rapor edilmiştir. Ayrıca, MATE2 proteininin hem  eltik hem de tütün bitkilerinde arsenik toleransını düzenlediği bildirilmiştir (Das vd. 2018). Diğer bitkilerde yürütülen araştırmalar MATE ailesi üyelerinin kuraklık, tuzluluk, soğuk stresleri, hastalık direnci, bitki hormonları ve sekonder metabolitler gibi süreçlerde doğrudan veya dolaylı roller üstlendiğini ortaya koymuştur (Santos vd. 2017, Huang vd. 2021). Çalışmamızda, Pb stresine maruz bırakılan mısır fidelerinin yapraklarında MATE genlerinin genel olarak teşvik edildiği g r lm ştir. Özellikle birkaç MATE taşıyıcı proteininin kontrol koşullarına kıyasla Pb altında belirgin düzeyde artış gösterdiği, T +Pb uygulamasında ise bu artışın daha da belirginleştiği saptanmıştır. Bu durum, MATE taşıyıcılarının ağır metal stresi altında aktifleşerek detoksifikasyon mekanizmalarına katkı sağladığını göstermektedir. Bulgularımız, MATE gen ailesinin yalnızca klasik toksik bileşik uzaklaştırma görevini değil, aynı zamanda Pb stresinde detoksifikasyon ve tolerans mekanizmalarında da kritik bir rol üstlendiğini ortaya koymaktadır.

Kurşun doğrudan bir redoks metali olmamasına rağmen bitkilerde ROT üretimini tetikleyebilmektedir (Singh vd. 2010). Özellikle Pb'un hücre içinde yeterince şelatlanamaması veya vakuollere taşınamaması durumunda sitozolde biriken Pb iyonları, ROT oluşumunu indükleyerek nükleik asitler, proteinler ve lipidler üzerinde yıkıcı etkilere yol açmaktadır (Apel ve Hirt 2004). Bu bağlamda, Pb toksisitesi sırasında ortaya çıkan ROT birikiminin dengelenmesi bitkilerde antioksidan savunma sistemlerinin etkinliği ile doğrudan ilişkilidir. Bitki hücreleri, ROT hasarına karşı yalnızca enzimatik savunma değil, aynı zamanda glutatyon, flavonoidler, karotenoidler,

fenolik bileşikler gibi non–enzimatik antioksidanlarla da koruma sağlamaktadır (Kumar ve Prasad 2018). Çalışmamızda, Pb uygulaması altında özellikle SOD, APX, CAT, GPX ve POD genlerinin artış göstermesi, literatürde de belirtildiği üzere (Malecka vd. 2021) bu enzimlerin hücre içinde geniş bir şekilde dağılarak ROT detoksifikasyonunda görev aldığını ortaya koymaktadır. Ayrıca, TÛ+Pb uygulaması ile birlikte bu genlerin daha da güçlü bir şekilde indüklendiği gözlemlenmiştir. Bu durum, TÛ uygulamasının Pb kaynaklı oksidatif stresi hafifletici etkisinin, antioksidan sistemin daha etkin çalışmasını sağlayarak gerçekleştiğini düşündürmektedir. Dolayısıyla, elde edilen bulgular Pb toksisitesine karşı antioksidan genlerin kritik bir savunma mekanizması olduğunu ve TÛ uygulamasının bu mekanizmayı güçlendirdiğini göstermektedir.

Glutasyon S–transferaz (GST) enzimleri, farklı ağır metal streslerine karşı dirençte kritik rol oynamakta olup, glutasyonu (GSH) çeşitli endojen ve eksojen kaynaklı elektrofilik bileşiklere konjuge ederek detoksifikasyon sürecini kolaylaştırmaktadır. Önceki çalışmalar, GST gen ifadesinin Pb stresiyle yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (Xu vd. 2017, Zhu vd. 2018). *Typha orientalis*'te yapılan bir çalışmada Pb uygulamasının dört GST transkriptinin artan yönde düzenlediği bildirilmiştir (Xu vd. 2020). Mevcut çalışmada, Pb uygulaması altında birçok GST geninin kontrol gruplarına kıyasla belirgin şekilde indüklendiği görülmüştür. Bu durum, Pb'un hücre içinde neden olduğu oksidatif stresin giderilmesinde GST'lerin detoksifikasyon kapasitesinin önemli bir koruyucu mekanizma olduğunu göstermektedir. Daha dikkat çekici olarak, TÛ+Pb koşullarında GST genlerinin çoğunun Pb koşuluna göre daha da yüksek seviyelerde eksprese olduğu saptanmıştır. Bu artış, TÛ uygulamasının Pb stresine karşı glutasyon temelli savunmayı güçlendirerek ROT birikiminin daha etkin biçimde sınırlandırılmasına katkıda bulunduğunu düşündürmektedir. Dolayısıyla, elde edilen bulgular GST enzimlerinin Pb kaynaklı oksidatif hasarın azaltılmasında merkezi rol oynadığını ve TÛ uygulamasının bu savunmayı belirgin biçimde pekiştirdiğini ortaya koymaktadır.

Dehidrinler (DHN'ler) ya da grup 2 geç embriyogenez bol (LEA) proteinleri, bitki hücrelerini dehidrasyon stresinden korumada çok yönlü roller üstlenmektedir. Bu proteinlerden bazıları amino asit kalıntıları ile ROT türleri arasındaki etkileşimler

aracılığıyla ROT temizleme kapasitesine sahiptir (Battaglia vd. 2008) ve aynı zamanda antioksidan (Hara vd. 2005), iyon sekestrantı (Heyen vd. 2002) ve bitki floem özsuunda metal iyon taşıyıcısı (Kruger vd. 2002) olarak da işlev görmektedir. Çalışmamızda, DHN genlerinin Pb stresi altında farklı ifade profilleri sergilediği gözlemlenmiştir. Özellikle *DHN1* (RAB17 proteini) kontrol koşullarına kıyasla Pb uygulamasında güçlü bir artış göstermiş, TÛ+Pb koşullarında ise daha da yükselmiştir. Benzer şekilde *DHN3* (COR410) geninin de Pb altında artış eğiliminde olduğu ve TÛ katkısı ile bu artışın belirginleştiği saptanmıştır. Buna karşılık, *DHN13*'ün ifade düzeyi nispeten sabit kalmış, bu da farklı dehidrin izoformlarının Pb stresine tepkilerinde çeşitlilik olabileceğini düşündürmektedir. Bitkiler ayrıca Pb kaynaklı toksisiteyi ozmoregülasyon yoluyla da tolere edebilmektedir. Bu süreç, mannitol, şekerler, glisin betain ve prolin gibi uyumlu ozmolitler tarafından kolaylaştırılmaktadır. Özellikle prolin, stres koşullarında biriken ve genellikle stres toleransı ile pozitif ilişki gösteren önemli bir organik ozmolit olarak bilinmektedir (Rucinska-Sobkowiak vd. 2013). Bu metabolit, P5CS (Δ -1-pirrolin-5-karboksilat sentaz) ve prolin dehidrogenaz gibi enzimler tarafından hücresel düzeyde düzenlenmektedir. Mevcut araştırmada, *P5CS* geninin Pb koşullarında hafif bir artış sergilediği ve TÛ+Pb uygulamasında bu artışın daha belirginleştiği, prolin dehidrogenaz geninin ise Pb uygulamasıyla indüklendiği ve TÛ+Pb ile daha da güçlendiği görülmüştür. Bu sonuçlar, Pb stresi altında prolin metabolizmasının aktif bir şekilde devreye girdiğini ve TÛ uygulamasının bu mekanizmayı pekiştirerek Pb toleransını artırabileceğini göstermektedir.

Ağır metal şelatlama yoluyla detoksifikasyon, bitkilerin Pb toksisitesine karşı en temel savunma mekanizmalarından biridir ve bu süreçte metallotioneinler (MT'ler) önemli bir rol oynar (Cobbett ve Goldsbrough 2002). MT'ler düşük molekül ağırlıklı, sisteince zengin metal bağlayıcı peptitlerdir ve Pb stresine karşı farklı bitki türlerinde indüklendikleri daha önce rapor edilmiştir. Örneğin, *Platanus acerifolia*'da MT2a genlerinin Pb stresinde belirgin şekilde arttığı (Wang vd. 2015) ve *Arabidopsis thaliana*'da MT1a, MT2a, MT2b, MT3, MT4a ve MT4b gibi altı farklı MT geninin Pb stresine yanıt verdiği gösterilmiştir (Guo vd. 2008). Mevcut araştırmada, üç farklı MT-benzeri genin ifade seviyeleri incelendiğinde, Pb uygulamasında genel olarak kontrolle benzer veya hafif düşüş gösterdiği, ancak TÛ+Pb koşullarında yeniden artış

eğilimine girdiği gözlenmiştir. Bu sonuç, Pb stresinde tek başına MT genlerinin aktivasyonunun sınırlı kaldığı ve MT ifadesinin TÜ uygulaması ile birlikte ilave artış göstermesi Pb iyonlarının bağlanması ve hücre içi detoksifikasyon sürecindeki katkısını ortaya koymaktadır.

Transkripsiyon faktörleri (TF'ler), ağır metal stresine karşı bitkisel toleransın düzenlenmesinde merkezi rol oynayan genetik düzenleyicilerdir. Daha önce yapılan çalışmalar, WRKY, ERF, MYB ve DREB gibi farklı TF ailelerinin Pb stresi altında artan yönde düzenlendiğini göstermiştir (Wang vd. 2013, Shukla vd. 2018, Jiang vd. 2017). Xu vd. (2020), Pb uygulamalarında toplam 199 TF ile ilişkili DEG belirlemiş ve bunların önemli bir kısmının Pb tarafından indüklendiğini veya baskılandığını bildirmiştir. Ayrıca *AtWRKY30*'un aşırı ifadesinin *Arabidopsis*'in erken gelişim evrelerinde abiyotik streslere karşı direncini artırdığı (Scarpeci vd. 2013) ve *WRKY13*'ün Cd toleransını artırdığı (Sheng vd. 2019) rapor edilmiştir. Benzer şekilde, AP2/ERF ailesinden *AtERF13*'ün ABA aracılı stres yanıtına katıldığı (Lee vd. 2010) ve *PvERF15*'in Cd toleransında önemli rol oynadığı (Lin vd. 2017), ayrıca MYB TF'lerinin ağır metal stresine karşı koruyucu işlev gördüğü (Hu vd. 2017, Wang vd. 2017) rapor edilmiştir. Çalışmamızda toplam 144 adet TF geni tanımlanmış olup, bunların Pb ve TÜ+Pb koşullarında gösterdiği ifade profilleri bu literatür bulgularıyla uyumluluk sergilemektedir. Genel olarak Pb uygulaması altında birçok TF geninde orta düzeyde indüksiyon gözlenmiş, buna karşın TÜ+Pb koşulunda bu indüksiyonun daha da belirginleştiği dikkat çekmiştir. Özellikle AP2/ERF ailesi üyeleri (ör. *RAP2-2*, *RAP2-4*, *ERF008*), Pb stresinde kısmi bir artış gösterirken, TÜ katkısıyla daha güçlü bir şekilde aktive olmuştur. Benzer bir şekilde, bHLH ve bZIP TF'leri, Pb altında kısmi bir yanıt verirken, TÜ+Pb kombinasyonunda belirgin artış sergilemiştir. MYB ailesi üyeleri arasında da bazı genlerin Pb'ye karşı duyarlı olup baskılandığı, bazılarının ise TÜ+Pb koşullarında toparlanarak yeniden aktive olduğu görülmüştür. Ayrıca WRKY TF'leri (örn. *WRKY30*, *WRKY36*, *WRKY57*) Pb uygulamasıyla indüklenmiş, TÜ varlığında bu indüksiyonun daha güçlü hale geldiği dikkat çekmiştir. Bu bulgular, Pb stresinde TF ağlarının çok yönlü bir şekilde düzenlendiğini ve özellikle WRKY, AP2/ERF, bZIP, bHLH ve MYB TF ailelerinin ağır metal toleransında kritik rol oynadığını göstermektedir. TÜ uygulamasının TF gen ifadelerini artırıcı etkisi, Pb

stresine karşı geliştirilen savunma mekanizmalarının daha etkin bir şekilde düzenlenmesine aracılık etmiş olabilir. Dolayısıyla çalışmamızdaki sonuçlar, Pb toleransında TF'lerinin temel düzenleyici rolünü vurgulamakta ve T  uygulamasının bu süreçte ek bir koruyuculuk sağladığını ortaya koymaktadır.

Bitkilerde glikoliz ve TCA döngüsü, aerobik ve anaerobik solunum için merkezi metabolik yollar olarak enerji üretimini sağlar ve hücrel karbon akışını düzenler (Ferne vd. 2004, Sukumar vd. 2017). Çalışmamızda Pb uygulaması altında, glikoliz genlerinin bir kısmında hafif değişimler gözlenmişken, T +Pb koşullarında bu genlerde belirgin bir artış ortaya çıkmıştır. Özellikle fosfoglisarat mutaz, trioz fosfat izomeraz, fruktoz-bisfosfat aldolaz, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) ve piruvat kinaz genleri, Pb ile birlikte artış göstermiş ve T +Pb koşullarında daha güçlü bir yukarı regülasyon sergilemiştir. TCA döngüsü genleri açısından da benzer bir eğilim gözlenmiştir. Akonitaz, izositat dehidrogenaz, malat dehidrogenaz ve süksinat dehidrogenaz gibi temel enzimler, Pb stresi altında kısmi artış göstermiş, T +Pb uygulaması ile bu artış daha belirgin hale gelmiştir. Bu bulgu, Pb stresinde hücrel enerji dengesinin korunması için hem glikoliz hem de TCA döngüsünün birlikte düzenlendiğini göstermektedir. Ayrıca, piruvat dehidrogenaz kompleksi ve malat sentezi gibi bağlantı noktalarındaki enzimler, karbon akışını TCA döngüsüne yönlendirerek ATP üretimini ve metabolik esnekliği artırmış görünmektedir. Genel olarak, T +Pb koşullarında glikoliz ve TCA döngüsü genlerinin ifade düzeylerinin artması, bitkinin Pb stresine karşı enerji metabolizmasını optimize etme kapasitesinin arttığını ve stres adaptasyonunda merkezi bir rol üstlendiğini ortaya koymaktadır. Bu bulgular ışığında, Pb toksisitesine karşı uyum mekanizmalarında glikoliz ve TCA yollarındaki metabolik esnekliğin, ilave T  uygulamasıyla artırıldığını söyleyebiliriz.

Pb stresi altında bitkilerde büyüme hızı azalırken, hücrel enerji ihtiyacını karşılamak için mitokondriyal solunum artar ve ATP üretimi yükselir. Yüksek solunum hızı, sabit karbonun daha hızlı tükenmesine yol açar ve bu durum, bitkinin büyüme ve verim potansiyelini olumsuz etkileyebilir (Romero-Munar vd. 2017). Çalışmamızda mitokondriyal solunum ile ilişkili genler, Pb ve T +Pb koşullarında belirgin değişimler göstermiştir. Özellikle NADH:ubikinon oksidoredüktaz (kompleks I) alt birimleri,

süksinat dehidrogenaz (kompleks II), sitokrom c ve sitokrom c oksidaz (kompleks IV) alt birimleri, ATP sentaz alt birimleri gibi genler, Pb uygulaması ile artan yönde düzenlenirken, TÛ+Pb uygulaması ile ifade seviyeleri daha belirgin şekilde artmıştır. Bu artış, Pb stresi altında enerji üretimini sürdürmek için mitokondriyal elektron taşıma zincirinin ve ATP sentezinin aktive olduğunu göstermektedir. Literatürde bildirildiği gibi, Pb stresi, *Hordeum vulgare* ve *Pisum sativum*'da ATP/ADP oranında artışa yol açarak solunum hızını %50'den fazla artırmıştır (Romanowska vd. 2005, 2006). Benzer şekilde, çalışmamızdaki gen ifade profilleri, Pb stresine karşı bitkilerin enerji metabolizmasını dengelemek için mitokondriyal solunum yollarını aktive ettiğini ve TÛ uygulamasının bu yanıtı güçlendirdiğini ortaya koymaktadır. Bu durum, karbon rezervlerinin korunması ve stres toleransının artırılması açısından kritik bir adaptasyon mekanizması olarak yorumlanabilir.

Karbonhidratlar, hücre yapısı ve enerji üretimi için birincil enerji kaynağı olarak görev yapmakta ve özellikle ağır metal stresi altında bitkilerin dayanıklılığını artırmada kritik bir rol oynamaktadır (Kong vd. 2019). Bu bağlamda nişasta ve sükroz metabolizması, bitkilerde karbon dağılımı ve enerji mobilizasyonu için en önemli yollar arasında yer almaktadır. Sükroz, bitkilerde başlıca taşınan şeker olarak enerji rezervlerinin yeniden dağılımını sağlamakla kalmaz, aynı zamanda ROT temizlenmesine katkıda bulunarak stres toleransını artırır (Jia vd. 2020, Savchenko ve Tikhonov 2021). Çalışmamızda, sakkaroz sentazlar, sakkaroz-fosfat sentazlar, beta-amilazlar, nişasta sentazları ve çeşitli beta-glukozidazlar gibi nişasta ve sükroz metabolizmasına dahil genler Pb stresi ve TÛ+Pb uygulamaları altında ifade değişiklikleri göstermiştir. Pb uygulaması bu genlerin ifadelerinde orta düzeyde değişikliklere yol açarken, TÛ varlığında bu yanıtın güçlendiği gözlenmiştir; bu durum karbon rezervlerinin daha aktif mobilizasyonunu ve dönüşümünü işaret etmektedir. Bu artış, bitkilerin enerji üretimi, ozmotik denge ve stresle başa çıkma kapasitesini sürdürmesine yardımcı olabilir. Bulgularımız, karbonhidratların sadece bitki büyümesi için enerji sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda stres koşullarında ozmotik homeostazı ve ROT detoksifikasyonunu düzenlediğini gösteren önceki çalışmalarla uyumludur (Krasensky ve Jonak 2012, Jammer vd. 2015). Sonuç olarak, Pb ve TÛ+Pb koşullarında nişasta ve sakkaroz metabolizması genlerinin yükselmiş ifadeleri, karbon akışının sürdürülmesinde, enerji metabolizmasının

desteklenmesinde ve bitkilerin ağır metal stresine karşı dayanıklılığının artırılmasında bu genlerin önemini vurgulamaktadır.

Kurşun stresi altında bitkilerde proteinlerin yanlış katlanması, agregasyon ve oksidatif stres kaynaklı hasarların artmasıyla birlikte, hücrel homeostazın korunması için ısı şok proteinleri (HSP) ve moleküler şaperonlar kritik bir savunma rolü üstlenmektedir. Timperio vd. (2008), HSP'lerin yalnızca protein katlanması, translokasyonu ve yıkımı gibi süreçlerde değil, aynı zamanda oksidatif stres koşullarında proteinin rastgele birikimini engelleyerek hücrel kararlılığın sağlanmasında da görev aldığını belirtmektedir. Benzer şekilde, Pb stresine maruz kalan *Festuca arundinacea* (Li vd. 2017) ve *Medicago sativa* (Hattab vd. 2016) bitkilerinde yüksek düzeyde HSP70 birikimi rapor edilmiştir. Çalışmamızda hem küçük HSP'ler (örneğin 17.4 kDa class I HSP, 21.7 kDa class VI HSP) hem de mitokondriyal HSP22'nin Pb stresinde artış gösterdiği, TÛ ilavesiyle bu artışın daha da belirginleştiği görülmüştür. Bu durum, Pb ile tetiklenen protein hasarına karşı küçük HSP'lerin özellikle proteinin yeniden katlanması ve agregasyonun önlenmesinde aktif rol aldığını göstermektedir. Diğer taraftan, yüksek molekül ağırlıklı şaperonlar olan HSP70 ve HSP90 ailesi üyeleri de Pb ve TÛ+Pb koşullarında güçlü bir şekilde indüklenmiştir. HSP70'in Pb stresinde aşırı ifadesinin daha önce farklı bitki türlerinde rapor edildiği (Li vd. 2017, Hattab vd. 2016) dikkate alındığında, mevcut çalışmada da Pb ile tetiklenen oksidatif hasara karşı benzer bir mekanizmanın devreye girdiğini göstermektedir. Ayrıca DnaJ proteinleri, Clp proteaz sistemi ve peptidil–prolil izomerazlar gibi yardımcı şaperon ve proteaz genlerinin de özellikle TÛ+Pb koşullarında belirgin şekilde artması, yalnızca hasarlı proteinlerin yeniden katlanmasının değil, aynı zamanda hatalı proteinlerin seçici olarak yıkıma yönlendirilmesinin de aktif olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, Rahman vd. (2024)'nin vurguladığı gibi, Pb ile tetiklenen oksidatif hasarın ilave TÛ uygulaması ile birlikte proteinlerin işlev gördüğü mekanizmalar için yapısal ve işlevsel özelliklerinin korunduğunu söyleyebiliriz.

Bitki hormonları, Pb stresi gibi ağır metal baskılarında hücrel uyumu düzenleyen başlıca düzenleyici faktörlerdir (Bhoi vd. 2021). Çalışmamızda Pb ve TÛ+Pb koşullarında özellikle oksin, sitokinin, etilen, gibberellin, jasmonat ve absisik asit sinyali

yollarına ait genlerde belirgin farklılıklar gözlenmiştir. Oksin sinyal transdüksiyonunda ARF genleri yüksek Pb koşullarında güçlü şekilde indüklenmiş, TÛ uygulaması ile bu artış daha da belirginleşmiştir. ARF'nin yukarı regülasyonu, aşağı akışta yer alan SAUR ve GH3 genlerinin de aktive olmasına yol açmış ve bu durumun çevresel stres koşullarında bitki büyüme yönünün yeniden düzenlenmesiyle ilişkili olabileceği düşünülmüştür (Guilfoyle ve Hagen 2001). Ayrıca PIN-LIKE taşıyıcıları ve oksin taşıma bileşenlerinin Pb ve TÛ+Pb altında artış göstermesi, auksin akışkanlığının yeniden şekillendiğini göstermektedir. Bu durum, Muhammad vd. (2024)'nin belirttiği gibi, AUX/IAA baskılayıcılarının parçalanması yoluyla oksine duyarlı genlerin transkripsiyonunun yeniden programlanmasıyla ilişkili olabilir. Gibberellin metabolizması ile ilişkili GA 2-oksidad enzimi, Pb altında artış göstermiş, TÛ uygulaması ile bu yükseliş daha da belirginleşmiştir. Bu sonuç, GA'nın Pb stresine karşı bitkilerde mitotik indeksi yeniden dengeleme (Mansour ve Ehab 2005) ve antioksidan sistemleri güçlendirme (Ullah vd. 2025) yönündeki etkileriyle uyumludur. Sitokinin metabolizması genlerinden sitokinin dehidrogenazlar Pb koşullarında indüklenmiş, TÛ ilavesi ile daha da yüksek seviyelere ulaşmıştır. Bu durum Zhou vd. (2019)'nin belirttiği gibi, ağır metal stresine karşı sitokininin yeniden dağılım ve adaptasyon mekanizmalarında rol oynadığına işaret etmektedir. Benzer şekilde cis-zeatin O-glukosiltransferaz ve N-glukosiltransferaz enzimlerindeki artış da Pb toksisitesi altında sitokinin metabolizmasının yeniden düzenlendiğini düşündürmektedir. Jasmonat sinyali ile ilgili olarak TIFY/JAZ proteinleri Pb altında belirgin şekilde artmış, TÛ uygulamasıyla daha da yüksek düzeylere çıkmıştır. Bu durum, Meng vd. (2022)'nin Pb altında JAZ baskılayıcılarının azalmasıyla birlikte JA yanıtlarının aktive olduğu yönündeki bulgularıyla örtüşmektedir. Ayrıca JAR1 ve jasmonat O-metiltransferaz genlerinin Pb ve TÛ+Pb altında artışı, JA metabolizmasının ROT birikimine karşı prolin gibi metabolitlerle bağlantılı savunma mekanizmalarına dahil olabileceğini düşündürmektedir (Verma vd. 2020). Etilen biyosentezi açısından hem ACC sentaz hem de ACC oksidad Pb altında güçlü bir şekilde aktive olmuş, TÛ uygulaması ile bu artış daha da belirginleşmiştir. Buna paralel olarak EIN3 benzeri transkripsiyon faktörleri ve ABR1 gibi etilen yanıt genleri de Pb koşullarında artan yönde regülasyon göstermiştir. Bu bulgular, etilenin ağır metal stresine karşı adaptif cevapta önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Diğer taraftan, ABA sinyali açısından ise, Pb koşullarında PYL5

reseptörü geninin ifade seviyesi düşüş göstermesine rağmen, TÛ uygulaması ile birlikte yeniden artmıştır. Buna karşılık ABA stres–olgunlaşma proteinleri ve ABA’ya yanıt veren genler hem Pb hem de TÛ+Pb koşullarında belirgin şekilde artmıştır. Bu durum Park vd. (2009)’nin belirttiği gibi, PYL/RCAR reseptörlerinin Pb altında PP2C baskılayıcılarını inhibe ederek ABF transkripsiyon faktörlerini aktive etmesi mekanizmasıyla ilişkili olabilir. Genel olarak, çalışmamızda Pb stresine karşı bitkide hormon sinyal ağlarının bütüncül bir şekilde yeniden düzenlendiği, özellikle oksin, JA ve etilen yollarının artan yönde düzenlenmesi ile büyüme ve stres adaptasyonu arasında bir denge kurulduğu görülmektedir. TÛ uygulamasının ise bu düzenleyici yanıtları güçlendirerek Pb stresine karşı toleransı artırdığı sonucuna varılabilir.

Sekonder metabolitler, özellikle terpenoidler ve fenilpropanoidler, bitkilerde çevresel stres koşullarında savunma yanıtlarının temel bileşenleri olarak öne çıkmaktadır. Terpenoidler, izopren, monoterpen, seskiterpen ve diterpenler gibi alt gruplarıyla bitkilerin hem büyüme ve gelişiminde hem de stres adaptasyonunda rol almakta; ayrıca antioksidan özellikleri sayesinde oksidatif zararı azaltmaktadır (Loreto vd. 2014). Çalışmamızda terpenoid sentezine ilişkin genlerde Pb stresinde belirgin bir yukarı regülasyon gözlenmiş, TÛ uygulaması ile bu artış daha da güçlenmiştir. Özellikle (+)–neomentol dehidrogenaz ve terpen sentaz alanı içeren proteinler Pb koşullarında artış gösterirken, TÛ+Pb altında daha da yüksek seviyelere ulaşmıştır. Benzer şekilde geranilgeranil pirofosfat sentaz ve mevalonat yoluna ait enzimler de Pb altında indüklenmiş olup, bu durum Li vd. (2017)’nin Pb stresinin terpenoid yollarını düzenlediğini ortaya koyan bulgularıyla uyumludur. Ayrıca, 12–okso–fitojienoik asit redüktaz genlerinin aktivasyonu, jasmonat türevlerinin sentezinde rol oynayarak hem oksidatif stres yanıtlarını hem de savunma sinyallerini tetiklemiş olabilir.

Fenilpropanoid metabolizması açısından, Pb stresinde fenilalanin amonyum liyaz (PAL) ve trans–sinnamat 4–monooksijenaz genlerinde güçlü bir indüksiyon gözlenmiş, TÛ uygulaması bu artışı daha da pekiştirmiştir. PAL enzimi, fenolik bileşiklerin ana biyosentetik kapısı olup, flavonoid, antosiyanin ve lignin sentezinin temel belirleyicisidir (Kohli vd. 2019, Shopova vd. 2021). Bu çalışmada PAL’ın Pb stresi koşullarında aktive olması, ağır metal stresine karşı fenolik bileşiklerin önemli bir

antioksidan tampon görevi üstlendiğini düşündürmektedir. Fenolik bileşiklerin karboksil ve hidroksil grupları sayesinde metal iyonlarını şelatlayarak oksidatif zararı azalttığı bilinmektedir (Anwar vd. 2021). Ayrıca, dihidroflavonol-4-redüktaz ve flavonol sentaz gibi flavonoid biyosentez genleri de Pb ve TÛ+Pb koşullarında artış göstermiştir. Bu bulgular, Pb maruziyeti sonrası flavonoid düzeylerinin yükseldiğini rapor eden önceki çalışmalarla (Agati vd. 2011, Omolola, 2020) uyum göstermektedir. Sonuç olarak, verilerimiz Pb stresinin hem terpenoid hem de fenilpropanoid yollarını güçlü bir şekilde aktive ettiğini, TÛ uygulamasının ise bu savunma mekanizmalarını daha da pekiştirdiğini ortaya koymaktadır. Bu durum, sekonder metabolitlerin Pb stresine karşı bitkilerde hem doğrudan antioksidan koruma hem de dolaylı olarak sinyal ve savunma düzenleme görevlerini üstlendiğini göstermektedir.

Sonuç olarak, Pb toksisitesinin mısır bitkilerinde büyüme, fotosentetik kapasite, pigment içeriği, oksidatif denge ve metabolik süreçler üzerinde ciddi olumsuz etkiler oluşturduğu belirlenmiştir. Ancak dışsal TÛ uygulamasının Pb stresine karşı önemli bir koruyucu rol üstlendiği, özellikle kök ve gövdedeki Pb birikimini azaltarak, klorofil düzeylerini artırarak, lipid peroksidasyonunu sınırlandırarak ve antioksidan savunma sistemini yeniden düzenleyerek tolerans mekanizmalarını güçlendirdiği ortaya konmuştur. Transkriptomik analizler Pb stresinin mısır yapraklarında fotosentez, karbon metabolizması, antioksidan savunma, ağır metal taşıyıcıları, şelatlama mekanizmaları ve transkripsiyon faktörleri gibi birçok temel biyolojik süreci doğrudan hedef aldığını ortaya koymaktadır. Pb toksisitesi, fotosentetik kapasiteyi ve enerji metabolizmasını baskılayarak büyüme ve verimliliği sınırlandırırken; TÛ uygulaması bu olumsuz etkileri hafifletmiş, fotosentez genlerinden detoksifikasyon mekanizmalarına kadar geniş bir yelpazede gen ifadesini yeniden düzenleyerek bitkisel toleransı güçlendirmiştir. Özellikle anten proteinleri, Calvin döngüsü enzimleri, ABC ve HMA taşıyıcıları, antioksidan enzimler, GST'ler ve belirli transkripsiyon faktörlerinin TÛ katkısıyla daha güçlü şekilde teşvik edilmesi, Pb stresine karşı çok katmanlı bir savunma ağının harekete geçtiğini göstermektedir. Bu bulgular, TÛ uygulamasının Pb stresinde bitkilerin metabolik esnekliğini artıran ve detoksifikasyon kapasitesini güçlendiren etkili bir koruyucu strateji olduğunu vurgulamaktadır. Elde edilen sonuçlar hem ağır metal stresine karşı bitkisel yanıt mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkı

sağlamakta hem de Pb kirliliği altındaki tarımsal üretimde potansiyel bir iyileştirici uygulama olarak TÖ kullanımının önemini ortaya koymaktadır.



KAYNAKLAR

- Abdullah–Zawawi M R, Ahmad–Nizammuddin N F, Govender N, Harun S, Mohd–Assaad N, Mohamed–Hussein Z A, 2021, Comparative Genome–Wide Analysis of WRKY, MADS–box and MYB Transcription Factor Families in Arabidopsis and Rice, Scientific Reports, 11, 19678.
- Abdulraheem M I, Xiong Y, Moshood A Y, Cadenas–Pliego G, Zhang H, Hu J, 2024, Mechanisms of Plant Epigenetic Regulation in Response to Plant Stress Recent Discoveries and Implications, Plants, 13, 163.
- Aebi H, 1984, Catalase *in vitro*. In Methods in Enzymology, 105, 121–126.
- Agarwal G, Kudapa H, Ramalingam A, Choudhary D, Sinha P, Garg V, vd., 2020, Epigenetics and Epigenomics Underlying Mechanisms, Relevance, and Implications in Crop Improvement, Functional and Integrative Genomics, 20, 739–761.
- Agati G, Biricolti S, Guidi L, Ferrini F, Fini A, Tattini M, 2011, The Biosynthesis of Flavonoids Is Enhanced Similarly by UV Radiation and Root Zone Salinity in *L. vulgare* Leaves, Journal of Plant Physiology, 168, 204–212.
- Ahmed A, Tajmir–Riahi H A, 1993, Interaction of Toxic Metal Ions Cd^{2+} , Hg^{2+} and Pb with Light–Harvesting Proteins of Chloroplast Thylakoid Membranes An FTIR Spectroscopic Study, Journal of Inorganic Biochemistry, 50, 235–243.
- Ahmad M, Waraich E A, Zulfiqar U, Ullah A, Farooq M, 2021, Thiourea Application Improves Heat Tolerance in Camelina (*Camelina sativa* L. Crantz) by Modulating Gas Exchange, Antioxidant Defense and Osmoprotection, Industrial Crops and Products, 170, 113826.
- Ahmad S, Aziz A U, Ullah A, Raza M A, 2022, Effect of Vermicompost and Organic Matter in Enhancing Wheat Tolerance against Drought Stress, International Journal of Agriculture and Biosciences, 11, 165–167.
- Ahmad M, Waraich E A, Zulfiqar U, Hussain S, Yasin M U, Farooq M, 2023, Thiourea Application Improves the Growth and Seed and Oil Yields in Canola by Modulating Gas Exchange, Antioxidant Defense and Osmoprotection under

- Heat Stress, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 22, 3655–3666.
- Ahmad M, Waraich E A, Zulfiqar U, Ullah A, Farooq M, 2023, Thiourea Application Increases Seed and Oil Yields in Camelina under Heat Stress by Modulating the Plant Water Relations and Antioxidant Defense System, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 23, 290–307.
- Alamri S A, Siddiqui M H, Al-Khaishany M Y, Nasir Khan M, Ali H M, Alaraidh I A, 2018, Ascorbic Acid Improves the Tolerance of Wheat Plants to Lead Toxicity, *Journal of Plant Interactions*, 13, 409–419.
- Aldasoro J J, Matilla A, Nicolás G, 1981, Effect of ABA, Fusicoccin and Thiourea on Germination and K⁺ and Glucose Uptake in Chick-Pea Seeds at Different Temperatures, *Physiologia plantarum*, 53, 139–145.
- Ali B, Xu X, Gill R A, Yang S, Ali S, Tahir M, vd., 2014, Promotive Role of 5-Aminolevulinic Acid on Mineral Nutrients and Antioxidative Defense System under Lead Toxicity in *Brassica napus*, *Industrial Crops and Products*, 52, 617–626.
- Amel S B, Nabil M, Nadia A, Hocine G, Hakim L, Nadjib D, 2016, Phytoremediation of Soil Contaminated with Zn Using Canola (*Brassica napus* L.) *Ecological Engineering*, 95, 43–49.
- Andersson R, Gebhard C, Miguel-Escalada I, Hoof I, Bornholdt J, Boyd, M, vd., 2010, FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Version 0.11, 2.
- Anwar S, Khan S, Almatroudi A, Khan A A, Alsahli M A, Almatroodi S A, vd., 2021, A Review on Mechanism of Inhibition of Advanced Glycation end Products Formation by Plant Derived Polyphenolic Compounds, *Molecular Biology Reports*, 48, 787–805.
- Apel K, Hirt H, 2004, Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction, *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373–399.
- Arazi T, Sunkar R, Kaplan B, Fromm H, 1999, A Tobacco Plasma Membrane Calmodulin-Binding Transporter Confers Ni²⁺ Tolerance and Pb²⁺

- Hypersensitivity in Transgenic Plants, *Plant Journal*, 20, 171–182.
- Arias J A, Peralta–Videa J R, Ellzey J T, Ren M, Viveros M N, Gardea–Torresdey J L, 2010, Effects of *Glomus deserticola* Inoculation on Prosopis Enhancing Chromium and Lead Uptake and Translocation as Confirmed by X–Ray Mapping ICP–OES and TEM Techniques, *Environmental and Experimental Botany*, 68, 139–148.
- Arshad M, Silvestre J, Pinelli E, Kallerhoff J, Kaemmerer M, Tarigo A, 2008, A Field Study of Lead Phytoextraction by Various Scented Pelargonium Cultivars *Chemosphere*, 71, 2187–2192
- Arsova B, Watt M, Usadel B, 2018, Monitoring of Plant Protein Post–Translational Modifications Using Targeted Proteomics, *Frontiers in Plant Science*, 9, 1168.
- Auguy F, Fahr M, Moulin P, El Mzibri M, Smouni A, Filali–Maltouf A, vd., 2016, Transcriptome Changes in *Hirschfeldia incana* in Response to Lead Exposure, *Frontiers in Plant Science*, 6, 1231.
- Baqer R A, Al–Kaaby H K, Adul–Qadir L H, 2020, Antioxidant Responses in Wheat Plants (*Triticum aestivum* L.) Treated with Thiourea, *Plant Archives*, 20, 717–22.
- Barbosa J S, Cabral T M, Ferreira D N, Agnez–Lima L F, De Medeiros S B, 2010, Genotoxicity Assessment in Aquatic Environment Impacted by the Presence of Heavy Metals, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 320–325.
- Battaglia M, Olvera–Carrillo Y, Garcarrubio A, Campos F, Covarrubias A A, 2008, The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins, *Plant Physiology*, 148, 6–24.
- Beauchamp C, Fridovich I, 1971, Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels, *Analytical Biochemistry*, 44, 276–287.
- BessonBard A, Gravot A, Richaud P, Auroy P, Duc C, Gaymard F, vd., 2009, Nitric Oxide Contributes to Cadmium Toxicity in Arabidopsis by Promoting Cadmium Accumulation in Roots and Up–Regulating Genes Involved in Iron Uptake, *Plant Physiology*, 149, 1302–1315.

- Bharwana S A, Ali S, Farooq M A, Iqbal N, Abbas F, Ahmad, M S A, 2013, Alleviation of Lead Toxicity by Silicon Is Related to Elevated Photosynthesis, Antioxidant Enzymes Suppressed Lead Uptake and Oxidative Stress in Cotton, *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 4, 1000187.
- Bhati K K, Sharma S, Aggarwal S, Kaur M, Shukla V, Kaur J, vd, 2015, Genome–Wide Identification and Expression Characterisation of ABCC–MRP Transporters in Hexaploid Wheat, *Frontiers in Plant Science*, 6, 488.
- Bhoi A, Yadu B, Chandra J, Keshavkant S, 2021, Contribution of Strigolactone in Plant Physiology, Hormonal Interaction and Abiotic Stresses, *Planta*, 254, 28.
- Björn L O, Papageorgiou G C, Blankenship R E, Govindjee, 2009, A Viewpoint: Why Chlorophyll a, *Photosynthesis Research*, 99, 85–98.
- Blaylock M J, Salt D E, Dushenkov S, Zakarova O, Gussman C, Kapulnik Y, vd., 1997, Enhancement of Pb Accumulation in Indian Mustard by Soil Applied Chelating Agents, *Environmental Science and Technology Journal*, 31, 860–865.
- Blaylock, M J. and Huang J W, 2000, Phytoextraction of Metals In Phytoremediation of Toxic Metals Using Plants to Clean up the Environment. Raskin, BD Ensley.
- Bolger A M, Lohse M, Usadel B, 2014, Trimmomatic Aflexible Trimmer for Illumina Sequence Data, *Bioinformatics*, 30, 2114–2120.
- Borisova G, Chukina N, Maleva M, Kumar A, and Prasad M N V, 2016, Thiols as Biomarkers of Heavy Metal Tolerance in the Aquatic Macrophytes of Middle Urals, *International Journal of Phytoremediation*, 18, 1037–1045.
- 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.
- Bray N L, Pimentel H, Melsted P, Pachter L, 2016, Near–optimal Probabilistic RNA–seq Quantification, *Nature Biotechnology*, 34, 525–527.
- Brunetti P, Zanella L, De Paolis A, Di Litta D, Cecchetti V, Falasca G, vd., 2015, Cadmium–Inducible Expression of the ABC–type Transporter AtABCC3 Increases Phytochelatin–mediated Cadmium Tolerance in Arabidopsis, *Journal of Experimental Botany*, 66, 3815–3829.

- Burman U, Garg B K, Kathju S, 2004, Interactive Effects of Thiourea and Phosphorus on Clusterbean under Water Stress, *Biologia plantarum*, 48, 61–65.
- Burzynski M, Grabowski A, 1984, Effect of Lead on Nitrate Uptake and Reduction in Cucumber Seedlings, *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 53, 77–86.
- Cao S, Pan J, Rehman M, Luo D, Wang Q, Jin, G, vd., 2024, Exogenous Nitric Oxide Alleviates Cadmium Toxicity in Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) through Modulating Cd Deposition and Regulating Key Genes and Involved Pathways, *Industrial Crops and Products*, 221, 119359.
- Chang Y N, Zhu C, Jiang J, Zhang H, Zhu J K, Duan C G, 2020, Epigenetic Regulation in Plant Abiotic Stress Responses, *Journal of Integrative Plant Biology*, 62, 563–580.
- Chang, Y S, Sung F H, 2000, Effects of Gibberellic Acid and Dormancybreaking Chemicals on Flower Development of *Rhododendron pulchrum* Sweet and *Rhododendron scabrum*, *Scientia Horticulturae*, 83, 331–337
- Chang J D, Gao W, Wang P, Zhao F J, 2022, *OsNRAMP5* is a Major Transporter for Lead Uptake in Rice, *Environmental Science and Technology*, 56, 17481–17490.
- Chaudhary K, Agarwal S, Khan S, 2018, Role of Phytochelatins (PCs), Metallothioneins (MTs), and Heavy Metal ATPase (HMA) Genes in Heavy Metal Tolerance, in *Mycoremediation and Environmental Sustainability*, Cham, Springer International Publishing, 2, 39–60,
- Chaumont F, Tyerman S D, 2014, Aquaporins: Highly Regulated Channels Controlling Plant Water Relations, *Plant Physiology*, 164, 1600–1618.
- Chen J, Wang W H, Wu F H, You C Y, Liu T W, Dong X J, vd., 2013, Hydrogen Sulfide Alleviates Aluminum Toxicity in Barley Seedlings, *Plant and Soil*, 362, 301–318.
- Chen Y, Mo H Z, Zheng M Y, Xian M, Qi Z Q, Li Y Q, vd., 2014b Selenium Inhibits Root Elongation by Repressing the Generation of Endogenous Hydrogen Sulfide in *Brassica rapa*, *PLoS One* 9, e110904.

- Chen X, Rechavi O, 2022, Plant and Animal Small RNA Communications between Cells and Organisms, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23, 185–203.
- Chen X, Xu H, Shu X, Song C X, 2025, Mapping Epigenetic Modifications by Sequencing Technologies, *Cell Death and Differentiation*, 32, 56–65.
- Chhatwal H, Naik J, Pandey A, Trivedi P K, 2024, Broadening the Epigenetic Horizon of Abiotic Stress Response in Plants, *Plant Growth Regulation*, 103, 491–501.
- Cobbett C, Goldsbrough P, 2002, Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis, *Annual Review Plant Biology*, 53, 159–182.
- Collin S, Baskar A, Geevarghese D M, Ali M N V S, Bahubali P, Choudhary R, vd., 2022, Bioaccumulation of Lead (Pb) and Its Effects in Plants a Review, *Journal of Hazardous Materials Letters*, 3, 100064.
- Collin S, Baskar A, Geevarghese D M, Ali M N V S, Bahubali P, Choudhary R, vd., 2022, Bioaccumulation of Lead (Pb) and its Effects in Plants: A review. *Journal of Hazardous Materials Letters*, 3, 100064.
- Corpas F J, Barroso J B, 2017, Lead-Induced Stress, which Triggers the Production of Nitric Oxide (NO) and Superoxide Anion ($O_2^{\cdot-}$) in Arabidopsis Peroxisomes, Affects Catalase Activity, *Nitric Oxide*, 68, 103–110.
- Courtois C, Besson A, Dahan J, Bourque S, Dobrowolska G, Pugin A, vd., 2008, Nitric Oxide Signalling in Plants Interplays with Ca^{2+} and Protein Kinases, *Journal of Experimental Botany*, 59, 155–163.
- Cui L G, Shan J X, Shi M, Gao J P, Lin H X, 2014, The miR156–SPL 9–DFR Pathway Coordinates the Relationship between Development and Abiotic Stress Tolerance in Plants, *The Plant Journal*, 80, 1108–1117.
- Das K, Roychoudhury A, 2014, Reactive Oxygen Species and Response of Antioxidants as ROS–Scavengers during Environmental Stress in Plants, *Frontiers in Environmental Science*, 2, 53.
- Das N, Bhattacharya S, Bhattacharyya S, Maiti M K, 2018, Expression of Rice *MATE* Family Transporter *OsMATE2* Modulates Arsenic Accumulation in Tobacco and

- Rice, Plant Molecular Biology, 98, 101–120.
- Davies B E, 1995, Lead and other Heavy Metals in Urban Areas and Consequences for the Health of their Inhabitants, Environmental Contaminants, Ecosystems and Human Health, 287–307.
- Dey S K, Dey J, Patra S, Pothal D, 2007, Changes in the Antioxidative Enzyme Activities and Lipid Peroxidation in Wheat Seedlings Exposed to Cadmium and Lead Stress, Brazilian Journal of Plant Physiology, 19, 53–60.
- Dhar G A, Saha S, Mitra P, Nag Chaudhuri R, 2021, DNA Methylation and Regulation of Gene Expression, Guardian of Our Health, The Nucleus, 64, 259–270.
- Dixit G, Singh A P, Kumar A, Mishra S, Dwivedi S, Kumar S, vd., 2016, Reduced Arsenic Accumulation in Rice (*Oryza sativa* L.) Shoot Involves Sulfur Mediated Improved Thiol Metabolism, Antioxidant System and Altered Arsenic Transporters, Plant Physiology and Biochemistry, 99, 86
- Doğan M, Karatas M, Aasim M, 2018, Cadmium and Lead Bioaccumulation Potentials of an Aquatic Macrophyte *Ceratophyllum demersum* L. a Laboratory Study, Ecotoxicology and Environmental Safety, 148, 431–440.
- Durner J, Klessig D F, 1999, Nitric Oxide as a Signal in Plants, Current Opinion in Plant Biology, 2, 369–74.
- Dvořák P, Krasnylenko Y, Zeiner A, Šamaj J, Takáč T, 2021, Signaling toward Reactive Oxygen Species–Scavenging Enzymes in Plants, Frontiers in Plant Science, 11, 618835.
- El–Keblawy A, 2013, Impacts of Dormancy–Regulating Chemicals on Innate and Salinity–Induced Dormancy of Four Forage Grasses Native to Arabian Deserts, Grass and Forage Science, 68, 288–296.
- Ezaki B, Takahashi K, Utsumi K, Higashi A, 2015, Semi–Type AvABCG1 Transporter Derived from *Andropogon virginicus* L. Provides Aluminium Tolerance, Environmental and Experimental Botany, 118, 21–31.
- Fang H, Jing T, Liu Z, Zhang L, Jin Z, Pei Y, 2014, Hydrogen Sulfide Interacts with Calcium Signaling to Enhance the Chromium Tolerance in *Setaria italica*, Cell

Calcium, 56, 472–481.

- Fang H, Liu Z, Jin Z, Zhang L, Liu D, Pei Y, 2016, An Emphasis of Hydrogen Sulfide–Cysteine Cycle on Enhancing the Tolerance to Chromium Stress in Arabidopsis, *Environmental Pollution*, 213, 870–877.
- Feng G, Li S, Yang X, Hu Y, Zhang X, Chen D, vd., 2025, Integrative Multi–Omic Analyses Reveal the Molecular Mechanisms of Silicon Nanoparticles in Enhancing Hyperaccumulator under Pb Stress, *Environmental Pollution*, 368, 125677.
- Fernie A R, Carrari F, Sweetlove L J, 2004, Respiratory Metabolism: Glycolysis, the TCA Cycle and Mitochondrial Electron Transport, *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 254–261.
- Fitzpatrick K L, Reid R J, 2009, The Involvement of Aquaglyceroporins in Transport of Boron in Barley Roots, *Plant, Cell and Environment*, 32, 1357–1365.
- Francisco R M, Regalado A, Ageorges A, Burla B J, Bassin B, Eisenach C, vd., 2013, ABCC1, an ATP Binding Cassette Protein from Grape Berry, Transports Anthocyanidin 3–O–Glucosides. *The Plant Cell*, 25, 1840–1854.
- Fu S, Lu Y, Zhang X, Yang G, Chao D, Wang Z, vd., 2019, The ABC Transporter ABCG36 is Required for Cadmium Tolerance in Rice, *Journal of experimental botany*, 70, 5909–5918.
- Gao J, Zhang Y, Lu C, Peng H, Luo M, Li G, vd., 2015, Developmental Dynamics of Maize Root Transcriptome in Response to Heavy Metal Pb Pollution, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458, 287–293.
- Gao P P, Liang H, Dong Y, Xue P Y, Zhao Q L, Yan J S, vd., 2023, Transcriptomic Mechanisms of Reduced PM (2.5)–Pb Retention in the Leaves of the Low–Pb–Accumulation Genotype of Chinese Cabbage, *Journal of Hazardous Materials*, 444, 130385.
- Ge Y, Hu K D, Wang S S, Hu L Y, Chen X Y, Li H Y, 2017, Hydrogen Sulfide Alleviates Postharvest Ripening and Renescence of Banana by Antagonizing the Effect of Ethylene, *PLoS One*, 12, 1–15.

- Ghani A, Hussain M, Ikram M, Hameed T, 2016, Toxic Effect of Lead on Germination and Seedling Growth of *Brassica campestris* L., Journal of Geology, Earth and Environmental Sciences, 6, 45–48.
- Ghorbani A, Razavi S M, Ghasemi V, Pirdeshti H, 2019, Effects of Endophyte Fungi Symbiosis on some Physiological Parameters of Tomato Plants under 10 Day Long Salinity Stress, Journal of Plant Process and Function, 7, 193–208.
- Gichner T, Žnidar I, Száková J, 2008, Evaluation of DNA Damage and Mutagenicity Induced by Lead in Tobacco Plants, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 652, 186–190.
- Gidlow D A, 2004, Lead toxicity, Occupational Medicine, 54, 76–81.
- Godbold D L, Kettner C, 1991, Lead Influences Root Growth and Mineral Nutrition of *Picea abies* Seedlings, Journal of Plant Physiology, 139, 95–99.
- Godzik B, 1993, Heavy Metal Contents in Plants in Zinc Dumping Areas and Reference Area, Polish Botanical Studies, 5, 113–132.
- Gomes E J R, 2011, Genotoxicity and Cytotoxicity of Cr (VI) and Pb²⁺ in *Pisum sativum*, Doctoral Dissertation, Universidade de Aveiro, 179, Portugal.
- Gomes S M D S, Lima V L A D, Souza A P D, do Nascimento J J, Nascimento E S D, 2014, Chloroplast Pigments as Indicators of Lead Stress, Engenharia Agrícola, 34, 877–884.
- Gopal R, Rizvi A H, 2008, Excess Lead Alters Growth Metabolism and Translocation of Certain Nutrients in Radish, Chemosphere 70, 1539–1544.
- Greger M, Kabir A H, Landberg T, Mity P J, Lindberg S, 2016, Silicate Reduces the Absorption of Cadmium into Wheat Cells, Environmental Pollution, 211, 90–97.
- Grover P V, Rekhadevi K, Danadevi S B, Vuyyuri M, Mahboob M, Rahman M F, 2010, Genotoxicity Evaluation in Workers Occupationally Exposed to Lead, International Journal of Hygiene and Environmental Health, 213, 99–106.
- Guilfoyle T J, Hagen G, 2001, Auxin Response Factors, Journal of Plant Growth Regulation, 20, 453–460.

- Guo W J, Meetam M, Goldsbrough P B, 2008, Examining the Specific Contributions of Individual Arabidopsis Metallothioneins to Copper Distribution and Metal Tolerance, *Plant Physiology*, 146, 1697–1706.
- Guo Z, Liang Y, Yan J, Yang E, Li K, Xu H, 2018, Physiological Response and Transcription Profiling Analysis Reveals the Role of H₂S in Alleviating Excess Nitrate Stress Tolerance in Tomato Roots, *Plant Physiology and Biochemistry*, 124, 59–69.
- Guo M, Song W, Tian J, 2020, Biochar–facilitated Soil Remediation Mechanisms and Efficacy Variations, *Frontiers in Environmental Science*, 8, 521512.
- Guo Z, Yuan X, Li T, Wang S, Yu Y, Liu C E, vd., 2024, Integrated Transcriptomic and Metabolomic Analysis Reveals the Molecular Regulatory Mechanism of Flavonoid Biosynthesis in Maize Roots under Lead Stress, *International Journal of Molecular Sciences*, 25, 6050.
- Gupta D K, Nicoloso F T, Schetinger M R C, Rossato L V, Pereira L B, Castro G Y vd., 2009, Antioxidant Defense Mechanism in Hydroponically Grown *Zea mays* Seedlings under Moderate Lead Stress, *Journal of Hazardous Materials Letters*, 172, 479–484.
- Gupta D K, Huang H G, Yang X E, Razafindrabe B H N, Inouhe M, 2010, The Detoxification of Lead in *Sedum alfredii* H. is not Related to Phytochelatins but the Glutathione, *Journal of Hazardous Materials*, 177, 437–444.
- Gupta M, Kumar S, Dwivedi V, Gupta D G, Ali D, Alarifi S, vd., 2024, Selective Synergistic Effects of Oxalic Acid and Salicylic Acid in Enhancing Amino Acid Levels and Alleviating Lead Stress in *Zea mays* L., *Plant Signaling and Behavior*, 19, 2400451.
- Haider F U, Virk A L, Rehmani M I A, Skalicky M, Ata–Ul–Karim S T, Ahmad N, vd., 2022, Integrated Application of Thiourea and Biochar Improves Maize Growth, Antioxidant Activity and Reduces Cadmium Bioavailability in Cadmium–Contaminated Soil, *Frontiers in Plant Science*, 12, 809322.
- Halimaa P, Lin Y F, Ahonen V H, Blande D, Clemens S, Gyenesei A, vd., 2014, Gene Expression Differences between *Noccaea caerulescens* Ecotypes Help to

- Identify Candidate Genes for Metal Phytoremediation, *Environmental Science and Technology*, 48, 3344–3353.
- Halliwell B, Gutteridge J M C, 1989, *Free Radical in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford, 86–123.
- Hammett F S, 1928, *Studies in the Biology of Metals*, *Protoplasma*, 5, 535–542.
- Han Y, Fan T, Zhu X, Wu X, Ouyang J, Jiang L, vd., 2019, WRKY12 Represses GSH1 Expression to Negatively Regulate Cadmium Tolerance in Arabidopsis, *Plant Molecular Biology*, 99, 149–159.
- Han Z, Zheng Y, Zhang X, Wang B, Guo Y, Guan Z, 2024, Flavonoid Metabolism Plays an Important Role in Response to Lead Stress in Maize at Seedling Stage, *BMC Plant Biology*, 24, 726.
- Hara M, Fujinaga M, Kuboi T, 2005, Metal Binding by Citrus Dehydrin with Histidine-Rich Domains, *Journal of Experimental Botany*, 56, 2695–2703.
- Haroun S A, Shukry W M, El-Sawy O, 2010, Effect of Asparagine or Glutamine on Growth and Metabolic Changes in *Phaseolus vulgaris* under in Vitro Conditions, *Bioscience Research*, 7, 1–21.
- Haroon M, Anas M, Naurin I, Afzal R, Irfan U, Tariq H, vd., 2023, Autoimmunity in Plants a Powerful Weapon in Kingdom Plantae to Combat Stresses, *International Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 12, 159–64.
- Harpaz-Saad S, Azoulay T, Arazi T, Ben-Yaakov, E, Mett, A, Shibolet Y M, vd., 2007, Chlorophyllase is a Rate-Limiting Enzyme in Chlorophyll Catabolism and is Posttranslationally Regulated, *The Plant Cell*, 19, 1007–1022.
- Hattab S, Hattab S, Flores-Casseres M L, Boussetta H, Doumas P, Hernandez L E, Banni M, 2016, Characterisation of Lead-induced Stress Molecular Biomarkers in *Medicago sativa* Plants, *Environmental and Experimental Botany*, 123, 1–12.
- Hausling M, Jorns C A, Lehmbecker G, Hecht-Buchholz C, Marschner H, 1988, Ion and Water Uptake in Relation to Root Development of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst), *Journal of Plant Physiology*, 133, 486–491.

- He F, Shi Y J, Li J L, Lin T T, Zhao K J, Chen L H, vd., 2022, Genome–Wide Analysis and Expression Profiling of Cation/H⁺ Exchanger (CAX) Family Genes Reveal Likely Functions in Cadmium Stress Responses in Poplar, *International journal of Biological Macromolecules*, 204, 76–88.
- He S, An R, Yan J, Zhang C, Zhang N, Xi N, vd., 2023, Association Studies of Genes in a Pb Response–Associated Network in Maize (*Zea mays* L.) Reveal that *ZmPIP2;5* Is Involved in Pb Tolerance, *Plant Physiology and Biochemistry*, 195, 300–309.
- 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.
- Heyen B J, Alsheikh M K, Smith E A, Torvik C F, Seals D F, Randall S K, 2002, The Calcium–Binding Activity of a Vacuole–Associated, Dehydrin–Like Protein is Regulated by Phosphorylation, *Plant Physiology*, 130, 675–687.
- Hirsch R E, Lewis B D, Spalding E P, Sussman M R, 1998, A Role for the AKT1 Potassium Channel in Plant Nutrition, *Science*, 280, 918–921.
- Hotamisligil G S, Davis R J, 2016, Cell Signaling and Stress Responses, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8, a006072.
- Hu S, Yu Y, Chen Q, Mu G, Shen Z, Zheng L, 2017, *OsMYB45* Plays an Important Role in Rice Resistance to Cadmium Stress, *Plant Science*, 264, 1–8.
- Huang J W, Cunningham S D, 1996, Lead Phytoextraction Species Variation in Lead Uptake and Translocation, *New Phytologist*, 134, 75–84.
- Huang H, Gupta D K, Tian S, Yang X E, Li T, 2012, Lead Tolerance and Physiological Adaptation Mechanism in Roots of Accumulating and Non–Accumulating Ecotypes of *Sedum alfredii*, *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 1640–1651.
- Huang Y, He G, Tian W, Li D, Meng L, Wu D, vd., 2021, Genome–Wide Identification of *MATE* Gene Family in Potato (*Solanum tuberosum* L.) and Expression Analysis in Heavy Metal Stress, *Frontiers in Genetics*, 12, 650500.

- Huihui Z, Xin L, Zisong X, Yue W, Zhiyuan T, Meijun A, 2020, Toxic Effects of Heavy Metals Pb and Cd on Mulberry (*Morus alba* L.) Seedling Leaves, Photosynthetic Function and Reactive Oxygen Species (ROS) Metabolism Responses, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 195, 110469.
- Hwang J U, Song W Y, Hong D, Ko D, Yamaoka Y, Jang S, vd., 2016, Plant ABC Transporters Enable Many Unique Aspects of a Terrestrial Plant's Lifestyle, *Molecular Plant*, 9, 338–355.
- Ikram S, Javed F, Wahid A, Ahmad R, 2014, Invitro Relationship between Cadmium Stress and Thiourea in Two Barley Genotypes, *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 51, 671–676.
- Ikram S, Javed F, Wahid A, Ahmad R, 2014, Invitro Relationship between Cadmium Stress and Thiourea in Two Barley Genotypes, *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 51, 673–678.
- Islam E, Yang X, Li T, Liu D, Jin X, Meng F, 2007, Effect of Pb Toxicity on Root Morphology, Physiology and Ultrastructure in the Two Ecotypes of *Elsholtzia argyi*, *Journal of Hazardous Materials*, 147, 806–816.
- Islam E, Liu D, Li T, Yang X, Jin X, Mahmood Q, 2008, Effect of Pb Toxicity on Leaf Growth, Physiology and Ultrastructure in the Two Ecotypes of *Elsholtzia argyi*, *Journal of Hazardous Materials Letters*, 154, 914–926.
- Jammer A, Gasperl A, Luschin–Ebengreuth N, Heyneke E, Chu H, Cantero–Navarro E, vd., 2015, Simple and Robust Determination of the Activity Signature of Key Carbohydrate Metabolism Enzymes for Physiological Phenotyping in Model and Crop Plants, *Journal of Experimental Botany*, 66, 5531–5542.
- Jaskulak M, Rorat A, Grobelak A, Kacprzak M, 2018, Antioxidative Enzymes and Expression of *rbcL* Gene as Tools to Monitor Heavy Metal–Related Stress in Plants, *Journal of Environmental Management*, 218, 71–78.
- Javed M T, Akram M S, Habib N, Tanwir K, Ali Q, Niazi N K, 2018, Deciphering the Growth, Organic Acid Exudations, and Ionic Homeostasis of *Amaranthus viridis* L. and *Portulaca oleracea* L. under Lead Chloride Stress, *Environmental*

Science and Pollution Research, 25, 2958–2971.

- Jia H, Wang X, Dou Y, Liu D, Si W, Fang H, 2016, Hydrogen Sulfide–Cysteine Cycle System Enhances Cadmium Tolerance through Alleviating Cadmium–Induced Oxidative Stress and Ion Toxicity in Arabidopsis Roots, Scientific Reports 6, 1–14.
- Jia H, Wang L, Li J, Sun P, Lu M, Hu J, 2020, Comparative Metabolomics Analysis Reveals Different Metabolic Responses to Drought in Tolerant and Susceptible Poplar Species, Physiologia Plantarum, 168, 531–546.
- Jiang W, Liu D, 2010, Pb–Induced Cellular Defense System in the Root Meristematic Cells of *Allium sativum* L., BMC Plant Biology, 10, 40–40.
- Jiang J, Ma S, Ye N, Jiang M, Cao J, Zhang J, 2017, WRKY Transcription Factors in Plant Responses to Stresses, Journal of Integrative Plant Biology, 59, 86–101.
- Jiang L, Wang W, Chen Z, Gao Q, Xu Q, Cao H, 2017, A Role for APX1 Gene in Lead Tolerance in *Arabidopsis thaliana*, Plant Science, 256, 94–102.
- Jiang Y, Han J, Xue W, Wang J, Wang B, Liu L, 2021, Overexpression of SmZIP Plays Important Roles in Cd Accumulation and Translocation, Subcellular Distribution and Chemical Forms in Transgenic Tobacco under Cd Stress, Ecotoxicology and Environmental Safety, 214, 112097.
- Jones P M, George A M, 2004, The ABC Transporter Structure and Mechanism Perspectives on Recent Research, Cellular and Molecular Life Sciences, 61, 682–699.
- Kaur G, Singh H P, Batish D R, Kohli R K, 2013, Lead (Pb)–Induced Biochemical and Ultrastructural Changes in Wheat (*Triticum aestivum*) Roots, Protoplasma, 250, 53–62.
- Kaur G, 2014, Pb–induced Toxicity in Plants, Effect on Growth, Development and Biochemical Attributes, Journal of Global Biosciences, 3, 881–889.
- Kaya C, Ugurlar F, Farooq S, Ashraf M, Alyemeni M N, Ahmad P, 2022, Combined Application of Asparagine and Thiourea Improves Tolerance to Lead Stress in

- Wheat by Modulating AsA–GSH Cycle, Lead Detoxification and Nitrogen Metabolism, *Plant Physiology and Biochemistry*, 190, 119–132.
- Khan I, Iqbal M, Ashraf M Y, Ashraf M A, Ali S, 2016, Organic Chelants–mediated Enhanced Lead (Pb) Uptake and Accumulation is Associated with Higher Activity of Enzymatic Antioxidants in Spinach (*Spinacea oleracea* L.), *Journal of Hazardous Materials*, 317, 352–361.
- Khan M, Samrana S, Zhang Y, Malik Z, Khan M D, Zhu S, 2020, Reduced Glutathione Protects Subcellular Compartments from Pb–Induced ROS Injury in Leaves and Roots of Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.), *Frontiers in Plant Science*, 11, 412.
- Kim Y Y, Yang Y Y, Lee Y, 2002, Pb and Cd Uptake in Rice Roots, *Physiologia Plantarum*, 116, 368–372.
- Kiran B R, Prasad M N V, 2017, Responses of *Ricinus communis* L. (Castor Bean, Phytoremediation Crop) Seedlings to Lead (Pb) Toxicity in Hydroponics, *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 31, 73–80.
- Kohler C, Merkle T, Neuhaus G, 1999, Characterisation of a Novel Gene Family of Putative Cyclic Nucleotide and Calmodulin Regulated Ion Channels in *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Journal*, 18, 97–104.
- Kohli S K, Handa N, Bali S, Khanna K, Arora S, Sharma A, vd., 2019, Current Scenario of Pb Toxicity in Plants: Unraveling Plethora of Physiological Responses, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 249, 153–197.
- Kolberg L, Raudvere U, Kuzmin I, Vilo J, Peterson H, 2020, Gprofiler2– An R Package for Gene List Functional Enrichment Analysis and Namespace Conversion Toolset g: Profiler, *F1000Research*, 9.
- Kong L, Liu J, Han Q, Zhou Q, He J, 2019, Integrating Metabolomics and Physiological Analysis to Investigate the Toxicological Mechanisms of Sewage Sludge–Derived Biochars to Wheat, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 185, 109664.
- Kopittke P M, Asher C J, Kopittke R A, Menzies N W, 2007, Toxic Effects of Pb²⁺ on

- Growth of Cowpea *Vigna unguiculata*, Environmental Pollution, 150, 280–287.
- Köseoğlu S, 2019, Investigation of Physiological and Biochemical Effects of Salicylic Acid Applications on Maize (*Zea mays* L.) under Salt Stress, Master's Thesis, Sakarya University, 245, Sakarya.
- Krasensky J, Jonak C, 2012, Drought, Salt, and Temperature Stress–Induced Metabolic Rearrangements and Regulatory Networks, Journal of Experimental Botany, 63, 1593–1608.
- Kruger C, Berkowitz O, Stephan U W, Hell R, 2002, A Metal–Binding Member of the Late Embryogenesis Abundant Protein Family Transports Iron in the Phloem of *Ricinus communis* L., Journal of Biological Chemistry, 277, 25062–25069.
- Kumar N P B A, Dushenkov V, Motto H, Raskin I, 1995, Phytoextraction, the Use of Plants to Remove Heavy Metals from Soils, Environmental Science and Technology Journal, 29, 1232–1238.
- Kumar B, Smita K, Flores L C, 2017, Plant Mediated Detoxification of Mercury and Lead, Arabian Journal of Chemistry, 10, 2335–2342.
- Kumar A, Prasad M N V, 2018, Plant–Lead Interactions: Transport, Toxicity, Tolerance, and Detoxification Mechanisms, Ecotoxicology and Environmental Safety, 166, 401–418.
- Lane S D, Martin E S, 1977, Histochemical Investigation of Lead Uptake in *Raphanus sativus*, New Phytologist, 79, 281–286.
- Lee M, Lee K, Lee J, Noh E W, Lee Y, 2005, AtPDR12 Contributes to Lead Resistance in Arabidopsis, Plant Physiology, 138, 827–836.
- Lee S Z, Chang L, Yang H H, Chen C M, Liu M C, 1998, Absorption Properties of Lead on Soils, Journal of Hazardous Materials Letters, 63, 37–49
- Lee S J, Park J H, Lee M H, Yu J H, Kim S Y, 2010, Isolation and Functional Characterization of CE1 Binding Proteins, BMC Plant Biology, 10, 277.
- Li H, Hu T, Amombo E, Fu J, 2017, Transcriptome Profilings of Two Tall Fescue (*Festuca arundinacea*) Cultivars in Response to Lead (Pb) Stress, BMC

Genomics, 18, 145.

- Li C X, Yan J Y, Ren J Y, Sun L, Xu C, Li G X, vd., 2020, WRKY Transcription Factor Confers Aluminum Tolerance via Regulation of Cell Wall Modifying Genes, *Journal of Integrative Plant Biology*, 62, 1176–1192.
- Li H, Huang X, Zhan A, 2024 Context–Dependent Antioxidant Defense Dystem (ADS)–Based Stress Memory in Response to Recurrent Environmental Challenges in Congeneric Invasive Species, *Marine Life Science and Technology*, 6, 315–330.
- Li S P, Hu K D, Hu L Y, Li H Y, Jiang A M, Xiao F, vd., 2014, Hydrogen Sulfide Alleviates Postharvest Senescence of Broccoli by Modulating Antioxidant Defense and Senescence–Related Gene Expression, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 1119–1129.
- Li S, Han X, Lu Z, Qiu W, Yu M, Li H, vd., 2022, MAPK Cascades and Transcriptional Factors Regulation of Heavy Metal Tolerance in Plants, *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 4463.
- Li X, Jia Y, Zhang J, Qin Y, Wu Y, Zhou M, 2022, Efficient Removal of Tetracycline by H₂O₂ Activated with Iron–Doped Biochar Performance, Mechanism, and Degradation Pathways. *Chinese Chemical Letters*, 33, 2105–2110.
- Li Y, Zhou C, Huang M, Luo J, Hou X, Wu P, vd., 2016, Lead Tolerance Mechanism in *Conyza canadensis*, Subcellular Distribution, Ultrastructure, Antioxidative Defense System and Phytochelatins, *International Journal of Plant Research*, 129, 251–262.
- Liang Y, Zheng P, Li S, Li K Z, Xu H Z, 2018, Nitrate Reductase–dependent NO Production is Involved in H₂S–induced Nitrate Stress Tolerance in Tomato via Activation of Antioxidant Enzymes, *Scientia Horticulturae*, 229, 207–214.
- Lin T, Yang W, Lu W, Wang Y, Qi X, 2017, Transcription Factors PvERF15 and PvMTF–1 Form a Cadmium Stress Transcriptional Pathway, *Plant Physiology*, 173, 1565–1573.

- Liu D, Li T, Jin X, Yang X, Islam E, Mahmood Q, 2008, Lead Induced Changes in the Growth and Antioxidant Metabolism of the Lead Accumulating and Non-Accumulating Ecotypes of *Sedum alfredii*, *Journal of Integrative Plant Biology*, 50, 129–140.
- Liu P, Jiang L, Long P, Li Q, Hou F, Yuan G, vd., 2023, A Genome-wide Co-expression Network Analysis Revealed ZmNRAMP6-mediated Regulatory Pathway Involved in Maize Tolerance to Lead Stress, *Theoretical and Applied Genetics*, 136, 122.
- Liu Q, Wang S, Wen J, Chen J, Sun Y, Dong S, 2023, Genome-Wide Identification and Analysis of the WRKY Gene Family and Low-temperature Stress Response in *Prunus sibiric*, *BMC genomics*, 24, 358.
- Liu S, Fukumoto T, Gena P, Feng P, Sun Q, Li Q, vd., 2020, Ectopic Expression of a Rice Plasma Membrane Intrinsic Protein (OsPIP1;3) Promotes Plant Growth and Water Uptake, *The Plant Journal*, 102, 779–796.
- Liu X, Chen J, Wang G H, Wang W H, Shen J Z, Luo M R, 2016, Hydrogen Sulfide Alleviates Zinc Toxicity by Reducing Zinc Uptake and Regulating Genes Expression of Antioxidative Enzymes and Metallothioneins in Roots of the Cadmium/Zinc Hyperaccumulator *Solanum nigrum* L., *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 400, 177–192.
- Liu X, Chen J, Wang G H, Wang W H, Shen Z J, Luo M R, vd., 2016, Hydrogen Sulfide Alleviates Zinc Toxicity by Reducing Zinc Uptake and Regulating Genes Expression of Antioxidative Enzymes and Metallothioneins in Roots of the Cadmium-zinc Hyperaccumulator *Solanum nigrum* L., *Plant and Soil*, 400, 177–192.
- Loreto F, Dicke M, Schnitzler J P, Turlings T C, 2014, Plant Volatiles and the Environment, *Plant, Cell and Environment*, 37, 1905–1908.
- Love M I, Huber W, Anders S, 2014, Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-seq Data with DESeq2, *Genome Biology*, 15, 1–21.
- Lu Y, Bu Q, Chuan M, Cui X, Zhao Y, Zhou D X, 2023, Metabolic Regulation of the

- Plant Epigenome, *The Plant Journal*, 114, 1001–1013.
- Lucibelli F, Valoroso M C, Aceto S, 2022, Plant DNA Methylation an Epigenetic Mark in Development, Environmental Interactions and Evolution, *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 8299.
- Luna C M, González C A, Trippi V S, 1994, Oxidative Damage Caused by an Excess of Copper in Oat Leaves, *Plant and Cell Physiology*, 35, 11–15.
- Luqman M, Shahbaz M, Maqsood M F, Farhat F, Zulfiqar U, Siddiqui MH, 2023, Effect of Strigolactone on Growth, Photosynthetic Efficiency, Antioxidant Activity, and Osmolytes Accumulation in Different Maize (*Zea mays* L.) Hybrids Grown under Drought Stress, *Plant Signaling and Behavior*, 18, 2262795.
- Lyu G, Li D, Li S, Ning C, Qin R, 2020, Genotoxic Effects and Proteomic Analysis on *Allium cepa* var. *agrogarum* L. Root Cells under Pb Stress, *Ecotoxicology*, 29, 959–972.
- Ma C, Chen Y, Ding S, Li Z, Shi W G, Zhang Y, vd., 2018, Sulfur Nutrition Stimulates Lead Accumulation and Alleviates Its Toxicity in *Populus deltoides*, *Tree Physiology*, 38, 1724–1741.
- Ma D, Sun D, Wang C, Li Y, Guo T, 2014, Expression of Flavonoid Biosynthesis Genes and Accumulation of Flavonoid in Wheat Leaves in Response to Drought Stress, *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 60–66.
- Ma L G, Li J M, Qu L J, Janet H, Chen Z L, Zhao H Y, vd., 2001, Light Control of Arabidopsis Development Entails Coordinated Regulation of Genome Expression and Cellular Pathways, *The Plant Cell*, 13, 2589–2607
- Ma L, An R, Jiang L, Zhang C, Li Z, Zou C, vd., 2022, Effects of *ZmHIPP* on Lead Tolerance in Maize Seedlings: Novel Ideas for Soil Bioremediation, *Journal of Hazardous Materials*, 430, 128457.
- Ma Y, Egodawatta P, McGree J, Liu A, Goonetilleke A, 2016, Human Health Risk Assessment of Heavy Metals in Urban Stormwater, *Science of the Total Environment*, 557, 764–772.

- Maestri E, Marmiroli M, Visioli G, Marmiroli N, 2010, Metal Tolerance and Hyperaccumulation, Costs and Trade-Offs between Traits and Environment, *Environmental and Experimental Botany*, 68, 1–13.
- Maia C F, da Silva B R S, Batista B L, Bajguz A, Lobato A K D S, 2022, 24-Epibrassinolide Simultaneously Stimulates Photosynthetic Machinery and Biomass Accumulation in Tomato Plants under Lead Stress: Essential Contributions Connected to the Antioxidant System and Anatomical Structures, *Agronomy*, 12, 1985.
- Malecka A, Piechalak A, Morkunas I, Tomaszewska B, 2008, Accumulation of Lead in Root Cells of *Pisum sativum*, *Acta Physiologiae Plantarum*, 30, 629–637.
- Małecka A, Konkolewska A, Hanć A, Ciszewska L, Staszak A M, Jarmuszkiewicz W, vd., 2021, Activation of Antioxidative and Detoxificative Systems in *Brassica juncea* L. Plants Against the Toxicity of Heavy Metals, *Scientific Reports*, 11, 22345.
- Malkowski E, Kita A, Galas W, Karez W, Michael K, 2002, Lead Distribution in Corn Seedlings (*Zea mays* L.) and Its Effect on Growth and the Concentration of Potassium and Calcium, *Plant Growth Regulation*, 37, 69–76.
- Manne H, Kumari N, Yashveer S, Nain S, Duhan J, Avtar R, vd., 2024, Mitigation of Lead Toxicity in *Brassica juncea* L. by Sulphur Application–Via Various Biochemical and Transcriptomic Strategies, *Journal of King Saud University–Science*, 36, 103175.
- Mansour M M, Kamel E A R, 2005, Interactive Effect of Heavy Metals and Gibberellic Acid on Mitotic Activity and Some Metabolic Changes of *Vicia faba* L. Plants, *Cytologia*, 70, 275–282.
- Maqbool S, Ramzan T, Haider A, Waraich E A, Fatima A, Siddiqui M H, vd., 2025, Impact of Thiourea on Wheat's Morpho–Physiological and Ionic Attributes (*Triticum aestivum* L.) under Lead Stress: Reducing the Translocation of Lead from Soil to Roots, Shoots, and Grains, *ACS omega*, 10, 3054–3066.
- Marcato–Romain, C E, Guiresse M, Cecchi M, Cotelle S, Pinelli E, 2009, New Direct

- Contact Approach to Evaluate Soil Genotoxicity Using the *Vicia faba* Micronucleus Test, *Chemosphere*, 77, 345–350.
- Maron L G, Pineros M A, Guimaraes C T, Magalhaes J V, Pleiman J K, Mao C, vd., 2010, Two Functionally Distinct Members of the MATE (Multi–Drug and Toxic Compound Extrusion) Family of Transporters Potentially Underlie Two Major Aluminum Tolerance QTLs in Maize, *The Plant Journal*, 61, 728–740.
- Maurel C, Boursiac Y, Luu D T, Santoni V, Shahzad Z, Verdoucq L, 2015, Aquaporins in Plants, *Physiological Reviews*, 95, 1321–1358.
- Meng L, Yang Y, Ma Z, Jiang J, Zhang X, Chen Z, vd., 2022, Integrated Physiological, Transcriptomic and Metabolomic Analysis of the Response of *Trifolium pratense* L. to Pb Toxicity, *Journal of Hazardous Materials*, 436, 129128.
- Meng Y, Zhang L, Wang L, Zhou C, Shangguan Y, Yang Y, 2019, Antioxidative Enzymes Activity and Thiol Metabolism in Three Leafy Vegetables under Cd Stress, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 173, 214–224.
- Mika A, Luthje S, 2003, Properties of Guaiacol Peroxidase Activities Isolated from Corn Root Plasma Membranes, *Plant Physiology*, 132, 1489–1498.
- Miller R J, Koeppe D E, 1971, Lead Accumulation and Physiological Effects in Maize, University of Missouri, Columbia 4 Proceedings, pp.186–193.
- Milner M J, Seamon J, Craft E, Kochian L V, 2013, Transport Properties of Members of the ZIP Family in Plants and Their Role in Zn and Mn Homeostasis, *Journal of Experimental Botany*, 64, 369–381.
- Mishra A, Choudhary M A, 1998, Amelioration of Lead and Mercury Effects on Germination and Rice Seedling Growth by Antioxidants, *Biologia Plantarum*, 41, 469–473
- Mishra S, Srivastava S, Tripathi R D, Kumar R, Seth C S, Gupta D K, 2006, Lead Detoxification by Coontail *Ceratophyllum demersum* L. Involves Induction of Phytochelatins and Antioxidant System in Response to its Accumulation, *Chemosphere*, 65, 1027–1039.
- Mittler R, 2002, Oxidative Stress, Antioxidant and Stress Tolerance, *Trends in Plant*

Science, 7, 841–851

- Moeen–Ud–Din M, Yang S, Wang J, 2023, Auxin Homeostasis in Plant Responses to Heavy Metal Stress, *Plant Physiol and Biochemistry*, 205, 108210.
- Moriyama Y, Hiasa M, Matsumoto T, Omote H, 2008, Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE)–Type Proteins as Anchor Transporters for the Excretion of Metabolic Waste Products and Xenobiotics, *Xenobiotica*, 38, 1107–1118.
- Muhammad H M D, Naz S, Lal M K, Tiwari R K, Ahmad R, Nawaz M A, vd., 2024, Melatonin in Business with Abiotic Stresses in Vegetable Crops, *Scientia Horticulturae*, 324, 112594.
- Munzuroğlu O, Geckil H, 2002, Effects of Metals on Seed Germination, Root Elongation and Coleoptile and Hypocotyl Growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 43, 203–213
- Nadeem M, Al–Qurainy F, Khan S, Tarroum M, Ashraf M, 2012, Effect of Bome Chemical Treatments on Seed Germination and Dormancy Breaking in an Important Medicinal Plant *Ochradenus arabicus* Chaudhary, Hill C. & AG Mill, *Pakistan Journal of Botany*, 44, 1037–1040.
- Nakano Y, Asada K, 1987, Purification of Ascorbate Peroxidase in Spinach Chloroplasts its Inactivation in Ascorbate–Depleted Medium and Reactivation by Monodehydroascorbate Radical, *Plant and Cell Physiology*, 28, 131–140.
- Navarro–Espíndola R, Suaste–Olmos F, Peraza–Reyes L, 2020, Dynamic Regulation of Peroxisomes and Mitochondria during Fungal Development, *Journal of Fungi*, 6, 302–330.
- Naz S, Perveen S, 2021, Response of Wheat (*Triticum aestivum* L. var. Galaxy–2013) to Pre–sowing Seed Treatment with Thiourea under Drought Stress, *Pakistan Journal of Botany*, 53, 1209–1217.
- Neill S, Barros R, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, vd., 2008, Nitric Oxide Stomatal Closure and Abiotic Stress, *Journal of Experimental Botany*, 59, 165–176.

- Nield J, Orlova E V, Morris E P, Gowen B, Heel M V, Barber J, 2000, 3D Map of the Plant Photosystem II Supercomplex Obtained by Cryoelectron Microscopy and Single Particle Analysis, *Nature Structural Biology*, 7, 44–47.
- Nimmo H G, 2000, The Regulation of Phosphoenolpyruvate Carboxylase in CAM Plants, *Trends in Plant Science*, 5, 75–80.
- Nitsch S, Zorro Shahidian L, Schneider R, 2021, Histone Acylations and Chromatin Dynamics: Concepts, Challenges and Links to Metabolism, *EMBO Reports*, 22, e52774.
- NMKL, 1998, Metals: Determination by Atomic Adsorption Spectrophotometry after Wet Digestion in Microwave Oven, NMKL Method No. 161, Nordic Committee on Food Analysis, Norway, 8.
- Omolola T O, 2020, Phytochemical, Proximate and Elemental Composition of *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray Leaves, *International Annals of Science*, 8, 54–61.
- Omote H, Hiasa M, Matsumoto T, Otsuka M, Moriyama Y, 2006, The MATE Proteins as Fundamental Transporters of Metabolic and Xenobiotic Organic Cations, *Trends in Pharmacological Sciences*, 27, 587–593.
- Öz A, Özata E, Kapar H, 2013, A Research on Hybrid Maize *Zea mays* Indentata Sturt Breeding, *Reserach Journal of Agricultural Sciences*, 2, 19–23.
- Paivoke A E A, 2002, Soil Lead Alters Phytase Activity and Mineral Nutrient Balance of *Pisum sativum*, *Environmental and Experimental Botany*, 48, 61–73.
- Pang K, Li Y, Liu M, Meng Z, Yu Y, 2013, Inventory and General Analysis of the ATP–Binding Cassette (ABC) Gene Superfamily in Maize (*Zea mays* L.), *Gene*, 526, 411–28.
- Park S Y, Fung P, Nishimura N, Jensen D R, Fujii H, Zhao Y, vd., 2009, Absciscic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins, *Science*, 324, 1068–1071.
- Patade V Y, Nikalje G C, Srivastava S, 2020, Protective Chemical Agents in the Amelioration of Plant Abiotic Stress Biochemical and Molecular Perspectives,

Wiley–Blackwell, 704, ABD New Jersey.

- Patade V Y, Nikalje G C, Srivastava S, 2020, Role of Thiourea in Mitigating Different Environmental Stresses in Plants, Protective Chemical Agents in the Amelioration of Plant Abiotic Stress: Biochemical and Molecular Perspectives, 467–482.
- Patra M, Bhowmik N, Bandopadhyay B, Sharma A, 2004, Comparison of Mercury, Lead and Arsenic with Respect to Genotoxic Effects on Plant Systems and the Development of Genetic Tolerance, Environmental and Experimental Botany, 52, 199–223.
- Pérez–López J, Gandullo J, de la Osa C, Feria A B, Echevarría C, Monreal J A, vd., 2023, Responses to Aluminum and Cadmium of a RNAi Sorghum with Decreased Levels of Phosphoenolpyruvate Carboxylase 3 (PPC3), Environmental and Experimental Botany, 205, 105139.
- Perveen A, Wahid A, Mahmood S, Hussain I, Rasheed R, 2015, Possible Mechanism of Medium–Supplemented Thiourea in Improving Growth, Gas Exchange, and Photosynthetic Pigments in Cadmium–Stressed Maize (*Zea mays*), Brazilian Journal of Botany, 38, 71–79.
- Perveen S, Farooq R, Shahbaz M, 2016, Thiourea–Induced Metabolic Changes in Two Mung Bean *Vigna radiata* L. Wilczek (Fabaceae) Varieties Under Salt Stress, Brazilian Journal of Botany, 39, 41–54.
- Pinkett H W, Lee A T, Lum P, Locher K P, Rees D C, 2007, An Inward–Facing Conformation of a Putative Metal–Chelate–Type ABC Transporter, Science, 315, 373–377.
- Piotrowska A, Bajguz A, Godlewska–Zylkiewicz B, Czerpak R, Kaminska M, 2009, Jasmonic Acid as Modulator of Lead Toxicity in Aquatic Plant *Wolffia arrhiza* (Lemnaceae), Environmental and Experimental Botany, 66, 507–513.
- Pittman J K, Hirschi K D, 2016, CAX–ing a Wide Net: Cation/H⁺ Transporters in Metal Remediation and Abiotic Stress Signalling, Plant Biology, 18, 741–749.
- Pitzschke A, Forzani C, Hirt H, 2006, Reactive Oxygen Species Signaling in Plants,

- Antioxidants and Redox signaling, 8, 1757–1764.
- Polishchuk O V, 2021, Stress–related Changes in the Expression and Activity of Plant Carbonic Anhydrases, *Planta*, 253, 58.
- Pourrut B, Perchet G, Silvestre J, Cecchi M, Guiresse M, Pinelli E, 2008, Potential Role of NADPH–Oxidase in Early Steps of Lead–Induced Oxidative Burst in *Vicia faba* Roots, *Journal Plant Physiology*, 165, 571–579.
- Pourrut B, Jean S, Silvestre J, Pinelli E, 2011, Lead–Induced DNA Damage in *Vicia faba* Root Cells Potential Involvement of Oxidative Stress, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 726, 123–128.
- Prasad M N V, Hagemeyer J, 1999, Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems, Springer, 405, Germany.
- Qi Q, Guo Z, Liang Y, Li K, Xu H, 2019, Hydrogen Sulfide Alleviates Oxidative Damage under Excess Nitrate Stress through MAPK/NO Signaling in Cucumber, *Plant Physiology and Biochemistry*, 135, 1–8.
- Qufei L, Fashui H, 2009, Effects of Pb²⁺ on the Structure and Function of Photosystem II of *Spirodelapolyrrhiza*, *Biological Trace Element Research*, 129, 251.
- Rahman S U, Qin A, Zain M, Mushtaq Z, Mehmood F, Riaz L, vd, 2024, Pb Uptake, Accumulation, and Translocation in Plants: Plant Physiological, Biochemical, and Molecular Response: a Review, *Heliyon*, 10.
- 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.
- Rasheed A, Khan A A, Nawaz M, Mahmood A, Arif U, Hassan M U, vd., 2023, Development of Aluminium (Al)–Tolerant Soybean Using Molecular Tools Limitations and Future Directions, *Journal of Plant Growth Regulation*, 42, 7403–7417.
- Ratnakumar P, Khan M I R, Minhas P S, Farooq M A, Sultana R, Per T S, 2016, Can Plant Bio–Regulators Minimize Crop Productivity Losses Caused by Drought, Salinity and Heat Stress An Integrated Review, *Journal of Applied Botany and*

Food Quality, 89, 113–125.

- Remans T, Opdenakker K, Guisez Y, Carleer R, Schat H, Vangronsveld J, vd., 2012, Exposure of *Arabidopsis thaliana* to Excess Zn Reveals a Zn-specific Oxidative Stress Signature, *Environmental and Experimental Botany*, 84, 61–71.
- Romanowska E, Pokorska B, Siedlecka M, 2005, The Effects of Oligomycin on Content of Adenylates in Mesophyll Protoplasts, Chloroplasts and Mitochondria from Pb²⁺ Treated Pea and Barley Leaves, *Acta Physiologiae Plantarum*, 27, 29–36.
- Romanowska E, Wróblewska B, Drozak A, Siedlecka M, 2006, High Light Intensity Protects Photosynthetic Apparatus of Pea Plants Against Exposure to Lead, *Plant Physiology and Biochemistry*, 44, 387–394.
- Romero-Munar A, Del-Saz N F, Ribas-Carbó M, Flexas J, Baraza E, Florez-Sarasa I, vd., 2017, Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis with *Arundo donax* Decreases Root Respiration and Increases Both Photosynthesis and Plant Biomass Accumulation, *Plant, Cell and Environment*, 40, 1115–1126.
- Rucińska R, Sobkowiak R, Gwóźdź E A, 2004, Genotoxicity of Lead in Lupin Root Cells as Evaluated by the Comet Assay, *Cellular and Molecular Biology Letter*, 9, 519–528.
- Rucińska-Sobkowiak R, Nowaczyk G, Krzesłowska M, Rabęda I, Jurga S, 2013, Water Status and Water Diffusion Transport in Lupine Roots Exposed to Lead, *Environmental and Experimental Botany*, 87, 100–109.
- Sandhu K S, Singh N, Malhi N S, 2007, Some Properties of Corn Grains and Their Flours I: Physicochemical, Functional and Chapati-Making Properties of Flours, *Food Chemistry*, 101, 938–946.
- Santos A L D, Chaves-Silva S, Yang L, Maia L G S, Chalfun-Júnior A, Sinharoy S, 2017, Global Analysis of the MATE Gene Family of Metabolite Transporters in Tomato, *BMC Plant Biology*, 17, 185.
- Sanz L, Albertos P, Mateos I, Sanchez-Vicente I, Lechon T, Fernandez-Marcos M, vd., 2015, Nitric oxide (NO) and Phytohormones Cross-Talk during Early Plant Development, *Journal of Experimental Botany*, 66, 2857–2868.

- Savchenko T, Tikhonov K, 2021, Oxidative Stress–Induced Alteration of Plant Central Metabolism, *Life*, 11, 304.
- Scarpeci T E, Zanol M I, Mueller–roeber B, Valle E M, 2013, Overexpression of *AtWRKY30* Enhances Abiotic Stress Tolerance during Early Growth Stages in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Molecular Biology*, 83, 265–277.
- Sengar R S, Gautam M, Sengar R S, Sengar R S, Garg S K, Sengar K, 2009, Lead Stress Effects on Physiobiochemical Activities of Higher Plants, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 196, 1–21.
- Seregin I V, Ivaniov V B, 2001, Physiological Aspects of Toxic Effects of Cadmium and Lead on Higher Plants, *Russian Journal of Plant Physiology*, 48, 606–630.
- Seregin I V, Shpigun L K, Ivanov V B, 2004, Distribution and Toxic Effects of Cadmium and Lead on Maize Roots, *Russian Journal of Plant Physiology*, 51, 525–533.
- Shah T, Munsif F, D’amato R, Nie L, 2020, Lead Toxicity Induced Phytotoxic Impacts on Rapeseed and Clover Can Be Lowered by Biofilm Forming Lead Tolerant Bacteria, *Chemosphere*, 246, 125766.
- Shahid M, Pinelli E, Pourrut B, Silvestre J, Dumat C, 2011, Lead Induced Genotoxicity to *Vicia faba* L. Roots in Relation with Metal Cell Uptake and Initial Speciation, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 78–84.
- Sharma P, Dubey R S, 2005, Lead Toxicity in Plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 35–52.
- Sheng Y, Yan X, Huang Y, Han Y, Zhang C, Ren Y, vd., 2019, The WRKY Transcription Factor, *WRKY13*, Activates *PDR8* Expression to Positively Regulate Cadmium Tolerance in *Arabidopsis*, *Plant, Cell and Environment*, 42, 891–903.
- Shi M, Wang S, Zhang Y, Wang S, Zhao J, Feng H, vd., 2020, Genome–wide Characterization and Expression Analysis of ATP–binding Cassette (ABC) Transporters in Strawberry Reveal the Role of *FvABCC11* in Cadmium Tolerance, *Scientia Horticulturae*, 271, 109464.

- Shopova E, Katerova Z, Brankova L, Dimitrova L, Sergiev I, Todorova D, vd., 2021, Modulation of Physiological Stress Response of *Triticum aestivum* L. to Glyphosate by Brassinosteroid Application, *Life*, 11, 1156.
- Shu X, Yin L, Zhang Q, Wang W, 2012, Effect of Pb Toxicity on Leaf Growth, Antioxidant Enzyme Activities and Photosynthesis in Cuttings and Seedlings of *Jatropha curcas* L., *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 893–902.
- Shukla T, Khare R, Kumar S, Lakhwani D, Sharma D, Asif M H, vd., 2018, Differential Transcriptome Modulation Leads to Variation in Arsenic Stress Response in *Arabidopsis thaliana* Accessions, *Journal of Hazardous Materials*, 351, 1–10.
- Simontacchi M, García–Mata C, Bartoli C G, Santa–María G E, Lamattina L, 2013, Nitric Oxide as a Key Komponent in Hormone–Regulated Processes, *Plant Cell Reports*, 32, 853–866.
- Simontacchi M, Galatro A, Ramos–Artuso F, Santa–María G E, 2015, Plant Survival in a Changing Environment, the Role of Nitric Oxide in Plant Responses to Abiotic Stress, *Frontiers in Plant Science*, 6, 977.
- Singh P K, Indoliya Y, Chauhan A S, Singh S P, Singh A P, Dwivedi S, vd., 2017, Nitric Oxide Mediated Transcriptional Modulation Enhances Plant Adaptive Responses to Arsenic Stress, *Scientific Reports*, 7, 3592.
- Singh R P, Singh D, 2017, Response of Lentil to Thiourea Application under Rain Fed Conditions of Central India, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 06, 2556–2560.
- Singh R, Tripathi R D, Dwivedi S, Kumar A, Trivedi P K, Chakrabarty D, 2010, Lead Bioaccumulation Potential of an Aquatic Macrophyte *Najas indica* are Related to Antioxidant System, *Bioresource Technology*, 101, 3025–3032.
- Singh R, Tripathi R, Dwivedi S, Kumar A, Trivedi P, Chakrabarty D, 2010, Lead Bioaccumulation Potential of an Aquatic Acrophyte *Najas indica* are Related to Antioxidant System, *Bioresource Technology*, 101, 3025–3032.
- Sivaguru M, Liu J, Kochian L V, 2013, Targeted Expression of Sb MATE in the Root

- Distal Transition Zone is Responsible for Sorghum Aluminum Resistance, *The Plant Journal*, 76, 297–307.
- Soliman E R, Abdelhameed R E, 2025, Selenium Seed Priming Adjusts Photosynthesis, Metabolic Constituents and Gene Expression Profiling in *Vicia faba* L. to Outstand Lead Stress, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 25, 6623–6641.
- Srivastava A K, Srivastava S, Mishra S, D'Souza S F, Suprasanna P, 2014, Identification of Redox–Regulated Components of Arsenate (AsV) Tolerance Through Thiourea Supplementation in Rice, *Metallomics*, 6, 1718–1730.
- Srivastava A K, Sablok G, Hackenberg M, Deshpande U, Suprasanna P, 2017, Thiourea Priming Enhances Salt Tolerance Through Co–ordinated Regulation of microRNAs and Hormones in *Brassica juncea*, *Scientific Reports*, 7, 45490.
- Srivastava A K, Pandey M, Ghate T, Kumar V, Upadhyay M K, Majumdar A, vd., 2021, Chemical Intervention for Enhancing Growth and Reducing Grain Arsenic Accumulation in Rice, *Environmental Pollution*, 276, 116719.
- Sukumar G, Divya L D, Mithula S, Chandra S R, Lakshmi P M, 2017, Biostimulant Activity of Plant Protein Hydrolysate on the Growth of *Beta vulgaris* subs. *vulgaris* (Linn.), *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 8, 173–178.
- Sun X, Wang J, Zhang M, Liu Z, Meng J, He T, 2023, Combined Application of Biochar and Sulfur Alleviates Cadmium Toxicity in Rice by Affecting Root Gene Expression and Iron Plaque Accumulation, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 266, 115596.
- Takahashi R, Ishimaru Y, Shimo H, Ogo Y, Senoura T, Nishizawa N K, vd., 2012, The OsHMA2 Transporter Is Involved in Root–to–Shoot Translocation of Zn and Cd in Rice, *Plant, Cell and Environment*, 35, 1948–1957.
- Talukdar D, 2014, Arsenic Induced Oxidative Stress and Its Reversal by Thiourea in Mung Bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek.) Genotype, *Central European Journal of Experimental Biology* 3, 13–18.
- Talukdar D, 2016, Exogenous Thiourea Modulates Antioxidant Defence and Glyoxalase

- Systems in Lentil Genotypes under Arsenic Stress, *Journal of Plant Stress Physiology*, 2, 9–21.
- Tan L, Qu M, Zhu Y, Peng C, Wang J, Gao D, vd., 2020, Zinc Transporter5 and Zinc Transporter9 Function Synergistically in Zinc/Cadmium Uptake, *Plant Physiology*, 18, 1235–1249.
- Tang B, Luo M, Zhang Y, Guo H, Li J, Song W, vd., 2021, Natural Variations in the P-Type ATPase Heavy Metal Transporter Gene *ZmHMA3* Control Cadmium Accumulation in Maize Grains, *Journal of Experimental Botany*, 72, 6230–6246.
- Tang W, Wang F, Chu H, You M, Lv Q, Ji W, vd., 2023, WRKY Transcription Factors Regulate Phosphate Uptake in Plants, *Environmental and Experimental Botany*, 208, 105241.
- Tehseen M, Cairns N, Sherson S, Cobbett C S, 2010, Metallochaperone-like Genes in *Arabidopsis thaliana*, *Metallomics*, 2, 556–564.
- Tian B, Qiao Z, Zhang L, Li H, Pei Y 2016, Hydrogen Sulfide and Proline Cooperate to Alleviate Cadmium Stress in Foxtail Millet Seedlings, *Plant Physiology and Biochemistry*, 109, 293–299.
- Tian S, Gu C, Liu L, Zhu X, Zhao Y, Huang S, 2015, Transcriptome Profile of *Louisiana iris* Root and Identification of Genes Involved in Lead Stress Response, *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 28087–28097.
- Timperio A M, Egidi M G, Zolla L, 2008, Proteomics Applied on Plant Abiotic Stresses: Role of Heat Shock Proteins (HSP), *Journal of Proteomics*, 71, 391–411.
- Tomulescu I M, Radoviciu E M, Merca V V, Tuduce A D, 2004, Effect of Copper, Zinc and Lead and Their Combinations on the Germination Capacity of Two Cereals, *Journal of Agricultural Sciences*, 15, 39–42.
- Tripathi D K, Singh V P, Prasad S M, Dubey N K, Chauhan D K, Rai A K, 2016, LIB Spectroscopic and Biochemical Analysis to Characterize Lead Toxicity Alleviative Nature of Silicon in Wheat *Triticum aestivum* L. Seedlings, *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology*, 154, 89–98.

- Ueda M, Seki M, 2020, Histone Modifications Form Epigenetic Regulatory Networks to Regulate Abiotic Stress Response, *Plant Physiology*, 182, 15–26.
- Ullah A, Hazrat A, Khan B A, Saqib S, Ullah F, 2025, Mitigating Lead Stress in Barley Using Gibberellic Acid (GA3): Effects on Morpho–Physiological and Biochemical Parameters, *Journal of Plant Growth Regulation*, 1–12.
- Uzu G, Sobanska S, Sarret G, Munoz M, Dumat C, 2010, Foliar Lead Uptake by Lettuce Exposed to Atmospheric Fallouts, *Environmental Science and Technology*, 44, 1036–1042.
- Valivand M, Amooaghaie R, Ahadi A, 2019, Seed Priming with H₂S and Ca²⁺ Trigger Signal Memory that Induces Cross–Adaptation against Nickel Stress in Zucchini Seedlings, *Plant Physiology and Biochemistry*, 143, 286–298.
- Van Assche F, Clijsters H, 1990, Effects of Metals on Enzyme Activity in Plants, *Plant Cell and Environment*, 13, 195–206.
- Venkatachalam P, Jayalakshmi N, Geetha N, Sahi S V, Sharma N C, Rene E R, vd., 2017, Accumulation Efficiency, Genotoxicity and Antioxidant Defense Mechanisms in Medicinal Plant *Acalypha indica* L. under Lead Stress, *Chemosphere*, 171, 544–553.
- Verbruggen N, Hermans C, Schat H, 2009, Molecular Mechanisms of Metal Hyperaccumulation in Plants, *New Phytologist*, 181, 759–776.
- Verma D, Jalmi S K, Bhagat P K, Verma N, Sinha A K, 2020, A bHLH Transcription Factor, MYC2, Imparts Salt Intolerance by Regulating Proline Biosynthesis in *Arabidopsis*, *The FEBS Journal*, 287, 2560–2576.
- Wahid A, Basra S, Farooq M, 2017, Thiourea a Molecule with Immense Biological Significance for Plants, *International Journal of Agriculture and Biology*, 19, 23–32.
- Wang D, Liu Y, Tan X, Liu H, Zeng G, Hu X, 2015, Effect of Exogenous Nitric Oxide on Antioxidative System and S–Nitrosylation in Leaves of *Boehmeria nivea* (L.) Gaud under Cadmium Stress, *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 3489–3497.

- Wang F Z, Chen M X, Yu L J, Xie L J, Yuan L B, Qi H, vd., 2017, OsARM1, an R2R3 MYB Transcription Factor, Is Involved in Regulation of the Response to Arsenic Stress in Rice, *Frontiers in Plant Science*, 8, 1868.
- Wang H, Liu Y, Peng Z, Li J, Huang W, Liu Y, vd., 2019, Ectopic Expression of Poplar ABC Transporter PtoABCG36 Confers Cd Tolerance in *Arabidopsis thaliana*, *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 3293.
- Wang H, Shan X, Wen B, Owens G, Fang J, Zhang S, 2007, Effect of Indole-3-Acetic Acid on Lead Accumulation in Maize (*Zea mays* L.) Seedlings and the Relevant Antioxidant Response, *Environmental and Experimental Botany*, 61, 246–253.
- Wang L, Yang H, Liu R, Fan G, 2015, Detox Strategies and Regulation of Oxygen Production and Flowering of *Platanus acerifolia* under Lead (Pb) Stress by Transcriptome Analysis, *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 12747–58.
- Wang L, Yang H, Liu R, Fan G, 2015, Detoxification Strategies and Regulation of Oxygen Production and Flowering of *Platanus acerifolia* under Lead (Pb) Stress by Transcriptome Analysis, *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 12747–12758.
- Wang L, Zheng B, Yuan Y, Xu Q, Chen P, 2020, Transcriptome Profiling of *Fagopyrum tataricum* Leaves in Response to Lead Stress, *BMC Plant Biology*, 20, 1–14.
- Wang S, Shi X, Salam M M A, Chen G, 2021, Integrated Study on Subcellular Localization and Chemical Speciation of Pb Reveals Root Strategies for Pb Sequestration and Detoxification in *Salix integra*. *Plant and Soil*, 467, 197–211.
- Wang Y, Xu L, Chen Y, Shen H, Gong Y, Limera C, vd., 2013, Transcriptome Profiling of Radish (*Raphanus sativus* L.) Root and Identification of Genes Involved in Response to Lead (Pb) Stress with Next Generation Sequencing, *PLoS One*, 8, e66539.
- Wang Y, Zou Z, Su X, Wan F, Zhou Y, Lei Z, vd., 2021, Physiological of Biochar and α -Fe₂O₃ Nanoparticles as Amendments of Cd Accumulation and Toxicity toward Muskmelon Grown in Pots, *Journal of Nanobiotechnology*, 19, 442.

- Wani S H, Anand S, Singh B, Bohra A, Joshi R, 2021, WRKY Transcription Factors and Plant Defense Responses, Latest Discoveries and Future Prospects, *Plant Cell Reports*, 40, 1071–1085.
- Wei Y, Peng X, Wang X, Wang C, 2023, The Heavy Metal-associated Isoprenylated Plant Protein (HIPPI) Gene Family Plays a Crucial Role in Cadmium Resistance and Accumulation in the Tea Plant (*Camellia sinensis* L.), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 260, 115077.
- Wellburn A R, 1994, The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution, *Journal of Plant Physiology*, 144, 307–313.
- Wojas S, Ruszczynska A, Bulska E, Wojciechowski M, Antosiewicz D M, 2007, Ca^{2+} -Dependent Plant Response to Pb^{2+} is Regulated by *LCT1*, *Environmental Pollution*, 147, 584–592.
- Wu X, Su N, Yue X, Fang B, Zou J, Chen Y, 2021, IRT1 and ZIP2 Were Involved in Exogenous Hydrogen-Rich Water-Reduced Cadmium Accumulation in *Brassica chinensis* and *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Hazardous Materials*, 407, 124599.
- Xalxo R, Keshavkant S, 2019, Melatonin, Glutathione and Thiourea Attenuates Lead and Acid Rain-Induced Deleterious Responses by Regulating Gene Expression of Antioxidants in *Trigonella foenum graecum* L., *Chemosphere*, 221, 1–10.
- Xiong Z T, 1997, Bioaccumulation and Physiological Effects of Excess Lead in a Roadside Pioneer Species *Sonchus oleraceus* L., *Environmental Pollution*, 97, 275–279.
- Xiong Z T, Zhao F, Li M J, 2006, Lead Toxicity in *Brassica pekinensis* Rupr. Effect on Nitrate Assimilation and Growth, *Environmental Toxicology*, 21, 147–153.
- Xu B, Wang Y, Zhang S, Guo Q, Jin Y, Chen J, 2017, Transcriptomic and Physiological Analyses of *Medicago sativa* L. Roots in Response to Lead Stress, *PLoS One*, 12, e0175307.
- Xu N, Zhang N, Yi P, Chen L, Dai H, Zhang J, vd., 2024, Integrated

Physio–Biochemistry and RNA–seq Revealed the Mechanism Underlying Biochar–Mediated Alleviation of Compound Heavy Metals (Cd, Pb, As) Toxicity in Cotton, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 284, 116974.

Xu X, Chen Q, Mo S, Qian Y, Wu X, Jin Y, vd., 2020, Transcriptome–Wide Modulation Combined with Morpho–Physiological Analyses of *Typha orientalis* Roots in Response to Lead Challenge, *Journal of Hazardous Materials*, 384, 121405.

Yadav P, Srivastava S, 2021, Effect of Thiourea Application on Root, Old Leaf and Young Leaf of Two Contrasting Rice Varieties (*Oryza sativa* L.) Grown in Arsenic Contaminated Soil, *Environmental Technology and Innovation*, 21, 101368.

Yadav S K, 2010, Heavy Metals Toxicity in Plants: an Overview on the Role of Glutathione and Phytochelatins in Heavy Metal Stress Tolerance of Plants, *South African Journal of Botany*, 76, 167–179

Yadav T, Kumar A, Yadav R, Yadav G, Kumar R, Kushwaha M, 2020, Salicylic Acid and Thiourea Mitigate the Salinity and Drought Stress on Physiological Traits Governing Yield in Pearl Millet–Wheat, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27, 2010–7.

Yadav V K, Amari A, Gacem A, Elboughdiri N, Eltayeb L B, Fulekar M H, 2023, Treatment of Fly–Ash–Contaminated Wastewater Loaded with Heavy Metals by Using Fly–Ash–Synthesized Iron Oxide Nanoparticles, *Water*, 15, 15.

Yan, Z Z, Ke L, Tam N F Y, 2010, Lead Stress in Seedlings of *Avicennia marina*, a Common Mangrove Species in South China, with and without Cotyledons, *Aquatic Botany*, 92, 112–118.

Yang R, Li X, Yang Q, Zhao M, Bai W, Liang Y, vd., 2023, Transcriptional Profiling Analysis Providing Insights into Desiccation Tolerance Mechanisms of the Desert Moss *Syntrichia caninervis*, *Frontiers in Plant Science*, 14, 1127541.

Yang Y, Zhang L, Huang X, Zhou Y, Quan Q, Li Y, vd., 2020, Response of Photosynthesis to Different Concentrations of Heavy Metals in *Davidia*

- involucrata, PLoS One, 15, e0228563.
- Yang G, Fu S, Huang J, Li L, Long Y, Wei Q, vd., 2021, The Tonoplast–Localized Transporter OsABCC9 is Involved in Cadmium Tolerance and Accumulation in Rice, Plant Science, 307, 110894.
- Yao G F, Li C, Sun K K, Tang J, Huang Z Q, Yang F, 2020, Hydrogen Sulfide Maintained the Good Appearance and Nutrition in Post–Harvest Tomato Fruits by Antagonizing the Effect of Ethylene, Frontiers in Plant Science, 11, 584.
- Yıldız M, Terzi H, Sönmez N, 2025, Biochemical and Proteomic Analyses Reveal Thiourea–Induced Cadmium Tolerance in Maize (*Zea mays* L.) Seedlings, Turkish Journal of Botany, 49, 288–303.
- Yip Delormel T, Boudsocq M, 2019, Properties and Functions of Calcium–Dependent Protein Kinases and Their Relatives in *Arabidopsis thaliana*, New Phytologist, 224, 585–604.
- Yu C, Dong W, Zhan Y, Huang Z A, Li Z, Kim I S, 2017, Genome–Wide Identification and Expression Analysis of CILAX, CIPIN and CIABCB Genes Families in *Citrullus lanatus* under Various Abiotic Stresses and Grafting, BMC Genetics, 18, 1–15.
- Yuan H, Zhang Y, Huang S, Yang Y, Gu C, 2015, Effects of Exogenous Glutathione and Cysteine on Growth, Lead Accumulation and Tolerance of *Iris lactea* var. *chinensis*, Environmental Science and Pollution Research, 22, 2808–2816.
- Zahid A, Ul Din K, Ahmad M, Hayat U, Zulfiqar U, Askri S M H, 2024, Exogenous Application of Sulfur–Rich Thiourea (STU) to Alleviate the Adverse Effects of Cobalt Stress in Wheat, BMC Plant Biology, 24, 126.
- Zhang L, Pei Y, Wang H, Jin Z, Liu Z, Qiao Z, 2015, Hydrogen Sulfide Alleviates Cadmium-induced Cell Death through Restraining ROS Accumulation in Roots of *Brassica rapa* L. ssp. *Pekinensis*, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2015, 804603.
- Zhang L J, Buatois L A, Mángano M G, 2022, Potential and Problems in Evaluating Secular Changes in the Diversity of Animal–Substrate Interactions at

Ichnospecies Rank, *Terra Nova*, 34, 433–40.

- Zhang R, Zhu J, Cao H Z, An Y R, Huang J J, Chen X H, 2013, Molecular Cloning and Expression Analysis of PDR1-like Gene in Ginseng Subjected to Salt and Cold Stresses or Hormonal Treatment, *Plant Physiology and Biochemistry*, 71, 203–211.
- Zhang X, Li M, Ma X, Jin X, Wu X, Zhang H, Wang P, 2024, Transcriptomics Combined with Physiology and Metabolomics Reveals the Mechanism of Tolerance to Lead Toxicity in Maize Seedling, *Physiologia Plantarum*, 176, e14547.
- Zhang X, Zhao B, Ma X, Jin X, Chen S, Wang P, vd., 2024, Combining Transcriptome and Metabolome Analyses to Reveal the Response of Maize Roots to Pb Stress, *Plant Physiology and Biochemistry*, 217, 109265.
- Zhang X, Zhao B, Ma X, Jin X, Chen S, Wang P, vd., 2024, Combining Transcriptome and Metabolome Analyses to Reveal the Response of Maize Roots to Pb Stress, *Plant Physiology and Biochemistry*, 217, 109265.
- Zhang Y, Deng B, Li Z, 2018, Inhibition of NADPH Oxidase Increases Defense Enzyme Activities and Improves Maize Seed Germination under Pb Stress, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 158, 187–192.
- Zheng L, Peer T, Seybold V, Lütz–Meindl U, 2012, Pb-Induced Ultrastructural Alterations and Subcellular Localization of Pb in Two Species of *Lespedeza* by TEM-Coupled Electron Energy Loss Spectroscopy, *Environmental and Experimental Botany*, 77, 196–206.
- Zhou C, Huang M, Li Y, Luo J, Cai L P, 2016, Changes in Subcellular Distribution and Antioxidant Compounds Involved in Pb Accumulation and Detoxification in *Neyraudia reynaudiana*, *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 21794–21804.
- Zhou J, Zhang Z, Zhang Y, Wei Y, Jiang Z, 2018, Effects of Lead Stress on the Growth, Physiology and Cellular Structure of Privet Seedlings, *PloS One*, 13, e0191139.
- Zhou M, Ghnaya T, Dailly H, Cui G, Vanpee B, Han R, vd., 2019, The Cytokinin

- Trans-Zeatin Riboside Increased Resistance to Heavy Metals in the Halophyte Plant Species *Kosteletzkya pentacarpos* in the Absence But Not in the Presence of NaCl, *Chemosphere*, 233, 954–965.
- Zhu F Y, Li L, Lam P Y, Chen M X, Chye M L, Lo C, 2013, Sorghum Extracellular Leucine-Rich Repeat Protein SbLRR2 Mediates Lead Tolerance in Transgenic *Arabidopsis*, *Plant and Cell Physiology*, 54, 1549–1559.
- Zhu H, Ai H, Cao L, Sui R, Ye H, Du D, vd., 2018, Transcriptome Analysis Providing Novel Insights for Cd-Resistant Tall Fescue Responses to Cd Stress, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 160, 349–356.
- Zhu H, Ai H, Hu Z, Du D, Sun J, Chen K, 2020, Comparative Transcriptome Combined with Metabolome Analyses Revealed Key Factors Involved in Nitric Oxide NO-Regulated Cadmium Stress Adaptation in Tall Fescue, *BMC Genomics*, 21, 1–13.
- Zhu Y, Liu L, Shen L, Yu H, 2016, NaKR1 Regulates Long-Distance Movement of FLOWERING LOCUS T in *Arabidopsis*, *Nature Plants*, 2, 1–10.
- Zulfiqar U, Farooq M, Hussain S, Maqsood M, Hussain M, Ishfaq M, vd., 2019, Lead Toxicity in Plants: Impacts and Remediation, *Journal of Environmental Management*, 250, 109557.