



**MISIR (*Zea mays* L.) FİDELERİNDE SİSTEİN TEŞVİKLİ KADMIYUM
TOLERANSININ TRANSKRİPTOMİK ANALİZLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yeliz OPAK ÇOBAN

Danışman
Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

İkinci Danışman
Doç. Dr. Hakan TERZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Mayıs 2024

Bu tez çalışması 22.FEN.BİL.10 numaralı proje ile Afyon Kocatepe Üniversitesi
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MISIR (*Zea mays* L.) FİDELERİNDE SİSTEİN TEŞVİKLİ
KADMİYUM TOLERANSININ TRANSKRİPTOMİK ANALİZLERİ**

Yeliz OPAK ÇOBAN

Danışman

Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

İkinci Danışman

Doç. Dr. Hakan TERZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Mayıs 2024

TEZ ONAY SAYFASI

Yeliz OPAK ÇOBAN tarafından hazırlanan “**Mısır (*Zea mays* L.) fidelerinde sistein teşvikli kadmiyum toleransının transkriptomik analizleri**” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilişkili maddeleri uyarınca 24/05/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** 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

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

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

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

..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. 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 ilişkili 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.

24 / 05 / 2024

Yeliz OPAK ÇOBAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MISIR (*Zea mays* L.) FİDELERİNDE SİSTEİN TEŞVİKLİ KADMIYUM TOLERANSININ TRANSKRİPTOMİK ANALİZLERİ

Yeliz OPAK ÇOBAN

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

İkinci Danışman: Doç. Dr. Hakan TERZİ

Kadmiyum (Cd), toprakta birikebilen, bitki büyümesi ve gelişimi için ciddi bir tehdit oluşturabilen oldukça toksik bir ağır metaldir. Sülfür içeren bir amino asit olan sisteinin (Cys), bitkilerdeki Cd detoksifikasyonunda çok önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, mısır fidelerinde Cys aracılı Cd toleransının altında yatan moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada, mısır (*Zea mays* L. cv. Capuzi) fidelerinde Cys aracılı Cd detoksifikasyonunun olası moleküler mekanizmaları fizyolojik ve transkriptomik analizlerle araştırılmıştır. Hidroponik olarak büyütülen mısır fideleri 75 µM Cd ve 250 µM Cys uygulamalarına maruz bırakılmıştır. On gün sonra, muamele edilmiş mısır fideleri, büyüme, Cd birikimi, klorofil içeriği, enzimatik antioksidanları ve diferansiyel olarak ifade edilen genleri (DEG'ler) incelenerek metal tolerans mekanizmasını analiz etmek için hasat edilmiştir. Cd stresi, daha fazla Cd birikimine bağlı olarak fide büyümesini ve klorofil içeriğini azaltmıştır. Ayrıca Cd stresi, süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerindeki azalmaya bağlı olarak lipid peroksidasyonu gibi oksidatif stres belirteçlerini arttırmıştır. Dışsal Cys uygulanmasının, Cd birikimini ve lipid peroksidasyonunu azaltarak ve fotosentetik pigmentleri ve antioksidan enzimlerin aktivitelerini iyileştirerek bitki büyümesi üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Karşılaştırmalı transkriptom analizi, Cd stresi altında 2422 genin ifade seviyesinin değiştiğini (953 artan ve 1469 azalan) göstermiş. Cys+Cd uygulamasında ise 2577 genin (1540 artan ve 1037 azalan)

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS OF THE CYSTEINE-INDUCED CADMIUM TOLERANCE IN MAIZE (*Zea mays* L.) SEEDLINGS

Yeliz OPAK ÇOBAN

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

Cadmium (Cd) is a highly toxic heavy metal that can accumulate in the soil, posing a serious threat to plant growth and development. Cysteine (Cys), a sulfur-containing amino acid, has been shown to play a crucial role in the detoxification of cadmium in plants. However, the molecular mechanisms underlying Cys-mediated Cd tolerance in maize seedlings has not been well understood. In this study, therefore, the possible molecular mechanisms of the Cys-mediated Cd detoxification in maize (*Zea mays* L. cv. Capuzi) seedlings by physiological and transcriptomic analyses were investigated. Hydroponically grown maize seedlings were subjected to 75 μM Cd and 250 μM Cys treatments. After 10 d, the treated maize seedlings were harvested to analyze the metal tolerance mechanism via examining growth, Cd accumulation, chlorophyll content, enzymatic antioxidants and differentially expressed genes (DEGs). Cd stress decreased seedling growth and chlorophyll content due to greater Cd accumulation. Moreover Cd stress enhanced oxidative stress markers such as lipid peroxidation due to decrease in superoxide dismutase and catalase activities. It has been determined that exogenous Cys application has a protective effect on plant growth by reducing Cd accumulation and lipid peroxidation and improving the activities of photosynthetic pigments and antioxidant enzymes. Comparative transcriptome analysis showed that the expression levels of 2422 genes changed (953 up-regulated and 1469 down-regulated) under Cd stress. Whereas the expression levels of 2577 genes changed by Cys+Cd application

(1540 up-regulated and 1037 down-regulated). In gene ontology (GO) classification, many DEGs related to small molecule metabolic process, transmembrane transport and carbohydrate metabolic process were enriched in the control/Cd comparison, and transmembrane transport, photosynthesis and carbohydrate metabolic process were enriched in the Cd/Cys+Cd comparison. The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis reveals that DEGs in control/Cd comparison are related to the metabolic pathways, photosynthesis, and biosynthesis of secondary metabolites, while in Cd/Cys+Cd comparison, DEGs are related to the photosynthesis, metabolic pathways, and phenylpropanoid biosynthesis. The results indicated that exogenous application of Cys improved the Cd tolerance of maize seedlings by regulating the expression of genes in different pathways, such as photosynthesis, chlorophyll biosynthesis, membrane transport, antioxidant enzyme system, and secondary metabolite biosynthesis. This research has the potential to contribute to the development of innovative strategies for improving the tolerance of crops to heavy metal stress, ultimately benefiting agricultural productivity and environmental sustainability.

2024, xii + 107 pages

Key words: Maize, Cadmium, Cysteine, Transcriptomics.

TEŞEKKÜR

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

Deneysel çalışmalarım ve tez yazım sürecinde yardımlarını esirgemeyen doktora öğrencisi Emre PEHLİVAN, Arş. Gör. Saliha AYDIN, yüksek lisans öğrencileri Hakan YALÇIN, Tuğçe DEMİRCİ ve Nurgül SÖNMEZ'e teşekkür ederim.

Bu çalışmayı 22.FEN.BİL.10 nolu proje ile destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne katkılarından dolayı en içten dileklerimle teşekkür ederim.

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

Yeliz OPAK ÇOBAN
Afyonkarahisar 2024

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER ve KISMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	4
2.1 Mısır (<i>Zea mays</i> L.) Üretimi	4
2.2 Ağır Metal: Kadmiyum	4
2.2.1 Kadmiyum Toksisitesi	4
2.2.2 Kadmiyumun Bitkiye Alınımı ve Taşınımı	5
2.2.3 Kadmiyum Stresinin Bitki Gelişimi Üzerindeki Etkileri.....	9
2.2.4 Bitkilerde Kadmiyum Sinyal Yolakları	10
2.2.5 Kadmiyum Stresinin Bitkilerde Neden Olduğu Moleküler Düzeydeki Değişiklikler.....	13
2.2.6 Kadmiyum Stresinin Bitki Transkriptom Profilleri Üzerine Etkisi	14
2.3 Kadmiyum Stresinde Farklı İyileştiricilerinin Transkriptomik Profiller Üzerine Etkisi.....	19
2.3.1 Fitohormonlar	19
2.3.2 Nitrik Oksit	22
2.4.4 Glutasyon	23
2.4.5 Hidrojen Sülfür	24
2.4.6 Sistein.....	26
3. MATERYAL ve METOT	28
3.1 Bitki Materyali ve Bitki Yetiştirme Koşulları.....	28
3.2 Fidelerin Taze ve Kuru Ağırlıklarının Belirlenmesi	29
3.3 Kadmiyum Birikiminin Belirlenmesi.....	29
3.4 Klorofil İçeriğinin Belirlenmesi	29

3.5 Malondialdehit İçeriğinin Belirlenmesi	30
3.6 Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	30
3.6.1 Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi.....	31
3.6.2 Guaiakol Peroksidaz (POD) Aktivitesi.....	31
3.6.3 Katalaz (CAT) Aktivitesi.....	31
3.6.4 Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi.....	32
3.7 RNA–Seq Analizleri	32
3.7.1 RNA Ekstraksiyonu	32
3.7.2 RNA–Seq Analizleri.....	34
3.8 RNA–Seq Verilerinin Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR (qPCR) ile Doğrulanması	37
3.9 İstatistiki Analizler	38
4. BULGULAR	39
4.1 Cd ve Sistein Uygulamalarının Büyüme Üzerine Etkisi	39
4.2 Cd ve Sistein Uygulamalarının Cd Birikimi Üzerine Etkisi	39
4.3 Cd ve Sistein Uygulamalarının Klorofil İçeriği Üzerine Etkisi	40
4.4 Cd ve Sistein Uygulamalarının Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi	41
4.5 RNA-Seq Verilerinin Değerlendirilmesi.....	42
4.6 Diferansiyel Olarak İfade Edilen Genlerin Analizi.....	42
4.7 DEG’lerin Zenginleştirme Analizleri.....	44
4.8 Fotosentez ile İlişkili DEG’lerin Analizleri	47
4.9 Transmembran Taşınımı ile İlişkili DEG’lerin Analizleri	48
4.10 Karbohidrat Metabolizması ile İlişkili DEG’lerin Analizleri	49
4.11 Enerji Metabolizması ile İlişkili DEG’lerin Analizleri	50
4.12 Stres Savunma ile İlişkili DEG’lerin Analizleri.....	51
4.13 Sekonder Metabolitlerin Biyosentezi ile İlişkili DEG’lerin Analizleri.....	52
4.14 DEG’lerin İfade Profillerinin RT–qPCR ile Doğrulanması.....	53
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	55
6. KAYNAKLAR.....	68
ÖZGEÇMİŞ.....	107

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Ca	Kalsiyum
Cd	Kadmiyum
Cr	Krom
Cu	Bakır
Fe	Demir
Hg	Civa
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H ₂ S	Hidrojen sülfür
Mg	Magnezyum
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
mM	Milimolar
O ₂ • ⁻	Süperoksit radikali
•OH	Hidroksil radikali
Pb	Kurşun
Zn	Çinko

Kısaltmalar

ABA	Absisik asit
ABC	ATP bağlayıcı kaset
APX	Askorbat peroksidaz
BS	Biyolojik süreç
CAT	Katalaz
Cys	Sistein
DEG	Diferansiyel olarak ifade olan gen
FPKM	Milyon haritalanmış okuma başına transkriptin kilobaz başına parça sayısı
GO	Gen Ontolojisi
GR	Glutatyan redüktaz
GRX	Glutaredoksin
GSH	Glutasyon
GST	Glutasyon S-transferaz
HB	Hücre sel bileşen
HMA	Ağır metal ATPaz
HSP	Isı şoku proteini
IRT	Demirle düzenlenen taşıyıcı
KEGG	Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi
LHC	Işık toplayıcı kompleks
MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinaz
MDA	Malondialdehit
MF	Moleküler fonksiyon
MT	Metalotiyonein

NRAMP	Doğal dirençle ilişkili makrofaj proteini
NO	Nitrik oksit
OEC	Oksijen üretici kompleks
PAL	Fenilalanin amonyum liyaz
PC	Fitoşelatin
PCS	Fitoşelatin sentaz
POD	Peroksidaz
RNT	Reaktif azot türü
ROT	Reaktif oksijen türü
RuBisCO	Rubiloz 1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz
SOD	Süperoksit dismutaz
TF	Transkripsiyon faktörü
ZIP	Çinko/demirle düzenlenen taşıyıcı protein



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Çeltikte kadmiyum (Cd^{+2}) alımı, dağılımı, sekestrasyonu, uzun mesafeli taşınımı ve tohumdaki yerleşimini gösteren bir diyagram.	7
Şekil 2.2 Kadmiyum (Cd) stresi ve detoksifikasyon şeması. Cd maruz kalma sırasında metal şelatörlerin (örneğin, sideroforlar ve organik asitler) sentezi için kullanılan trikarboksilik asit döngüsü (TCA) ara maddeleri.....	11
Şekil 4.1 Kontrol, Cys (250 μ M), Cd (75 μ M) ve Cys+Cd (250 μ M + 75 μ M) 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.....	44
Şekil 4.2 Kontrole göre Cd uygulamasında tespit edilen DEG'lerin GO zenginleştirme analizinin sonuçları.	45
Şekil 4.3 Cd'a göre Cys + Cd uygulamasında tespit edilen DEG'lerin GO zenginleştirme analizinin sonuçları.	46
Şekil 4.4 (a) K/Cd ve (b) Cd/Cys+Cd gruplarındaki DEG'ler arasında ilk 10 zenginleştirilmiş KEGG yolağı.	47
Şekil 4.5 a) K/Cd ve b) Cd/Cys+Cd grupları arasındaki fotosentezle ilişkili DEG'leri göstereren ısı haritaları.	48
Şekil 4.6 a) K/Cd ve b) Cd/Cys+Cd grupları arasındaki transmembran taşınımı ile ilişkili DEG'leri göstereren ısı haritaları.	49
Şekil 4.7 a) K/Cd ve b) Cd/Cys+Cd grupları arasındaki karbonhidrat metabolizması ile ilişkili DEG'leri göstereren ısı haritaları.	50
Şekil 4.8 a) K/Cd ve b) Cd/Cys+Cd grupları arasındaki enerji metabolizması ile ilişkili DEG'leri göstereren ısı haritaları.	51
Şekil 4.9 a) K/Cd ve b) Cd/Cys+Cd grupları arasındaki stres savunma ile ilişkili DEG'leri göstereren ısı haritaları.	52
Şekil 4.10 a) K/Cd ve b) Cd/Cys+Cd grupları arasındaki sekonder metabolitlerin biyosentezi ile ilişkili DEG'leri göstereren ısı haritaları.	53
Şekil 4.11 Kontrol, Cd ve Cys+Cd uygulamalarına maruz bırakılan mısır fidelerinin yapraklarında ifade edilen ve RNA-seq analizi ile elde edilen FPKM	

değerleri ve RT-qPCR kullanılarak doğrulanan dokuz genin ifade profili.. 54



ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1 Mevcut çalışmada qPCR analizi için kullanılan primerlerin listesi	38
Çizelge 4.1 Mısır fidelerinde gövde ve kökün taze ve kuru ağırlığı üzerine Cd (75 µM) ve Cys (250 µM) uygulamalarının etkisi	39
Çizelge 4.2 Mısır fidelerinde gövde ve kök dokularının Cd içeriği üzerine Cd (75 µM) ve Cys (250 µM) uygulamalarının etkisi	40
Çizelge 4.3 Mısır fidelerinin yaprak dokularında klorofil içeriği üzerine Cd (75 µM) ve Cys (250 µM) uygulamalarının etkisi	40
Çizelge 4.4 Mısır fidelerinin yaprak dokularında MDA içeriği ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerine Cd (75 µM) ve Cys (250 µM) uygulamalarının etkisi..	41
Çizelge 4.5 RNA–Seq okumalarının özeti	42
Çizelge 4.6 Uygulamalar arası karşılaştırmalar sonucunda elde edilen gen sayıları	43
Çizelge 4.7 GO ve KEGG yolaklarında zenginleştirilmiş terim sayıları (p < 0,05)	45

1. GİRİŞ

İnsan sağılığı üzerindeki potansiyel riskleri nedeniyle ağır metal kirliliğı, dünyadaki en yaygın stres faktörlerinden biridir (Chang vd. 2019, Clemens 2019, Kamran vd. 2020). Kadmiyum, çevre ve insan sağılığı için önemli bir tehdit oluşturan oldukça toksik bir ağır metaldir. Madencilik, eritme ve pil üretimi gibi endüstriyel faaliyetlerin yanı sıra gübre ve böcek ilacı kullanımı nedeniyle çevreye yaygın olarak dağılmaktadır (Zou vd. 2021). Kirli tarım arazilerinde yetişen bitkiler bol miktarda Cd'a maruz kalmakta ve bitki dokularında yüksek seviyelerde birirmektedir (Nannoni vd. 2016). Bitkilerde aşırı Cd birikimi, anormal bitki büyümesine ve gelişmesine, azalmış fotosentetik aktivite ve klorofil biyosentezine, su ve besin alımını ve taşınmasını engellenmesine, bozulmuş hücre içi redoks homeostazisine ve artan oksidatif hasara yol açarak bitki verimi ve kalitesinde azalmalara neden olabilmektedir (Hu vd. 2022). Toprak ve sudaki kadmiyum kirliliğı, besin zincirinde birikerek insanlarda ve hayvanlarda ciddi sağılık sorunlarına yol açabilmesi nedeniyle son yıllarda büyük bir endişe kaynağı haline gelmiştir. Bu nedenle, Cd birikimi ve neden olduğu oksidatif stresin olumsuz etkilerini hafifletmeye yönelik potansiyel stratejilerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Kükürt bitki büyümesi için gerekli besin maddelerinden biridir ve bitkiler tarafından çoğunlukla topraktan sülfat formunda alınmaktadır (Davidian ve Kopriva 2010). Bitki bünyesine alındıktan sonra sülfat, ağır metal toleransın önemli rol oynayan sistein (Cys), glutatyon (GSH), fitoşelatinler (PC'ler) ve metalotiyoneinler (MT'ler) gibi bazı organik bileşiklerin yapısına katılmaktadır (Leustek vd. 2000). Bitkilerde Cys, inorganik sülfatın organik sülfüre asimilasyonunun son ürünüdür (Deuschle vd. 2004) ve yan zincirinde nükleofilik olan ve kolayca oksitlenen bir sülfhidril grubu taşımaktadır (Dickinson ve Chang 2011). Ayrıca Cys, bitkilerde ağır metallerin şelasyonu ve detoksifikasyonunda rol oynayan GSH, PC'ler ve MT'ler gibi bazı önemli biyomoleküllerin fonksiyonel öncüsüdür (Cobbett ve Goldsbrough 2002). Çeşitli çalışmalarda, dışsal Cys uygulamasının Cd (Xue vd. 2024), Cr (Terzi ve Yıldız 2021, Yıldız ve Terzi 2021), Hg (Aysin vd. 2020) ve Pb stresi (Yuan vd. 2015) altındaki bitkilerde askorbat–glutatyon döngüsü ve antioksidan enzimler dahil olmak üzere antioksidan sistemleri senkronize ederek ağır metal kaynaklı oksidatif hasarın

azaltabildiği gösterilmiştir. Xue vd. (2024), Cd stresi altındaki *Brassica juncea* fidelerinde dışsl Cys uygulamasının, endojen Cys, GSH, PC içeriklerinin yanı sıra glutatyon redüktazın (GR) aktivitelerini arttırdığı, böylece Cd toksisitesini etkili bir şekilde azalttığı ve fotosentetik oranı önemli ölçüde artırdığını göstermiştir. Jia vd. (2016), Cr stresi altındaki *Arabidopsis* bitkilerinde Cys uygulamasının PC sentaz enzimini kodlayan genlerin (*PCS1* ve *PCS2*) ifade seviyelerini artan yönde düzenleyerek GSH birikimini arttırdığını ve PC sentezini aktive ettiğini bildirmiştir.

Bitkilerde Cd alımı ve detoksifikasyonu ile ilgili moleküler mekanizmalarının kapsamlı bir şekilde anlaşılması, bitkilerde Cd birikiminin etkin yönetimi ve manipülasyonu için önemli bir temel adımdır. Bitkilerde Cd birikimini ve taşınmasını kontrol eden bir dizi gen, nicel özellik lokusları analizi ve haritaya dayalı klonlama yoluyla tanımlanmıştır (Chen vd. 2019, Rasheed vd. 2020). Bununla birlikte, yüksek verimli RNA transkriptom dizi (RNA-seq) analizi, bir hücrede belirli bir gelişim aşamasını veya fizyolojik durumu yansıtan tüm transkriptlerin setlerini sağlamaktadır. Bu veriler, farklı çevresel ortamlarda yetişen bitkilerde anahtar genlerin biyolojik süreçlerini ve bitki büyümesinde yer alan ilgili metabolik süreçleri tanımlamak için kullanılabilir (Wang vd. 2009). RNA-seq teknolojisi, arpa (Kintlová vd. 2021), mısır (Yue vd. 2016) ve buğday (Zhou vd. 2019) gibi farklı bitki türlerinde Cd stres tepkilerini içeren biyolojik süreçleri ve moleküler ağları deşifre etmek için yaygın olarak kullanılmıştır. Örneğin, S-adenosilmetiyonin döngüsünü, metal taşınmasını, vakuolar alıkonma ve oksin sinyal yolağı ile ilgili birçok strese duyarlı genin Cd stresine yanıt olarak mısır bitkilerinde farklı şekilde ifade edildiği gösterilmiştir (Yue vd. 2016, Lin vd. 2022). Bununla birlikte, bitkilerde Cd toleransını artıran kimyasalların moleküler mekanizmalarını ortaya çıkarmak, anahtar diferansiyel olarak ifade edilen genleri (DEG'ler) ve ilgili metabolik yolları tanımlamak için de kullanılmaktadır (Sun vd. 2022, Di vd. 2023, Liu vd. 2023). Pamuk bitkilerinde melatonin aracılı Cd detoksifikasyonunda antioksidan sistem, Cd şelasyonu ve ABC taşıyıcıları gibi DEG'lerin fonksiyon gördüğü yolların teşvik edildiği gösterilmiştir (Li vd. 2022a).

Bildiğimiz kadarıyla, mısırdaki Cys teşvikli Cd toleransının altında yatan moleküler mekanizmayı ortaya çıkarmak için transkriptom analizi bugüne kadar

gerçekleştirilmemiştir. Bu çalışmada, fizyobiyokimyasal ve transkriptomik analizleri entegre edilerek mısır fidelerinde Cys teşvikli Cd toleransı mekanizmaları incelenmiştir. Bu bağlamda, Cd stresi altındaki mısır fidelerinde büyüme, Cd birikimi, klorofil içeriği, lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktivitelerinin yanı sıra transkriptom analiz kullanılarak farklı şekilde ifade olan DEG'lerin ve metabolik yolların belirlenmesi amaçlanmıştır.



2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Mısır (*Zea mays* L.) Üretimi

Mısır (*Zea mays* L.), Poaceae familyasına ait dünyanın önemli tek yıllık tahıl ürünüdür. Mısır dünyanın birçok yerinde temel gıda olarak kabul edilir ve çeltik ve buğdaydan sonra dünyanın en önemli üçüncü temel ürünüdür (Sandhu vd. 2007). Mısır dünya üzerinde yaklaşık 196 milyon ha ekim alanına sahiptir (FAO 2020). Ekilen mısırın %60'ı hayvan yemi, %20'si insan gıdası, %10'u hazır gıda ve kalan %10'u da yeniden ekim için tohumluk olarak kullanılmaktadır (Bilgiç vd. 2012). Mısır, elde edilen yüksek verim, yaygın yetiştiricilik, depolanma kolaylığı ve ıslah yoluyla devamlı geliştirilmeye uygun olması gibi nedenlerden dolayı önemli bir besin maddesi olarak kabul edilmektedir.

Dünyada mısır üretiminde ilk sırada Amerika Birleşik Devletleri bulunmaktadır (FAO 2020). Türkiye ise Dünya mısır üretiminde 23. sırada yer almaktadır (FAO 2020). Mısır, Türkiye'de 6,9 milyon da ekim alanı ve 6,5 milyon ton üretim miktarı bakımından en çok yetiştiriciliği yapılan ürünlerin başında gelmektedir (TÜİK 2021). Silaj (hayvan yemi), yağ, un, patlamış mısır, haşlanmış mısır ve tatlandırıcı üretimi gibi birçok farklı gıda eldesinde kullanılabilmesi mısırı ekonomik olarak da önemli bir kültür bitkisi haline getirmektedir. Bu sebeplerle mısır üretimi ihtiyaç ve talebe bağlı olarak her yıl artış göstermektedir (TÜİK 2021).

2.2 Ağır Metal: Kadmiyum

2.2.1 Kadmiyum Toksisitesi

Kadmiyum (Cd), çevredeki en zehirli ağır metallerden biridir (Zhan vd. 2017). Madencilik ve döküm endüstrisi (Robson vd. 2014), gübreleme ve atık su ile sulama yapılması gibi insan kaynaklı üretim faaliyetleri nedeniyle giderek artan miktarlarda Cd ekilebilir topraklara katılmaktadır (Atafar vd. 2010, Chen vd. 2013). Toprak Cd kirliliği özellikle madencilik ve döküm alanlarının etrafındaki tarım arazilerinde her zaman

yüksek konsantrasyonda oluşmaktadır (Li vd. 2014). Bu nedenle, kirli tarım arazilerinde yetişen bitkiler bol miktarda Cd'a maruz kalmakta ve bitki dokularında yüksek seviyelerde birikmektedir (Nannoni vd. 2016). Besin zinciri ile Cd alımının azaltılması, insan sağlığının ve çevrenin korunması için çok önemli bir görevdir. Bu nedenle, tarımsal ürünlerin güvenli üretimi yoluyla Cd'un potansiyel insan sağlığı risklerinin en aza indirilebilmesi için tahıl tanelerinde Cd birikiminin sınırlandırılması zorunludur.

Ağır metal kirliliği, dünyadaki en yaygın stres faktörlerinden biridir ve insan sağlığı üzerindeki potansiyel riskleri nedeniyle dünya çapında önemli bir problem haline gelmiştir (Chang vd. 2019, Clemens 2019, Kamran vd. 2020). İnsan kaynaklı faaliyetler, kirli lağım çamurunun atılması, aşırı kimyasal gübre kullanımı, sanayileşmenin hızla büyümesi ve kentleşme toprak kirlenme sürecini hızlandırmıştır (Rizwan vd. 2018). Kadmiyum önemli toksik kirleticilerden biridir ve insan vücuduna alındığında yaklaşık 10–30 yıl gibi uzun ve kalıcı bir biyolojik ömre sahiptir (Clemens 2006, Clemens vd. 2013). İnsanlarda Cd osteoporoz, kanser ve böbrek fonksiyon bozukluğu gibi çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir (Johri vd. 2010, Yu vd. 2017, Mao vd. 2019).

2.2.2 Kadmiyumun Bitkiye Alınımı ve Taşınımı

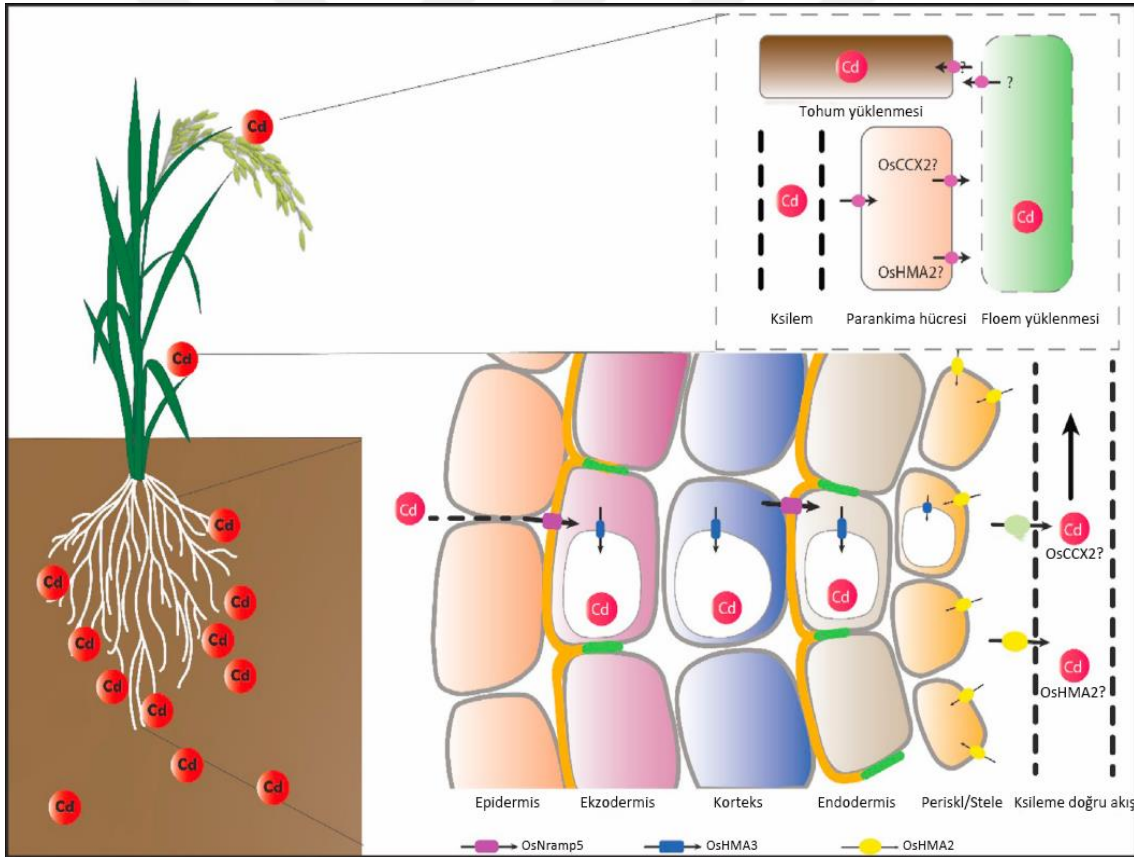
Kadmiyum topraklarda çeşitli formlarda bulunmakta ancak birçoğu bitkiler tarafından alınamamaktadır (Liu vd. 2018a). Cd genellikle toprakta Cd^{+2} olarak bulunmakta ve Cd'un en toksik formu olarak kabul edilmektedir (Zhan vd. 2017). Kadmiyum alımı Cd'un formuna, bitki türlerine ve toprağın fizikokimyasal koşullarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Zhi-bin vd. 2016, Rizwan vd. 2018). Cd kolaylıkla topraktan alınmakta ve bitkinin toprak üstü kısımlarına taşınmaktadır (Shanmugaraj vd. 2019). Kadmiyumun alınma yeteneği, bitkinin fizyolojik özellikleri (Tiryakioglu vd. 2006, Yadav vd. 2018, Gupta vd. 2019), bitkinin yaşı (Manousaki ve Kalogerakis 2009), kök yapısı (Redjala vd. 2011, Fahr vd. 2013, Laghlimi vd. 2015), kök boyutu (Thakur vd. 2016) ve kök yüzey alanı (Redjala vd. 2011, Thakur vd. 2016, Zhi-bin vd. 2016, Yadav vd. 2018) gibi bitki özelliklerindeki farklılıklar nedeniyle bitki türleri ve genotipler arasında değişiklik göstermektedir. Kök tüyleri, Cd alımında çok önemli bir işlev

görmekte (Zheng vd. 2011) ve ince tüylü köklere sahip bitkiler, yüksek oranda Cd alımı ve birikimi göstermektedir (Gupta vd. 2019). İz elementlerin bitkiye genellikle iki değerlikli formda alınması nedeniyle (Fontes vd. 2014, Gupta vd. 2016), Cd'un Ca^{+2} , Fe^{+2} , Mg^{+2} , Cu^{+2} ve Zn^{+2} ile aynı taşıyıcıları kullanarak kök hücre çeperlerini geçtiği gösterilmiştir (Villiers vd. 2012, Fontes vd. 2014, Ismael vd. 2019). Kadmiyum pasif taşıma (difüzyon) yoluyla da toprak çözeltisinden bitki köklerine geçebilmektedir (Redjala vd. 2011, Rog Young vd. 2015). Ayrıca, spesifik olmayan zar taşıma proteinleri (çinko taşıyıcı ZIP ve demir taşıyıcı IRT) ve ATPaz'lar Cd taşınmasında görev almaktadır (Yamaguchi vd. 2011, Gallego vd. 2012, Wu vd. 2015, Sebastian ve Prasad 2018).

Bitki sürgünlerine Cd alımı, Cd'un kök yoluyla alınmasına, vakuollerde alıkonulmasına, ksilem ve floem yüklemesine bağlıdır (Riaz vd. 2021). Bitkinin toprak üstü kısımları, toprak altı kısımlarına kıyasla daha düşük Cd biriktirmektedir. Bu durum Cd'un büyük miktarının köklerde tutulduğunu ve daha azının ksilem aracılığı ile toprak üstü dokulara taşındığını göstermektedir (Riaz vd. 2021). Cd'un yüksek hareketliliği, köklerin topraktan alımını kolaylaştırır, ardından apoplastik veya simplastik yollar veya organik asit veya fitoşelatinler ile kompleks oluşturarak ksileme ulaşmaktadır (Lei vd. 2020). Cd alımı ve tohumla taşınmasında, Cd'un kökler tarafından alımı, ksileme yüklenmesi, sürgünlere translokasyonu ve son olarak floem translokasyonu ile tohumlara iletilmesi (Uraguchi ve Fujiwara 2012, 2013) dört ana aşama olarak kabul edilmektedir (Şekil 2.1) (Clemens 2019).

Kökler tarafından Cd alımı temel bitki besin maddelerinin topraktan alınması için kullanılan farklı taşıyıcılar tarafından gerçekleştirilen ilk adımdır (Enstone vd. 2002, Sasaki vd. 2012). Ağır metallerin zarlardan taşınması için bitkilerin farklı kısımlarında birkaç çeşit taşıyıcı rapor edilmiştir (Xia vd. 2010, Takahashi vd. 2011, Sasaki vd. 2012). Farklı ağır metal taşıyıcı protein türleri arasında NRAMP (doğal dirençle ilişkili makrofaj proteini) ailesi çok çeşitli metal elementlerin taşınmasıyla ilişkili olup, Mn, Zn, Co ve Ni'i (Takahashi vd. 2011) ve Al'u (OsNrat1 tarafından) (Xia vd. 2010) taşıdığı bilinmektedir. Çeltikte, kök hücrelerinin ekzodermisi ve endodermisinde lokalize olan OsNramp5 proteininin Mn alımı ve translokasyonundan sorumlu

olmasının yanı sıra Cd taşınmasından sorumlu olduğu bildirilmiştir (Sasaki vd. 2012). Diğer taraftan, NRAMP ailesinin diğer üyelerinden farklı olarak OsNramp4'ün Al (üç değerlikli katyon) dışında iki değerlikli katyonların taşınmasında yer almadığı bildirilmiştir (Xia vd. 2010). Ayrıca OsNramp6'nın Cd'dan ziyade Fe ve Mn alımını gerçekleştirdiği (Peris–Peris vd. 2017) ve OsNramp3'ün Cd taşınmasına katılmadığı gösterilmiştir (Yamaji vd. 2013a, Yang vd. 2014). Fe taşıyan iyon kanallarının (OsIRT1, OsIRT2 ve OsNRAMP1) aynı zamanda Cd'un alınmasında görev aldığı bazı araştırmalarla gösterilmiştir (Curie vd. 2000, Ishimaru vd. 2006, Nakanishi vd. 2006, Takahashi vd. 2011). Bununla birlikte, bu taşıyıcıların özellikle Fe eksikliği koşullarında ifade edildiği ve Fe taşıyıcıları aracılı Cd alınması için Fe eksikliğinin meydana gelmesi gerektiği bildirilmiştir (Clemens 2019).



Şekil 2.1 Çeltikte kadmiyum (Cd²⁺) alımı, dağılımı, sekestrasyonu, uzun mesafeli taşınımı ve tohumdaki yerleşimini gösteren bir diyagram. Cd alımı, taşıyıcı (OsNramp5) aracılığıyla kökler tarafından gerçekleştirilir. Vakuolar sekestrasyon, tonoplast lokalize taşıyıcılar (OsHMA3) tarafından gerçekleştirilir. Ksilem yüklemesi kökten sürgüne doğru HMA2 ve HMA4 tarafından gerçekleştirilir. CAX tipi ve MTP tipi taşıyıcılar da Cd alımına aracılık eder. Son olarak, ksilem-floem yeniden yer değiştirme ve yapraklardan remobilizasyon yoluyla floem yüklemesi gerçekleştirilir (Clemens 2019'dan değiştirilerek).

Bitkilerle yapılan çalışmalarda IRT1 (demirle düzenlenen taşıyıcı), vakuollere Cd sekestrasyonunda görev yapan HMA3 (ağır metal ATPaz), vakuollerden Cd taşınmasında rol alan AtNRAMP3/4, Cd translokasyonu ve dağılımında görev alan HMA2, AtHMA4, OsLCT1 (düşük afiniteli katyon taşıyıcı) ve yaprakta Cd birikiminde yer alan OsCAL1'in (Mendoza–Cozatl vd. 2011, Clemens ve Ma 2016, Luo vd. 2018) Cd taşınmasına aracılık eden diğer taşıyıcılar olarak tanımlanmıştır.

Çeltik bitkilerinde şimdiye kadar dokuz HMA geni tanımlanmıştır. Bunlar arasında *OsHMA1* ve *OsHMA3*'ün Ag/Cu taşınmasında görevli olduğu gösterilmiştir (Lee vd. 2007). Ayrıca *OsHMA3*'ün kök hücrelerinin vakuollerinde Cd'un tutulmasına aracılık ettiği bildirilmiştir (Şekil 2.1) (Ueno vd. 2010, Miyadate vd. 2011). Tütün bitkilerinde aşırı *OsHMA3* ifadesinin sürgündeki Cd birikimini azalttığı ve Cd toleransını arttırdığı bildirilmiştir (Cai vd. 2019). OsNramp5 tarafından alınan Cd'un, OsHMA3'ün homologu olan OsHMA2 taşıyıcısı tarafından sürgünlere taşındığı belirtilmiştir (Satoh–Nagasawa vd. 2012, Takahashi vd. 2012a, Yamaji vd. 2013b). OsHMA3 tonoplastta lokalize olan bir taşıyıcıyken, OsHMA2 plazma zarında Cd ve Zn'un taşınmasında rol oynayan bir taşıyıcıdır (Takahashi vd. 2012a). Bununla birlikte, *OsHMA2* genlerinin devre dışı bırakılmasının sürgündeki Cd birikimini azalttığı rapor edilmiştir (Yamaji vd. 2013b). Bir plazma zarı taşıyıcısı olan OsLCT1 (düşük afiniteli Cd taşıyıcı 1)'in devre dışı bırakılmasının tahıl tanelerinde daha az Cd birikimine neden olduğu bildirilmiştir. Luo vd. (2018), yaprak Cd içeriğini kontrol eden ve sitozolde şelat oluşturarak çalışan ve hücre dışı boşluklarda Cd salgılanmasını teşvik ederek sitozolik Cd'u azaltan yeni bir tür defensin benzeri protein (OsCAL1) tanımlamıştır. Diğer taraftan, reaktif oksijen türleri (ROT), nitrik oksit (NO), giberellin ve oksin tarafından uyarılan bazı sinyal yollarının, IRT1 gibi taşıyıcıları kodlayan genlerin transkripsiyonel regülasyonunda yer aldığı bildirilmiştir (Rodriguez–Serrano vd. 2009, Gallego vd. 2012, Zhu vd. 2012, 2013, Kawakami ve Bhullar 2018). Bununla birlikte, bitki Cd alımı ve translokasyonunda yer alan genleri etkileyen düzenleyici yollar tam olarak anlaşılamamıştır (Lei vd. 2020).

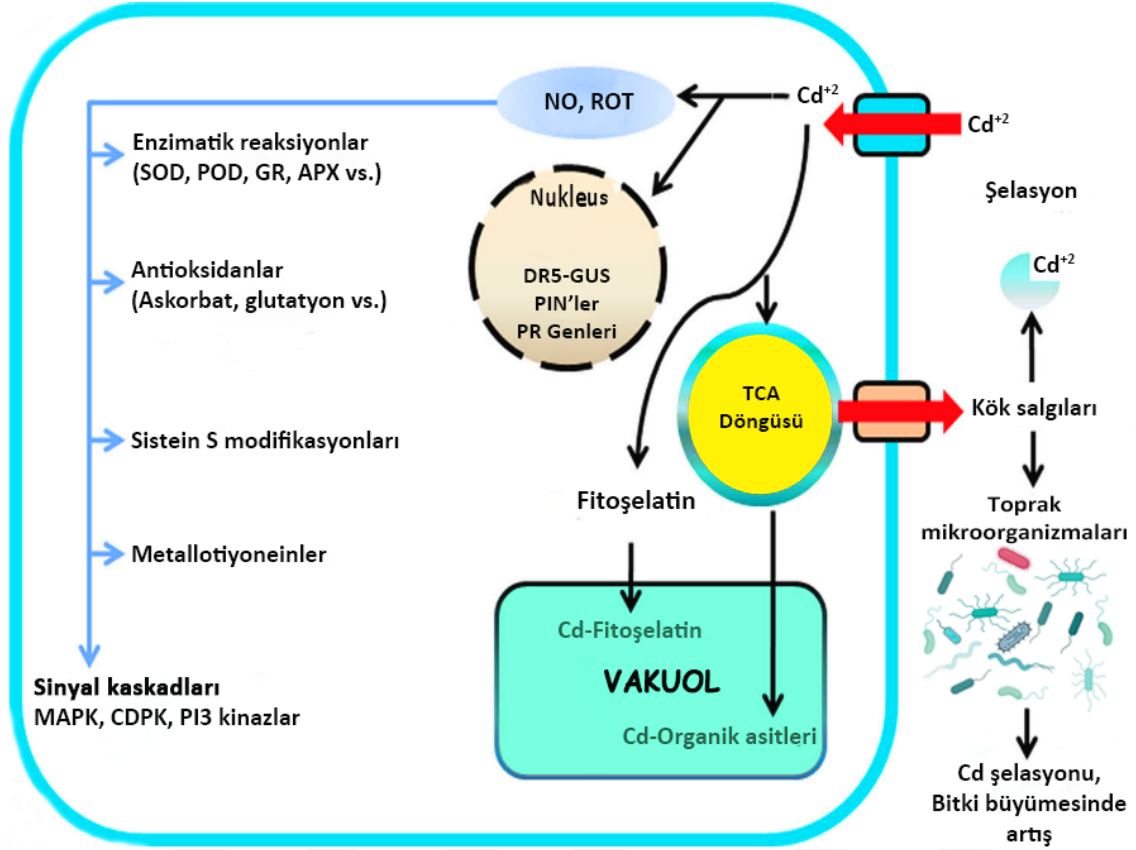
2.2.3 Kadmiyum Stresinin Bitki Gelişimi Üzerindeki Etkileri

Cd diğer ağır metallere göre nispeten daha hareketli bir elementtir ve bitki kökleri tarafından kolayca alınıp toprak üstü kısımlara taşınmaktadır (Verbruggen vd. 2009, Chang vd. 2019). Cd bitkilerin büyümesi ve üretkenliği için gerekli olan biyokimyasal, fizyolojik, morfolojik ve moleküler süreçleri olumsuz etkileyen toksik bir elementtir (Rizwan vd. 2016, Rehman vd. 2019). Bitki kökleri ağır metal stresine maruz kalan ilk bitki dokusudur ve Cd'un kök yapısına önemli düzeyde zarar vermektedir (Yan vd. 2018, Riaz vd. 2020). Kadmiyum su ve besinlerin dağılımını bozarak, fotosentezi ve solunumu azaltarak, kök uzaması ve biyokütle üretimini engelleyerek, transkripsiyon ve sinyal yollarını bozarak bitki büyüme ve gelişmesine ciddi şekilde zarar vermektedir (Dias vd. 2012, Gallego vd. 2012, Nazar vd. 2012, Clemens ve Ma 2016, Yao vd. 2018, Ismael vd. 2019). Belirli bir Cd konsantrasyonu (100 mg g^{-1}) altında hayatta kalabilen ve dokularında Cd biriktirebilen akümülatör bitkiler hariç, Cd bitki metabolizmasına zarar verebilir ve çok düşük bir seviyede ($5\text{--}10 \text{ mg g}^{-1}$) bile fitotoksositeye ve hatta bitki ölümüne neden olabilmektedir (Reeves 2000, Broadley vd. 2001, Verbruggen vd. 2009, Clemens vd. 2013). Kadmiyum toksisitesi, azot metabolizması ve karbohidrat metabolizmasını engelleyerek bitki büyüme parametrelerini önemli düzeyde etkilediği (Shahid vd. 2019) ve birçok bitki türünde fotosentezin bozulmasına (Alyemeni vd. 2018, Qin vd. 2018, Sepehri ve Gharehbaghli 2019, Ren vd. 2020) neden olduğu gösterilmiştir. Kadmiyum fitotoksitesinin neden olduğu oksidatif stresin bitkilerde ciddi fizyolojik ve biyolojik süreçlerin kesintiye uğramasına neden olduğu bildirilmiştir (Wu vd. 2016). Bitkilerde Cd toksisitesi kaynaklı oluşan reaktif oksijen türleri (ROT), moleküler fonksiyonları doğrudan veya dolaylı olarak bozmaktadır. ROT'ların fazla üretimi DNA, protein ve zar lipidlerinin yapısında bozulmalara ve bunlara bağlı olarak hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (Riaz vd. 2018, Yan vd. 2018). Organel ve organellerin zar yapısının zarar görmesi de Cd toksisitesinin yaygın bir sonucu olarak bildirilmiştir (Ali vd. 2013). Sonuç olarak, Cd'un bitkilerin büyümesini, gelişmesini, ürün verimini etkileyen ve buna bağlı olarak da insan sağlığını ciddi anlamda tehdit eden çok tehlikeli bir element olduğu bildirilmiştir (Clemens vd. 2013, Deng vd. 2019a, Riaz vd. 2020).

2.2.4 Bitkilerde Kadmiyum Sinyal Yolakları

Bitkilerde Cd birikiminin kalsiyum–kalmodulin yolunun, fitohormon sentezinin ve ROT aracılı sinyallemenin aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Hameed vd. 2016, Bali vd. 2019, Dobrikova ve Apostolova 2019, Ghosh ve Roy 2019). Bitkilerde Cd stresine yanıt olarak farklı sinyal yolakları Şekil 2.2'de sunulmuştur. Bu sinyal yolaklarından Ca^{+2} ve kalmodulin etkileşimlerinin, potansiyel toksik elementlere yanıt veren dış uyaranların habercisi ve sinyal yolağı olarak kritik bir görev aldığı rapor edilmiştir (Maksymiec 2007, Dalcorso vd. 2010, Hameed vd. 2016, Verma vd. 2016a, Vishwakarma vd. 2017, Mei vd. 2018). Cd'un bitki hücrelerine girişi, fosfolipaz C ve inositol–3–fosfatla uyarılan kalsiyum kanalları ve ADP riboz kapılı kanallar gibi çeşitli kanalların aktivitesinin bozulması nedeniyle sitozolik kalsiyum seviyelerinin artmasına neden olduğu bildirilmiştir (Garnier vd. 2006). Ca^{+2} 'daki bu artış, sırasıyla iyon taşınması ve bitki metabolizması ve stres toleransında yer alan gen ifadesinin düzenlenmesi ile ilişkili sinyal iletimini başlattığı gösterilmiştir (Hameed vd. 2016, Ghosh ve Roy 2019, Shanmugaraj vd. 2019). Örneğin, Cd stresi altındaki petunya bitkilerinde Ca^{+2}/H^{+} taşınmasında yer alan CAXcd taşıyıcısının ifadesi, Cd toleransı ve Cd birikiminde artış ile sonuçlandığı rapor edilmiştir (Wu vd. 2011).

Bitki hücrelerinde artan Cd birikiminin sinyal molekülleri olarak hareket edebilen ROT oluşumunda bir artışa yol açtığı gösterilmiştir (Lin ve Aarts 2012, Jalmi vd. 2018). Kadmiyum stresi altındaki mısır (Liu vd. 2019a), çemen otu (Zayneb vd. 2015), çeltik (Rahman vd. 2016) ve domates (Alves vd. 2017, Khan vd. 2019) fidelerinin köklerinde hızlı ROT üretimi gözlenmiştir. Kadmiyum stresi altındaki bitkilerde ROT üretiminin önemi ve Cd stresi altındaki sinyal yollarında ROT'ların rolü geniş çapta rapor edilmiştir (Baxter vd. 2014, Jain vd. 2018, Kundu vd. 2018, Mei vd. 2018). Hücre dışı ortamda Cd varlığının algılanmasının mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ağının aktivasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Ghosh ve Roy 2019). Bu sinyal mekanizmalarının Cd toksisitesine karşı bitki toleransında görev aldığı bildirilmiştir (Dalcorso vd. 2010, Chmielowska–Bak vd. 2014).



Şekil 2.2 Kadmiyum (Cd) stresi ve detoksifikasyon şeması. Cd maruz kalma sırasında metal şelatörlerin (örneğin, sideroforlar ve organik asitler) sentezi için kullanılan trikarboksilik asit döngüsü (TCA) ara maddeleri. Cd, hücre duvarlarını Zn, Fe, Cu ve Ca iyonlarına ait taşıyıcılar aracılığıyla geçer. Cd girişi, reaktif oksijen türlerinin (ROT) (örneğin, H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$ ve $\bullet OH$) ve nitrik oksidin (NO) aşırı üretimine yol açarak antioksidan enzim aktivitesi (örneğin, POD, SOD, GR) ve antioksidanların sentezinde artışa neden olur. Fazla Cd, protein S-nitrosilasyonuna ve metalotiyonin üretimine neden olur. Cd stresinde yer alan anahtar sinyal yolları sırasıyla mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), kalsiyuma bağımlı protein kinaz (CDPK) ve fosfoinositid 3-kinazlardır (PI3 kinazlar). Cd stresi ayrıca oksine duyarlı promotör (DR5-GUS), oksin akış taşıyıcıları (PIN'ler) ve patojenle ilişkili genleri (PR genleri) aktive eder. Cd stresine yanıt olarak sentezlenen fitoşelatinler, Cd'un vakuolar sekestrasyonu yoluyla Cd'a karşı bir bitki savunma sistemi görevi görmektedir (Taoufik El Rasafi vd. 2022'den değiştirilerek).

MAPK'ler, Cd stresi altında ROT üretimine bağlı olarak fosforilasyon ile aktive olan bir grup protein kinaz ailesidir (MAPK, MAPKK ve MAPKKK) (Gallego vd. 2012, Ya-Fen ve Aarts 2012, Jain vd. 2018, Jalmi vd. 2018). Kadmiyum stresi altındaki mısır fidelerinde hem *ZmMPK3-1* hem de *ZmMPK6-1* genlerinin ROT üretimine bağlı sinyal yoluyla aktive olduğu bildirilmiştir (Liu vd. 2019a). Benzer şekilde, Cd'a maruz

birakılan *Arabidopsis* bitkilerinde meydana gelen ROT birikimi, sinyal iletiminde yer alan *MPK3* ve *MPK6* genlerinin aktivasyonuna neden olduğu kanıtlanmıştır (Liu vd. 2010). Bununla birlikte, Cd stresine maruz bırakılan soya fasülyesi köklerinde, kontrol bitkilerine kıyasla daha yüksek *MAPKK2* gen ifadesi bulunmuştur (Chmielowska–Bak vd. 2013).

Ağır metal stresi altında, bitkilerdeki kalsiyum/kalmodulin sinyal yolağında aşırı ROT üretimi ve MAPK aktivasyonuna ek olarak bitki hormonlarının da görev aldığı belirtilmiştir (Hameed vd. 2016, Zhi–bin vd. 2016). Cd'a maruz kalma ayrıca Ca^{+2} 'un sitoplazmaya hızla salınmasına neden olur (Garnier vd. 2006, Yeh vd. 2007), bu da reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşmasına yol açan NADPH oksidazın aktivasyonuna neden olur (Garnier vd. 2006). Cd stresine maruz kalan patates (*Solanum tuberosum*) köklerinde (Stroiński vd. 2013) ve Cd–toleranslı *Oryza sativa* kökleri ve yapraklarında (Hsu ve Kao 2003) ABA konsantrasyonlarının önemli düzeyde arttığı belirlenmiştir. Cd stresi altındaki püsküllü saç otu (*Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv.) köklerinde, ABA artışını takiben sitokininlerin seviyesinde bir azalma olduğu gösterilmiştir (Hayward vd. 2013). Ayrıca, Cd'a maruz kalan soya fasülyesi fidelerinde, Cd ile indüklenen genlerin promotörleri ABA ve etilen sinyal yolaklarında yer alan promotörlerle bağlantılı düzenleyici motiflere sahip olduğu gösterilmiştir (Chmielowska–Bak vd. 2013). Zhao vd. (2014), Cd stresi altındaki çeltik (*Oryza sativa* L.) köklerinde absisik asit (ABA), oksin, MAPK (mitojen aktive protein kinaz) sinyali ve hücre döngüsü arasındaki bağlantıyı incelemiştir. DR5–GUS barındıran çeltik bitkilerinin GUS boyaması, ABA'nın Cd stresi altındaki köklerde oksin dağılımını etkilediğini göstermiştir. DRB (5,6–diklorobenzimidazol 1–b Dribofuranosid, bir RNA sentez inhibitörü), MG132 (bir protein yıkım inhibitörü), BFA (brefeldin A, bir protein taşıma inhibitörü) ve TIBA (2,3,5–triiodobenzoik asit, bir polar oksin taşıma inhibitörü) kullanılarak yapılan çalışma sonucunda, ABA'nın Cd stresi altında transkripsiyon, protein yıkımı ve taşıma yolları yoluyla oksin dağılımını düzenlediğini ortaya koymuştur. Köklere 11 gün boyunca Cd+ABA uygulaması, ABA seviyelerinin MAPK genlerinin transkripsiyonunu etkilediğini ve bu genlerin çeltik fidelerinde ABA tarafından farklı şekilde düzenlendiğini göstermiştir. Genel olarak, bu sonuçlar ABA'nın Cd stresine yanıt olarak oksin ve MAPK sinyalini ve hücre döngüsünü koordine ettiğini göstermektedir. Bu

durumun Cd stresinin algılanmasında ve strese yanıtta ABA'nın rol oynadığını göstermektedir (Perez Chaca vd. 2014).

2.2.5 Kadmiyum Stresinin Bitkilerde Neden Olduğu Moleküler Düzeydeki Değişiklikler

Cd stresinin morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik etkilerine ek olarak bitki genetiğini de ciddi oranda etkileyen bir abiyotik stres olduğu kanıtlanmıştır (Rizwan vd. 2017). Cd toksisitesinin, stresle ilişkili proteinlerin ve sinyal moleküllerinin sentezinde, kromozomal yapıda, hücre döngüsünde, bölünmesinde ve nükleik asitlerde bozulmalara neden olduğu gösterilmiştir (Dalcorso vd. 2010, Gill ve Tuteja 2011). Bitkilerdeki fazla metal iyonları protein ve DNA'ya bağlanarak gen mutasyonlarına ve DNA hasarına yol açan bozulmalara neden olmaktadır (Gill 2014). Cd, bitkiler tarafından kolayca alındığından düşük dozlarda bile aşırı toksisiteye neden olabileceği bildirilmiştir (Tamas vd. 2010). Bitkilerin Cd'a maruz kalması, gen modifikasyonu ve genom değişikliği dahil olmak üzere moleküler düzeyde çeşitli olumsuz etkilere neden olmaktadır. İki farklı arpa çeşidinde yapılan bir çalışma sonucunda, 15 gün boyunca 50 µM Cd içeren bir hidroponik kültürde büyütülen arpa fidelerinin gen ifadelerinde önemli değişiklikler gözlemlenmiştir (Sun vd. 2015). Buna göre W6nk2 (düşük Cd biriktiren) çeşidinde Cd stresine bağlı olarak 382 artan yönde düzenlenen ve 131 azalan yönde düzenlenen gen tespit edilmiştir. Diğer bir çeşit olan Zhenong 8'de (yüksek Cd biriktiren) ise 303 artan yönde düzenlenen ve 106 azalan yönde düzenlenen gen ile toplamda 812 genin Cd stresi altında ifadelerinin değiştiği bulunmuştur (Sun vd. 2015). Kadmiyum toksisitesi, metal detoksifikasyon mekanizmalarıyla (örneğin, fitoşelatinler ve metalloproteinler) ilişkili gen ifadesinde değişikliklere neden olduğu bulunmuştur (El Rasafi vd. 2022). Arpa köklerinde bulunan metalloproteinlerden sorumlu genler, Cd varlığında aktive olurken, fitoşelatin sentazın gen ifadesinde herhangi bir etki gözlenmemiştir (Tamas vd. 2008). Bu çalışmada, Cd'un sinyal ve detoksifikasyon yollarında yer alan genlerin ifadesini değiştirdiği sonucuna varılmıştır. Shanmugaraj vd. (2013), aşırı düzeyde Cd'a maruz kalan *Brassica juncea*'da fitoşelatin sentazı kodlayan genin mRNA ifadesinde bir artış bulmuştur. Proteinler ve kloroplastlarla ilişkili gen ifadesinde de değişiklikler gözlenmiştir. Zaripova vd. (2011), 7 gün boyunca 100 µM CdCl₂'e maruz bırakılan arpa

fidelerinde, kloroplast genlerinin transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel seviyelerde ifadelerini araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonuçları, *Rpl16*, *rpl23* ve *rpl12* gibi ribozomal proteinlere ait genlerin transkripsiyonlarında ve plastid NADH–plastokinon oksidoredüktazın alt ünite 1'i kodlayan *ndhA* gen ifade seviyelerinde artış olduğunu göstermiştir (Zaripova vd. 2011). Yüksek Cd seviyeleri, bitkilerde moleküler düzeyde yüksek toksisiteye neden olur ve bitkilerde Cd stresine verilen yanıtlarda yer alan moleküler mekanizmaları incelemek, Cd savunma stratejilerini anlamak için önemlidir (El Rasafi vd. 2022). Örneğin Cd stresi altında *ZmMPK3–1* ve *ZmMPK6–1* genlerinin ifadesi artarak ROT sistemini aktive olduğu bulunmuştur (Liu vd. 2019a). Bu durum Cd stresine maruz kalan bitkilerde peroksidaz (*ZmPRX*) gibi antioksidan enzimlerin ifadesini artan yönde düzenlendiği sonucunu desteklemiştir (Yue vd. 2016). Kadmiyum ayrıca fotosentezle ilişkili genlerin (*psbA*, *psaB*, *rbcL*) ifadesini etkilediği ve bitkilerde karbon fiksasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir (Sebastian ve Prasad 2019). Ayrıca, Cd'a (32 mg L⁻¹) maruz bırakılan *Theobroma cacao* fidelerinde, sınıf III peroksidaz (*PER–1*) biyosentezi ile ilişkili genlerin köklerde (%57) ve yapraklarda (%26) ifade artışı gösterdiği bulunmuştur (Castro vd. 2015).

2.2.6 Kadmiyum Stresinin Bitki Transkriptom Profilleri Üzerine Etkisi

Bitkilerin Cd stresine verdiği moleküler yanıt mekanizmaları karmaşık olup, çeşitli stres türlerine karşı bitki tepkilerinde yer alan gen ağlarını aydınlatmak için stratejiler geliştirmede faydalı olabileceği düşünülmektedir (Oono vd. 2014). Yeni nesil dizileme araçları kullanılarak gerçekleştirilen RNA–seq stratejisi, mRNA'lar ve kodlanmayan RNA'lar dahil olmak üzere tüm transkriptleri doğru bir şekilde ölçmek, kataloglamak ve genom çapında gen ifadesini analiz etmek için çok yararlı bir araç haline gelmiştir. Yüksek çözünürlük ve hassasiyet prensibi ile çalışan RNA–seq analizinin, genlerin transkripsiyonel yapısı hakkında ayrıntılı bilgi sağlayabileceği bildirilmiştir (Wang vd. 2009).

Bitkilerin Cd toksisitesini nasıl tolere ettikleri konusunda çok fazla çalışma yapılmıştır (Kollárová vd. 2019, Singh vd. 2019, El Dakak ve Hassan 2020). Tahıl bitkileri, Cd stresinde hayatta kalabilmek için Cd sinyallerine yanıt olarak bir dizi adaptif

mekanizma geliştirmişlerdir (Hall 2002, Garnier vd. 2006, Shu–Hua vd. 2006, Yoshihara vd. 2006, Verbruggen vd. 2009, Vert vd. 2009, Dalcorsu vd. 2010). Bu mekanizmalar moleküler, fizyolojik ve biyokimyasal olmak üzere kompleks cevaplar içermektedir (Gallego vd. 2012, Deng vd. 2019a). Cd'un oksidatif strese yol açabileceği ve birçok proteinin reaksiyon merkezindeki kritik metal iyonlarının yerini alabileceği, bunun da proteinlerin fonksiyon kaybına ve doğal iyonların salınmasına neden olabileceği öne sürölmüştür (Dalcorsu vd. 2010).

Kadmiyum tolerans mekanizmaları arasında glutatyon (GSH; γ -glutamat–sistein glisin) metabolizması ve içerdieği tiyol bileşişinin Cd toksisitesini hafifletmede anahtar bir rol oynadığı kabul edilmiştir (Sobrino–Plata vd. 2014, Hernández vd. 2015). GSH, genellikle ağır metal ve Cd stresine yanıt olarak ortaya çıkan fenilalanin amonyum liyaz, süperoksit dismutaz veya glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimlerin gen ifadesini düzenlemektedir (Schellingen vd. 2015). Son araştırmalar, glutatyon/okside glutatyon oranının (GSH/GSSG) bitkilerde Cd stresi ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (Semane vd. 2007). Bitkilerde γ -glutamilsistein sentetaz (GSH1) ve glutatyon sentetaz (GSH2), GSH sentezinde yer alırken, glutatyon redüktaz 1 (GR1) ve glutatyon redüktaz 2 (GR2), GSH sentezinin azalmasında rol oynadığı bildirilmiştir (Jozefczak vd. 2014). Cd stresinin GSH1, GSH2, GR1 ve GR2 dahil olmak üzere GSH ile ilişkili tüm genlerin transkripsiyon seviyelerini artırabileceği gösterilmiştir (Semane vd. 2007, Schellingen vd. 2015). Kadmiyum stresinin yüksek afiniteli bir sülfat taşıyıcısının (HAST) ifadesinde artışa bağlı olarak sülfat alımında bir artışa neden olduğu bildirilmiştir (Nocito vd. 2002). Sülfat, bitkilerde kükürt asimilasyon yolu ile sistein (Cys) biyosentezine yol açmaktadır. Sistein daha sonra γ -glutamat ile bağlanarak γ -glutamilsistein sentetaz (γ -GCS) tarafından katalize edilen bir peptit oluşturmaktadır. Daha sonra glutatyon sentetaz tarafından glisin eklenmesi, iki ATP'ye bağlı reaksiyonla meydana gelen tripeptit GSH'ın senteziyle sonuçlanmaktadır (Mendoza–Cózatl vd. 2005). GSH, Cd stresine maruz kalan bitkilerin Cd toleransında çok işlevli anahtar bir rol oynamaktadır. GSH, yüksek afiniteye sahip tiyol (–SH) grubu (Na ve Salt 2011) nedeniyle sadece Cd homeostazında önemli bir şelatlayıcı bileşik olmakla kalmaz, aynı zamanda Cd kaynaklı reaktif oksijen türlerine karşı etkili bir antioksidandır (Jozefczak vd. 2012, Jozefczak vd. 2014). Daha da önemlisi GSH varlığında glutatyon

S-transferazlar (GST), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimlerin gen ifade seviyeleri artış göstermektedir, çünkü GSH tiyol bileşiklerinin önemli bir öncüsüdür (Noctor vd. 2012). Örneğin, GST daha az toksik bir kompleks elde etmek için GSH'un Cd iyonları ile konjugasyonunu sağlamaktadır (Adamis vd. 2004). Ek olarak hem GST hem de GSH-Px, H₂O₂ ve organik peroksitlerin temizlenmesi için bir indirgeyici ajan olarak GSH'u doğrudan tüketmektedir (Anjum vd. 2012). GR, oksitlenmiş glutatyonu (GSSG) indirgenmiş GSH'ye dönüştürür, böylece Cd stresi altında yüksek bir GSH/GSSG oranının korunmasına yardımcı olmaktadır (Gill vd. 2013).

Bitkilerde GSH, fitoşelatin (PC) üretmek için fitoşelatin sentaz (PCS) enziminin substratı olarak görev yapmaktadır (Sheen 1996, Guo vd. 2008). PC'lerin, Cd detoksifikasyonunda önemli bir rol oynayan kararlı PC-Cd komplekslerini oluşturmak için sitoplazmik Cd'u bağlayabildiği bildirilmiştir (Brunetti vd. 2015). *Arabidopsis*'te PC sentazları kodlayan *AtPCS1* ve *AtPCS2* genlerinin GSH'dan PC üretmek için Cd sinyali ile aktive edildiği gösterilmiştir (Vatamaniuk vd. 1999). Farklı çalışmalar ayrıca, uzun süreli Cd maruziyetinin *AtPCS1* ve *AtPCS2*'nin ifade seviyelerini önemli ölçüde artırdığını doğrulamıştır (Sheen 1996, Guo vd. 2008). PC-Cd kompleksi, ATP bağlayıcı kaset (ABC) tipi taşıyıcılar tarafından taşınmaktadır. Çoğu ABC tip taşıyıcı, PC-ağır metal komplekslerinin taşınmasındaki işlevleri nedeniyle vakuoler membranda lokalize oldukları kanıtlanmıştır (Salt ve Rouser 1995, Song vd. 2014). İki ABC tipi taşıyıcısının [ATP-BINDING CASSETTE C1 (AtABCC1) ve ATP-BINDING CASSETTE C2 (AtABCC2)], Cd-stres sinyal yolunda önemli roller oynadığı ortaya çıkarılmıştır (Park vd. 2012). Bitkilerde *abcc1* ve *abcc2* fonksiyon kaybı mutantları Cd'a aşırı duyarlıyken, *AtABCC1* ve *AtABCC2*'nin aşırı ifade mutantları Cd toleransı ve birikimine karşı duyarsız olduğu gösterilmiştir (Park vd. 2012, Brunetti vd. 2015).

Ubikutinasyonla gerçekleşen protein modifikasyonlarının, Cd stresi altındaki bitkiler için kritik roller oynadığını gösterilmiştir (Cui vd. 2012, Zhou vd. 2012). Ubikuitine bağımlı proteoliz yolu, mayadaki Cd stresi sırasında aktive edilebilirken, spesifik ubikuitin-konjüge edici enzimleri olmayan mutantların Cd stresine duyarlı olduğu gösterilmiştir (Jungmann vd. 1993, Yen vd. 2005, Zhao vd. 2013). Bu sonuçlar,

ubikutinasyonun Cd-sinyal iletiminde rol oynadığını göstermektedir. Ubikuitinasyon maruz kalan proteinler, bitkilerde önemli roller oynayan ubikutin uzaklaştırıcı enzimler (DUB'ler) adı verilen özel bir proteaz enzim grubu tarafından uzaklaştırılmaktadır (Wilkinson 1997, Andrea ve Pellman 2008). Bir DUB sınıfı olan ubikuitine özgü proteazlar (UBP'ler), bitkilerde 27 UBP üyesinden oluşmaktadır (Yan vd. 2000, Doelling vd. 2001, Liu vd. 2008). UBP'ler, bitki büyümesi ve gelişiminin düzenlenmesinde yaygın olarak yer almaktadır (Zhou vd. 2012, Du vd. 2014, Xu vd. 2016). UBP16'nın *Arabidopsis*'te tuz toleransı için ubikuitine özgü bir proteaz olarak işlev gördüğü ve plazma zarı Na^+/H^+ antiportunu pozitif olarak düzenlediği bulunmuştur (Zhou vd. 2012). UBP16'nın fonksiyon kaybı mutantları, *Arabidopsis*'te tuz stresine ve Cd stresine karşı aşırı duyarlı olduğu gösterilmiştir (Zhou vd. 2012). UBP16, sodyum taşınmasını modüle etmek için fotorespirasyon ve tuz toleransında yer alan bir bileşen olan serin hidroksimetiltransferaz1 (SHM1) ile etkileşime girmektedir (Zhou vd. 2012). Ayrıca UBP16'nın, Cd'un detoksifikasyonunda işlev gören önemli bir bileşen olan ağır metal ilişkili izoprenillenmiş bitki proteini 27 (HIP27) ile etkileşime girdiği ortaya çıkarılmıştır (Zhao vd. 2013). UBP16'nın mısırdaki homologları olan *ZmUBP15*, *ZmUBP16* ve *ZmUBP19*'nın Cd stresi altında ifade seviyelerinde artış gözlemlenmiştir (Kong vd. 2019).

Artan sayıda transkriptomik çalışmalar ile çeşitli bitki türlerinde Cd stresine verilen yanıtlarda yer alan bir dizi aday geni tanımlanmıştır (Milner vd. 2014, Oono vd. 2014, Chen vd. 2015a, Gao vd. 2015, Oono vd. 2016). Bir transkripsiyon faktörü olan *AtWRKY12*'nin mRNA ifade seviyesi, Cd stresi altında keskin bir şekilde azalırken, *atwrky12* geni işlev kaybı mutantlarında Cd uygulanması sonucunda bitkilerde Cd toleransı artmış ve Cd birikimi azalış göstermiştir (Han vd. 2019). Defensin benzeri bir proteini kodlayan *OsCAL1*'in sitozolik Cd içeriğini azaltabileceği ve sitozolde Cd şelatlanmasını ve hücre dışı boşluğa Cd salgılanmasını kolaylaştırarak köklerden sürgünlere doğru uzun mesafeli taşınmayı engelleyebileceği gösterilmiştir (Luo vd. 2018). Çeltiğin (*Oryza sativa*) iki alt türü (*O. sativa* subsp. *indica* ve *O. sativa* subsp. *japonica*) arasında meydana gelen *OsCd1* gen varyasyonu nedeniyle hem kökten Cd alımında hem de tanede Cd birikiminde farklılık meydana geldiği bildirilmiştir (Yan vd. 2019).

Mısırdada 7 gün boyunca 100 µM Cd uygulamasından sonra gerçekleştirilen RNA-seq analizleri sonucunda 6342 farklı şekilde ifade olan gen (DEG) belirlenmiştir (Yue vd. 2016). DEG'lerden 2560 gen azalan yönde, 3778 gen ise artan yönde ifade olduğu belirlenmiştir. Artan yönde düzenlenen DEG'lerin %11'i bitki-patojen etkileşimi, %9'u fenilpropanoid biyosentezi, %6'sı nişasta ve süktroz metabolizması, %6'sı amino şeker ve nükleotit metabolizması, %5'i hücre döngüsü ve %4'ü fenilalanin metabolizmasında işlev gördüğü tespit edilmiştir. Buna karşılık azalan yönde ifade olan DEG'ler de 5 farklı KEGG yolunda zenginleştirilmiş ve %6'sının fenilpropanoid biyosentezi, %5'inin glikoliz/glukoneogenez yolağı, %4'ünün glutatyon metabolizması, %4'ünün sistein/metiyonin metabolizması ve %4'ünün de bitki-patojen etkileşimi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Yue vd. 2016).

Viola yedoensis bitkilerinde gerçekleştirilen de-novo transkriptom sonuçlarına göre Cd stresi altındaki bitkilerde artan yönde ifade olan 305, azalan yönde ifade olan 587 gen olmak üzere toplam 892 DEG tespit edilmiştir (Gao vd. 2015). İfadesinde farklılık gösteren DEG'lerin farklı metabolik yollarda işlev gördüğü tespit edilmiştir. Gen Ontoloji (GO) analizleri ile sınıflandırılan DEG'lerin, hücre duvarı yapısı (GO:0005618), apoplast yapısı (GO:0005618), strese yanıt (GO:0006950) ve abiyotik strese (GO:0009628) yanıtta yer aldığı bulunmuştur. Ek olarak, bazı DEG'lerin oksidoredüktaz aktivitesi (GO:0016491) ve transferaz aktivitesi (GO:0016757, GO:0016758) olarak görev yaptığı belirlenmiştir (Gao vd. 2015).

Oono vd. (2014), Cd stresine maruz bırakılmış çeltik fidelerinin gövde ve köklerinde ifade olan 60000 transkript değerlendirmiştir. Artan yönde ifade olan ROT süpürücü enzimlerin, şelatörlerin ve metal taşıyıcılarının Cd stresine başa çıkma ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Transkriptlerin Gen Ontolojisi (GO) analizlerine göre Cd stresinin kuraklık stresi ile ilişkili birçok genin artan yönde düzenlendiğini göstermiştir. Bitkilerde kuraklık stresi altında ifade olan *DREB* genlerinin ifadesinde gözlemlenen artış sonucunda çeşitli kuraklık stresi sinyal yollarındaki genlerin ifadesinin Cd stresi altında da aktive edildiği ileri sürülmüştür (Oono vd. 2014).

Cui vd. (2020), hidrojençe–zenginleştirilmiş su (HZS) uygulamasının *Medicago sativa* bitkilerinin köklerindeki etkileri RNA–seq analizleri ile değerlendirilmiştir. Kadmiyum stresi ve HZS uygulamasına maruz bırakılan kök dokularında toplam 1968 DEG RNA–seq analizi ile tanımlanmıştır. Bu DEG'lerin, GSH metabolizması, oksidatif stres ve ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıları dahil olmak üzere birçok stresle ilişkili yolakla ilişkili bulunmuştur. Bununla birlikte, gen ifadesi sonuçları, özellikle GSH metabolizmasında yer alan genlerin ifade seviyelerinin Cd stresi altındaki bitkilerde HZS uygulaması tarafından artırıldığını göstermiştir. Bir glutatyon sentez inhibitörü ve *Arabidopsis thaliana cad2–1* mutantları ile gerçekleştirilen ek deneyler HZS teşvikli Cd toleransında GSH'un belirgin rolünü ortaya koymuştur. Ek olarak, Cd toksisitesinin HZS uygulaması ile hafifletilmesinin, ABC kaset proteinlerinin artan seviyesine bağlı olarak köklerdeki Cd birikimindeki azalmadan kaynaklanabileceği öne sürülmüştür (Cui vd. 2020).

2.3 Kadmiyum Stresinde Farklı İyileştiricilerinin Transkriptomik Profiller Üzerine Etkisi

2.3.1 Fitohormonlar

Çeşitli fitohormonların bitkilerde Cd stresine karşı yanıtlarda rol oynadıkları ortaya konulmuştur (Sneideris vd. 2015). Kadmiyum stresi altındaki *Arabidopsis* bitkilerine brassinosteroid uygulamasının, Cd'un neden olduğu kök büyümesi inhibisyonunu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Bu durum brassinosteroid sinyali ile Cd arasında fonksiyonel bir etkileşim olduğunu göstermiştir (Villiers vd. 2012). Domateste, brassinosteroidlerin, Cd kaynaklı oksidatif stres ve fotosentetik inhibisyonun hafifletilmesindeki rolü de ortaya konmuştur (Hasan vd. 2011, Ahammed vd. 2013).

Abiyotik streslere karşı bitki tepkilerinde yer alan önemli bir fitohormon olan gibberellik asitin, *Arabidopsis*'te Cd'a bağlı NO birikimini ve Cd⁺² alımı ile ilişkili genlerin ifadesini azaltarak Cd toksisitesini hafiflettiği rapor edilmiştir (Zhu vd. 2012). *Kandelia obovata* fidelerinde dışsal metil jasmonat uygulamasının toprak üstü kısımlarda Cd birikimini inhibe ettiği gösterilmiştir (Chen vd. 2014). Kadmiyum

stresinin *Arabidopsis*'te etilen biyosentezini ACS2 (ACC sentetaz 2) ve ACS6 (Schelling ACC sentetaz 6) ifadesini artırarak indüklediği gösterilmiştir (Schelling vd. 2014). ACC sentezi, etilen biyosentezinde hız sınırlayıcı adımdır ve hem ACS2 hem de ACS6'nın transkript seviyeleri Cd stresi altında yüksek seviyelerde artış göstermiş ve böylece Cd kaynaklı etilen üretimindeki artışın önemini ortaya koymuştur (Schelling vd. 2014).

Çeşitli bitki türlerinde oksin ve Cd stresi arasında yakın bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Arpada, Cd kaynaklı hafif oksidatif stresin kök ucundaki indol-3-asetik asidi (IAA) sinyalini düzenleyerek kök büyümesinin inhibisyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Tamas vd. 2012). Çeltik fidelerinde oksin sinyalinin Cd stresi altında hücre döngüsü genlerinin ifadesinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Zhao vd. 2012). Mısırdan oksin tarafından düzenlenen ve bitki büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan GH3 genlerinin Cd toksisitesinin azaltılması da dahil olmak üzere birçok abiyotik stres koşullarında ifade olduğu rapor edilmiştir. GH3 gen ifadesi ile sentezlenen GH3 proteinleri, oksin konjugasyonunu katalize ederek ve serbest IAA amino asitlere bağlayarak oksin homeostazına katılmaktadır. Buna göre, Cd stresi altında mısır köklerinde serbest IAA içeriklerinin baskılanması ile Cd ve GH3 aracılı oksin seviyeleri arasında bir etkileşim olduğu kanıtlanmıştır (Feng vd. 2015).

Bitkilerde bir fenolik bileşik olan salisilik asit (SA)'ın, bitki büyüme, gelişme ve bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesinde pozitif veya negatif düzenleyici olarak önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Chen vd. 2009, Davies 2010, An ve Mou 2011, Rivas-San ve Plasencia 2011, Kawano ve Bouteau 2013, Guo vd. 2019). SA, çeşitli stres koşulları altında tohum çimlenmesini, fotosentezi, terlemeyi ve zar oluşumunu arttırdığı bulunmuştur (Mostofa ve Fujita 2013, Khan vd. 2015, Ahmad vd. 2019a). SA, Cd toksisitesine karşı koruma (Asgher vd. 2014) dahil olmak üzere, biyotik ve abiyotik streslere karşı bitki toleranslarını artırmak için doğal bir sinyal molekülü olarak işlev görmektedir (Hayat vd. 2010, Khan vd. 2014). SA'nın, Cd'a karşı bitki toleransını önemli ölçüde iyileştirdiğini kanıtlayan birçok çalışma mevcuttur (Metwally vd. 2003, Shi vd. 2009, Wang vd. 2013, Zhang vd. 2015). SA, bitki organlarında Cd alımını ve birikimini azaltarak (Drazic ve Mihailovic 2009, Shi vd. 2009), membran bütünlüğünü ve

stabilitesini koruyarak (Belkadhi vd. 2015), hidrojen peroksit (H_2O_2) birikimini azaltarak (Zhang vd. 2011), diğer bitki hormonları ile etkileşime girerek (Hayat vd. 2010, Tama's vd. 2015), ROT'lerini temizleyerek ve antioksidan savunma sistemini güçlendirerek (Popova vd. 2009, Belkadhi vd. 2010, Agami ve Mohamed 2013, Guo vd. 2013, Li vd. 2014), fotosentetik kapasiteyi iyileştirerek (Krantev vd. 2008, Janda vd. 2014) Cd toksisitesini hafifletebileceği gösterilmiştir. Salisilik asidin, GSH sentezindeki hız sınırlayıcı adımı düzenleyerek Cd stresine karşı toleransı artırdığı bildirilmiştir (Guan vd. 2015). Ayrıca SA'in, birkaç önemli genin ifadesinde bir sinyal molekülü olarak işlev görebileceği de gösterilmiştir (Kang vd. 2014). *Arabidopsis* bitkilerinde, *nahG* (salisilat hidroksilaz) gen ifadesindeki artışın Cd stresine karşı toleransı sağlayabileceği ve bununla ilişkili mekanizmaların yaprak antioksidan kapasitesi ve fotosentetik süreçlerle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Zawoznik vd. 2007, Tao vd. 2013, Wang vd. 2019). Kadmiyum stresi altındaki bitkilere dışsal SA uygulaması ROT detoksifikasyonunu arttırmıştır (Wang vd. 2019). Endojen SA düzeylerinin Cd stresi altında kök oksidatif hasar, antioksidan kapasite ve redoksla ilişkili genlerin ifade seviyelerinde SA'in Cd stresinin etkilerini azaltmada etkili olduğu bulunmuştur (Zhao vd. 2021). Zhao vd. (2021), Cd stresi altındaki *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde endojen SA düzeylerinin iyileştirici etkilerini incelemiştir. Salisilik asit öncüsü olan asetil salisilik asit (AsA) metabolizmasında, monodehidroaskorbatın indirgenme basamağında katalizör olarak görev yapan *MDAR2* geni, alternatif oksidaz (AOX) aracılı elektron taşıma sisteminin ifadesinde rol oynayan *AOX2* geni, biyotik stres dahil olmak üzere çok sayıda farklı biyolojik süreçte yer aldığı bilinen solunum patlaması oksidaz homoloğu (RBOH) ifadesinde rol oynayan *RBOHF* geni, fenilpropanoid yolunda anahtar enzim olan fenilalanin amonyum liyaz (PAL) enzimini kodlayan *PAL1* geni ve yine fenilpropanoid yolunda yer alan sinamik asit 4-hidroksilaz (C4H) ve 4-kumarik asit:CoA ligaz (4CL) enzimlerini kodlayan *C4H* ve *4CL3* genlerinin artan ifade seviyelerini belirlemişlerdir. Dışsal SA'in Cd stresi altındaki patatesta (*Solanum tuberosum*) *StSABP2*, *StSOD* ve *StAPX* dahil olmak üzere savunmayla ilişkili genlerin ifadesini uyardığı gösterilmiştir (Li vd. 2019).

2.3.2 Nitrik Oksit

Nitrik oksit (NO), gaz formunda, küçük molekül, suda ve yağda çözünen bir bileşik olarak bitkilerde görev yapan çok önemli bir ikincil haberci olarak kabul edilmektedir (Baudouin ve Hancock 2014, Santolini vd. 2017, Sami vd. 2018, Mukherjee 2019). NO'nin, tohum çimlenmesi, stoma kapanması, olgunlaşma ve yaşlanma, biyotik ve abiyotik streslere yanıt, programlanmış hücre ölümü dahil olmak üzere bitkilerde bir dizi farklı fizyolojik süreçte yer aldığı gösterilmiştir (Akram vd. 2018, Kaya vd. 2019). NO'nin aracılık ettiği strese karşı koruma, NO'nin ROT seviyesini ve toksisitesini düzenleme yeteneğine dayanmaktadır (Meng vd. 2022). NO'nin, bitki büyümesi ve gelişmesinde yer alan hidrojen sülfür (H₂S), amonyak (NH₃) ve karbon monoksit (CO) ile birlikte stres savunmasında görev aldığı rapor edilmiştir (Peco vd. 2020, Qiu vd. 2021, Zhang vd. 2021). Ayrıca NO'nin, bitkiler stres koşullarına maruz kaldığında reaktif azot türleri (RNT) olarak bilinen peroksinitrit anyonu (ONOO⁻), nitroz oksit (N₂O₃) ve S-nitrosoglutatyonun (GSNO) yüksek konsantrasyonlarda üretildiği gösterilmiştir (Ahmad vd. 2019b). Hücrelerde aşırı RNT kaynaklı nitrozilasyonun DNA, membran lipidleri, proteinler ve karbohidratlara zarar vererek hücresel işlevi etkilediği gösterilmiştir (Corpas vd. 2007). NO'nin, hücre içinde yayılarak sinyal yollarını tetiklediği ve ilişkili direnç genlerinin ifadesini düzenlediği (Leitner vd. 2009), proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonunda rol aldığı ya da diğer proteinlerle etkileşime girerek bitki savunma yanıtlarında sinyal molekülü olarak görev yaptığı rapor edilmiştir (Bellin vd. 2013, Sami vd. 2018, Hancock ve Whiteman 2016). Kadmiyum stresine maruz kalan bitkilerde ROT ve RNT seviyelerinin artış gösterdiği bildirilmiştir (Liu vd. 2018b). NO, bitkilerde Cd stresine bağlı meydana gelen serbest radikal oluşumuna yanıtta bir sinyal molekülü olarak stres savunma genlerinin ifadesinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (Chmielowska-Bak ve Deckert 2013). Bu bağlamda NO'nin birçok bitki türünü Cd'un neden olduğu oksidatif strese karşı koruyabileceği kanıtlanmıştır (Gill vd. 2013, Arora ve Bhatla 2017, Qiu vd. 2021)

Arabidopsis bitkilerinde 1 mM S-nitrozosistein (CysNO) uygulamasının yaprak dokularında 6436 genin (3448 artan yönde ifade olmuş ve 2988 azalan yönde ifade olmuş) ifade seviyelerinde değişime neden olduğu tespit edilmiştir (Hussain vd. 2016).

İfadesinde farklılık gösteren bu genlerin, çeşitli biyotik ve abiyotik streslere karşı bitki savunması, hormon sinyali ve diğer gelişim süreçleri dahil olmak üzere temel fizyolojik süreçlerde yer aldığı bulunmuştur (Hussain vd. 2016). Kadmiyum stresi ve dışsal NO uygulamasına maruz bırakılan *Pleurotus eryngii* bitkilerinde RNA-seq analizleri gerçekleştirilmiştir (Li vd. 2018). Yapılan transkriptomik analiz sonucunda, ısı şoku proteinlerini (HSP'ler) kodlayan genlerin, gliserolipid metabolizmasına ve steroid biyosentezine katılan genlerin artan yönde ifade olduğu bulunmuştur. Ayrıca NO uygulamasının oksidoredüktaz, dehidrogenaz, redüktaz, transferaz genlerini ve GTPaz aktivatör aktivitesi, transkripsiyon faktörü kompleksi, ATP bağlanması, GTP bağlanması ve enzim aktivatör aktivitesi gibi transkripsiyon faktörlerinin ifadesini önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (Li vd. 2018).

2.4.4 Glutasyon

Bitkiler Cd stresine maruz kaldığında reaktif oksijen türlerinin aşırı üretildiği bildirilmiştir (Zhou vd. 2018). Cd stresi altında transkripsiyon faktörlerinin ve genlerin anormal ifadesi temel hücre bileşenlerini bozarak hücrelerin apoptozuna neden olduğu rapor edilmiştir (Farooq vd. 2019). Ağır metaller, GSH'un sistein birimlerinin -SH gruplarına bağlanarak kararlı kompleksler oluşturmakta ve daha sonra metal kompleksleri taşıyıcılar aracılığıyla vakuollere taşınarak (Anjum vd. 2015) ağır metalin sitozoldeki toksisitesini azaltılmasına neden olmaktadır (Figueira vd. 2014). Bu nedenle GSH'un, ağır metal stresi altındaki bitkilerde detoksifiye edici mekanizmaların bir parçası olduğu ve antioksidan etkisi sayesinde bitkilerdeki ROT seviyelerini koruduğu bildirilmiştir (Song vd. 2020). GSH'un H₂O₂'i temizleyen indirgeyici ajan olarak askorbat AsA-GSH döngüsü aracılığıyla Cd toksisitesi kaynaklı oluşan reaktif oksijen türlerini temizlediği rapor edilmiştir (Joshi vd. 2019). GSH'un, H₂O₂'yi detoksifiye etmek için glutasyon peroksidaz (GPX) için de bir substrat olarak görev yaptığı gösterilmiştir (Nahar vd. 2015). Çeltik bitkilerinde aşırı GSH'un aşırı ifadesinin Cd toleransını arttırdığı ve fotosentetik performansı iyileştirdiği bildirilmiştir (Venkataramaiah vd. 2011, Hasan vd. 2015). Fitoşelatin sentaz (PCS) tarafından GSH, ağır metalleri apoplastlarda veya vakuollerde alıkonulmalarını kolaylaştırabilen fitoşelatinlere (PC'ler) dönüştürmektedir (Peco vd. 2020).

2.4.5 Hidrojen Sülfür

Hidrojen sülfür (H_2S) bitkilerde NO ve CO gibi gaz formunda olan ve sekonder haberci olarak görev yapan bir bileşiktir (Dorman vd. 2001, Wang 2002). H_2S ilk olarak mısır (*Zea mays* L.), salatalık (*Cucumis sativus* L.), kabak (*Cucurbita pepo* L.) ve soya fasulyesinde (*Glycine max* L.) tespit edilmiştir (Zhang vd. 2021). H_2S , tiyol grubunun ($-SH$) bir persülfid grubuna ($-SSH$) dönüştürülmesi ile hedef proteinler üzerindeki reaktif sistein kalıntılarının persülfidasyonu veya S-sülfidasyonu ile aktivite gösterdiği kanıtlanmıştır (Aroca vd. 2017). Bitkiler endojen olarak sülfat, sülfid, bisülfid veya L-sisteine maruz kaldıklarında H_2S üretiminde gözlemlenen artış, H_2S emisyonunun bitkilerin doğal koşullar altında oluşan fazla inorganik kükürdü uzaklaştırmasına yardımcı olduğunu göstermiştir (Zhang vd. 2021). H_2S 'ün, bitkilerde tohum çimlenmesi (Chen vd. 2018), fotosentez (Chen vd. 2015b), çiçek yaşlanması (Liu vd. 2017) ve bitkilerdeki biyotik ve abiyotik streslerin olumsuz etkilerinin hafifletilmesi (Guo vd. 2016) gibi çeşitli metabolik süreçlerde sinyal molekülü görevi gördüğü bildirilmiştir (Fatma vd. 2016, Ahmad vd. 2018). H_2S bitkilerde ağır metal toksisitesini azaltmak için, toksik metallerin alımını ve taşınmasını en aza indirerek vakuolde alıkonulmasının artırılmasında görev aldığı gösterilmiştir (Gong vd. 2020). H_2S , *Populus euphratica* hücrelerinde, sitozolde Cd içeriğini sınırladığı ve vakuollerde Cd alıkonulmasını artırarak Cd alımını ve taşınmasını değiştirdiği gösterilmiştir (Sun vd. 2013). Benzer şekilde, H_2S *Brassica napus*'ta Cd alımını önleyerek, Cd kaynaklı büyüme inhibisyonunu azalttığı bildirilmiştir (Ali vd. 2014). H_2S 'ün ROT temizleme yeteneği sayesinde hücresel Cd homeostazının korunmasında görev aldığı gösterilmiştir (Zhao vd. 2022). Oksidatif hasarın azaltılması, bitkilerin Cd ile kirlenmiş ortamlarda hayatta kalabilmeleri için çok önemlidir (Zhao vd. 2022). Bu bağlamda H_2S , antioksidan kapasiteyi artırarak ROT birikimini azalttığı bildirilmiştir (Mostofa vd. 2015, Banerjee vd. 2018, Huang vd. 2019). H_2S ile muamele edilmiş ve Cd'a maruz bırakılan *Populus euphratica* bitkilerinde APX, CAT ve GR aktivitesinin arttığı, bu durumun da H_2O_2 içeriğinin azalmasına ve daha az lipid peroksidasyonuna yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca, H_2O_2 ile aktive olan plazma zarı Ca^{+2} kanallarından Cd alımının azalış gösterdiği bildirilmiştir (Sun vd. 2013). H_2S uygulaması ile SOD, POD, CAT ve APX enzimlerinin aktivitesindeki artışlar yonca (Li vd. 2012), *Brassica rapa* (Zhang vd.

2015) ve eltik (Mostofa vd. 2015) gibi bitkilerde de gösterilmiştir. Ayrıca H₂S uygulamasının GSH içeriğini artırarak redoks homeostazını korumanın yanı sıra metilglioksal (MG) ve ROT detoksifikasyonunu geliştirdiği bildirilmiştir (Mostofa vd. 2015). H₂S’n yonca fidelerinde lipid peroksidasyonunu azalttığı bildirilmiştir (Li vd. 2012). H₂S uygulaması ile ROT seviyelerindeki azalış fotosentetik sistemdeki Cd hasarını azaltmıştır (Zhao vd. 2022). Cd'a maruz kalan *Brassica napus* bitkilerinin yaprak dokularında gerçekleştirilen bir çalışma sonucunda, H₂S’n fotosentetik performansı, besin alımı ve fotosentetik zar yapısını iyileştirdiği gösterilmiştir (Ali vd. 2014). Yine Cd'a maruz kalan tilkikuyruğu fidelerinde H₂S uygulaması ile fotosentezde artış gözlemlenmiştir (Tian vd. 2016). H₂S, *Populus euphratica* hücrelerinde Cd kaynaklı programlanmış hücre ölümünü iyileştirebileceği gösterilmiştir (Sun vd. 2013). H₂S, *Arabidopsis*'in Cd stresine karşı toleransını iyileştirmek için salisilik asit sentezinde bir sinyal molekülü olarak rol oynadığı bildirilmiştir (Shi vd. 2014, Tian vd. 2016, Aroca vd. 2018).

H₂S’n, ağır metallerin olumsuz etkilerini azaltmak için sistein, salisilik asit, prolin, NO, metil jasmonat (MeJA) ve kalsiyum bağımlı protein kinaz (CDPK) ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (Qiao vd. 2015). *Arabidopsis thaliana*'da H₂S’n sisteinlerin perslfidasyonunu teşvik ederek CAT aktivitesini düzenlediğini rapor edilmiştir (Aroca vd. 2018). H₂S’n Cd stresi altındaki bitkilerde stoma hareketini ve redoks durumunu destekleyerek fide büyümesinde belirgin bir artışa neden olduğu bildirilmiştir (Tian vd. 2016).

H₂S’n bitki savunmasında görev alan enzimlerle ilişkili genleri düzenleyerek bitkilerin strese karşı yanıtında rol oynadığı bildirilmiştir (Fang vd. 2016). H₂S’n prolin–5–karboksilat redüktaz (P5CR) ve prolin dehidrojenaz (PDH) genlerinin aktivitesini ve transkripsiyonunu artan yönde düzenleyerek prolin içeriğini arttırdığı gösterilmiştir (Tian vd. 2016). Bununla birlikte, H₂S’n sistein metabolizması ile ilişkili genler olan *OASTLa*, *SAT1* ve *SATS*'ın ifadesini düzenlediği ve fitoşelatin içeriğini artıran H₂S–Cys sisteminin artan yönde düzenlenmesini desteklediği gösterilmiştir. Bunlara ek olarak, fitoşelatin sentetaz genlerinin (*PCS1* ve *PCS2*) ifadesini arttırdığı ve metallothionein (MT) ile ilişkili gen *MT2A*'nın ifadesini düzenlediği rapor edilmiştir

(Fang vd. 2016, Saud vd. 2022). Fang vd. (2014), H₂S'ün *Seteria italica*'da PC'ler (PCS, plastosiyanin sentetaz), MT (MTA3, metallothionein 3a) ve diğer ağır metal şelatlayıcı genlerinin ifadesinin arttığını ve bunun sonucunda ağır metal stresinin hafifletildiğini göstermiştir. Buğdayda eksojen H₂S uygulamasının sentaz–hemi–oksijenaz–1 (H0–1) gen ifadesini düzenlediği ve buna bağlı olarak endojen CO üretimini uyararak giberellinin (GA) inhibisyonunu geciktirdiği gösterilmiştir. Böylece H₂S'ün buğday alöron tabakasındaki programlanmış hücre ölümünü geciktirdiği gösterilmiştir (Xie vd. 2014). H₂S'ün oksidoredüktaz genlerini düzenleyerek çinko stresini azaltabileceği gösterilmiştir (Liu vd. 2016). Yine H₂S'ün antioksidan enzimle ilişkili gen *CAT2* ve oksidazla ilişkili olan *CSD*, *FSD* ve *pAPX*'in genlerinin ifade seviyelerini düzenleyerek H₂O₂ detoksifikasyonunu artırdığı ve böylece çinko kaynaklı oksidatif stresi azalttığı rapor edilmiştir (Liu vd. 2016).

H₂S'ün hormon biyosentezi ile ilişkili genlerin [*NCED1/6*, *GA2ox7*, *IAA oksidaz*, *4C0*, *lipoksigenaz* ve *TFs (AP2)*] ifade seviyelerini düzenlediği gösterilmiştir (He vd. 2012). Jasmonik asit (JA), stomaların kapanmasını teşvik eden bitkiye özgü bir büyüme düzenleyicisidir (Han vd. 2018). Deng vd. (2019), *Arabidopsis thaliana* kotiledonlarında yaptıkları çalışma sonucunda, H₂S'ün stomalarla ilişkili genlerin ifadesini baskıladığını ve stomalarla ilişkili sinyal yolunda yer alan *TOO MANY MOUTHS (TMM)*, *STOMATAL DENSITY* and *DISTRIBUTION1 (SDD1)* ve *SPEECHLESS (SPCH)* genlerinin ifadelerinde değişikliğe neden olarak stoma gelişimini düzenlemek için JA sinyal yolu ile birlikte çalıştığı gösterilmiştir (Deng vd. 2019b). H₂S'ün etilen ile etkileşime girerek, muz bitkilerindeki antioksidan geni *MaAPX*'i, hastalık direnç geni *MaPAL*'ı, sinyal iletim genleri *MaETR*, *MaERS1*, *MaERS2* ve *MaERS3*'ün ifade seviyelerini arttırdığı rapor edilmiştir (Al Ubeed vd. 2017).

2.4.6 Sistein

Esansiyel bir amino asit olan sisteinin (Cys), bazı proteinlerin üç boyutlu yapısının sağlanmasından redoks stabilitesini sürdürmeye kadar çeşitli hayati fonksiyonlara sahip olduğu gösterilmiştir (Romero vd. 2014). Cys, içerdiği tiyol grupları sayesinde

metallere bağlanmanın yanı sıra reaktif oksijen türleri ile de kolaylıkla reaksiyona girerek onları etkisiz hale getirebilmekte ve bitkileri strese karşı koruyabilmektedir (Cooper vd. 2011, Genisel vd. 2015). Sisteinin GSH ve H₂S öncüsü, bir ağır metal şelatörü ve güçlü bir antioksidan olduğu iyi belgelenmiştir (Vadas ve Ahner 2009, Genisel vd. 2015). Azot ve kükürt yolları arasındaki kritik koordinasyon, çevresel stres etkenleri altında metabolit sentezini artan yönde düzenleyerek savunma sistemlerini geliştirmektedir (Khan vd. 2016). Cys, kükürt asimilasyonunun bir son ürünü olarak üretilir ve bir kükürt donörü olarak kullanılabilir. GSH ve PC gibi azot içeren metabolitlerin üretimi, ağır metal toleransında önemli bir işleve sahiptir. Bu nedenle Cys, iki ana süreç arasındaki dengeye aracılık ederek ağır metal toleransını kolaylaştırdığı rapor edilmiştir (Fang vd. 2016). Cys, endojen H₂S üretimi için ana substrat olmasının yanı sıra bitkilerde kükürt asimilasyonunun ilk organosülfür bileşiği ve organik kükürt bileşikleri için başlıca indirgenmiş kükürt vericisidir (Takahashi vd. 2011). Cys'den H₂S üretimi için L-Cys desülfhidraz (LCD) ve D-Cys desülfhidraz (DCD) enzimlerinin kritik rol oynadığı kanıtlanmıştır (Riemenschneider vd. 2005). Genisel vd. (2015), arpada tuzluluğun neden olduğu oksidatif hasarın Cys uygulaması ile yatıştırıldığını bildirmiştir. Başka bir araştırmada, N-asetil-sistein (NAC) uygulamasının, Cd stresi altındaki *Solanum nigrum* fidelerinde Cd'un neden olduğu inhibisyonları azalttığı rapor edilmiştir (Deng vd. 2010). Benzer şekilde, Sun vd. (2014), Cd toksisitesine maruz kalan iki farklı arpa çeşidinde dışsal NAC uygulamasının stresin zararlı etkilerini ortadan kaldırabileceğini bildirmiştir. Literatürde Cys stres koşulları altında bitkilerdeki direkt etkilerine dair transkriptomik çalışma mevcut değildir. Yapılan çalışmalarla Cys'in özellikle bir ağır metal şelatörü ve güçlü bir antioksidan olduğu kanıtlanırsa da (Vadas vd. 2009, Genisel vd. 2015) moleküler düzeydeki etki mekanizmalarının anlaşılmasına yönelik çalışmalar özellikle H₂S üzerine yoğunlaşmıştır (Wirtz vd. 2004, Erdal ve Türk 2016, Fang vd. 2016, Zhang vd. 2021).

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 kağıdı üzerine yerleştirilmiş ve kontrollü koşullarda (25°C sabit sıcaklık ve karanlıkta) 48 saat süreyle 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, 75 μM Cd stresi [kadmiyum klorür (CdCl_2)] ve/veya 250 μM Cys'in 4 farklı uygulamalarına 10 gün boyunca maruz bırakılmıştır. Literatür taramaları dikkate alınarak etkili Cd (75 ve 100 μM) ve Cys (250 μM) test konsantrasyonlarını belirlemek için ön çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Cd konsantrasyonu büyüme inhibisyonu temelinde 75 μM olarak belirlenmiştir. Etkili Cys konsantrasyonu ise Cd'un neden olduğu büyüme inhibisyonunu azaltma etkisi temelinde 250 μM olarak belirlenmiştir. Uygulama grupları şunlardır:

- 1) Kontrol: Sadece besin çözeltisi
 - 2) Cys: 250 μM Cys içeren besin çözeltisi
 - 3) Cd: 75 μM Cd içeren besin çözeltisi
 - 4) Cys + Cd: 250 μM Cys + 75 μM Cd içeren besin çözeltisi
- Kaplardaki besin çözeltileri gün aşırı değiştirilmiştir.

Uygulamalardan sonra fide büyümesi, Cd 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 Taze ve Kuru Ağırlıklarının Belirlenmesi

Kontrol, Cys, Cd ve Cys+Cd uygulamalarına maruz bırakılan mısır fidelerinin gövde ve kök taze ağırlıkları (TA, mg fide⁻¹) belirlendikten sonra 80°C 'lik etüvde 48 saat kurutulmuş ve bu süre sonunda gövde ve kök kuru ağırlıkları (KA, mg fide⁻¹) belirlenmiştir.

3.3 Kadmiyum Birikiminin Belirlenmesi

Kontrol, Cys, Cd ve Cys+Cd uygulamalarına maruz kalan mısır fidelerinden örneklenen kurutulmuş gövde ve kök dokularında Cd 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 Cd 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 Cd konsantrasyonları Winlab32 paket programı kullanan ICP/OES (Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry, Perkin Elmer 2100 DV) cihazı ile hesaplanmıştır. Cd için analitik belirleme limiti $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ olacak şekilde ayarlanmıştır. Cd birikimi $\mu\text{g g}^{-1}$ KA olarak hesaplanmıştır.

3.4 Klorofil İçeriğinin Belirlenmesi

Kontrol, Cys, Cd ve Cys+Cd 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 absorbanları 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

3.5 Malondialdehit İçeriğinin Belirlenmesi

Kontrol, Cys, Cd ve Cys+Cd 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 tiyobarbitirik asit (TBA; %0,5) içeren TCA (%20) çözeltisi ilave edilmiştir. Bu karışım 95°C'ye ayarlanmış sıcak su banyosunda 30 dakika tutulmuştur. Sıcak su banyosundan uzaklaştırılan örneklerdeki reaksiyonları durdurmak için tüpler buz banyosuna alınmıştır. Daha sonra test tüplerine (2 mL) alınan örnekler santrifüj (10.000 ×g, 10 dakika) edilmiştir. Süpernatantlar kuvars küvetlere alınmış ve TU-1880 Double Beam UV-VIS spektrofotometrede 532 ve 600 nm dalga boylarında absorbanları ölçülmüştür. TBA (%0,5) içeren TCA (%20) çözeltisi kör (örnek içermeyen) olarak kullanılmıştır. Yaprak dokularının MDA içeriği molar ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak µmol g⁻¹ TA olarak belirlenmiştir.

3.6 Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Kontrol, Cys, Cd ve Cys+Cd 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.

3.6.1 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.

3.6.2 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, guaiakolün ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak µmol min⁻¹ mg⁻¹ protein olarak belirlenmiştir.

3.6.3 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.

3.6.4 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 H_2O_2 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 $\text{EU dk}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein olarak hesaplanmıştır.

3.7 RNA–Seq Analizleri

3.7.1 RNA Ekstraksiyonu

Kontrol, Cys, Cd ve Cys+Cd 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 taktirde 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 taktirde 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 taktirde lizat içeren kolon 14.000 rpm’de bir dakika daha santrifüjlenmelidir.

- b) Toplama tüpündeki süzöntü 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 süzöntü 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 süzöntü 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.

3.7.2 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 bağı manyetik boncuklar kullanılarak poli-A içeren mRNA molekülleri saflaştırılmıştır.
- d) RNA depleksiyonunun ardından, mRNA yüksek sıcaklık altında iki değerlikli 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 "daireleştirme" 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 değerlendirilmesi 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 genomu 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). Anlamli terimleri p-değeri ($p < 0,05$) eşğine 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 RNA-Seq Verilerinin Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR (qPCR) ile Doğrulanması

Kontrol, Cys, Cd ve Cys+Cd uygulamalarına maruz bırakılan mısır fidelerinin yaprak dokularında gerçekleştirilen RNA-seq analizleri sonucunda elde edilen veriler içerisinde, patojenle ilişkili protein 10 (Q29SB6_MAIZE, *PR10*), reseptör-benzeri serin/treonin protein kinaz (A0A1D6KIH3_MAIZE, *RPK*), ABC taşıyıcı G ailesi üye 34 (A0A1D6KKY0_MAIZE, *ABCG*), selüloz sentaz (A0A1D6KTX6_MAIZE, *CesA*), peroksidaz (B4FG39_MAIZE, *POD*), glutatyon S-transferaz (A0A1D6N1E8_MAIZE, *GST*), fenilalanin amonyum-liyaz (A0A804NTK5_MAIZE, *PAL*), dehidrin 1 (A3KLI1_MAIZE, *DHN1*) ve S-adenozilmetiyonin sentaz (K7VC35_MAIZE, *SAMS*) genleri seçilerek qPCR ile doğrulanmıştır.

Kontrol, Cys, Cd ve Cys+Cd uygulamalarına maruz bırakılan mısır fidelerinin 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. Dokuz gen için Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>) aracılığıyla varsayılan parametreler kullanılarak primerler sentezlenmiş ve benzersizlikleri BLAST aracılığıyla NCBI nr (non redundant) veri tabanında, erime eğrisi analizine göre kontrol edilmiştir. Primer dizilerinin listesi Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Mevcut çalışmada qPCR analizi için kullanılan primerlerin listesi

Gen	Uniprot Gen Adı	İleri Primer (5' – 3')	Geri Primer (5' – 3')
<i>PR10</i>	Q29SB6_MAIZE	CGCAAGCAGAAGCTACAATCC	TGGCGGAGGCCATTACTACT
<i>RPK</i>	A0A1D6KIH3_MAIZE	TIGGGTGGCCAATCGGGATA	GATGACCATATGGGTGCTTCCT
<i>ABCG</i>	A0A1D6KKY0_MAIZE	CTGGGCTGGTGATCAAAACAA	ATTCGGCGACITGCATTACAC
<i>CesA</i>	A0A1D6KTX6_MAIZE	CCAAGAGCCCCAAGAAGCCT	TGAAGGACGACAGCGTCTGG
<i>POD</i>	B4FG39_MAIZE	CATCAGTTGCCTTCCTTGGTG	CGGTGTGGTTTCTTCACGAC
<i>GST</i>	A0A1D6N1E8_MAIZE	GCCGTTGGTCCAGAGAGTA	GTACGCCTCCTTCCTTCAG
<i>PAL</i>	A0A804NTK5_MAIZE	GAGAGCGACCCGCTGAACTG	GGAACCCCTCGATCTTGACCAC
<i>DHN1</i>	A3KLI1_MAIZE	CACACAAGCACGAAGACTCG	GACTAGGTTGCCGTACTGGT
<i>SAMS</i>	K7VC35_MAIZE	TGGCTGCTCTGCTCCATAGAA	GCGCATTAAATCCTGGCTGCT

3.9 İstatistikî Analizler

Denemeler, rastgele deneme deseninde düzenlenmiştir. Denemelerden elde edilen veriler en az üç tekrarlı, iki bağımsız denemeden elde edilmiştir. 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

Mevcut tez çalışmasında Cd stresine maruz bırakılan mısır fidelerinde Cys'in iyileştirici etkisi değerlendirilmiştir. Bu bağlamda, taze ve kuru ağırlıkları (sırasıyla TA ve KA), gövde ve kökte Cd birikimi, klorofil içeriği, lipid peroksidasyonu, bazı antioksidan enzimlerin (SOD, POD, CAT ve APX) aktiviteleri ve transkriptom profilleri analiz edilmiş ve değerlendirilmiştir.

4.1 Cd ve Sistein Uygulamalarının Büyüme Üzerine Etkisi

Mısır fideleri kontrol, Cys (250 μ M), Cd (75 μ M) ve Cys+Cd uygulamalarına maruz bırakılmıştır. Kontrole göre diğer uygulamalarda gövde taze ve kuru ağırlığında önemli düzeyde azalma belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Cd stresi, kontrole kıyasla gövde taze ağırlığını %53,1 ve gövde kuru ağırlığını %37,6 azaltmıştır. Cd uygulamasına göre Cys+Cd uygulaması, gövde taze ağırlığını %30,7 ve gövde kuru ağırlığı %23,0 artırmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Mısır fidelerinde gövde ve kökün taze ve kuru ağırlığı üzerine Cd (75 μ M) ve Cys (250 μ M) 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	2691,3 $\pm$ 104,9 ^{a*}	164,7 $\pm$ 7,0 ^a	663,3 $\pm$ 38,4 ^a	31,5 $\pm$ 1,03 ^a
Cys	2325,7 $\pm$ 97,3 ^b	144,3 $\pm$ 5,5 ^b	580,0 $\pm$ 14,2 ^{ab}	28,8 $\pm$ 0,43 ^a
Cd	1123,7 $\pm$ 29,4 ^d	92,9 $\pm$ 1,9 ^d	449,0 $\pm$ 16,5 ^b	29,6 $\pm$ 0,87 ^a
Cys+Cd	1545,7 $\pm$ 34,3 ^c	118,3 $\pm$ 3,5 ^c	509,7 $\pm$ 14,5 ^{ab}	32,3 $\pm$ 1,97 ^a

*Her bir parametre için farklı harfler (a-d), Duncan çoklu karşılaştırma testine göre ortalamalar arasında önemli düzeydeki farkı gösterir ($P < 0.05$). Tüm veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir ($n = 3$).

4.2 Cd ve Sistein Uygulamalarının Cd Birikimi Üzerine Etkisi

Kontrol, Cys, Cd ve Cys+Cd uygulamalarına maruz kalan mısır fidelerinin gövde ve kök dokularında Cd içeriği belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Kontrol ve Cys uygulanmış

mısır fidelerinde Cd seviyeleri tespit limitlerinin altında olduğu için belirlenememiştir. Bununla birlikte, Cd stresine maruz bırakılan mısır fidelerinin gövde ve köklerinde önemli düzeyde Cd birikimi belirlenmiştir. Cd'a göre Cys+Cd uygulamasında Cd birikimi kök dokularında önemli düzeyde yüksek bulunurken (%76) gövde dokularında önemli düzeyde düşük bulunmuştur (%22).

Çizelge 4.2 Mısır fidelerinde gövde ve kök dokularının Cd içeriği üzerine Cd (75 µM) ve Cys (250 µM) uygulamalarının etkisi

Uygulamalar	Gövde Cd birikimi (mg kg ⁻¹ KA)	Kök Cd birikimi (mg kg ⁻¹ KA)
Kontrol	ND	ND
Cys	ND	ND
Cd	56,4 ± 3,6 ^a	528,9 ± 49,0 ^b
Cys+Cd	44,0 ± 2,2 ^b	931,7 ± 77,9 ^a

*Her bir parametre için farklı harfler (a-d), Duncan çoklu karşılaştırma testine göre ortalamalar arasında önemli düzeydeki farkı gösterir ($P < 0.05$). Tüm veriler ortalama ± standart hata olarak ifade edilmiştir ($n = 3$). ND=Belirlenemeyen.

4.3 Cd ve Sistein Uygulamalarının Klorofil İçeriği Üzerine Etkisi

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

Çizelge 4.3 Mısır fidelerinin yaprak dokularında klorofil içeriği üzerine Cd (75 µM) ve Cys (250 µM) uygulamalarının etkisi

Uygulamalar	mg/g TA
Kontrol	36,32 ± 2,18 ^{a*}
Cys	37,93 ± 1,29 ^a
Cd	13,03 ± 1,64 ^c
Cys+Cd	18,17 ± 2,46 ^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 olarak ifade edilmiştir ($n = 3$).

4.4 Cd ve Sistein Uygulamalarının Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi

Mısır fidelerinin yapraklarındaki lipid peroksidasyon seviyeleri malondialdehit (MDA) içerikleri ölçülerek belirlenmiştir (Çizelge 4.4). MDA içeriği bakımından kontrol ile Cys uygulaması arasındaki fark önemsizdir. Kontrole göre Cd uygulaması MDA içeriğini önemli düzeyde artırırken, Cd'a göre Cys+Cd uygulaması MDA içeriği önemli düzeyde azaltmıştır (Çizelge 4.4).

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

Çizelge 4.4 Mısır fidelerinin yaprak dokularında MDA içeriği ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerine Cd (75 µM) ve Cys (250 µM) uygulamalarının etkisi

Parametreler	Uygulamalar			
	Kontrol	Cys	Cd	Cys+Cd
MDA içeriği <i>nmol g⁻¹ TA</i>	15,6 ± 1,34 ^a	21,5 ± 1,15 ^a	26,4 ± 1,74 ^c	16,0 ± 0,51 ^b
SOD aktivitesi <i>Unit mg⁻¹ protein</i>	18,8 ± 2,38 ^a	19,9 ± 2,30 ^a	7,9 ± 0,91 ^c	11,6 ± 1,07 ^b
POD aktivitesi <i>µmol min⁻¹ mg⁻¹ protein</i>	26,8 ± 1,75 ^a	35,7 ± 1,59 ^b	125,14 ± 3,86 ^c	79,91 ± 2,67 ^d
CAT aktivitesi <i>µmol min⁻¹ mg⁻¹ protein</i>	0,155 ± 0,007 ^a	0,180 ± 0,004 ^a	0,116 ± 0,009 ^b	0,161 ± 0,008 ^a
APX aktivitesi <i>µmol min⁻¹ mg⁻¹ protein</i>	6,92 ± 0,80 ^a	6,90 ± 1,50 ^a	9,47 ± 0,65 ^{ab}	11,77 ± 1,45 ^b

*Her bir parametre için farklı harfler (a-d), Duncan çoklu karşılaştırma testine göre ortalamalar arasında önemli düzeydeki farkı gösterir ($P < 0.05$). Tüm veriler ortalama ± standart hata olarak ifade edilmiştir ($n = 3$). ND=Belirlenemeyen.

4.5 RNA-Seq Verilerinin Değerlendirilmesi

Dışsal Cys uygulamasının mısır fidelerinin Cd toleransı üzerindeki etkisinin daha iyi anlaşılması için yaprak dokularında transkripsiyonel profillemeye analizleri gerçekleştirilmiştir. Kontrol, Cys (250 μ M), Cd (75 μ M) ve Cys+Cd (250 μ M + 75 μ M) uygulamalarına maruz bırakılan mısır fidelerinin yapraklarından RNA ekstraksiyonu için gerçekleştirilmiş ve daha sonra Illumina dizilimi için cDNA kütüphaneleri hazırlanmıştır. Ham okumalar uygulamalar arasında ~8–62 milyon arasında değişmiştir (Çizelge 4.5). Kalite kontrolü sırasında, düşük kaliteli ham okumalar uzaklaştırılarak yeni ham okumalar elde edilmiş ve Q30 değerleri ortalama %93,74 olarak belirlenmiştir. GC içerikleri yaklaşık %43–44 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5 RNA-Seq okumalarının özeti

Uygulama	Toplam okuma	Haritalama oranı	Çoklu haritalanmış okumalar	Q30 (%)	GC (%)
K1	17.001.210	73,6	2.255.633	93,89	44
K2	15.451.135	72,0	2.041.406	92,63	43
K3	10.969.488	73,8	1.517.481	92,31	44
Cys1	11.607.233	72,8	1.479.041	93,44	43
Cys2	12.757.966	71,5	1.582.868	93,92	43
Cys3	13.195.743	71,6	1.616.213	92,24	43
Cd1	25.028.171	73,2	3.061.085	94,65	44
Cd2	8.211.523	73,4	1.100.853	95,13	44
Cd3	61.959.074	65,2	8.766.058	93,55	44
Cys+Cd1	8.872.519	71,7	1.153.989	96,34	45
Cys+Cd2	7.865.610	72,9	1.050.546	93,54	46
Cys+Cd3	12.872.438	73,6	1.772.594	93,19	44

4.6 Diferansiyel Olarak İfade Edilen Genlerin Analizi

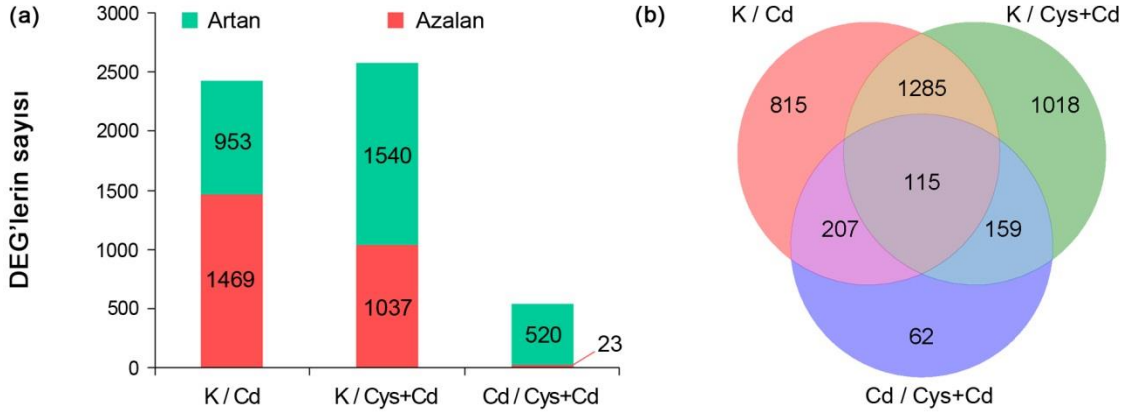
Kontrol, Cys (250 μ M), Cd (75 μ M) ve Cys+Cd (250 μ M + 75 μ M) uygulamalarına maruz kalan mısır fidelerinin yaprak dokularında RNA-seq analizleri yapılmıştır. Biyoenformatik analizler ile genlerin toplam sayıları ve diferansiyel olarak ifade edilen genlerin (DEG'ler) sayıları belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6 Uygulamalar arası karşılaştırmalar sonucunda elde edilen gen sayıları

Karşılaştırılan uygulamalar	Analiz edilen toplam gen sayısı	Diferansiyel olarak ifade edilen genlerin (DEG'ler)	
		Artan yönde düzenlenen genlerin sayısı (FC>1, padj<0,05)	Azalan yönde düzenlenen genlerin sayısı (FC<1, padj<0,05)
Kontrol–Cys	30,777	14	118
Kontrol–Cd	30,914	953	1469
Kontrol–Cys+Cd	31,452	1540	1037
Cd–Cys+Cd	31,254	520	23

Kontrole göre Cys uygulamasında 30,777 gen analiz edilmiştir (Çizelge 4.6). Buna göre, artan yönde düzenlenen DEG'lerin sayısı 14, azalan yönde düzenlenen DEG'lerin sayısı 118 olarak belirlenmiştir. Kontrole göre Cd uygulamasında 30,914 gen analiz edilmiştir. Buna göre, artan yönde düzenlenen DEG'lerin sayısı 953, azalan yönde düzenlenen DEG'lerin sayısı 1469 olarak belirlenmiştir. Kontrole göre Cys+Cd uygulamasında 31,452 gen analiz edilmiştir. Buna göre, artan yönde düzenlenen DEG'lerin sayısı 1540 azalan yönde düzenlenen DEG'lerin sayısı 1037 olarak belirlenmiştir. Cd uygulamasına göre Cys+Cd uygulamasında 31,254 gen analiz edilmiştir. Buna göre, artan yönde düzenlenen DEG'lerin sayısı 520, azalan yönde düzenlenen DEG'lerin sayısı 23 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

Cd stresinin mısır yapraklarındaki gen ifadesi üzerindeki ve Cys uygulamasının Cd toksisitesi üzerindeki etkilerini incelemek için ikili karşılaştırmalar gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1). DEG'ler $|\log_2(\text{kat değişimi})| \geq 1$ ve $P < 0,05$ koşullarıyla belirlenmiştir. Kontrole göre Cd uygulamasında 953 DEG'in ifade seviyesi artarken, 1469 DEG'in ifade seviyesi azalmıştır. Kontrole göre Cys+Cd uygulamasında 1540 DEG'in ifade seviyesi artarken 1037 DEG'in ifadesi seviyesi azalmıştır. Bununla birlikte, Cd'a göre Cys+Cd uygulamasında 520 DEG'in ifade seviyesinde artış, 23 DEG'in ifade seviyesinde ise azalış tespit edilmiştir (Şekil 4.1a). Uygulamalar arasında ortak olarak ifade olan DEG'ler venn şeması analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1b). Üç uygulama arasında ortak olan 115 DEG ve Cd ile Cys+Cd uygulaması arasındaki 207 DEG daha ileri araştırmalar için değerli adaylar olarak kabul edilmiştir.



Şekil 4.1 Kontrol, Cys (250 μ M), Cd (75 μ M) ve Cys+Cd (250 μ M + 75 μ M) 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.

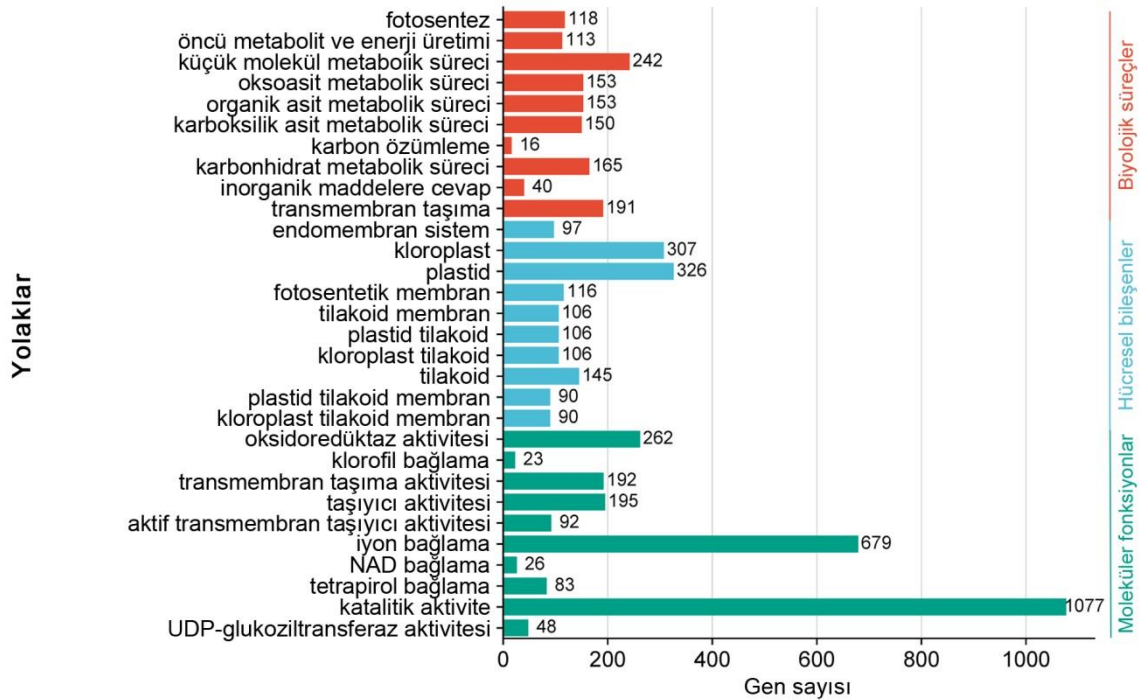
4.7 DEG'lerin Zenginleştirme Analizleri

Kontrol, Cys (250 μ M), Cd (75 μ M) ve Cys+Cd (250 μ M + 75 μ M) uygulamalarına maruz kalan mısır fidelerinin yaprak dokularından elde edilen toplam RNA'ların RNA-seq analizlerine göre karşılaştırılan tüm uygulamalarda (kontrol-Cd, kontrol-Cys+Cd, Cd-Cys+Cd) tespit edilen DEG'lerin zenginleştirildikleri GO ve KEGG terimlerine ait sayısal veriler Çizelge 4.7'de verilmiştir. Ayrıca bu DEG'lerin genel rollerini belirlemek amacıyla her gruptaki DEG'ler için fonksiyonel zenginleştirme analizi yapılmıştır (Şekil 4.2 ve 4.3). Bu analizlere göre K/Cd, K/Cd+Cys ve Cd/Cd+Cys gruplarındaki DEG'ler biyolojik süreç (BS), hücresel bileşen (HB) ve moleküler fonksiyon (MF) olmak üzere kategoriye ayrılmıştır. Kontrole göre Cd karşılaştırmasında, BS açısından küçük molekül metabolik süreci, transmembran taşınması ve karbohidrat biyosentetik sürecinin en zengin GO terimleri olduğu belirlenmiştir. Hücresel bileşen olarak plastid, kloroplast ve tilakoid önemli ölçüde zenginleştirilmiş GO terimleridir. MF ontolojisinde en güçlü şekilde zenginleştirilmiş gen fonksiyonu terimleri katalitik aktivite, iyon bağlama ve oksidoredüktaz aktivitesi olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2).

Çizelge 4.7 GO ve KEGG yollarında zenginleştirilmiş terim sayıları ($p < 0,05$)

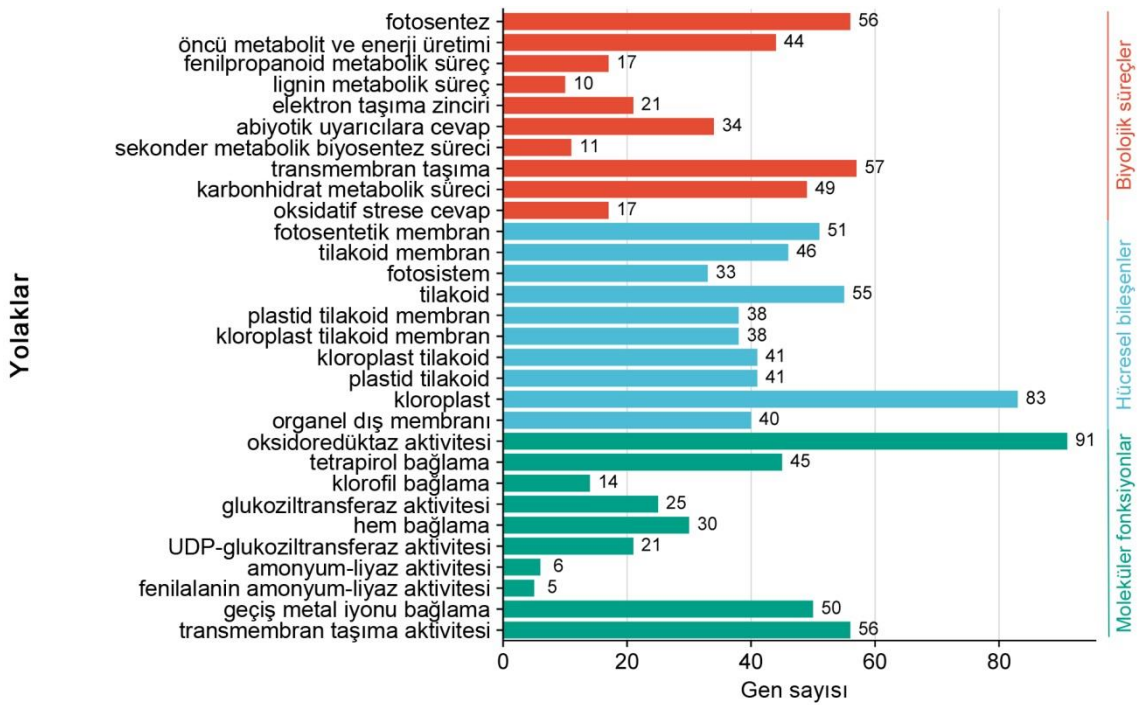
Karşılaştırılan uygulamalar	Kaynak	Zenginleştirilen tüm terimler	Zenginleştirilen artan terimler	Zenginleştirilen azalan terimler
Kontrol / Cd	GO:BS	61	57	49
	GO:HB	34	5	42
	GO:MF	35	52	25
	KEGG	9	10	8
Kontrol / Cys+Cd	GO:BS	93	93	69
	GO:HB	34	5	49
	GO:MF	62	57	58
	KEGG	10	11	5
Cd / Cys+Cd	GO:BS	31	34	20
	GO:HB	36	34	13
	GO:MF	28	27	5
	KEGG	5	5	TE

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



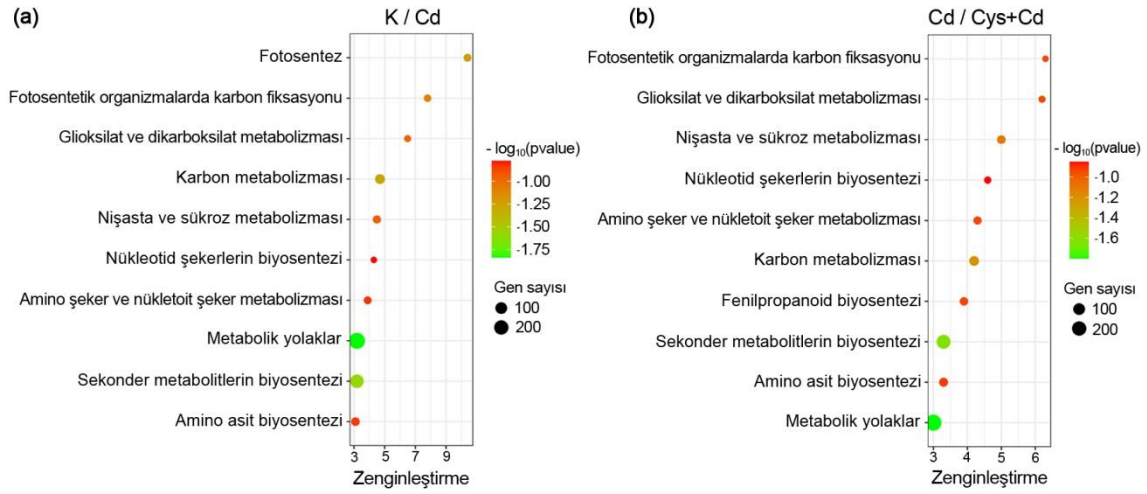
Şekil 4.2 Kontrole göre Cd uygulamasında tespit edilen DEG'lerin GO zenginleştirme analizinin sonuçları.

Cd'a göre Cys+Cd uygulamasında, BS açısından transmembran taşınması, fotosentez ve karbohidrat biyosentetik süreci en zengin GO terimleri olarak belirlenmiştir. HB ontolojisinde kloroplast, tilakoid ve fotosentetik membran en önemli ölçüde zenginleştirilmiş GO terimleri olarak tespit edilmiştir. MF ontolojisinde oksidoredüktaz aktivitesi, transmembran taşıyıcı aktivitesi ve geçiş metali iyonu bağlanması önemli ölçüde zenginleştirilmiş GO terimlerine ait olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 Cd'a göre Cys + Cd uygulamasında tespit edilen DEG'lerin GO zenginleştirme analizinin sonuçları.

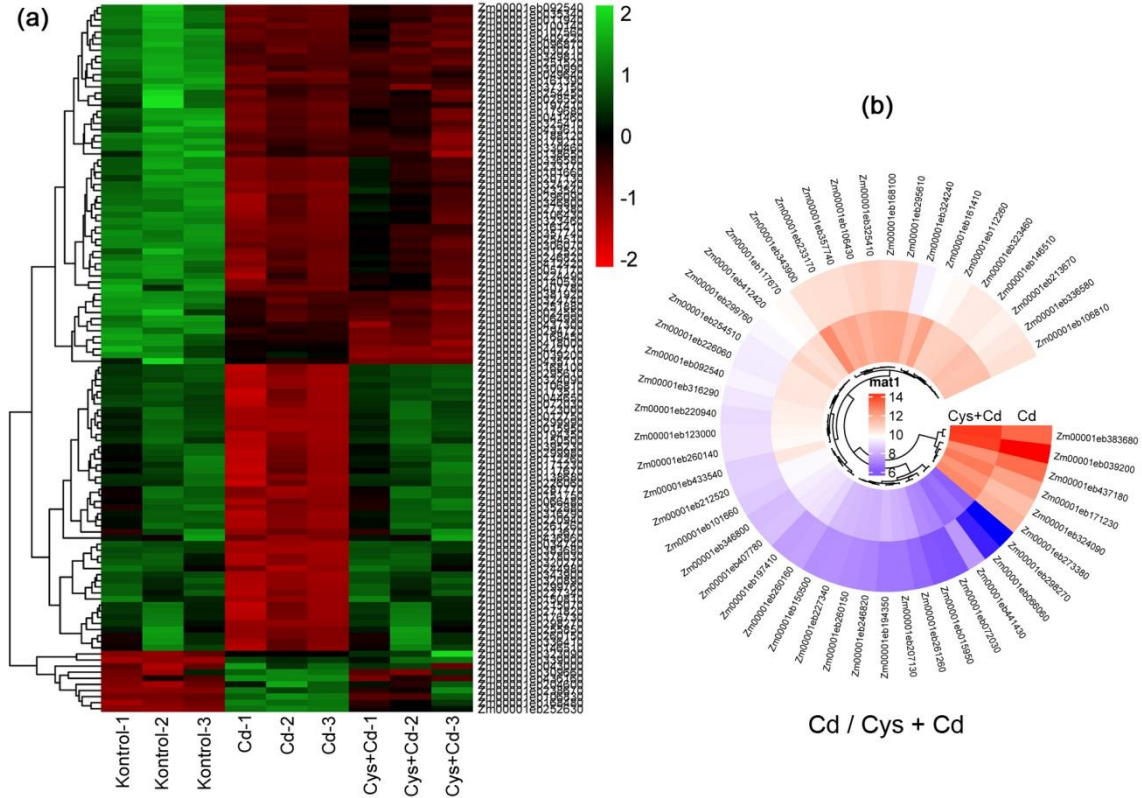
KEGG analizleri için zenginleştirilen terimler Şekil 4.4'te verilmiştir. Kontrole göre Cd uygulamasında, DEG'ler esas olarak fotosentez, fotosentetik organizmalarda karbon fiksasyonu, glioksilat ve dikarboksilat metabolizması, karbon metabolizması, nişasta ve sükröz metabolizması açısından zenginleştirilmiştir (Şekil 4.4a). Diğer taraftan, Cd'a göre Cys+Cd uygulamasında DEG'ler fotosentetik organizmalarda karbon fiksasyonu, glioksilat ve dikarboksilat metabolizması, nişasta ve sükröz metabolizması, nükleotid şekerlerin biyosentezi, amino şeker ve nükleotid şeker metabolizması gibi KEGG yollarında zenginleştirilmiştir (Şekil 4.4b).



Şekil 4.4 (a) K/Cd ve (b) Cd/Cys+Cd gruplarındaki DEG'ler arasında ilk 10 zenginleştirilmiş KEGG yolu.

4.8 Fotosentez ile İlişkili DEG'lerin Analizleri

KEGG zenginleştirme analizine göre fotosentez ile ilişkili genlerin transkripsiyonu K/Cd ve Cd/Cys+Cd uygulamalarında önemli düzeyde değişiklik göstermiştir (Şekil 4.5). Kontrole göre Cd uygulamasında, fosfoenolpiruvat karboksilaz, protein THYLAKOID FORMATION 1 ve piruvat kinaz gibi 10 DEG'in artan yönde düzenlendiği, buna karşın şaperonin benzeri RbcX protein 2, klorofil a-b bağlayıcı proteini, oksijen çıkışını arttırıcı protein 1, fotosistem I reaksiyon merkezi alt birimleri ve ribuloz bisfosfat karboksilaz küçük alt birimi gibi 106 DEG'in azalan yönde düzenlendiği belirlenmiştir. Ayrıca, Cd'a göre Cys+Cd uygulaması, sitokrom f ve NAD(P)H-kinon oksidoredüktaz alt birimi K genlerinin ifade seviyelerini azaltırken, klorofil a-b bağlayıcı protein, ferredoksin, oksijen çıkışını arttırıcı proteinler ve fotosistem II onarıcı proteini PSB27-H1 gibi 47 genin ifade seviyesini arttırmıştır (Şekil 4.5).

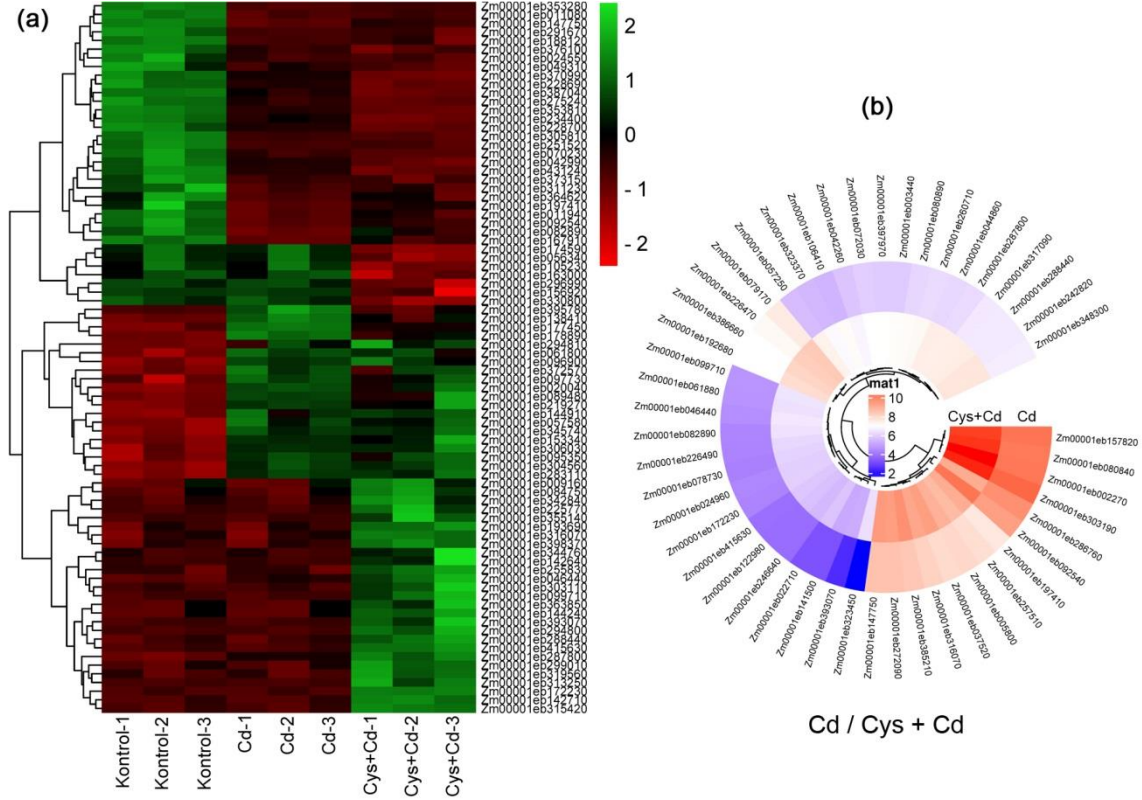


Şekil 4.5 a) K/Cd ve b) Cd/Cys+Cd grupları arasındaki fotosentezle ilişkili DEG'leri gösteren ısı haritaları.

4.9 Transmembran Taşınımı ile İlişkili DEG'lerin Analizleri

KEGG zenginleştirme analizine göre transmembran taşınımı ile ilişkili genlerin transkripsiyonu K/Cd ve Cd/Cys+Cd uygulamalarında çoğunlukla artan yönde düzenlemiştir (Şekil 4.6). Kontrole göre Cd uygulamasında, ABC taşıyıcıları, akuaporinler, katyonik amino asit taşıyıcıları, Nramp alüminyum taşıyıcısı, V tipi proton ATPazlar ve çinko taşıyıcıları gibi 105 genin ifade seviyesinin artan yönde düzenlendiği, buna karşın oksin taşıyıcı benzeri protein 1, çift yönlü şeker taşıyıcı SWEET, dikarboksilat taşıyıcılar ve protein NRT1 gibi 86 genin ifadesini azalan yönde düzenlendiği belirlenmiştir. Ayrıca, Cd'a göre Cys+Cd uygulaması, ABC taşıyıcıları, akuaporinler, klorür kanalı proteinleri, poliol taşıyıcı 5, protein DETOKSİFİKASYON (çoklu ilaç ve toksik bileşik ekstrüzyon proteini) ve protein NRT1 gibi 50 genin ifade seviyesini artan yönde düzenlerken, ATP sentaz alt birimi alfa, ATP sentaz alt birimi alfa, sitokrom c oksidaz alt birimi 3, NAD(P)H-kinon oksidoredüktaz alt birimi K ve

endotransglukosilaz/hidrolaz gibi 48 genin ifade seviyesi artarken, sadece likenaz-2 geninin ifade seviyesi azalmıştır.

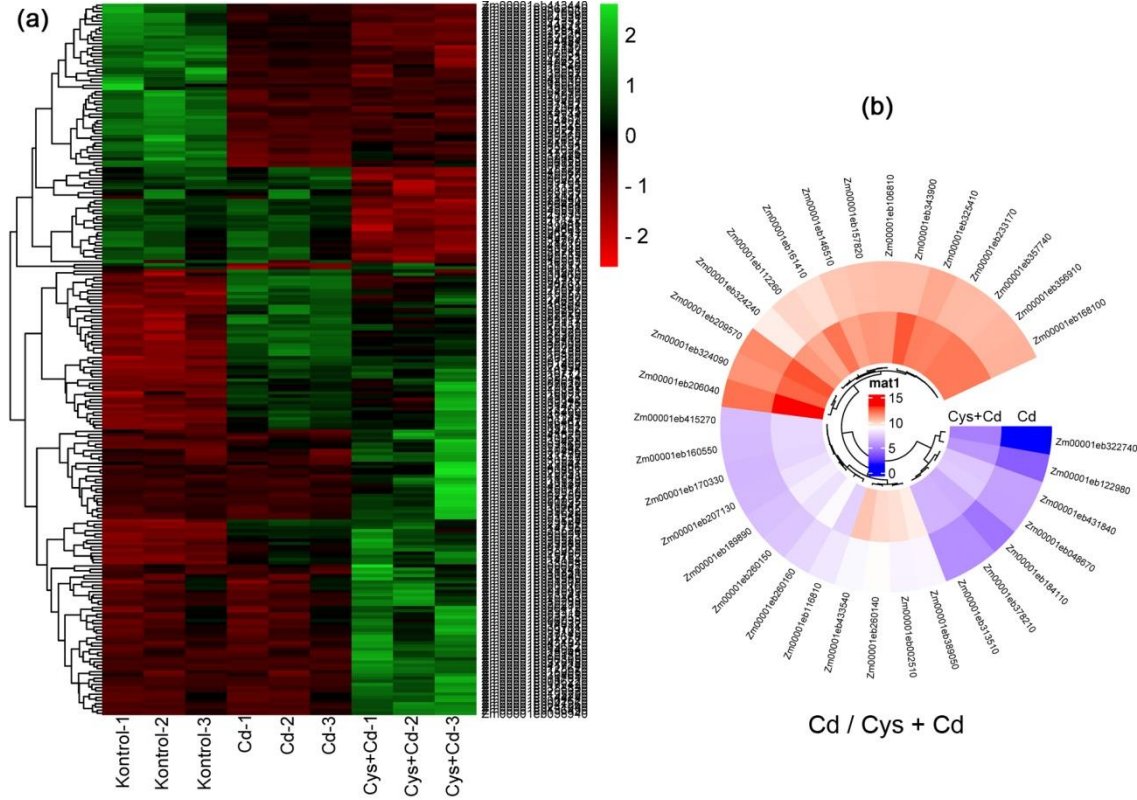


Şekil 4.7 a) K/Cd ve b) Cd/Cys+Cd grupları arasındaki karbonhidrat metabolizması ile ilişkili DEG'leri gösteren ısı haritaları.

4.11 Enerji Metabolizması ile İlişkili DEG'lerin Analizleri

KEGG zenginleştirme analizine göre enerji metabolizması ile ilişkili genlerin transkripsiyonu K/Cd ve Cd/Cys+Cd uygulamalarında çoğunlukla azalan yönde düzenlenmiştir (Şekil 4.8). Kontrole göre Cd uygulamasında, sitokrom c domaini içeren protein, fruktoz–bifosfat, malat dehidrogenaz, NADH dehidrogenaz, fosfoenolpirüvat karboksilaz ve plastosiyanin gibi 83 genin ifade seviyesinin azalan yönde düzenlendiği, buna karşın sitrat sentaz, sitokrom b, sitokrom c oksidaz, izositrat dehidrogenaz [NADP] ve NADH–ubikinon oksidoredüktaz gibi 31 genin ifadesini artan yönde düzenlendiği belirlenmiştir. Ayrıca, Cd'a göre Cys+Cd uygulaması, fruktoz–bisfosfat aldolaz, malat sentaz, NADH dehidrogenaz [ubikinon] 1 beta alt kompleks alt birimi 3–A, fosfoenolpirüvat karboksilaz izoformu 1 ve plastokinol-plastosiyanin redüktaz gibi

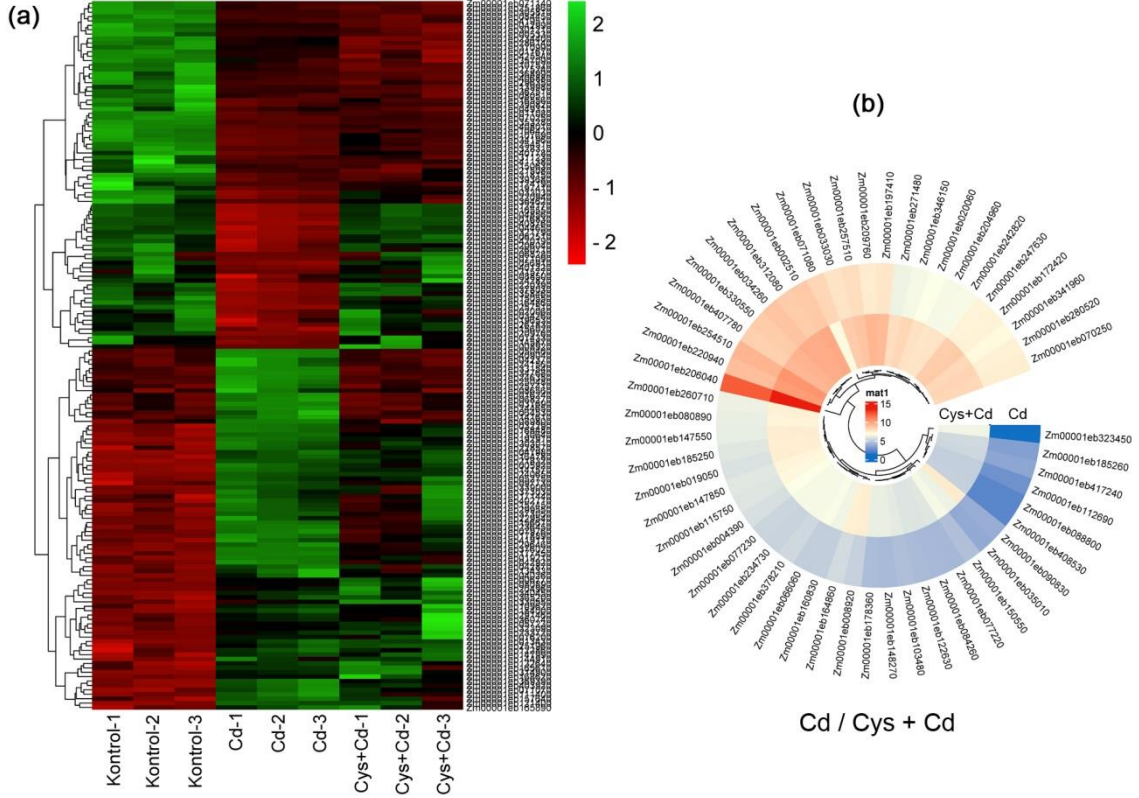
artan protein gibi 46 genin ifade seviyesi artarken, sadece ATP'ye bağımlı DNA helikaz 2 alt birimi KU70 geninin ifade seviyesi azalmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 a) K/Cd ve b) Cd/Cys+Cd grupları arasındaki stres savunma ile ilişkili DEG'leri gösteren ısı haritaları.

4.13 Sekonder Metabolitlerin Biyosentezi ile İlişkili DEG'lerin Analizleri

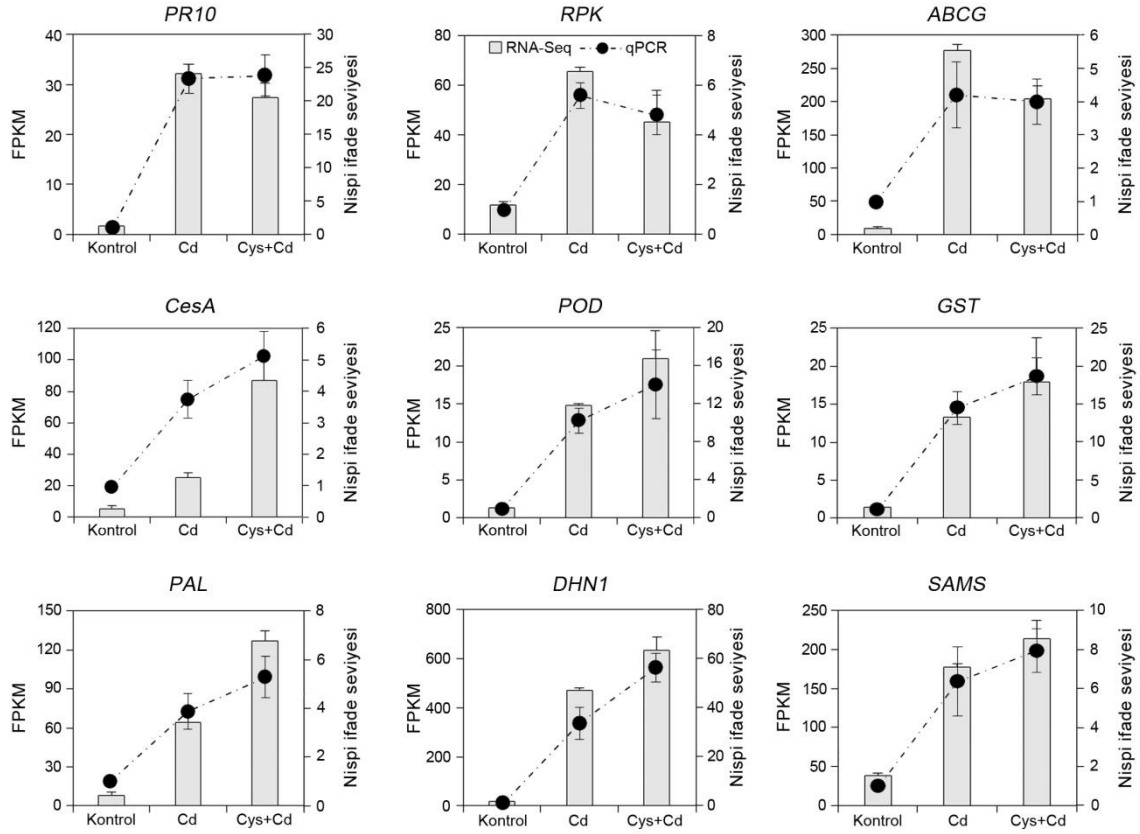
KEGG zenginleştirme analizine göre, Cd ve Cys+Cd uygulamalarının sekonder metabolizma ile ilişkili genlerin transkripsiyonunu önemli düzeyde etkilediği belirlenmiştir (Şekil 4.10). Kontrole göre Cd uygulamasında, 12-okso-fütodienoik asit redüktaz, akonitat hidrataz ve S-adenozilmetiyonin sentaz gibi 82 DEG'in artan yönde düzenlendiği, buna karşın 3-ketoasil-KoA sentaz, 4-kumarat-KoA ligaz ve benzoksazinon sentezi 3 gibi 79 DEG'in azalan yönde düzenlendiği belirlenmiştir. Ayrıca, Cd'a göre Cys+Cd uygulaması, 3-ketoasil-KoA sentaz, 4-kumarat-KoA ligaz, kafeik asit 3-O-metiltransferaz, kafeoil-KoA O-metiltransferaz 2, sinamil-alkol dehidrogenaz ve fenilalanin amonyum-liyaz gibi 43 genin ifade seviyesini artırırken sadece asiklik seskiterpen sentaz geninin ifade seviyesini azaltmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 a) K/Cd ve b) Cd/Cys+Cd grupları arasındaki sekonder metabolitlerin biyosentezi ile ilişkili DEG'leri gösteren ısı haritaları.

4.14 DEG'lerin İfade Profillerinin RT-qPCR ile Doğrulanması

Kontrol, Cd ve Cys+Cd 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 9 genin ifade seviyeleri RT-qPCR ile test edilmiştir. Bu genlerin kontrol, Cd ve Cys+Cd uygulamaları arasındaki ifade seviyelerindeki artışlar ölçülmüştür. Uygulamalara bağlı olarak bu genlerin transkriptom dizileme sonuçları (FPKM) ile RT-qPCR 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 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11 Kontrol, Cd ve Cys+Cd uygulamalarına maruz bırakılan mısır fidelerinin yapraklarında ifade edilen ve RNA-seq analizi ile elde edilen FPKM değerleri ve RT-qPCR kullanılarak doğrulanarak dokuz genin ifade profili. *PR10*: Patogenezle ilişkili protein 10, *RPK*: Reseptör benzeri serin/treonin-protein kinaz, *ABCG*: ABC taşıyıcı G, *CesA*: Selüloz sentaz, *POD*: Peroksidaz, *GST*: Glutasyon S-transferaz, *PAL*: Fenilalanin amonyum-liyaz, *DHN1*: Dehidrin 1, *SAMS*: S-adenozilmetiyonin sentaz.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kadmiyum (Cd) toprakta yaygın olarak bulunmakta ve bitkilerde biriken yüksek Cd seviyeleri besin zincirleri yoluyla insan sağlığını tehdit etmektedir (Clemens vd. 2013). Bitkilerde aşırı Cd birikimi, reaktif oksijen türlerinin (ROT) aşırı miktarda oluşumunu tetikler ve bu durum ROT üretimi ve detoksifikasyonu arasında dengesizliğe neden olabilmektedir. Bu dengesizlik lipid peroksidasyonu ve oksidatif hasara neden olarak hücre zarlarını ve klorofilin fonksiyonunu bozmaktadır (Ahanger vd. 2020, Gu vd. 2021). Bu nedenle, bitkilerde Cd birikiminin azaltılması ve Cd'un besin zincirine girişinin en aza indirilmesinin araştırılması gerekmektedir. Kükürt içeren bileşiklerin, bitkilerin ağır metal birikimi ve toleransı üzerinde olumlu etkileri olduğu bilinmektedir (Cao vd. 2023, Sun vd. 2023). Özellikle sistein (Cys), kükürt özümleme sürecindeki ilk organik kükürt bileşiğidir ve ağır metallerin bitkilere yönelik toksisitesini hafifletmede rol oynayan glutatyon (GSH) ve fitoşelatinlerin (PC'ler) öncüsüdür (Yıldız ve Terzi 2021, Kim vd. 2022). Mevcut araştırma bulguları, dışsal Cys (250 µM) uygulaması mısır fidelerinin gövde ve kök büyümesindeki Cd kaynaklı inhibisyonu etkili bir şekilde hafifletebildiğini göstermiştir. Benzer olarak, 1 mM Cys uygulamasının *Brassica juncea* fidelerinde Cd toleransını arttırdığı rapor edilmiştir (Xue vd. 2024). Dışsal Cys uygulamasının, *Arabidopsis* (Jia vd. 2016), kolza (Yıldız ve Terzi 2021) ve mısır fidelerinde (Terzi ve Yıldız 2021) Cr stresi kaynaklı büyüme inhibisyonunu etkili bir şekilde azalttığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, *Arabidopsis* ve mısır fidelerinde Cys uygulamasının Hg toksisitesini hafiflettiği belirtilmiştir (Aysin vd. 2020, Kim vd. 2022).

Bitkilerde dışsal Cys uygulamasının Cd alımını azaltarak toksisiteyi hafiflettiği rapor edilmiştir (Jia vd. 2016). Mevcut çalışmada, Cd stresi altındaki mısır fidelerinde Cys uygulamasının gövde Cd birikimini azalttığı, buna karşın kök dokularında arttırdığı gösterilmiştir. Xue vd. (2024), dışsal Cys uygulamasının *B. juncea* bitkilerinin hem kök hem de gövde dokularında Cd birikimini azalttığını rapor etmiştir. Çalışmamıza benzer olarak, Cys uygulamasının mısır sürgünlerinde Cr birikimini önemli ölçüde azalttığı, ancak köklerde arttığı gösterilmiştir (Terzi ve Yıldız 2021). Vadas ve Ahner (2009), Cys uygulamasının mısır ve kolza köklerinde Cd alımını arttırdığını ve Cd-Cys

kompleksini tanıyan peptit taşıyıcılarının Cys aracılı Cd alımını kolaylaştırdığını öne sürmüştür. Ayrıca Cys'in kök çevresindeki Hg'ya hızlı bir şekilde bağlanabileceği ve Hg-Cys komplekslerinin daha sonra kök hücre zarını geçerek Arabidopsis köklerinde yüksek Hg birikimine neden olduğu bildirilmiştir (Kim vd. 2022). Bununla birlikte, Cys uygulamasının, ağır metallerin vakuollerde veya hücre duvarlarında tutulmasında rol oynayan ağır metal şelatörlerinin indüksiyonu yoluyla kökten gövdeye translokasyonu azaltılabileceği ileri sürülmüştür (Terzi ve Yıldız 2021). Ayrıca lignin biyosentezinin ekstra bir endodermal katman oluşturarak *Thlaspi caerulescens*'teki vasküler silindirden aşırı metal akışını önlediğini ileri sürmüştür (van de Mortel vd. 2008).

Klorofiller, kloroplast pigment sistemlerinin temel bileşenleri olarak kabul edilmektedir ve dolayısıyla bitkilerde büyüme ve gelişmeyi doğrudan etkilemektedir. Klorofil içeriklerinin belirlenmesi, biyotik ve abiyotik stres faktörlerinin bitkiler üzerindeki etkilerini anlamak için en yaygın yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir. Ağır metal stresinin neden olduğu klorofil içeriğindeki azalma, klorofil yıkımının hızlanmasına ve klorofil biyosenteziyle ilgili enzimlerin inhibisyonuna bağlanabilmektedir. Mevcut araştırmada, mısır fidelerinin yaprak dokularındaki yüksek Cd birikimi klorofil içeriğinde önemli düzeyde azalmaya neden olmuştur. Bununla birlikte, klorofil içeriğindeki Cd kaynaklı azalma dışsal Cys uygulaması ile önemli düzeyde hafifletilmiştir. Benzer olarak, Cys uygulamasının Hg ve Cd stresi altındaki *B. juncea* ve mısır yapraklarında klorofil içeriğini önemli düzeyde arttırdığı ve bu durumun ağır metallerin neden olduğu hasarın hafifletilmesine yardımcı olduğu bildirilmiştir (Erdal ve Türk 2016, Aysin vd. 2020, Xue vd. 2024). Araştırma bulgularımıza göre klorofil içeriğindeki azalmanın klorofil parçalanmasındaki bir artıştan ziyade klorofil biyosentezinde görev alan enzimleri kodlayan genlerin ifade seviyelerindeki bir azalmayla ilişkili olabilir. Bu durum, yapılan RNA-seq analizinden elde edilen verilere göre klorofil biyosentezinde fonksiyon gören Mg-protoporfirin IX metiltransferaz, Mg-protoporfirin IX şelataz ve NADPH-protoklorofilid oksidoredüktaz gibi bazı enzimleri kodlayan genlerin ifade seviyelerinin azalan yönde düzenlenmesi ile ilişkilendirilebilir.

Bitkilerde aşırı Cd birikimi hücresel redoks homeostazisini bozabilir ve reaktif oksijen türlerinin üretimini artırabilmektedir (Gill ve Tuteja 2010). Membran lipitleri ROT

saldırısına karşı özellikle hassastır ve lipid peroksidasyonu seviyeleri bitkilerdeki oksidatif stresin güvenilir bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bitki hücre zarlarındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif bozunması, lipid peroksidasyonunu tetikler, bu da lipid peroksidasyonunun ayrışma ürünlerinden biri olan MDA seviyesinde artışa yol açar (Dixit vd. 2001). Ağır metal stresine hassasiyetin bir ölçüsü ve oksidatif hasarın önemli bir göstergesi olarak MDA birikimindeki artış değerlendirilmektedir (Noor vd. 2022). Mevcut araştırmada, mısır yapraklarının MDA içerikleri Cd uygulaması ile önemli düzeyde artarken, Cys+Cd uygulamasında ise MDA içeriğinin önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir. Benzer olarak, Cd stresi altındaki *B. juncea* (Xue vd. 2024), Cr stresi altındaki *A. thaliana* (Azarakhsh vd. 2014) ve *B. napus* (Yıldız ve Terzi 2021) ve Co stresi altındaki *Ocimum basilicum* fidelerinde dışsal Cys uygulamasının MDA içeriğini azalttığı rapor edilmiştir. Xue vd. (2024), Cys uygulamasının Cd şelasyonunu artırarak ROT birikimini etkili bir şekilde azalttığı, böylece Cd kaynaklı oksidatif stresi hafiflettiği ve *B. juncea* fidelerinin büyümesini ve gelişmesini teşvik ettiğini bildirmiştir. Cys'in yanı sıra Cys'ten türetilmiş GSH ve PCS gibi bileşiklerin doğrudan veya dolaylı olarak ROT seviyelerinin düzenlenmesinde rol oynayabildiği bildirilmiştir (Singh vd. 2006).

Bitkilerde ROT seviyeleri, farklı ROT üreten ve ROT temizleyici mekanizmalar arasındaki etkileşimle düzenlenmektedir. ROT temizleme mekanizması, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve peroksidazlar (POD ve APX) gibi enzimatik antioksidanların yanı sıra ve GSH ve askorbat gibi enzimatik olmayan bileşikleri içermektedir (Halliwell ve Gutteridge 2015). Mevcut araştırmada, mısır yaprak dokularında kontrole göre Cd uygulaması SOD ve CAT aktivitelerini önemli düzeyde azaltırken, Cd'a göre Cys+Cd uygulaması SOD ve CAT aktivitelerini önemli düzeyde artırmıştır. Çalışmamıza zıt olarak, *B. juncea* fidelerinde Cd stresinin SOD aktivitesinde artışa neden olduğu ve bu artışın dışsal Cys uygulaması ile azaltıldığı belirtilmiştir (Xue vd. 2024). Bununla birlikte, Cd stresine maruz bırakılan Arabidopsis köklerinde kontrole göre Cd uygulamasında SOD ve CAT aktivitelerinin arttığı, bu artışın Cys+Cd uygulaması ile birlikte teşvik edildiği bildirilmiştir (Jia vd. 2016). Bununla birlikte, *B. napus* köklerinde Cr stresinin SOD ve CAT aktivitelerini azalttığı ve dışsal Cys uygulamasının bu enzimlerin aktivitelerini iyileştirdiği rapor edilmiştir (Yıldız ve Terzi

2021). Araştırmamızda, Cd uygulaması ile artan POD aktivitesi Cys+Cd uygulaması ile azalmıştır. Çalışmamıza benzer olarak Xue vd. (2024), *B. juncea* fidelerinde POD aktivitesinin Cd stresi ile arttığını bildirmiştir. Bununla birlikte, *B. napus* köklerinde Cr stresinin POD aktivitesini azalttığı ve dışsal Cys uygulamasının bu enzimin aktivitelerini iyileştirdiği rapor edilmiştir (Yıldız ve Terzi 2021). Diğer taraftan, sadece Cys+Cd uygulaması APX aktivitesinde önemli artışa neden olmuştur. Sonuç olarak, ağır metal stresi, uygulanan iyileştiriciler, bitki türü ve organlarına bağlı olarak SOD, POD, CAT ve APX aktivitelerinin farklı düzenlendiği ve bu durumun ROT seviyelerinin düzenlenmesinde etkili olduğu söylenebilir.

Bitkilerde çeşitli genler stres sinyali tepkilerini başlatmaya, düzenlemeye ve stres toleransını geliştirmeye katkıda bulunmaktadır (Xu vd. 2022). Birçok çalışmada, Cd stresinin zararlı etkilerini azaltmak için farklı türde bileşikler uygulanmıştır (Chen vd. 2022a, Di vd. 2023). Bunlar arasında Cys, bitkilerinin morfolojisini ve fizyolojisini iyileştirerek abiyotik streslerin etkilerini hafifletmek için kullanılmıştır (Yıldız ve Terzi, 2021, Xue vd. 2024). Ayrıca, bitkilerde stres toleransının altında yatan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılabilmesi için RNA-seq gibi kapsamlı ve güvenilir araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Li vd. 2022b). Bu araştırmada, Cys teşvikli Cd toleransında rol oynayan anahtar genler ve moleküler yollar belirlenmiştir.

Ağır metal iyonları fotosentezin ışık reaksiyonlarını ve CO₂ asimilasyonunu azaltmaktadır. Kadmiyum kaynaklı oksidatif stres fotosentetik aparatta ve ışık toplayıcı komplekste hasara neden olmakta, böylece fotosistem I ve II'nin yapısal bütünlüğünü bozarak fotosentetik verimin azalmasına yol açmaktadır (Siedlecka ve Krupa 1996). Işık toplayan klorofil a/b-bağlayıcı protein (LHCB) (Gong vd. 2017), oksijen üretici kompleks (OEC) (Carneiro vd. 2017) ve oksijen üretimi arttırıcı protein (OEE) (Roy vd. 2016), Cd stresi altındaki bitkilerde fotosistem II (FSII) aktivitesindeki değişikliklerden sorumludur. Fotosistem I ve II'deki anten kompleksinin klorofil a/b-bağlayıcı proteinini kodlayan *Lhca* ve *Lhcb* genleri, LHC kompleksinin alt birimlerini kodlayan çoklu genlerdir (Andersson vd. 2003). Mevcut araştırmada, Cd uygulamasının 22 *Lhca* ve *Lhcb* geninin aşağı yönde düzenlendiği belirlenmiştir. Zıt olarak, Liu vd. (2023), buğday bitkilerinde Cd'a yanıt olarak *Lhcb1* geninin ifade

seviyesinin artan yönde düzenlendiğini bulmuştur. Diğer taraftan, dışsal Cys uygulaması, Cd stresi altındaki mısır yapraklarında 14 *Lhca* ve *Lhcb* geninin yukarı yönde düzenlenmesine neden olmuştur.

Oksijen üretici kompleks, suyun fotooksidasyonuna, plastokinonun indirgenmesine ve proton gradientinin oluşumuna aracılık eden bir enzimdir (Akhtar vd. 2017). PsbP proteini, PsbO ve PsbQ ile birlikte tilakoid lümeni oluşturan fotosistem II'nin bir bileşenidir ve yüksek bitkilerde OEC'nin bir parçasıdır (Wei vd. 2016) ve suyun oksidasyonu tarafından üretilen Mn iyonlarına yakınlığı nedeniyle Mn üzerinde stabilize edici bir etkiye sahiptir (Bommer vd. 2016). PsbO, FSII kompleksinin en önemli ekzojen proteindir ve çoklu klorozu hızlandıran proteinlerden sinyallerin alınmasını kolaylaştırmaktadır (Wang ve Blumwald 2014). Ek olarak, FSII'nin suyu parçalama reaksiyonu, fonksiyonu PsbQ proteini tarafından düzenlenen edilen Ca^{2+} ve Cl^- iyonlarını gerektirmektedir (Seidler 1996). PsbY proteininin, OEC'ye manganezin bağlanmasında rol oynadığı öne sürülmüştür (Gau vd. 1995). Ayrıca PsbS proteininin, fotoinhibisyona karşı korunma için gerekli olan bir ışık stres sensörü olduğu ve fotokimyasal olmayan yatışmayı düzenlediği bildirilmiştir (Valencia ve Pandit 2024). Çalışmamızda Cd stresi *PsbO*, *PsbP*, *PsbQ*, *PsbS* ve *PsbY* genlerinin ifade seviyesi azalan yönde düzenlemiştir ve bu durum Cd'un OEC yapısının stabilitesini bozabileceğini öne sürmektedir. Diğer taraftan Cys+Cd uygulaması bu genlerin ifade seviyelerini arttırmıştır. Benzer şekilde, Cd stresi FSI reaksiyon merkezi ile ilgili proteinleri kodlayan genlerin (*PsaF*, *PsaG*, *PsaH*, *PsaL* ve *PsaO*) ifade seviyeleri azaltırken, dışsal Cys uygulaması bu genlerin ifade seviyelerini arttırmıştır. Bu sonuçlar, Cys'in, FSI ve FSII sistemlerinin işlevini ve aktivitesini koruyarak mısır fidelerinin fotosentetik performansını iyileştirmede faydalı rolünü ortaya koymaktadır.

Sitokrom b_6f (Cb6f) kompleksi, elektronları plastokinolden plastosiyanine aktaran bir plastokinol–plastosiyanin oksidoredüktaz gibi davranarak hem doğrusal elektron taşınmasını hem de siklik elektron taşınmasını bağlamada önemli bir rol oynamaktadır (Allen 2004). Yapısal olarak Cb6f sekiz alt birimden oluşmakta, ancak yalnızca küçük PetM alt birimi ve Rieske FeS proteini (PetC) nükleer olarak kodlanmaktadır (Leister 2003). Ayrıca Cb6f kaybının, *Phaseolus vulgaris* bitkilerinde FSII, FSI ve kloroplastik

ATP sentezinin bozulmasına neden olduğu bildirilmiştir (Ben-David vd. 1983). Plastosiyanin (PetE), elektronları Cb6f kompleksinden FSI'ya taşıyarak fotosentezde merkezi bir rol oynamaktadır (Haehnel 1986). Ferredoksin-NADP redüktaz (PetH) enzimi ferredoksin (PetF) aldığı elektronları kullanarak NADP⁺'ı karbon fiksasyonunda kullanılan NADPH'ye indirgemektedir (Hanke ve Mulo 2013). Diğer taraftan, kloroplast tilakoid membranlarda yer alan F tipi ATPaz'lar, ADP'yi ATP'ye dönüştürebilmekte ve böylece bitkide karbon fiksasyonu için enerji sağlamaktadır (Kühlbrandt 2019). Araştırmamızda, Cb6f kompleksi (*PetC*), fotosentetik elektron taşınması (*PetE*, *PetF* ve *PetH*) ve ATP sentaz (*atpD* ve *atpG*) ile ilgili genlerin ifade seviyelerinin kontrole göre Cd uygulamasında azaldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, Cys+Cd uygulamasında *PetC*, *PetE*, *atpD* ve *atpG* genlerinin ifade seviyeleri önemli ölçüde artmıştır. Benzer olarak, marul bitkilerinde Cd stresinin *PetA*, *PetC*, *PetD*, *PetF*, *PetJ*, *atpA* ve *atpG* proteinlerinin ifadesini azalttığı ve dışsal fuvlik asit uygulamasının *PetJ* ve *PetG* proteinlerinin ifade seviyelerini artırdığı bildirilmiştir (Chen vd. 2022b). Mevcut araştırmanın sonuçları, dışsal Cys uygulamasının mısır yapraklarında fotosentetik elektron taşınımını ve ATP sentezini teşvik ederek Cd toleransına katkıda bulunduğunu ileri sürebilir.

Bitkilerde Cd stresi ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz/oksijenaz (RuBisCO), RuBisCO aktivaz (RCA), gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH), sedoheptuloz-1,7 bifosfat (SBPaz), fosfoenolpirüvat karboksilaz (PEPC) ve karbonik anhidraz (CA) gibi karbon özümlemesi ile ilgili enzimleri etkilemektedir (D'Alessandro vd. 2013, Roy vd. 2016, Gong vd. 2017). Mevcut çalışmada, Cd stresi mısır yapraklarında *RuBisCO*, *RCA*, *GAPDH*, *SBPaz*, *PEPC* ve *CA* genlerinin ifade seviyelerini kontrole göre önemli seviyede azaltmıştır. Bununla birlikte, Cd stresi altındaki bitkilere Cys uygulaması bu genlerin ifade seviyesinde artışa neden olmuştur. Bu sonuçlar, dışsal Cys uygulamasının Cd stresi koşullarında karbohidrat metabolizmasını iyileştirerek bitki büyüme ve gelişimine katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

Kadmiyum iyonlarının hücre altı seviyelerde kompartımanlaştırılması, bitkilerin Cd stresine başa çıkmada önemli bir mekanizmadır (Sterckeman ve Thomine 2020). Cys'in Cd alımını ve detoksifikasyonunu düzenleyebildiği bilinmektedir (Xue vd. 2024).

Transkriptomik analizler, ABC, PIP1–2, HMA ve ZIP gibi taşıyıcıların gen ifade seviyelerinin Cd stresi ve Cys uygulaması tarafından düzenlendiğini göstermiştir. ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıları, plazma zarı veya vakuolar membran üzerinde yer alan ve aynı zamanda Cd detoksifikasyonunda önemli roller oynayan en büyük membran protein ailelerinden biridir (Rui vd. 2017). Önceki çalışmalar, iki C tipi ABC taşıyıcısı ABCC1 ve ABCC2'nin, Arabidopsis'te Cd toleransına aracılık eden PC'lerin birincil taşıyıcıları olduğu gösterilmiştir (Park vd. 2012). Cd stresi altında GSH'nin, GSH–Cd kompleksini oluşturmak için Cd'a bağlanabildiği (Hasan vd. 2016) ve GSH–Cd kompleksinin ABC taşıyıcıları ve HMA3 (ağır metal ATPaz3) gibi ağır metal taşıyıcılar yoluyla vakuolde tutulduğu ve bu durumun da Cd'un toprak üstü organlara translokasyonu inhibe ettiği bildirilmiştir (Zhu vd. 2020). Mevcut araştırmada, kontrole göre Cd uygulaması 16 ABC taşıyıcısı genin ifade seviyesini artırırken, Cys+Cd uygulaması 25 ABC taşıyıcı genin ifade seviyesi artırmıştır. Bununla birlikte, fitoşelatinlerin (PC'ler) ve metallothioneinlerin (MT'ler) metal iyonlarını şelatlayarak ağır metal kompleksleri oluşturabildiği ve bunları vakuolde tutabildiği bulunmuştur (Sharma ve Chakraverty 2013). MT'ler düşük molekül ağırlıklı, sistein açısından zengin metal bağlayıcı peptitlerdir. Mevcut çalışmada, Cd stresi metallothionein benzeri proteini kodlayan iki genin ifade seviyesini azaltırken, Cys+Cd uygulaması bu iki genin ifade seviyesini artırmıştır. Bu sonuçlar, Cys'in etkin bir şekilde Cd'un vakuolde alıkonulmasına önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Özellikle Cd, akuaporin proteinlerinin iletkenliğini etkileyerek membranın su geçirgenliğinde bir azalmaya neden olabilmektedir (Przedpeńska ve Wierzbicka 2010). Ayrıca akuaporin genlerinin aşırı ifadesinin bütün bitkilerinde Cd direncini artırdığı bildirilmiştir (Zhang vd. 2008). Akuaporinlerin temel rolü, bitki hücrelerinin içi ve dışı arasındaki su akışını koordine etmektir (Srivastava vd. 2014). Plazma içsel proteini (PIP) ve tonoplast içsel proteini (TIP) gibi akuaporinlerin ifadesinin iyileştirilmesiyle bitki hücrelerinin ihtiyaç duyulandan daha fazla su ve çözünen madde elde edilebildiği bildirilmiştir (Gautam ve Pandey 2021). Bununla birlikte, nitrat taşıma proteinlerinin nitrat taşıyıcı 1 (NRT1), nitrat taşıyıcı 2 (NRT2), klorür kanalı (CLC) ve yavaş anyon kanalıyla ilişkili homologlar (SLAC/SLAH) olmak üzere dört nitrat taşıyıcısı yüksek bitkilerde tanımlanmıştır (Krapp vd. 2014). NRT1'in çeşitli ağır metal streslerine karşı

bitki direncini düzenlemede rol oynadığı rapor edilmiştir (Jian vd. 2018, Pan vd. 2020). Mevcut araştırmada, Cd stresi mısır yapraklarında 2 akuaporin (*PIP2;3* ve *PIP2;4*), 4 *NRT1* ve 1 *CLC* geninin ifade seviyesini azaltmıştır. Buna karşın dışsal Cys+Cd uygulaması bu genlerin ifade seviyelerini arttırmıştır. Bu sonuçlar, Cys uygulamasının Cd stresi altındaki bitkilerde su ve nitrat taşınımını regüle ederek Cd toleransına katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

ZIP taşıyıcıları, plazma zarında yer alan ve Zn^{+2} , Fe^{+2} , Cd^{+2} ve Mn^{+2} gibi iki değerlikli kasyonları taşıyan ve demire duyarlı bir grup taşıma proteindir (Liu vd. 2019b). Bu taşıyıcılar metalleri hücre dışı alandan veya organellerden sitoplazmaya taşımaktadır (Krishna vd. 2020). Mevcut araştırmada, Cd stresi ZIP ve çinko taşıyıcı proteini kodlayan genlerin ifade seviyesinde artışa neden olmuştur. Bununla birlikte, bu genlerden ikisi Cys+Cd uygulamasında daha da artmıştır. Liu vd. (2019), çeltik bitkilerinde ZIP1 taşıyıcısının aşırı Zn, Cu ve Cd birikimini önlediğini bildirmiştir. Bu sonuçlar, mısır yapraklarında aşırı Cd birikiminin engellenmesi için ZIP taşıyıcılarının ifadesinin arttığını ileri sürebilir.

ZIP taşıyıcıları gibi, plazma zarında lokalize olan ağır metal taşıma ATPaz'lar (HMA'lar) da bitki hücrelerinde metal homeostazisinin düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. HMA'lar bitkilerde ağır metal alımı ve translokasyonunda rol oynamakta ve metal substratına bağlı olarak iki alt gruba ayrılmaktadır (Williams ve Mills 2005). *A. thaliana*'da AtHMA ailesi, hücre içi lokalizasyona ve metal özgüllüğüne bağlı olarak sekiz üyeye ayrılmıştır (Takahashi vd. 2012b). AtHMA2 ve AtHMA4 adlı iki üyenin, hücrelerden ksileme Cd iyonlarının aktarılması yoluyla Cd detoksifikasyonuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Wong ve Cobbett 2009). Ayrıca çeltik bitkilerinde HMA3 taşıyıcısının Cd'un vakuollerde tutulmasında fonksiyon gördüğü ve kökten gövdeye Cd translokasyonunu etkilediği bildirilmiştir (Cao vd. 2019). Çeltik bitkilerinde aşırı *OsHMA3* ifadesinin Cd toleransını artırdığı (Sasaki vd. 2014) ve *OsHMA3* fonksiyon kaybının bazı çeltik çeşitlerinde yüksek Cd birikimine neden olduğu rapor edilmiştir (Yan vd. 2016). Mevcut araştırmada, Cd stresi HMA domain içeren proteini kodlayan genin ifade seviyesini azaltırken, Cys+Cd uygulaması bu genin ifade seviyesinde artışa neden olmuştur. Bu sonuç, Cys'in Cd birikimi ve

detoksifikasyonundaki rolünü işaret edebilir.

Çoklu gen gruplarına bağlı transkripsiyon faktörleri (TF'ler), özellikle stresli koşullar altında, çeşitli bitki türlerinde gen ifadesinin temel düzenleyicileridir. Önceki çalışmalar, tek bir transkripsiyon faktörünün, hedef genlerinin primerlerindeki cis-etkili bölge ile spesifik olarak etkileşime girerek birçok hedef genin transkripsiyonunu düzenleyebildiğini ortaya çıkarmıştır (Statello vd. 2021). Hedef genlerinin primerlerindeki cis-düzenleyici bölgelerle arayüz oluşturan bir DNA bağlanma bölgesine ek olarak, çoğu transkripsiyon faktörü, diğer TF'ler ile oligomerizasyonunu kolaylaştıran bir protein-protein arayüz bölgesine de sahiptir (Lai vd. 2019). MYB, WRKY, AREB/ABF, bHLH, DREB1/CBF, AP2/EREBP, bZIP, NAC, MYC, HB, HSF, ARID, EMF1, C2C2-Dof, C2H2, C2C2-Gata, C2C2-CO benzeri, C2C2-YABBY, C3H ve E2F-DP gibi farklı transkripsiyon faktörü ailelerinin bitkilerde gen aracılı stres tepkilerinin düzenlenmesinde aktif olarak rol oynadığı bildirilmiştir (Parihar vd. 2019). Bu çalışmada, çeşitli TF gruplarının (WRKY, MYB, bHLH, bZIP, MADS-box, AP2/EREBP, C2C2-CO-benzeri, C2C2-GATA, C2C2-YABBY, HSF ve NAC), Cd stresi tarafından farklı şekilde düzenlendiği bulunmuştur. Bununla birlikte, Cys uygulaması C2C2-CO benzeri, C2C2-GATA, C2H2, GRAS, NAC ve bZIP gibi TF'lerinin ifade seviyelerindeki Cd kaynaklı azalmayı ortadan kaldırmıştır. Önceki çalışmalarda, WRKY, bHLH, MYB, bZIP ve NAC familyası genleri gibi çok sayıda TF'nin, Cd stresine yanıt olarak birçok bitkide stresle ilişkili genlerin ifadesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı kanıtlanmıştır (DalCorso vd. 2010, Viana vd. 2018). MYB transkripsiyon faktörleri bitki gelişiminde ve kuraklık, tuz ve düşük sıcaklık gibi abiyotik stres toleransında önemli bir rol oynamaktadır (Gao vd. 2017). *Arabidopsis*'te MYB4'ün aşırı ifadesinin, Cd toleransında artışa neden olduğu gösterilmiştir (Agarwal vd. 2020). bZIP transkripsiyon faktörlerinin, oksidatif stres de dahil olmak üzere çeşitli abiyotik streslere verilen yanıtlara katkıda bulunduğuna dair önemli kanıtlar vardır (Choi vd. 2021). *Salix matsudana* SmZIP'in aşırı ifadesinin transgenik tütünde Cd alımını ve Cd toleransını arttırdığı bildirilmiştir (Jiang vd. 2021). Bu sonuçlar, mısır fidelerinin Cd toksisitesini hafifletmek için bir dizi transkripsiyon faktörünü aktive ederek transkripsiyon sürecini düzenleyebildiğini göstermektedir.

Kadmiyuma maruz kalmanın çeşitli organizmalarda oksidatif hasarın nedeni olarak kabul edilen ROT'ları ürettiği iyi bilinmektedir (Schutzendubel ve Polle 2002). Olumsuz çevrenin neden olduğu oksidatif stresle mücadele etmek için bitkiler, AsA–GSH döngüsü, SOD, CAT, APX ve POD gibi enzimatik antioksidanlar gibi çeşitli etkili savunma mekanizmaları geliştirmiştir (Bhaduri ve Fulekar 2012). Mevcut araştırmada, yaprak dokularındaki aşırı Cd birikimi, MDA içeriğindeki artışla da gösterildiği gibi oksidatif hasara yol açmıştır. RNA-seq analizleri ROT metabolizmasında yer alan birden fazla genin, yaprak dokularını oksidatif hasara karşı korumak için Cd stresine doğrudan yanıt verdiğini göstermiştir. Araştırmamızda, H₂O₂ detoksifiye eden CAT ve POD enzimlerini kodlayan genlerin ifade seviyeleri Cys+Cd uygulamasında artan yönde düzenlenmiştir. Bununla birlikte, sitokrom P450 (CYP450) gen ailesi ve glutatyon S–transferazlar (GST'ler) birçok organizmada Cd stresine cevapta iyi korunmuş bir mekanizmasıdır (Aioub vd. 2021). Sitokrom P450, ksenobiyotiklerin uzaklaştırılmasından sorumlu ilk savunma sistemi olduğu ve Cd stresi altında güçlü bir şekilde uyarıldığı bildirilmiştir (Wang vd. 2019). Ayrıca GST'ler, ksenobiyotiklerin GSH ile konjugasyonunda iyi bilinen bir role sahip geniş bir protein ailesidir (Pocsi vd. 2004). GST, Cd stresi altında yüksek ROT düzeylerinden kaynaklanan oksidatif hasara karşı korumada GSH metabolizması yoluyla önemli roller oynamaktadır (Nair vd. 2011). Mevcut araştırmada, Cd stresi 10 *CYP450* ve 2 *GST* geninin ifade seviyesinde azalmaya neden olurken, Cys+Cd uygulaması bu genlerin ifade seviyelerini artırmıştır. Glutaredoksinler (GRX'ler), hücrel redoks homeostazisini korumak için substrat proteinlerinin disülfid bağlarının indirgenmesini katalize etmek için glutatyonu kullanan küçük redoks proteinleridir. Ayrıca, çeşitli bitki GRX'leri için savunma tepkilerinin transkripsiyonel düzenlenmesi, çiçek gelişimi, oksidatif stres tepkisi, redoks sinyali, hormonal düzenleme, demir homeostazisi ve çevresel adaptasyon gibi çeşitli işlevler rapor edilmiştir (Ding vd. 2014). Verma vd. (2016b), çeltikte GRX genlerinin (*OsGrx_C7* ve *OsGrx_C2.1*) artan ifadesinin, GSH havuzunu koruyarak As toleransına önemli rol oynadığını bildirilmiştir. Nohut GRX (*CaGrx*) genini aşırı ifade eden *Arabidopsis* bitkilerinin yabancı bitkilere göre As, Cr ve Cd ağır metallerine karşı daha toleranslı olduğu rapor edilmiştir (Kumar vd. 2020). Peroksiredoksin/tiyoredoksin (PRX/TRX) yolu, H₂O₂ detoksifikasyonunda temel bir rol oynamaktadır (Gupta vd. 2018). Bu süreç, PRX tarafından H₂O₂'in indirgenmesini ve

TRX kullanılarak katalitik aktivitesinin restorasyonunu içermektedir (Zhong vd. 2017). Araştırmamızda, Cd uygulaması 3 *GRX* ve 2 *TRX* geninin ifade seviyesini azalan yönde düzenlerken, Cys+Cd uygulaması bu genlerin ifade seviyesini artırmıştır. Sonuç olarak, Cys+Cd uygulamasında *CAT*, *POD*, *CYP450*, *GST*, *GRX* ve *TRX* genlerinin artan yönde düzenlenmesi, bitkilerin antioksidan potansiyelinin artırarak oksidatif stresin etkilerinin azaltılmasında Cys'in pozitif bir rolünün olabileceğini göstermektedir.

Isı şok proteinleri (HSP'ler), yüksek oranda korunmuş amino asit dizilerine ve işlevlerine sahip bir protein türüdür. HSP'ler moleküler şaperonlar olarak işlev görür ve hasarlı proteinlerin onarılması ve yeniden katlanmasının yanı sıra normal proteinlerin sentezlenmesi, katlanması ve taşınmasında da rol oynarlar (Tiwari vd. 2015). Mevcut araştırmada, Cd stresi mısır fidelerinin yapraklarında 21.7 kDa sınıf VI HSP, 22.0 kDa HSP, şaperon protein dnaJ, şaperonin 10, şaperonin benzeri RBCX proteini, HSP20, HSP70 ve HSP90 gibi HSP'leri kodlayan genlerin ifadesini önemli ölçüde değiştirmiştir. Bu genlerden 11'i artan yönde düzenlenirken 9 gen azalan yönde düzenlenmiştir. Bu farklı ifade modelleri, mısır yapraklarında HSP'lerin Cd stresine cevapta fonksiyonel bir çeşitlilik olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan, Cys+Cd uygulaması bu genlerden sadece HSP20'nin ifade seviyesini artırmıştır. Bununla birlikte, protein degradasyonunda fonksiyon gören ATP'ye bağımlı Clp proteaz proteolitik alt birimi, peptidaz C1A papain C-terminal domaini içeren protein ve RING tipi E3 ubikuitin transferaz genlerinin ifade seviyeleri Cys+Cd uygulaması ile artış göstermiştir. Ayrıca protein katlanmasında önemli rol oynayan peptidil-prolil cis-trans izomeraz (*PPIaz*) geni de Cd uygulamasında azalan yönde düzenlenirken, Cys+Cd uygulaması bu genlerin ifadesini artırmıştır. Cys'e yanıt olarak bu genlerin artan ifadesi, Cys'in Cd stresi sırasında protein katlanması ve dönüşümünde hayati bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Fenilpropanoid metabolizması bitki gelişiminde ve stresle başa çıkmada önemli bir rol oynamaktadır. Sentezlenen metabolitler esas olarak flavonoidleri ve hücre çeperinin yapısına katılan ligninleri içermektedir (Gray vd. 2012). Bu bağlamda, ligninlerin ana işlevi, hücre duvarının mekanik gücünü ve sertliğini arttırmak ile su ve besin maddelerini uzun mesafelere taşımak için ksilem kanallarının oluşumunu teşvik

etmekken (Zhao 2016), flavonoidlerin ROT'ların neden olduğu oksidatif hasarı azalttığı rapor edilmiştir (Jiang vd. 2016). Önceki çalışmalarda, *A. thaliana* (Herbette vd. 2006), yer fıstığı (Yu vd. 2018) ve çeltikte (Xiong vd. 2009) Cd toleransını ve Cd birikimini geliştirmek için hücre çeperi biyosentezinin artırıldığı bulunmuştur. Çalışmamızda 4-kumarat-KoA ligaz (4CL) ve fenilalanin amonyum-liyaz (PAL) enzimlerini kodlayan genlerin Cys+Cd uygulanmasında artan yönde düzenlendiği belirlenmiştir. PAL ve 4CL birçok bitki metabolitin sentezlenmesi için öncüler sağlayan fenilpropanoid yolağında yer alan anahtar enzimlerdir (Ponniah vd. 2017). Bu çalışmada, selüloz sentaz, ksiloglukan endotransglukosilaz/hidrolaz, sinamil-alkol dehidrogenaz gibi hücre duvarı oluşumu ve yapısıyla ilişkili genler de Cys+Cd uygulamasına yanıt olarak artan yönde düzenlenmiştir. Sonuçlarımız Cys'in, fenilpropanoid metabolizması ile ilişkili genlerin ifadesini etkileyebileceğini ve yaprak yapısını daha iyi korumak ve mısır büyümesini teşvik etmek ve Cd stresinin neden olduğu oksidatif hasarı hafifletmek için hücre duvarı biyosentezini destekleyebileceğini göstermektedir.

Azot (N), bitki büyümesinde ve fotosentez, besin dağıtımı, biyokütle ve verim oluşumu gibi gelişimsel metabolik süreçlerde önemli bir rol oynamaktadır (Makino 2011). Cd stresi altında N alımının ve asimilasyonunun azaldığı rapor edilmiştir (Ma vd. 2017). Bununla birlikte, Cd stresinin N özümlemesinde rol oynayan genlerin ifade seviyelerini azalttığı rapor edilmiştir (Di vd. 2023). Bu çalışmada, Cd ve Cys+Cd uygulamaları azot metabolizmasıyla ilgili DEG'lerin ifadesini farklı şekilde etkilemiştir. Kontrole göre Cd uygulaması azot metabolizması sürecinde fonksiyon gören nitrat redüktaz (NR), ferredoksin nitrit redüktaz (nirA) ve glutamin sentetaz (glnA) genlerinin ifade seviyelerini azalan yönde düzenlemiştir. Ayrıca Cys+Cd uygulaması NR ve glnA genlerinin ifade seviyesini artırırken nirA geninin ifade seviyesini azaltmıştır. Dışsal Cys uygulaması Cd stresi koşullarında NR aktivitesini artırarak N alımı ve özümlemesini arttırabilir çok önemlidir. Azot özümlemesi sürecinde oluşturulan amonyuma daha GSH öncüsü olan glutamati sentezlemek için kullanılmaktadır. Bu sonuçlar, dışsal Cys'in azot metabolizmasını düzenleyerek mısır bitkilerinin Cd stresine verdiği cevapları iyileştirebileceğini ileri sürmektedir.

Sonuç olarak, fizyolojik ve gen ifadesi analizlerini içeren bu araştırma, dışsal olarak uygulanan Cys'in Cd stresine maruz bırakılan mısır fideleri üzerindeki çok yönlü olumlu etkisini göstermektedir. Mısır kök ve gövde dokularında aşırı Cd birikimi, yüksek düzeyde lipid peroksidasyonu ve klorofil içeriğinde azalmaya neden olarak bitki gelişimini olumsuz yönde etkilemiştir. Mısır fidelerinde Cd alımı, translokasyonu ve hücre altı dağılımından sorumlu birçok taşıyıcıyı kodlayan çok sayıda DEG belirlenmiştir. Bununla birlikte, dışsal Cys uygulaması klorofil içeriğini artırarak ve lipid peroksidasyonunu azaltarak Cd stresinin neden olduğu büyüme inhibisyonunu etkin bir şekilde azaltmıştır. Dışsal Cys antioksidan enzimlerin (SOD, POD, CAT, APX) aktivitelerini ve ilgili genlerin ifade seviyelerini artırarak redoks homeostazisini yeniden kurmuş ve Cd stresinin neden olduğu oksidatif hasardan mısır yapraklarını korumuştur. Ek olarak Cys, fotosentezin ışık ve karbon özümleme reaksiyonları ile ilgili genleri artan yönde düzenlemiş ve böylece mısır fidelerinin Cd stresi koşullarında azalan fotosentetik performansını iyileştirmiş olabilir. Ayrıca transkriptom analizler, Cd stresi altında karbohidrat ve enerji metabolizması, transkripsiyonel düzenleme, stres savunma ve sekonder metabolizma gibi çeşitli metabolik yollarda yer alan DEG'lerin Cys tarafından düzenlendiğini göstermiştir. Bu sonuçlar, Cd alımını ve toksisitesini hafifletmede Cys'in moleküler rollerinin anlaşılmasına katkıda bulunmuştur. Sonuçlarımız aynı zamanda gıda güvenliği açısından Cd ile kirlenmiş toprakta Cys'in umut verici rolünü de ortaya koymaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Adamis P D, Gomes D S, Pinto M L C, Panek A D, Eleutherio E C, 2004, The Role of Glutathione Transferases in Cadmium Stress, *Toxicology Letters*, 154, 81–88.
- Aebi H, 1984, Catalase *in Vitro*, In *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- Agami R A, Mohamed G F, 2013, Exogenous Treatment with Indole–3–acetic Acid and Salicylic Acid Alleviates Cadmium Toxicity in Wheat Seedlings, *Ecotoxicology and Environment Safety*, 94, 164–171.
- Agarwal P, Mitra M, Banerjee S, Roy S, 2020, MYB4 Transcription Factor, a Member of R2R3–Subfamily of MYB Domain Protein, Regulates Cadmium Tolerance via Enhanced Protection Against Oxidative Damage and Increases Expression of *PCS1* and *MT1C* in *Arabidopsis*, *Plant Science*, 297, 110501.
- Ahamed G J, Choudhary S P, Chen S, Xia X, Shi K, Zhou Y, vd., 2013, Role of Brassinosteroids in Alleviation of Phenanthrene Cadmium Co–contamination Induced Photosynthetic Inhibition and Oxidative Stress in Tomato, *Journal of Experimental Botany*, 64, 199–213.
- Ahanger M A, Aziz U, Sahli A A, Alyemeni M N, Ahmad P, 2020, Combined Kinetin and Spermidine Treatments Ameliorate Growth and Photosynthetic Inhibition in *Vigna angularis* by Up–regulating Antioxidant and Nitrogen Metabolism under Cadmium Stress, *Biomolecules* 10, 147.
- Ahmad P, Ahanger M A, Alyemeni M N, Wijaya L, Alam P, 2018, Exogenous Application of Nitric Oxide Modulates Osmolyte Metabolism, Antioxidants, Enzymes of Ascorbate–Glutathione Cycle and Promotes Growth under Cadmium Stress in Tomato, *Protoplasma*, 255, 79–93.
- Ahmad F, Singh A, Kamal A, 2019a, Salicylic Acid–mediated Defense Mechanisms to Abiotic Stress Tolerance, *Plant Signaling Molecules*, 13, 355–369.
- Ahmad P, Tripathi D K, Deshmukh R, Pratap Singh V, Corpas F J, 2019b, Revisiting the Role of ROS and RNS in Plants under Changing Environment, *Environmental and Experimental Botany*, 161, 1–3.
- Aioub A A, Zuo Y, Li Y, Qie X, Zhang X, Essmat N, vd., 2021, Transcriptome Analysis of *Plantago major* as a Phytoremediator to Identify Some Genes Related to Cypermethrin Detoxification, *Environmental Science and Pollution Research*,

28, 5101–5115.

- Akhtar T, Zia-ur-Rehman M, Naeem A, Nawaz R, Ali S, Murtaza G, vd., 2017, Photosynthesis and Growth Response of Maize (*Zea mays* L.) Hybrids Exposed to Cadmium Stress, *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 5521–5529.
- Akram N A, Iqbal M, Muhammad A, Ashraf M, Al-Qurainy F, Shafiq S, 2018, Aminolevulinic Acid and Nitric Oxide Regulate Oxidative Defense and Secondary Metabolisms in Canola (*Brassica napus* L.) under Drought Stress, *Protoplasma* 255, 163–174.
- Al Ubeed H, Wills R, Bowyer M, 2017, Interaction of Exogenous Hydrogen Sulphide and Ethylene on Senescence of Green Leafy Vegetables, *Postharvest Biology and Technology*, 133, 81–87.
- Ali H, Khan E, Sajad M A, 2013, Phytoremediation of Heavy Metals Concepts and Applications, *Chemosphere*, 91, 869–888.
- Ali B, Gill R A, Yang S, Gill M B, Ali S, Rafiq M T, vd., 2014, Hydrogen Sulfide Alleviates Cadmium-induced Morpho-physiological and Ultrastructural Changes in *Brassica napus*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 110, 197–207.
- Allen J F, 2004, Cytochrome b6f: Structure for Signalling and Vectorial Metabolism, *Trends in Plant Science*, 9, 130–137.
- Alves L R, Monteiro C C, Carvalho R F, Ribeiro P C, Tezotto T, Azevedo R A, vd., 2017, Cadmium Stress Related to Root to Shoot Communication Depends on Ethylene and Auxin in Tomato Plants, *Environmental and Experimental Botany*, 134, 102–115.
- Alyemeni M N, Ahanger M A, Wijaya L, Alam P, Bhardwaj R, Ahmad P, 2018, Selenium Mitigates Cadmium-induced Oxidative Stress in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Plants by Modulating Chlorophyll Fluorescence, Osmolyte Accumulation, and Antioxidant System, *Protoplasma*, 255, 459–469.
- An C, Mou Z, 2011, Salicylic Acid and Its Function in Plant Immunity, *Journal of Integrative Plant Biology*, 53, 412–428.
- Andersson J, Wentworth M, Walters R G, Howard C A, Ruban A V, Horton P, vd., 2003, Absence of the Lhcb1 and Lhcb2 Proteins of the Light-harvesting Complex of Photosystem II—Effects on Photosynthesis, Grana Stacking and Fitness, *The Plant Journal*, 35, 350–361.

- Andrea A D, Pellman D, 2008, De Ubiquitinating Enzymes: A New Class of Biological Regulators, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 33, 337–352.
- Andrews S, 2010, FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data.
- Anjum N A, Ahmad I, Mohmood I, Pacheco M, Duarte A C, Pereira E, 2012, Modulation of Glutathione and Its Related Enzymes in Plants' Responses to Toxic Metals and Metalloids–A Review, *Environmental and Experimental Botany*, 75, 307–324.
- Anjum N A, Hasanuzzaman M, Hossain M A, Thangavel P, Roychoudhury A, Gill S S, vd., 2015, Jacks of Metal/metalloid Chelation Trade in Plants an Overview, *Frontiers in Plant Science*, 6, 192.
- Aroca A, Benito J M, Gotor C, Romero L C, 2017, Persulfidation Proteome Reveals the Regulation of Protein Function by Hydrogen Sulfide in Diverse Biological Processes in Arabidopsis, *Journal of Experimental Botany*, 68, 4915–4927.
- Aroca A, Gotor C, Romero L C, 2018, Hydrogen Sulfide Signaling in Plants: Emerging Roles of Protein Persulfidation, *Frontiers in Plant Science*, 9, 1369.
- Arora D, Bhatla S C, 2017, Melatonin and Nitric Oxide Regulate Sunflower Seedling Growth under Salt Stress Accompanying Differential Expression of Cu/Zn SOD and Mn SOD, *Free Radical Biology and Medicine*, 106, 315–328.
- Asgher M, Khan M I R, Anjum N A, Khan N A, 2014, Minimising Toxicity of Cadmium in Plants Role of Plant Growth Regulators, *Protoplasma*, 252, 399–413.
- Atafar Z, Mesdaghinia A, Nouri J, Homae M, Yunesian M, Ahmadimoghaddam M, vd., 2010, Effect of Fertilizer Application on Soil Heavy Metal Concentration, *Environmental Monitoring and Assessment*, 160, 83–89.
- Aysin F, Karaman A, Yilmaz A, Aksakal Ö, 2020, Exogenous Cysteine Alleviates Mercury Stress by Promoting Antioxidant Defence in Maize (*Zea mays* L.) Seedlings, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 44, 506–516.
- Azarakhsh M, Asrar Z, Mansuori H, 2014, Effects of Seed and Vegetative Stage Cysteine Treatments on Oxidative Stress Response Molecules and Enzymes in *Ocimum basilicum* L. under Cobalt Stress, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 15, 651–662.

- Bali A S, Sidhu G P S, Kumar V, Bhardwaj R, 2019, Mitigating Cadmium Toxicity in Plants by Phytohormones, Hasanuzzaman M, Prasad M N V, Fujita M (Eds.), Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants (375–396), Academic Press, 589p.
- Banerjee A, Tripathi D K, Roychoudhury A, 2018, Hydrogen Sulphide Trapeze: Environmental Stress Amelioration and Phytohormone Crosstalk, Plant Physiology and Biochemistry, 132, 46–53.
- Baudouin E, Hancock J, 2014, Nitric Oxide Signaling in Plants, Frontiers in Plant Science, 4, 553.
- Baxter A, Mittler R, Suzuki N, 2014, ROS as Key Players in Plant Stress Signalling, Journal of Experimental Botany, 65, 1229–1240.
- Beauchamp C, Fridovich I, 1971, Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels, Analytical Biochemistry, 44, 276–287.
- Belkadhi A, Hediji H, Abbes Z, Nouairi I, Barhoumi Z, Zarrouk M, vd., 2010, Effects of Exogenous Salicylic Acid Pre-treatment on Cadmium Toxicity and Leaf Lipid Content in *Linum usitatissimum* L., Ecotoxicology and Environment Safety, 73, 1004–1011.
- Belkadhi A, De Haro A, Obregon S, Charbi W, Djebali W, 2015, Positive Effects of Salicylic Acid Pretreatment on the Composition of Flax Plastidial Membrane Lipids under Cadmium Stress, Environment Science Pollution Research, 22, 1457–1467.
- Bellin D, Asai S, Delledonne M, Yoshioka H, 2013, Nitric Oxide as a Mediator for Defense Responses, Molecular Plant–Microbe Interactions, 26, 271–277.
- Ben-David H, Nelson N, Gepstein S, 1983, Differential Changes in the Amount of Protein Complexes in the Chloroplast Membrane During Senescence of Oat and Bean Leaves, Plant Physiology, 73, 507–510.
- Bhaduri A M, Fulekar M H, 2012, Antioxidant Enzyme Responses of Plants to Heavy Metal Stress, Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 11, 55–69.
- Bilgiç Ş, Sade B, Soylu S, Bilgiçli N, Cerit İ, Öz A, 2012, Mısır Raporu, Ulusal Hububat Konseyi, Ankara.
- Bolger A M, Lohse M, Usadel B, 2014, Trimmomatic: Aflexible Trimmer for Illumina Sequence Data, Bioinformatics, 30, 2114–2120.
- Bommer M, Bondar A N, Zouni A, Dobbek H, Dau H, 2016, Crystallographic and

- Computational Analysis of the Barrel Part of the PsbO Protein of Photosystem II: Carboxylate–water Clusters as Putative Proton Transfer Relays and Structural Switches, *Biochemistry*, 55, 4626–4635.
- 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
- Broadley M R, Willey N J, Wilkins J C, Baker A J, Mead A, White P J, 2001, Phylogenetic Variation in Heavy Metal Accumulation in Angiosperms, *New Phytologist*, 152, 9–27.
- Brunetti P, Zanella L, De P A, Di L 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.
- Cai H, Xie P, Zeng W, Zhai Z, Zhou W, Tang Z, 2019, Root–specific Expression of Rice *OsHMA3* Reduces Shoot Cadmium Accumulation in Transgenic Tobacco, *Molecular Breeding*, 39–49.
- Carneiro J M, Chacón–Madrid K, Galazzi R M, Campos B K, Arruda S C, Azevedo R A, vd., 2017, Evaluation of Silicon Influence on the Mitigation of Cadmium–stress in the Development of *Arabidopsis thaliana* Through Total Metal Content, Proteomic and Enzymatic Approaches, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 44, 50–58.
- Castro A V, de Almeida A A F, Pirovani C P, Reis G S M, Almeida N M, Mangabeira P A O, 2015, Morphological, Biochemical, Molecular and Ultrastructural Changes Induced By Cd Toxicity in Seedlings of *Theobroma cacao* L., *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 115, 174–186.
- Cao Z Z, Lin X Y, Yang Y J, Guan M Y, Xu P, Chen M X, 2019, Gene Identification and Transcriptome Analysis of Low Cadmium Accumulation Rice Mutant (lcd1) in Response to Cadmium Stress Using MutMap and RNA–Seq, *BMC Plant Biology*, 19, 1–13.
- Cao Y, Ma C, Yu H, Tan Q, Dhankher O P, White J C, vd., 2023, The Role of Sulfur

- Nutrition in Plant Response to Metal(loid) Stress: Facilitating Biofortification and Phytoremediation, *Journal of Hazardous Materials*, 443, 130283.
- Chang C, Yin R, Zhang H, Yao L, 2019, Bioaccumulation and Health Risk Assessment of Heavy Metals in The Soile Rice System in a Typical Seleniferous Area in Central China, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38, 1577–1584.
- Chen Z, Zheng Z, Huang J, Lai Z, Fan B, 2009, Biosynthesis of Salicylic Acid in Plants, *Plant Signal Behavior*, 4, 493–496.
- Chen W, Lu S, Peng C, Jiao W, Wang M, 2013, Accumulation of Cd in Agricultural Soil under Longterm Reclaimed Water Irrigation, *Environmental Pollution*, 178, 294–299.
- Chen J, Yan Z, Li X, 2014, Effect of Methyl Jasmonate on Cadmium Uptake and Antioxidative Capacity in *Kandelia obovate* Seedlings under Cadmium Stress, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104, 349–356.
- Chen S F, Li M W, Jing H J, Zhou R C, Yang G L, Wu W, vd., 2015a, De novo Transcriptome Assembly in *Firmiana danxiaensis*, A Tree Species Endemic to The Danxia Landform, *PLoS One*, 10, e0139373.
- Chen J, Wang W H, Wu F H, He E M, Liu X, Shangguan Z P, vd., 2015b, Hydrogen Sulfide Enhances Salt Tolerance Through Nitric Oxide–Mediated Maintenance of Ion Homeostasis in Barley Seedling Roots, *Scientific Reports*, 5, 12516.
- Chen Z, Yang B, Hao Z, Zhu J, Zhang Y, Xu T, 2018, Exogenous Hydrogen Sulfide Ameliorates Seed Germination and Seedling Growth of Cauliflower under Lead Stress and Its Antioxidant Role, *Journal of Plant Growth Regulation*, 37, 5–15.
- Chen J, Zou W, Meng L, Fan X, Xu G, Ye G, 2019, Advances in the Uptake and Transport Mechanisms and QTLs Mapping of Cadmium in Rice, *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 3417.
- Chen X, Shi X, Ai Q, Han J, Wang H, Fu Q, 2022a, Transcriptomic and Metabolomic Analyses Reveal that Exogenous Strigolactones Alleviate the Response of Melon Root to Cadmium Stress, *Horticultural Plant Journal*, 8, 637–649.
- Chen X, Zhang X, Chen H, Xu X, 2022b, Physiology and Proteomics Reveal Fulvic Acid Mitigates Cadmium Adverse Effects on Growth and Photosynthetic Properties of Lettuce, *Plant Science*, 323, 111418.
- Chmielowska–Bak J, Deckert J, 2013, Nitric Oxide Mediates Cd–dependent Induction

- of Signaling-associated Genes, *Plant Signaling and Behavior*, 8, 12.
- Chmielowska-Bak J, Gzyl J, Rucińska-Sobkowiak R, Arasimowicz-Jelonek M, Deckert J, 2014, The New Insights into Cadmium Sensing, *Frontiers in Plant Science*, 5, 245–213.
- Choi B Y, Kim H, Shim D, Jang S, Yamaoka Y, Shin S, vd., 2022, The Chlamydomonas bZIP Transcription Factor BLZ8 Confers Oxidative Stress Tolerance by Inducing the Carbon-concentrating Mechanism, *The Plant Cell*, 34, 910–926.
- Clemens S, 2006, Toxic Metal Accumulation, Responses to Exposure and Mechanisms of Tolerance in Plants, *Biochimie*, 88, 1707–1719.
- Clemens S, Aarts M G, Thomine S, Verbruggen N, 2013, Plant Science: The Key to Preventing Slow Cadmium Poisoning, *Trends in Plant Science*, 18, 92–99.
- Clemens S, Ma J F, 2016, Toxic Heavy Metal and Metalloid Accumulation in Crop Plants and Foods, *Annual Review of Plant Biology*, 67, 489–512.
- Clemens S, 2019, Safer Food Through Plant Science: Reducing Toxic Element Accumulation in Crops, *Journal of Experimental Botany*, 70, 5537–5557.
- Cobbett C, Goldsbrough P, 2002, Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis, *Annual Review of Plant Biology*, 53, 159–182.
- Cooper A J, Krasnikov B F, Niatetskaya Z V, Pinto J T, Callery P S, Villar M T, vd., 2011, Cysteine S-conjugate β -lyases: Important Roles in the Metabolism of Naturally Occurring Sulfur and Selenium-Containing Compounds, *Xenobiotics and Anticancer Agents, Amino Acids*, 41, 7–27.
- Corpas F J, Barroso J B, Carreras A, Valderrama R, Palma J M, Río L A, 2007, Nitrosative Stress in Plants: A new approach to understand the role of NO in abiotic stress, Lamattina L, Polacco J C (Eds.), *Nitric Oxide in Plant Growth, Development and Stress Physiology* (187–205), Springer, 283p, Berlin.
- Cui F, Liu I, Zhao Q, Zhang Z, Li Q, Lin B, vd., 2012, Arabidopsis Ubiquitin Conjugase *UBC32* Is an *ERAD* Component that Functions in Brassinosteroid-Mediated Salt Stress Tolerance, *Plant Cell*, 24, 233–244.
- Cui W, Yao P, Pan J, Dai C, Cao H, Chen Z, vd., 2020, Transcriptome Analysis Reveals Insight into Molecular Hydrogen-induced Cadmium Tolerance in Alfalfa: The

- Prominent Role of Sulfur and (Homo) Glutathione Metabolism, *BMC Plant Biology*, 20, 58.
- Curie C, Alonso J M, Jean M L, Ecker J R, Briat J F, 2000, Involvement of *NRAMP1* from *Arabidopsis thaliana* in Iron Transport, *Biochemical Journal*, 347, 749–755.
- D'Alessandro A, Taamalli M, Gevi F, Timperio A M, Zolla L, Ghnaya T, 2013, Cadmium Stress Responses in *Brassica juncea*: Hints from Proteomics and Metabolomics, *Journal of Proteome Research*, 12, 4979–4997.
- Dalcorso G, Farinati S, Furini A, 2010, Regulatory Networks of Cadmium Stress in Plants, *Plant Signaling and Behavior*, 5, 663–667.
- Davidian J C, Kopriva S, 2010, Regulation of Sulfate Uptake and Assimilation—The Same or not the Same?, *Molecular Plant*, 3, 314–325.
- Davies P J (Ed.), 2004, *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action*, Springer, 750p, Dordrecht.
- Deng X, Xia Y, Hu W, Zhang H, Shen Z, 2010, Cadmium Induced Oxidative Damage and Protective Effects of N-acetyl-L-cysteine Against Cadmium Toxicity in *Solanum nigrum* L., *Journal of Hazardous Materials*, 180, 722–729.
- Deng F, Yu M, Martinoia E, Song W Y, 2019a, Ideal Cereals with Lower Arsenic and Cadmium by Accurately Enhancing Vacuolar Sequestration Capacity, *Frontiers in Genetics*, 10, 322.
- Deng G, Zhou L, Wang Y, Zhang G, Chen X, 2019b, Hydrogen Sulfide Acts Downstream of Jasmonic Acid to Inhibit Stomatal Development in *Arabidopsis*, *Planta*, 251, 42.
- Deuschle K, Funck D, Forlani G, Stransky H, Biehl A, Leister D, vd., 2004, The Role of Δ^1 -Pyrroline-5-carboxylate Dehydrogenase in Proline Degradation, *The Plant Cell*, 16, 3413–3425.
- Di X, Jing R, Qin X, Wei Y, Liang X, Wang L, vd., 2023, Transcriptome Analysis Reveals the Molecular Mechanism of Different Forms of Selenium in Reducing Cadmium Uptake and Accumulation in Wheat Seedlings, *Chemosphere*, 340, 139888.
- Dias M C, Monteiro C, Moutinho-Pereira J, Correia C, GonScalves B, Santos C, 2012, Cadmium Toxicity Affects Photosynthesis and Plant Growth at Different Levels, *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 1281–1289.

- Dickinson B C, Chang C J, 2011, Chemistry and Biology of Reactive Oxygen Species in Signaling or Stress Responses, *Nature Chemical Biology*, 7, 504–511.
- Ding F, Cui P, Wang Z, Zhang S, Ali S, Xiong L, 2014, Genome-wide Analysis of Alternative Splicing of Pre-mRNA under Salt Stress in Arabidopsis, *BMC Genomics*, 15, 1–14.
- Dixit V, Pandey V, Shyam R, 2001, Differential Antioxidative Responses to Cadmium in Roots and Leaves of Pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad), *Journal of Experimental Botany*, 52, 1101–1109.
- Dobrikova A G, Apostolova E L, 2019, Damage and Protection of The Photosynthetic Apparatus under Cadmium Stress, Hasanuzzaman M, Prasad M N V, Fujita M (Ed.), *Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants* (275–298), Elsevier, 589.
- Doelling J H, Yan N, Kurepa J, Walker J, Vierstra R D, 2001, The Ubiquitin-specific Protease *UBP14* Is Essential for Early Embryo Development in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Journal for Cell and Molecular Biology* 27, 393–405.
- Dorman D C, Moulin F J M, McManus B E, Mahle K C, Jmmes R A, Struve M F, 2001, Cytochrome Oxidase Inhibition Induced by Acute Hydrogen Sulfide Inhalation: Correlation with Tissue Sulfide Concentrations in the Rat Brain, Liver, Lung, and Nasal Epithelium, *Toxicological Sciences*, 65, 18–25.
- Drazic G, Mihailovic N, 2009, Salicylic Acid Modulates Accumulation of Cd in Seedlings of Cd-Tolerant and Cd-Susceptible Soybean Genotypes, *Archives of Biological Sciences*, 61, 431–439
- Du L, Li N, Chen L, Xu Y, Li Y, Zhang Y, vd., 2014, The Ubiquitin Receptor *DA1* Regulates Seed and Organ Size by Modulating the Stability of the Ubiquitin-specific Protease *UBP15/SOD2* in Arabidopsis, *Plant Cell* 26, 665–677.
- El Dakak R A, Hassan I A, 2020, The Alleviative Effects of Salicylic Acid on Physiological Indices and Defense Mechanisms of Maize (*Zea Mays* L. Giza 2) Stressed with Cadmium, *Environmental Processes*, 7, 873–884.
- El Rasafi T, Oukarroum A, Haddioui A, Song, H, Eilhann E, Kwon Bolan N, vd., 2022, Cadmium Stress in Plants, A Critical Review of the Effects, Mechanisms, and Tolerance Strategies, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 52, 675–726.

- Enstone D E, Peterson C A, Ma F, 2002, Root Endodermis and Exodermis: Structure, Function, and Responses to the Environment, *Journal Plant Growth Regulation*, 21, 335–351.
- Erdal E, Turk H, 2016, Cysteine–induced Upregulation of Nitrogen Metabolism–related Genes and Enzyme Activities Enhance Tolerance of Maize Seedlings to Cadmium Stress, *Environmental and Experimental Botany*, 132, 92–99.
- Fahr M, Laplaze L, Bendaou N, Hocher V, Mzibri M, El Bogusz D, vd., 2013, Effect of Lead on Root Growth, *Frontiers in Plant Science*, 4, 175.
- 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 on Hydrogen Sulfide–Cysteine Cycle on Enhancing the Tolerance to Chromium Stress in *Arabidopsis*, *Environmental Pollution*, 213, 870–877.
- FAO, 2020, Crop Statistics, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Farooq M A, Niazi A K, Akhtar J, Farooq M, Sourì Z, Karimi N, vd., 2019, Acquiring Control: The Evolution of ROS–induced Oxidative Stress and Redox Signaling Pathways in Plant Stress Responses, *Plant Physiology and Biochemistry*, 141, 353–369.
- Fatma M, Masood A, Per T S, Khan N A, 2016, Nitric Oxide Alleviates Salt Stress Inhibited Photosynthetic Response by Interacting with Sulphur Assimilation in Mustard, *Frontiers in Plant Science*, 7, 521.
- Feng S, Yue R, Tao S, Yang Y, Zhang L, Xu M, vd., 2015, Genome–wide Identification, Expression Analysis of Auxin–responsive *GH3* Family Genes in Maize (*Zea mays* L.) under Abiotic Stresses, *Journal of Integrative Plant Biology*, 57, 783–795.
- Figueira E, Freitas R, Guasch H, Almeida S F P, 2014, Efficiency of Cadmium Chelation by Phytochelatins in *Nitzschia palea* (Kutzing) W. Smith, *Ecotoxicology*, 23, 285–292.
- Fontes R L F, Pereira J M N, Neves J C L, 2014, Uptake and Translocation of Cd and Zn in Two Lettuce Cultivars, *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 86, 907–922.

- Gallego S M, Pena L B, Barcia R A, Azpilicueta C E, Iannone M F, Rosales E P, vd., 2012, Unravelling Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants: Insight into Regulatory Mechanisms, *Environmental and Experimental Botany*, 83, 33–46.
- Gao J, Luo M, Zhu Y H, Wang Q, Zhang C, 2015, Transcriptome Sequencing and Differential Gene Expression Analysis in *Viola yedoensis* Makino (Fam. Violaceae) Responsive to Cadmium (Cd) Pollution, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 459, 60–65.
- Gao F, Zhou J, Deng R Y, Zhao H X, Li C L, Chen H, vd., 2017, Overexpression of a Tartary Buckwheat R2R3-MYB Transcription Factor Gene, *FtMYB9*, Enhances Tolerance to Drought and Salt Stresses in Transgenic Arabidopsis, *Journal of Plant Physiology*, 214, 81–90.
- Garnier L, Simonplais F, Thuleau P, Agnel J P, Blein J P, Ranjeva R, vd., 2006, Cadmium Affects Tobacco Cells by a Series of Three Waves of Reactive Oxygen Species that Contribute to Cytotoxicity, *Plant Cell Environment*, 29, 1956–1969.
- Gau A E, Thole H H, Pistorius E K, 1995, Isolation and Partial Characterization of a Manganese Requiring L-arginine Metabolizing Enzyme Being Present in Photosystem II Complexes of Spinach and Tobacco, *Zeitschrift für Naturforschung C*, 50, 638–651.
- Gautam A, Pandey A K, 2021, Aquaporins Responses under Challenging Environmental Conditions and Abiotic Stress Tolerance in Plants, *The Botanical Review*, 87, 467–495.
- Genisel M, Erdal S, Kizilkaya M, 2015, The Mitigating Effect of Cysteine on Growth Inhibition in Salt-Stressed Barley Seeds is Related to Its Own Reducing Capacity rather than Its Effects on Antioxidant System, *Plant Growth Regulation*, 75, 187–197.
- Ghosh R, Roy S, 2019, Cadmium Toxicity in Plants: Unveiling the Physicochemical and Molecular Aspects, Hasanuzzaman M, Prasad M N V, Nahar K (Ed.), *Cadmium Tolerance in Plants* (223–246), Elsevier, 599p.
- Gill S S, Tuteja N, 2010, Reactive Oxygen Species and Antioxidant Machinery in Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909–930.
- Gill S S, Tuteja N, 2011, Cadmium Stress Tolerance in Crop Plants: Probing the Role of

- Sulfur, Plant Signaling and Behavior, 6, 215–222.
- Gill S S, Hasanuzzaman M, Nahar K, Macovei A, Tuteja N, 2013, Importance of Nitric Oxide in Cadmium Stress Tolerance in Crop Plants, Plant Physiology and Biochemistry, 63, 254–261.
- Gill M, 2014, Heavy Metal Stress in Plants: A review, International Journal of Advanced Research, 2, 1043–1055.
- Gong B, Nie W, Yan Y, Gao Z, Shi Q, 2017, Unravelling Cadmium Toxicity and Nitric Oxide Induced Tolerance in *Cucumis sativus*: Insight into Regulatory Mechanisms Using Proteomics, Journal of Hazardous Materials, 336, 202–213.
- Gong Z, Xiong L, Shi H, Yang S, Herrera–Estrella L R, Xu G, vd., 2020, Plant Abiotic Stress Response and Nutrient Use Efficiency, Science China Life Sciences, 63, 635–674.
- Gray J, Caparrós–Ruiz D, Grotewold E, 2012, Grass Phenylpropanoids: Regulate Before Using!, Plant Science, 184, 112–120.
- Gu Q, Wang C, Xiao Q, Chen Z, Han Y, 2021, Melatonin Confers Plant Cadmium Tolerance: An Update, International Journal of Molecular Sciences, 22, 11704.
- Guan C, Ji J, Jia C, Guan W, Li X, Jin C, vd., 2015, A *GSHS*–like Gene from *Lycium chinense* Maybe Regulated by Cadmium–induced Endogenous Salicylic Acid and Overexpression of This Gene Enhances Tolerance to Cadmium Stress in Arabidopsis, Plant Cell Reports, 34, 871–884.
- Guo J, Dai X, Xu W, Mi M, 2008, Over Expressing *GSH1* and *AsPCS1* Simultaneously Increases the Tolerance and Accumulation of Cadmium and Arsenic in *Arabidopsis thaliana*, Chemosphere, 72, 1020.
- Guo Q, Meng L, Mao P C, Jia Y Q, Shi Y J, 2013, Role of Exogenous Salicylic Acid in Alleviating Cadmium–induced Toxicity in Kentucky Bluegrass, Biochemical Systematics and Ecology, 50, 269–276.
- Guo H, Xiao T, Zhou H, Xie Y, Shen W, 2016, Hydrogen Sulfide: A Versatile Regulator of Environmental Stress in Plants, Acta Physiologiae Plantarum, 38,1–13.
- Guo J, Qin S, Rengel Z, Gao W, Nie Z, Liu H, vd., 2019, Cadmium Stress Increases Antioxidant Enzyme Activities and Decreases Endogenous Hormone Concentrations More in Cd–tolerant than Cd–sensitive Wheat Varieties,

- Ecotoxicology and Environmental Safety, 172, 380–387.
- Gupta N, Ram H, Kumar B, 2016, Mechanism of Zinc Absorption in Plants: Uptake, Transport, Translocation and Accumulation, Environmental Science and Biotechnology, 15, 89–109.
- Gupta D K, Palma J M, Corpas F J (Ed.), 2018, Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants, Springer, 300p, Berlin.
- Gupta N, Yadav K K, Kumar V, Kumar S, Chadd R P, Kumar A, 2019, Trace Elements in Soil–Vegetables Interface, Translocation, Bioaccumulation, Toxicity and Amelioration A Review, The Science of the Total Environment, 651, 2927–2942.
- Haehnel W, 1986, Encyclopedia of Plant Physiology, Springer, 547–559.
- Hall J L, 2002, Cellular Mechanisms for Heavy Metal Detoxification and Tolerance, Journal of Experimental Botany, 53, 1–11.
- Hameed A, Rasool S, Azooz M M, Hossain M A, Ahanger M A, Ahmad P, 2016, Heavy Metal Stress: Plant Responses and Signaling, Ahmad P (Ed.), Plant Metal Interaction (557–583), Elsevier, 619p.
- Han X, Hu Y, Zhang G, Jiang Y, Chen X, Yu D, 2018, Jasmonate Negatively Regulates Stomatal Development in Arabidopsis Cotyledons, Plant Physiology, 176, 2871–2885.
- 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.
- Hancock J T, Whiteman M, 2016, Hydrogen Sulfide Signaling: Interactions with Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species, Annals of the New York Academy of Sciences, 1365, 5–14.
- Hanke G, Mulo P, 2013, Plant Type Ferredoxins and Ferredoxin-dependent Metabolism, Plant, Cell and Environment, 36, 1071–1084.
- Hasan S A, Hayat S, Ahmad A, 2011, Brassinosteroids Protect Photosynthetic Machinery Against the Cadmium Induced Oxidative Stress in Two Tomato Cultivars, Chemosphere, 84, 1446–1451.
- Hasan M K, Ahammed G J, Yin L, Shi K, Xia X, Zhou Y, vd., 2015, Melatonin Mitigates Cadmium Phytotoxicity Through Modulation of Phytochelatin Biosynthesis, Vacuolar Sequestration, and Antioxidant Potential in *Solanum*

- lycopersicum* L., *Frontiers in Plant Science*, 6, 601.
- Hasan M K, Liu C, Wang F, Ahammed G J, Zhou J, Xu M X, vd., 2016, Glutathione-mediated Regulation of Nitric Oxide, S-nitrosothiol and Redox Homeostasis Confers Cadmium Tolerance by Inducing Transcription Factors and Stress Response Genes in Tomato, *Chemosphere*, 161, 536–545.
- Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad A, 2010, Effect of Exogenous Salicylic Acid under Changing Environment: A Review, *Environment Experimental Botany*, 68, 14–25.
- Hayward A R, Coates K E, Galer A L, Hutchinson T C, Emery R J N, 2013, Chelator profiling in *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv. Reveals a Ni Reaction, Which is Distinct from the ABA and Cytokinin Associated Response to Cd, *Plant Physiology and Biochemistry*, 64, 84–91
- He H Y, He L F, Gu M H, 2012, Interactions Between Nitric Oxide and Plant Hormones in Aluminum Tolerance, *Plant Signaling and Behavior*, 7, 469–471.
- 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.
- Herbette S, Taconnat L, Hugouvieux V, Piette L, Magniette M L, Cuine S, vd., 2006, Genome-wide Transcriptome Profiling of the Early Cadmium Response of *Arabidopsis* Roots and Shoots, *Biochimie*, 88, 1751–1765.
- Hernández L E, Sobrino-Plata J, Montero-Palmero M B, Carrasco-Gil S, Flores-Cáceres M L, Ortega-Villasante C, vd., 2015, Contribution of Glutathione to The Control of Cellular Redox Homeostasis under Toxic Metal and Metalloid Stress, *Journal of Experimental Botany*, 66, 2901–2911.
- Hsu Y T, Kao C H, 2003, Role of Absciscic Acid in Cadmium Tolerance of Rice (*Oryza sativa* L.) Seedlings, *Plant Cell Environment*, 26, 867–874.
- Hu J, Chen G, Xu K, Wang J, 2022, Cadmium in Cereal Crops: Uptake and Transport Mechanisms and Minimizing Strategies, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70, 5961–5974.
- Huang Z, He K, Song Z, Zeng G, Chen A, Yuan L, vd., 2019, Alleviation of Heavy Metal and Silver Nanoparticle Toxicity and Enhancement of Their Removal by Hydrogen Sulfide in *Phanerochaete chrysosporium*, *Chemosphere*, 224, 554–561

- Hussain A, Mun B G, Imran Q M, Lee S U, Adamu T A, Shahid M, vd., 2016, Nitric Oxide Mediated Transcriptome Profiling Reveals Activation of Multiple Regulatory Pathways in *Arabidopsis thaliana*, *Frontiers in Plant Science*, 29, 975.
- Ishimaru Y, Suzuki M, Tsukamoto T, Suzuki K, Nakazono M, Kobayashi T, vd., 2006, Rice Plants Take Up iron as an *Fe³⁺*-phytosiderophore and as *Fe²⁺*, *Plant Journal*, 45, 335–346.
- Ismael M A, Elyamine A M, Moussa M G, Cai M, Zhao X, Hu C, 2019, Cadmium in Plants: Uptake, Toxicity, and Its Interactions with Selenium Fertilizers, *Metallomics*, 11, 255–277.
- Jain S, Muneer S, Guerriero G, Liu S, Vishwakarma K, Chauhan D K, vd., 2018, Tracing the Role of Plant Proteins in the Response to Metal Toxicity: A Comprehensive Review, *Plant Signaling and Behavior*, 13, 1–11.
- Jalimi S K, Bhagat P K, Verma D, Noryang S, Tayyeba S, Singh K, vd., 2018, Traversing the Links Between Heavy Metal Stress and Plant Signaling, *Frontiers in Plant Science*, 9, 12–21.
- Janda T, Gondor O K, Yordanova R, Szalai G, Paál M, 2014, Salicylic Acid and Photosynthesis: Signalling and Effects, *Acta Physiologiae Plantarum*, 36, 2537–2546.
- Jia H, Wang X, Dou Y, Liu D, Si W, Fang H, vd., 2016, Hydrogen Sulfide–Cysteine Cycle System Enhances Cadmium Tolerance Through Alleviating Cadmium–induced Oxidative Stress and Ion Toxicity in *Arabidopsis* Roots, *Scientific Reports*, 6, 39702.
- Jian S, Luo J, Liao Q, Liu Q, Guan C, Zhang Z, 2019, NRT1.1 Regulates Nitrate Allocation and Cadmium Tolerance in *Arabidopsis*, *Frontiers in Plant Science*, 10, 384.
- Jiang N, Doseff A I, Grotewold E, 2016, Flavones: From Biosynthesis to Health Benefits, *Plants*, 5, 27.
- Jiang Y, Han J, Xue W, Wang J, Wang B, Liu L, vd., 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.
- Johri N, Jacquillet G, Unwin R, 2010, Heavy Metal Poisoning: The Effects of Cadmium

- on the Kidney, *BioMetals*, 23, 783–792.
- Joshi N C, Meyer A J, Bangash S A K, Zheng Z L, Leustek T, 2019, Arabidopsis Gamma–Glutamylcyclotransferase Affects Glutathione Content and Root System Architecture During Sulfur Starvation, *New Phytologist*, 221, 1387–1397.
- Jozefczak M, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A, 2012, Glutathione Is a Key Player in Metal–induced Oxidative Stress Defenses, *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 3145–3175.
- Jozefczak M, Keunen E, Schat H, Blik M, Hernández L E, Carleer R, vd., 2014, Differential Response of Arabidopsis Leaves and Roots to Cadmium: Glutathione–related Chelating Capacity vs Antioxidant Capacity, *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 1–9.
- Jungmann J, Reins H A, Schobert C, Jentsch S, 1993, Resistance to Cadmium Mediated by Ubiquitin–dependent Proteolysis, *Nature*, 361–369.
- Kamran M, Danish M, Saleem M H, Malik Z, Parveen A, Abbasi G H, vd., 2020, Application of Abscissic Acid and 6–Benzylaminopurine Modulated Morpho–physiological and Antioxidative Defense Responses of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) by Minimizing Cobalt Uptake, *Chemosphere* 263, 128–169.
- Kang G, Li G, Guo T, 2014, Molecular Mechanism of Salicylic Acid–induced Abiotic Stress Tolerance in Higher Plants, *Acta Physiologiae Plantarum*, 36, 2287–2297.
- Kawakami Y, Bhullar N K, 2018, Molecular Processes in Iron and Zinc Homeostasis and Their Modulation for Biofortification in Rice, *Journal of Integrative Plant Biology*, 60, 1181–1198.
- Kawano T, Bouteau F, 2013, Crosstalk Between Intracellular and Extracellular Salicylic Acid Signaling Events Leading to Long distance Spread of Signals, *Plant Cell Reports*, 32, 1125–1138.
- Kaya C, Ashraf M, Wijaya L, Ahmad P, 2019, The Putative Role of Endogenous Nitric Oxide in Brassinosteroid–induced Antioxidant Defence System in Pepper (*Capsicum annuum* L.) Plants under Water Stress, *Plant Physiology and Biochemistry*, 143, 119–128.
- Khan M I R, Asgher M, Khan N A, 2014, Alleviation of Salt–induced Photosynthesis and Growth Inhibition by Salicylic Acid Involves Glycinebetaine and Ethylene in

- Mungbean (*Vigna radiata* L.), Plant Physiology and Biochemistry, 80, 67–74.
- Khan M I R, Fatma M, Per T S, Anjum N A, Khan N A, 2015, Salicylic Acid–induced Abiotic Stress Tolerance and Underlying Mechanisms in Plants, *Frontiers Plant Science*, 6, 462.
- Khan M I R, Iqbal N, Masood A, Mobin M, Anjum N A, Khan N A, 2016, Modulation and Significance of Nitrogen and Sulfur Metabolism in Cadmium Challenged Plants, *Plant Growth Regulation*, 78, 1–11.
- Khan M Y, Prakash V, Yadav V, Chauhan D K, Prasad S M, Ramawat N, vd., 2019, Regulation of Cadmium Toxicity in Roots of Tomato by Indole Acetic Acid with Special Emphasis on Reactive Oxygen Species Production and Their Scavenging, *Plant Physiology and Biochemistry*, 142, 193–201.
- Kim Y O, Gwon Y, Kim J, 2022, Exogenous Cysteine Improves Mercury Uptake and Tolerance in Arabidopsis by Regulating the Expression of Heavy Metal Chelators and Antioxidative Enzymes, *Frontiers in Plant Science*, 13, 898247.
- Kintlová M, Vrána J, Hobza R, Blavet N, Hudzieczek V, 2021, Transcriptome Response to Cadmium Exposure in Barley (*Hordeum vulgare* L.), *Frontiers in Plant Science*, 12, 629089.
- 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.
- Kollárová K, Kusá Z, Vatehová–Vivodová Z, Lišková D, 2019, The Response of Maize Protoplasts to Cadmium Stress Mitigated by Silicon, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 170, 488–494.
- Kong J, Jin J, Dong Q, Qiu J, Li Y, Yang Y, vd., 2019, Maize Factors *ZmUBP15*, *ZmUBP16* and *ZmUBP19* Play Important Roles for Plants to Tolerance the Cadmium Stress and Salt Stress, *Plant Science*, 280, 77–89.
- Krantev A, Yordanova R, Janda T, Szalai G, Popova L, 2008, Treatment with Salicylic Acid Decreases the Effect of Cadmium on Photosynthesis in Maize Plants, *Journal of Plant Physiology*, 165, 920–931.
- Krapp A, David L C, Chardin C, Girin T, Marmagne A, Leprince A S, vd., 2014, Nitrate Transport and Signalling in Arabidopsis, *Journal of Experimental Botany*, 65, 789–798.

- Krishna T P A, Maharajan T, Victor Roch G, Ignacimuthu S, Antony Ceasar S, 2020, Structure, Function, Regulation and Phylogenetic Relationship of ZIP Family Transporters of Plants, *Frontiers in Plant Science*, 11, 533228.
- Kumar A, Dubey A K, Kumar V, Ansari M A, Narayan S, Kumar S, vd., 2020, Over-expression of Chickpea Glutaredoxin (CaGrx) Provides Tolerance to Heavy Metals by Reducing Metal Accumulation and Improved Physiological and Antioxidant Defence System, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 192, 110252.
- Kundu P, Gill R, Ahlawat S, Anjum N A, Sharma K K, Ansari A A, vd., 2018, Targeting the Redox Regulatory Mechanisms for Abiotic Stress Tolerance in Crops, Wani S H (Ed.), *Biochemical, Physiological and Molecular Avenues for Combating Abiotic Stress in Plants* (151–220), Elsevier, 324.
- Kühlbrandt W, 2019, Structure and Mechanisms of F-Type ATP Synthases, *Annual Review of Biochemistry*, 88, 515–549.
- Laghlimi M, Baghdad B, Hadi H E, Bouabdli A, 2015, Phytoremediation Mechanisms of Heavy Metal Contaminated Soils, *Open Journal of Ecology*, 5, 375–388.
- Lai X, Daher H, Galien A, Hugouvieux V, Zubieta C, 2019, Structural Basis for Plant MADS Transcription Factor Oligomerization, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 946–953.
- Lee S, Kim Y Y, Lee Y, An G, 2007, Rice P1B-type Heavy Metal ATPase, *OsHMA9*, Is a Metal Efflux Protein, *Plant Physiology*, 145, 831–842.
- Lei G J, Sun L, Sun Y, Zhu X F, Li G X, Zheng S J, 2020, Jasmonic Acid Alleviates Cadmium Toxicity in Arabidopsis via Suppression of Cadmium Uptake and Translocation, *Journal of Integrative Plant Biology*, 62, 218–227.
- Leister D, 2003, Chloroplast Research in the Genomic Age, *Trends in Genetics*, 19, 47–56.
- Leitner M, Vandelle E, Gaupels F, Bellin D, Delledonne M, 2009, NO Signals in the Haze: Nitric Oxide Signalling in Plant Defence, *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 451–458.
- Leustek T, Martin M N, Bick J A, Davies J P, 2000, Pathways and Regulation of Sulfur Metabolism Revealed Through Molecular and Genetic Studies, *Annual Review of Plant Biology*, 51, 141–165.

- Li L, Wang Y, Shen W, 2012, Roles of Hydrogen Sulfide and Nitric Oxide in the Alleviation of Cadmium-induced Oxidative Damage in Alfalfa Seedling Roots, *Biometals*, 25, 617–631.
- Li X, Ma L, Bu N, Li Y, Zhang L, 2014, Effects of Salicylic Acid Pre-treatment on Cadmium and/or UV-B Stress in Soybean Seedlings, *Biologia Plantarum*, 58, 195–199.
- Li Q, Huang W, Xiong C, Zhao J, 2018, Transcriptome Analysis Reveals the Role of Nitric Oxide in *Pleurotus eryngii* Responses to Cd^{2+} Stress, *Chemosphere*, 201, 294–302.
- Li Q, Wang G, Wang Y, Yang D, Guan C, Ji J, 2019, Foliar Application of Salicylic Acid Alleviate the Cadmium Toxicity by Modulation the Reactive Oxygen Species in Potato, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 172, 317–325.
- Li L, Yan X, Li J, Wu X, Wang X, 2022a, Metabolome and Transcriptome Association Analysis Revealed Key Factors Involved in Melatonin Mediated Cadmium-stress Tolerance in Cotton, *Frontiers in Plant Science*, 13, 995205.
- Li G Z, Wang Y Y, Liu J, Liu H T, Liu H P, Kang G Z, 2022b, Exogenous Melatonin Mitigates Cadmium Toxicity Through Ascorbic Acid and Glutathione Pathway in Wheat, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 237, 113533.
- Lin Y F, Aarts M G M, 2012, The Molecular Mechanism of Zinc and Cadmium Stress Response in Plants, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69, 3187–3206.
- Lin K, Zeng M, Williams D V, Hu W, Shabala S, Zhou M, vd., 2022, Integration of Transcriptome and Metabolome Analyses Reveals the Mechanistic Basis for Cadmium Accumulation in Maize, *Iscience*, 25.
- Liu L J, Zhang Y C, Li Q H, Sang Y, Mao J, Lian H L, vd., 2008, *COP1*-mediated Ubiquitination of CONSTANS Is Implicated in Cryptochrome Regulation of Flowering in Arabidopsis, *Plant Cell*, 20, 292.
- Liu X M, Kim K E, Kim K C, Nguyen X C, Han H J, Jung M S, vd., 2010, Cadmium Activates Arabidopsis *MPK3* and *MPK6* via Accumulation of Reactive Oxygen Species, *Phytochemistry*, 71, 614–618.
- Liu X, Chen J, Wang G H, Wang W H, Shen J Z, 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 Soil*, 400, 177–192.
- Liu D, Xu S, Hu H, Pan J, Li P, Shen W, 2017, Endogenous Hydrogen Sulfide Homeostasis is Responsible for the Alleviation of Senescence of Postharvest Daylily Flower via Increasing Antioxidant Capacity and Maintained Energy Status, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 718–726.
- Liu L, Li W, Song W, Guo M, 2018a, Remediation Techniques for Heavy Metal Contaminated Soils, Principles and Applicability, *The Science of the Total Environment*, 633, 206–219.
- Liu S, Yang R, Tripathi D K, Li X, He W, Wu M, vd., 2018b, The Interplay Between Reactive Oxygen and Nitrogen Species Contributes in the Regulatory Mechanism of The Nitro-oxidative Stress Induced by Cadmium in Arabidopsis, *Journal of Hazardous Materials*, 344, 1007–1024.
- Liu Y, Liu L, Qi J, Dang P, Xia T, 2019a, Cadmium Activates *ZmMPK3-1* and *ZmMPK6-1* via Induction of Reactive Oxygen Species in Maize roots, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 516, 747–752.
- Liu X S, Feng S J, Zhang B Q, Wang M Q, Cao H W, Rono J K, vd., 2019b, OsZIP1 Functions as a Metal Efflux Transporter Limiting Excess Zinc, Copper and Cadmium Accumulation in Rice, *BMC Plant Biology*, 19, 1–16.
- Liu H, Jiao Q, Fan L, Jiang Y, Alyemeni M N, Ahmad P, vd., 2023, Integrated Physio-biochemical and Transcriptomic Analysis Revealed Mechanism Underlying of Si-mediated Alleviation to Cadmium Toxicity in Wheat, *Journal of Hazardous Materials*, 452, 131366.
- 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.
- Luo J S, Huang J, Zeng D L, Peng J S, Zhang G B, Ma H L, vd., 2018, A defensin-like Protein Drives Cadmium Efflux and Allocation in Rice, *Nature Communications*, 9, 645.
- Ma Q, Cao X, Tan X, Si L, Wu L, 2017, Effects of Cadmium Stress on Pakchoi (*Brassica chinensis* L.) Growth and Uptake of Inorganic and Organic Nitrogenous Compounds, *Environmental and Experimental Botany*, 137, 49–57.
- Makino A, 2011, Photosynthesis, Grain Yield, and Nitrogen Utilization in Rice and Wheat, *Plant Physiology*, 155, 125–129.

- Maksymiec W, 2007, Signaling Responses in Plants to Heavy Metal Stress, *Acta Physiologiae Plantarum*, 29, 177–187.
- Manousaki E, Kalogerakis, N, 2009, Phytoextraction of Pb and Cd by the Mediterranean Saltbush (*Atriplex halimus* L.) Metal Uptake in Relation to Salinity, *Environmental Science and Pollution Research International*, 16, 844–854.
- Mao C, Song Y, Chen L, Ji J, Li J, Yuan X, vd., 2019, Human Health Risks of Heavy Metals in Paddy Rice Based on Transfer Characteristics of Heavy Metals from Soil to Rice, *Catena*, 175, 339–348.
- Mei H, He C Q, Ding N Z, 2018, Abiotic Stresses: General Defenses of Land Plants and Chances for Engineering Multistress Tolerance, *Frontiers in Plant Science*, 871,1–18.
- Mendoza-Cózatl D, Loza-Tavera H, Hernández-Navarro A, Moreno-Sánchez R, 2005, Sulfur Assimilation and Glutathione Metabolism under Cadmium Stress in Yeast, Protists and Plants, *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 653–671.
- Mendoza-Cozatl D G, Jobe T O, Hauser F, Schroeder J I, 2011, Long Distance Transport, Vacuolar Sequestration, Tolerance, and Transcriptional Responses Induced by Cadmium and Arsenic, *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 554–562.
- Meng Y, Jing H, Huang J, Shen R, Zhu X, 2022, The Role of Nitric Oxide Signaling in Plant Responses to Cadmium Stress, *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 6901.
- Metwally A, Finkemeier I, Georgi M, Dietz K J, 2003, Salicylic Acid Alleviates the Cadmium Toxicity in Barley Seedlings, *Plant Physiology*, 132, 272–281.
- Mika A, Luthje S, 2003, Properties of Guaiacol Peroxidase Activities Isolated from Corn Root Plasma Membranes, *Plant Physiology*, 132, 1489–1498.
- Milner M J, Mitani-Ueno N, Yamaji N, Yokosho K, Craft E, Fei Z, vd., 2014, Root and Shoot Transcriptome Analysis of Two Ecotypes of *Noccaeacae rulescensun* Covers the Role of *NcNramp1* in Cd Hyperaccumulation, *Plant Journal*, 78, 398–410.
- Miyadate H, Adachi S, Hiraizumi A, Tezuka K, Nakazawa N, Kawamoto T, vd., 2011, *OsHMA3*, A *P1B*-type of ATPase Affects Root to Shoot Cadmium Translocation

- in Rice by Mediating Efflux into Vacuoles, *New Phytologist*, 189, 190–199
- Mostofa M G, Fujita M, 2013, Salicylic Acid Alleviates Copper Toxicity in Rice (*Oryza sativa* L.) Seedlings by Up-regulating Antioxidative and Glyoxalase Systems, *Ecotoxicology*, 22, 959–973.
- Mostofa M G, Rahman A, Ansary M M, Watanabe A, Fujita M, Tran L S, 2015, Hydrogen Sulfide Modulates Cadmium-induced Physiological and Biochemical Responses to Alleviate Cadmium Toxicity in Rice, *Scientific Reports*, 5, 14078.
- Mukherjee S, 2019, Recent Advancements in the Mechanism of Nitric Oxide Signaling Associated with Hydrogen Sulfide and Melatonin Crosstalk During Ethylene-induced Fruit Ripening in Plants, *Nitric Oxide*, 82, 25–34.
- Na G, Salt D E, 2011, The Role of Sulfur Assimilation and Sulfur-containing Compounds in Trace Element Homeostasis in Plants, *Environmental and Experimental Botany*, 72, 18–25.
- Nahar K, Hasanuzzaman M, Alam M M, Fujita M, 2015, Exogenous Glutathione Confers High Temperature Stress Tolerance in Mung Bean (*Vigna radiata* L.) by Modulating Antioxidant Defense and Methylglyoxal Detoxification System, *Environmental and Experimental Botany*, 112, 44–54.
- Nair P M G, Park S Y, Choi J, 2011, Expression of Catalase and Glutathione S-transferase Genes in *Chironomus riparius* on Exposure to Cadmium and Nonylphenol, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 154, 399–408.
- Nakanishi H, Ogawa I, Ishimaru Y, Mori S, Nishizawa N K, 2006, Iron Deficiency Enhances Cadmium Uptake and Translocation Mediated by the *Fe2p* transporters *OsIRT1* and *OsIRT2* in Rice, *Soil Science and Plant Nutrition*, 52, 464–469.
- 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.
- Nannoni F, Rossi S, Protano G, 2016, Potentially Toxic Element Contamination in Soil and Accumulation in Maize Plants in a Smelter Area in Kosovo, *Environmental Science and Pollution Research*, 11937–11946.
- Nazar R, Iqbal N, Masood A, Khan M I R, Syeed S, Khan N A, 2012, Cadmium Toxicity in Plants and Role of Mineral Nutrients in Its Alleviation, *American*

- Journal of Plant Sciences, 3 1476–1489.
- 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.
- Nocito F F, Pirovano L, Cocucci M, Sacchi G A, 2002, Cadmium–induced Sulfate Uptake in Maize Roots, *Plant Physiology*, 129, 1872.
- Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y I, Neukermans J, Marquez–Garcia B, vd., 2012, Glutathione in Plants: An Integrated Overview, *Plant Cell and Environment*, 35, 454–484.
- Noor I, Sohail H, Sun J, Nawaz M A, Li G, Hasanuzzaman M, vd., 2022, Heavy Metal and Metalloid Toxicity in Horticultural Plants: Tolerance Mechanism and Remediation Strategies, *Chemosphere*, 303, 135196.
- Oono Y, Yazawa T, Kawahara Y, Kanamori H, Kobayashi F, Sasaki H, vd., 2014, Genome–Wide Transcriptome Analysis Reveals that Cadmium Stress Signaling Controls the Expression of Genes in Drought Stress Signal Pathways in Rice, *PloS One*, 9, e96946.
- Oono Y, Yazawa T, Kanamori H, Sasaki H, Mori S, Handa H, vd., 2016, Genome–wide Transcriptome Analysis of Cadmium Stress in Rice, *BioMed Research International*, 9739505.
- Pan W, You Y, Weng Y N, Shentu J L, Lu Q, Xu Q R, vd., 2020, Zn Stress Facilitates Nitrate Transporter 1.1–mediated Nitrate Uptake Aggravating Zn Accumulation in Arabidopsis Plants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190, 110104.
- Parihar P, Singh S, Singh R, Rajasheker G, Rathnagiri P, Srivastava R K, vd., 2019, An Integrated Transcriptomic, Proteomic, and Metabolomic Approach to Unravel the Molecular Mechanisms of Metal Stress Tolerance in Plants, *Srivastava S, Srivastava A K, Suprasanna P (Ed.), Plant–Metal Interactions (1–28)*, Springer, 316p, Switzerland.
- Park J, Song W Y, Ko D, Eom Y, Hansen T H, Schiller M, vd., 2012, The Phytochelatin Transporters *AtABCC1* and *AtABCC2* Mediate Tolerance to Cadmium and Mercury, *Plant Journal*, 69, 278–288.
- Peco J D, Campos J A, Romero–Puertas M C, Olmedilla A, Higuera P, Sandalio L M, 2020, Characterization of Mechanisms Involved in Tolerance and Accumulation

- of Cd in *Biscutella auriculata* L., *Ecotoxicology Environmental Safety*, 201, 110784.
- Perez Chaca M V, Vigliocco A, Reinoso H, Molina A, Abdala G, Zirulnik F, vd., 2014, Effects of Cadmium Stress on Growth, Anatomy and Hormone Contents in *Glycine max* (L.), *Acta Physiologiae Plantarum*, 36, 2815–2826.
- Peris–Peris C, Serra–Cardona A, Sanchez–Sanuy F, Campo S, Arino J, SanSegundo B, 2017, Two NRAMP6 Isoforms Function as Iron and Manganese Transporters and Contribute to Disease Resistance in Rice, *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 30, 385–398.
- Pocsi I, Prade R A, Penninckx M J, 2004, Glutathione, Altruistic Metabolite in Fungi, *Advances in Microbial Physiology*, 49, 1–76.
- Ponniah S K, Shang Z, Akbudak M A, Srivastava V, Manoharan M, 2017, Down–Regulation of Hydroxycinnamoyl CoA: Shikimate Hydroxycinnamoyl Transferase, Cinnamoyl CoA Reductase, and Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase Leads to Lignin Reduction in Rice (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponbare), *Plant Biotechnology Reports*, 11, 17–27.
- Popova L P, Maslenkova L T, Yordanova R Y, Ivanova A P, Krantev A P, Szalai G, vd., 2009, Exogenous Treatment with Salicylic Acid Attenuates Cadmium Toxicity in Pea Seedlings, *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 224–231.
- Przedpelska E M, Wierzbicka M, 2011, Gating of Aquaporins by Heavy Metals in *Allium cepa* L. Epidermal Cells, *Protoplasma*, 248, 663–671.
- Qiao Z J, Jing T, Liu Z Q, Zhang L P, Jin Z P, Liu D M, vd., 2015, H₂S Acting as A Downstream Signaling Molecule of SA Regulates Cd Tolerance in Arabidopsis, *Plant and Soil* 393, 137–146.
- Qin X, Nie Z, Liu H, Zhao P, Qin S, Shi Z, 2018, Influence of Selenium on Root Morphology and Photosynthetic Characteristics of Winter Wheat under Cadmium Stress, *Environmental and Experimental Botany*, 150, 232–239.
- Qiu C W, Zhang C, Wang N H, Mao W, Wu F, 2021, Strigolactone GR24 Improves Cadmium Tolerance by Regulating Cadmium Uptake, Nitric Oxide Signaling and Antioxidant Metabolism in Barley (*Hordeum vulgare* L.), *Environmental Pollution*, 273, 116486.
- Rahman A, Nahar K, Hasanuzzaman M, Fujita M, 2016, Manganese Induced Cadmium

- Stress Tolerance in Rice Seedlings: Coordinated Action of Antioxidant Defense, Glyoxalase System and Nutrient Homeostasis, *Comptes Rendus Biologies*, 339, 462–474.
- Rasheed A, Fahad S, Aamer M, Hassan M U, Tahir M M, Wu Z M, 2020, Role of Genetic Factors in Regulating Cadmium Uptake, Transport and Accumulation Mechanisms and Quantitative Trait Loci Mapping in Rice, A Review, *Applied Ecology and Environmental Research*, 18.
- Redjala T, Zelko I, Sterckeman T, Legue V, Lux A, 2011, Relationship Between Root Structure and Root Cadmium Uptake in Maize, *Environmental and Experimental Botany*, 71, 241–248.
- Reeves R D, 2000, Metal-accumulating Plants, Raskin I, Ensley B D (Ed.), *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean up the Environment* (193–229), Wiley, 304p, New York.
- Rehman S, Abbas G, Shahid M, Saqib M, Farooq A B U, Hussain M, vd., 2019, Effect of Salinity on Cadmium Tolerance, Ionic Homeostasis and Oxidative Stress Responses in *Conocarpus* Exposed to Cadmium Stress: Implications for Phytoremediation, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 171, 146–153.
- Ren M, Qin Z, Li X, Wang L, Wang Y, Zhang J, vd., 2020, Selenite Antagonizes the Phytotoxicity of Cd in the Cattail *Typha angustifolia*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 189, 109959.
- Riaz M, Yan L, Wu X, Hussain S, Aziz O, Wang Y, vd., 2018, Boron Alleviates the Aluminum Toxicity in Trifoliate Orange by Regulating Anti-oxidant Defense System and Reducing Root Cell Injury, *Journal Environmental Management*, 208, 149–158.
- Riaz M, Kamran M, Fang Y, Wang Q, Cao H, Yang G, vd., 2020, Arbuscular Mycorrhizal Fungi-induced Mitigation of Heavy Metal Phytotoxicity in Metal Contaminated Soils: A Critical Review, *Journal Hazard Mater*, 123919.
- Riaz M, Kamran M, Rizwan M, Ali S, Parveen A, Malik Z, vd., 2021, Cadmium Uptake and Translocation: Selenium and Silicon Roles in Cd Detoxification for the Production of Low Cd Crops: A Critical Review, *Chemosphere*, 273, 129690.
- Riemenschneider A, Wegele R, Schmidt A, Papenbrock J, 2005, Isolation and Characterization of a D-cysteine Desulphydrase Protein from *Arabidopsis*

- thaliana*, FEBS Journal, 272, 1291–1304.
- Rivas–San V M, Plasencia J, 2011, Salicylic Acid Beyond Defence: Its Role in Plant Growth and Development, Journal of Experimental Botany, 62, 3321–3338.
- Rizwan M, Ali S, Adrees M, Rizvi H, Ziaur–Rehman M, Hannan F, vd., 2016, Cadmium Stress in Rice: Toxic Effects, Tolerance Mechanisms, and Management: A Critical Review, Environmental Science and Pollution Research, 23, 17859–17879.
- Rizwan M, Ali S, Adrees M, Ibrahim M, Tsang D C W, Zia–Ur–Rehman M, vd., 2017, A Critical Review on Effects, Tolerance Mechanisms and Management of Cadmium in Vegetables, Chemosphere, 182, 90–105.
- Rizwan M, Ali S, ur Rehman M Z, Rinklebe J, Tsang D C, Bashir A, 2018, Cadmium Phytoremediation Potential of *Brassica* Crop Species: A review, Science of the Total Environment, 631, 1175–1191.
- Robson T C, Braungardt C B, Rieuwerts J, Worsfold P, 2014, Cadmium Contamination of Agricultural Soils and Crops Resulting from Sphalerite Weathering Environmental Pollution, 184, 283–289.
- Rodriguez–Serrano M, Romero–Puertas M C, Pazmino D M, Testillano P S, Risueno M C, Del Rio L A, vd., 2009, Cellular Response of Pea Plants to Cadmium Toxicity: Crosstalk Between Reactive Oxygen Species, Nitric Oxide, and Calcium, Plant Physiology, 150, 229–243.
- Rog Young K, Yoon J K, Kim T S, Yang J E, Owens G, Kim K R, 2015, Bioavailability of Heavy Metals in Soils: Definitions and Practical Implementation a Critical Review, Environmental Geochemistry and Health, 37, 1041–1061.
- Romero L C, Aroca M Á, Laureano–Marín A M, Moreno I, García I, Gotor C, 2014, Cysteine and Cysteine–Related Signaling Pathways in *Arabidopsis thaliana*, Molecular Plant, 7, 264–276.
- Roy S K, Cho S W, Kwon S J, Kamal A H M, Kim S W, Oh M W, vd., 2016, Morpho–physiological and Proteome Level Responses to Cadmium Stress in Sorghum, PLoS One, 11, e0150431.
- Rui H, Zhang X, Shinwari K I, Zheng L, Shen Z, 2018, Comparative Transcriptomic Analysis of Two *Vicia sativa* L. Varieties with Contrasting Responses to Cadmium Stress Reveals the Important Role of Metal Transporters in Cadmium

- Tolerance, *Plant and Soil*, 423, 241–255.
- Salt D E, Rauser W E, 1995, Mg ATP-dependent Transport of Phytochelatins Across the Tonoplast of Oat Roots, *Plant Physiology*, 107, 1293.
- Sami F, Faizan M, Faraz A, Siddiqui H, Yusuf M, Hayat S, 2018, Nitric Oxide-mediated Integrative Alterations in Plant Metabolism to Confer Abiotic Stress Tolerance, NO Crosstalk with Phytohormones and NO-mediated Post Translational Modifications in Modulating Diverse Plant Stress, *Nitric Oxide*, 73, 22–38.
- 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.
- Santolini J, André F, Jeandroz S, Wendehenne D, 2017, Nitric Oxide Synthase in Plants: Where Do We Stand?, *Nitric Oxide*, 63, 30–38.
- Sasaki A, Yamaji N, Yokosho K, Ma J F, 2012, Nramp5 is a Major Transporter Responsible for Manganese and Cadmium Uptake in Rice, *Plant Cell*, 24, 2155–2167.
- Sasaki A, Yamaji N, Ma J F, 2014, Overexpression of *OsHMA3* Enhances Cd Tolerance and Expression of Zn Transporter Genes in Rice, *Journal of Experimental Botany*, 65, 6013–6021.
- Sato-Nagasawa N, Mori M, Nakazawa N, Kawamoto T, Nagato Y, Sakurai K, vd., 2012, Mutations in Rice (*Oryza sativa*) Heavy Metal ATPase 2 (*OsHMA2*) Restrict the Translocation of Zinc and Cadmium, *Plant Cell Physiology*, 53, 213–224.
- Saud S, Hassan S, Xiong L, 2022, The Physiological Function and Molecular Mechanism of Hydrogen Sulfide Resisting Abiotic Stress in Plants, *Journal of Botany*, 45, 563–572.
- Schellingen K, Van Der Straeten D, Vandenbussche F, Prinsen E, Remans T, Vangronsveld J, vd., 2014, Cadmium-induced Ethylene Production and Responses in *Arabidopsis thaliana* Rely on ACS2 and ACS6 Gene Expression, *BMC Plant Biology*, 14, 214.
- Schellingen K, Straeten D V D, Remans T, Loix C, Vangronsveld J, Cuypers A, 2015, Ethylene Biosynthesis Is Involved in the Early Oxidative Challenge Induced by

- Moderate Cd Exposure in *Arabidopsis thaliana*, Environmental and Experimental Botany, 117, 1–11.
- Schultzendubel A, Polle A, 2002, Plant Responses to Abiotic Stresses: Heavy Metal-induced Oxidative Stress and Protection by Mycorrhization, Journal of Experimental Botany, 53, 1351–1365.
- Sebastian A, Prasad M N V, 2018, Exogenous Citrate and Malate Alleviate Cadmium Stress in *Oryza sativa* L.: Probing Role of Cadmium Localization and Iron Nutrition, Ecotoxicology and Environmental Safety, 166, 215–222.
- Sebastian A, Prasad M N V, 2019, Photosynthetic Light Reactions in *Oryza sativa* L. under Cd Stress: Influence of Iron, Calcium, and Zinc Supplements, The EuroBiotech Journal, 3, 175–181.
- Seidler A, 1996, The Extrinsic Polypeptides of Photosystem II, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Bioenergetics, 1277, 35–60.
- Semane B, Cuypers A, Smeets K, VanBelleghem F, Horemans N, Schat H, vd., 2007, Cadmium Responses in *Arabidopsis thaliana*: Glutathione Metabolism and Antioxidative Defence System, Physiologia Plantarum, 129, 519–528.
- Sepehri A, Gharehbaghli N, 2019, Selenium Alleviate Cadmium Toxicity by Improving Nutrient Uptake, Antioxidative and Photosynthetic Responses of Garlic, Russian Journal of Plant Physiology, 66, 152–159.
- Shahid M A, Balal R M, Khan N, Zotarelli L, Liu G D, Sarkhosh A, vd., 2019, Selenium Impedes Cadmium and Arsenic Toxicity in Potato by Modulating Carbohydrate and Nitrogen Metabolism, Ecotoxicology Environmental Safety, 180, 588–599.
- Shanmugaraj B M, Chandra H M, Srinivasan B, Ramalingam S, 2013, Cadmium Induced Physio-Biochemical and Molecular Response in *Brassica juncea*, International Journal of Phytoremediation, 15, 206–218.
- Shanmugaraj B M, Malla A, Ramalingam S, 2019, Cadmium Stress and Toxicity in Plants, Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants, Elsevier, 1–17.
- Sheen J, 1996, Ca²⁺ Dependent Protein Kinases and Stress Signal Transduction in Plants, Science, 274, 1900.
- Shi G, Cai Q, Liu Q, Wu L, 2009, Salicylic Acid-mediated Alleviation of Cadmium Toxicity in Hemp Plants in Relation to Cadmium Uptake, Photosynthesis, and

- Antioxidant Enzymes, *Acta Physiologiae Plant*, 31, 969–977.
- Shi H T, Ye T T, Chan Z L, 2014, Nitric Oxide–Activated Hydrogen Sulfide is Essential for Cadmium Stress Response in Bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.), *Plant Physiology and Biochemistry*, 74, 99–107.
- Shu–Hua R U, De–Chun S U, Wang J Q, 2006, Characteristics of Cd Pollution in Soil and the Mechanisms of Phytoremediation For Soil Contamination, *Chinese Journal of Eco–Agriculture*, 16, 594–598.
- Siedlecka A, Krupa Z, 1996, Interaction Between Cadmium and Iron and Its Effect on Photosynthetic Capacity of Primary Leaves of *Phaseolus vulgaris*, *Plant Physiology and Biochemistry*, 34, 833–841.
- Singh S, Eapen S, D’Souza S F, 2006, Cadmium Accumulation and Its Influence on Lipid Peroxidation and Antioxidative System in an Aquatic Plant, *Bacopa monnieri* L., *Chemosphere*, 62, 233–246.
- Singh S, Singh V P, Prasad S M, Sharma S, Ramawat N, Dubey N K, vd., 2019, Interactive Effect of Silicon (Si) and Salicylic Acid (SA) in Maize Seedlings and Their Mechanisms of Cadmium (Cd) Toxicity Alleviation, *Journal of Plant Growth Regulation*, 38, 1587–1597.
- Sneideris L C, Gavassi M A, Campos M L, D’Amico–Damiao V, Carvalho R F, 2015, Effects of Hormonal Priming on Seed Germination of *Pigeon pea* under Cadmium Stress, *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 87, 1847–1852.
- Sobrinho–Plata J, Meyssen D, Cuypers A, Escobar C, Hernández L E, 2014, Glutathione Is a Key Antioxidant Metabolite to Cope with Mercury and Cadmium Stress, *Plant Soil*, 377, 369–381.
- Song W Y, Mendozacózatl D G, Lee Y, Schroeder J I, Ahn S N, Lee H S, vd., 2014, Phytochelatin–metal(loid) Transport into Vacuoles How Is Different Substrate Preferences in Barley and Arabidopsis, *Plant*, 37, 1192–1201.
- Song Y, Zhang F, Li H, Qiu B, Gao Y, Cui D, vd., 2020, Antioxidant Defense System in Lettuces Tissues upon Various as Species Exposure, *Journal of Hazardous Materials*, 399, 123003.
- Srivastava A K, Penna S, Nguyen D V, Tran L S P, 2016, Multifaceted Roles of Aquaporins as Molecular Conduits in Plant Responses to Abiotic Stresses, *Critical Reviews in Biotechnology*, 36, 389–398.

- Statello L, Guo C J, Chen L L, Huarte M, 2021, Gene Regulation by Long Non-coding RNAs and Its Biological Functions, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22, 96–118.
- Sterckeman T, Thomine S, 2020, Mechanisms of Cadmium Accumulation in Plants, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 39, 322–359.
- Stroiński A, Gizewska K, Zielezińska M, 2013, Absciscic Acid is Required in Transduction of Cadmium Signal to Potato Roots, *Biologia Plantarum*, 57, 121–127.
- Sun J, Wang R, Zhang X, Yu Y, Zhao R, Li Z, vd., 2013, Hydrogen Sulfide Alleviates Cadmium Toxicity Through Regulation of Cadmium Transport Across the Plasma and Vacuolar Membranes in *Populus euphratica* Cells, *Plant Physiology and Biochemistry*, 65, 67–74.
- Sun H Y, Zhang X H, He X Y, Ahmed I M, Cao F B, Zhang G P, vd., 2014, N-acetyl-cysteine Alleviates Cd Toxicity and Reduces Cd Uptake in the Two Barley Genotypes Differing in Cd Tolerance, *Plant Growth Regulation*, 74, 93–105.
- Sun H, Chen Z H, Chen F, Xie L, Zhang G, Vincze E, vd., 2015, DNA Microarray Revealed and RNAi Plants Confirmed Key Genes Conferring Low Cd Accumulation in Barley Grains, *BMC Plant Biology*, 15, 1–17.
- Sun C, Liang X, Gong X, Chen H, Liu X, Zhang S, vd., 2022, Comparative Transcriptomics Provide New Insights into the Mechanisms by Which Foliar Silicon Alleviates the Effects of Cadmium Exposure in Rice, *Journal of Environmental Sciences*, 115, 294–307.
- 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, Senoura T, Shimo H, Ishikawa S, Arao T, vd., 2011, The *OsNRAMP1* Iron Transporter Is Involved in Cd Accumulation in Rice, *Journal of Experimental Botany*, 62, 4843–4850.
- Takahashi R, Ishimaru Y, Shimo H, Ogo Y, Senoura T, Nishizawa N K, vd., 2012a, The *OsHMA2* Transporter Is Involved in Root to Shoot Translocation of Zn and Cd in

- Rice, *Plant Cell Environmnet*, 35, 1948–1957.
- Takahashi R, Bashir K, Ishimaru Y, Nishizawa N K, Nakanishi H, 2012b, The Role of Heavy-metal ATPases, HMAs, in Zinc and Cadmium Transport in Rice, *Plant Signaling and Behavior*, 7, 1605–1607.
- Tama's L, Mistri'k I, Alemayehu A, Zelinova V, Boc'ova B, Huttova J, 2015, Salicylic Acid Alleviates Cadmium-induced Stress Responses Through the Inhibition of Cd-induced Auxin-mediated Reactive Oxygen Species Production in Barley Root Tips, *Journal of Plant Physiology*, 173, 1–8.
- Tamas L, Dudikova J, Durcekova K, Haluskova L, Huttova J, Mistrik I, vd., 2008, Alterations of the Gene Expression, Lipid Peroxidation, Proline and Thiol Content Along the Barley Root Exposed to Cadmium, *Journal of Plant Physiology*, 165, 1193–1203.
- Tamas L, Mistrik I, Huttova J, Haluskova L, Valentovicova K, Zelinova V, 2010, Role of Reactive Oxygen Species Generating Enzymes and Hydrogen Peroxide During Cadmium, Mercury and Osmotic Stresses in Barley Root Tip, *Planta*, 231, 221–231.
- Tamas L, Bocova B, Huttova J, Liptakova L, Mistrik I, Valentovicova K, vd., 2012, Impact of the Auxin Signaling Inhibitor p-chlorophenoxyisobutyricacid on Short-term Cd-induced Hydrogen Peroxide Production and Growth Response in Barley Root Tip, *Journal of Plant Physiology*, 169, 1375–1381.
- Tao S Y, Sun L H, Ma C Y, Li L L, Li G Z, Hao L, 2013, Reducing Basal Salicylic Acid Enhances Arabidopsis Tolerance to Lead or Cadmium, *Plant and Soil*, 372, 309–318.
- Terzi H, Yıldız M, 2021, Proteomic Analysis Reveals the Role of Exogenous Cysteine in Alleviating Chromium Stress in Maize Seedlings, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 209, 111784.
- Thakur S, Singh L, Wahid Z A, Siddiqui M F, Atnaw M, Din M F, 2016, Plant-driven Removal of Heavy Metals from Soil, Uptake, Translocation, Tolerance Mechanism, Challenges, and Future Perspectives, *Environmental Monitoring and Assessment*, 188, 204.
- 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.
- Tiryakioglu M, Eker S, Ozkutlu F, Husted S, Cakmak I, 2006, Antioxidant Defense System and Cadmium Uptake in Barley Genotypes Differing in Cadmium Tolerance, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 20, 181–189.
- Tiwari S, Thakur R, Shankar J, 2015, Role of Heat–Shock Proteins in Cellular Function and in the Biology of Fungi, *Biotechnology Research International*, 2015.
- TÜİK, 2021, Türkiye Yıllara Göre Tahıl Ekiliş Alanları ve Üretim Miktarları, Bitkisel Üretim İstatistikleri, Türkiye İstatistik Kurumu, Merkezi Dağıtım Sistemi.
- Ueno D, Yamaji N, Kono I, Huang C F, Ando T, Yano M, vd., 2010, Gene Limiting Cadmium Accumulation in Rice, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 16500–16505.
- Uraguchi S, Fujiwara T, 2012, Cadmium Transport and Tolerance in Rice: Perspectives for Reducing Grain Cadmium Accumulation, *Rice*, 5, 5.
- Uraguchi S, Fujiwara T, 2013, Rice Breaks Ground for Cadmium–free Cereals, *Current Opinion in Plant Biology*, 16, 328–334.
- Vadas T M, Ahner B A, 2009, Cysteine and Glutathione–Mediated Uptake of Lead and Cadmium into *Zea mays* and *Brassica napus* Roots, *Environmental Pollution*, 157, 2558–2563.
- Valencia W M, Pandit A, 2023, Photosystem II Subunit S (PsbS): A Nano Regulator of Plant Photosynthesis, *Journal of Molecular Biology*, 168407.
- van de Mortel J E, Schat H, Moerland P D, Van Themaat E V L, Van Der Ent S J O E R D, Blankestijn H, vd., 2008, Expression Differences for Genes Involved in Lignin, Glutathione and Sulphate Metabolism in Response to Cadmium in *Arabidopsis thaliana* and the Related Zn/Cd–Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *Plant, Cell and Environment*, 31, 301–324.
- Vatamaniuk O K, Mari S, Lu Y P, Rea P A, 1999, *AtPCS1*, A Phytochelatin Synthase from Arabidopsis: Isolation and *In vitro* Reconstitution, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 7110–7115.
- Venkataramaiah N, Ramakrishna S V, Sreevathsa R, 2011, Overexpression of Phytochelatin Synthase (*AtPCS*) in Rice for Tolerance to Cadmium Stress *Biologia*, 66, 1060–1073.
- Verbruggen N, Hermans C, Schat H, 2009, Mechanisms to Cope with Arsenic or

- Cadmium Excess in Plants, *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 364–72.
- Verma V, Ravindran P, Kumar P P, 2016a, Plant Hormone–Mediated Regulation of Stress Responses, *BMC Plant Biology*, 16, 86.
- Verma P K, Verma S, Pande V, Mallick S, Deo Tripathi R, Dhankher O P, vd., 2016b, Overexpression of Rice Glutaredoxin *OsGrx_C7* and *OsGrx_C2.1* Reduces Intracellular Arsenic Accumulation and Increases Tolerance in *Arabidopsis thaliana*, *Frontiers in Plant Science*, 7, 189726.
- Vert G, Barberon M, Zelazny E, Séguéla M, Briat J F, Curie C, 2009, *Arabidopsis IRT2* Cooperates with the High–affinity Iron Uptake System to Maintain Iron Homeostasis in Root Epidermal Cells, *Planta*, 229, 1171.
- Viana V E, Busanello C, da Maia L C, Pegoraro C, de Oliveira A C, 2018, Activation of Rice WRKY Transcription Factors: An Army of Stress Fighting Soldiers?, *Current Opinion in Plant Biology*, 45, 268–275.
- Villiers F, Jourdain A, Bastien O, Leonhardt N, Fujioka S, Tichtincky G, vd., 2012, Evidence for Functional Interaction Between Brassinosteroids and Cadmium Response in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Experimental Botany*, 63, 1185–1200.
- Vishwakarma K, Upadhyay N, Kumar N, Yadav G, Singh J, Mishra R K, vd., 2017, Absciscic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects, *Frontiers in Plant Science*, 8, 161.
- Wang R, 2002, Two's Company, Three's a Crowd: Can H₂S be the Third Endogenous Gaseous Transmitter? *The FASEB Journal*, 16, 1792–1798.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M, 2009, RNA–Seq: A Revolutionary Tool for Transcriptomics, *Nature Reviews Genetics*, 10, 57–63.
- Wang Y, Tao X, Tang X M, Xiao L, Sun J I, Yan X F, vd., 2013, Comparative Transcriptome Analysis of Tomato (*Solanum lycopersicum*) in Response to Exogenous Absciscic Acid, *BMC Genomics*, 14, 841.
- Wang S, Blumwald E, 2014, Stress–induced Chloroplast Degradation in *Arabidopsis* is Regulated via a Process Independent of Autophagy and Senescence–Associated Vacuoles, *The Plant Cell*, 26, 4875–4888.
- Wang J, Wei B, Peng Y, Huang T, Yang H, Peng X, vd., 2018, Transcriptome Analysis Reveals the Molecular Response to Cadmium Toxicity in *P. pseudoannulata*,

- Environmental Science and Pollution Research, 25, 34294–34305.
- Wang Y Y, Wang Y, Li G Z, Hao L, 2019, Salicylic Acid–Altering Arabidopsis Plant Response to Cadmium Exposure: Underlying Mechanisms Affecting Antioxidation and Photosynthesis–Related Processes, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 169, 645–653.
- Wei X, Su X, Cao P, Liu X, Chang W, Li M, vd., 2016, Structure of Spinach Photosystem II–LHCII Supercomplex at 3.2 Å Resolution, *Nature*, 534, 69–74.
- 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.
- Wilkinson K D, 1997, Regulation of Ubiquitin–dependent Processes by De Ubiquitinating Enzymes, *Faseb Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 11, 1245.
- Wirtz M, Droux M, Hell R, 2004, O–acetylserine (thiol) Lyase: An Enigmatic Enzyme of Plant Cysteine Biosynthesis Revisited in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Experimental Botany*, 55, 1785–1798.
- Wong C K E, Cobbett C S, 2009, HMA P–Type ATPases Are the Major Mechanism for Root–to–Shoot Cd Translocation in *Arabidopsis thaliana*, *New Phytologist*, 181, 71–78.
- Wu Q, Shigaki T, Williams K A, Han J S, Kim C K, Hirschi K D, vd., 2011, Enhances Cadmium Tolerance and Accumulation, *Journal of Plant Physiology*, 168.
- Wu Z, Zhao X, Sun X, Tan Q, Tang Y, Nie Z, vd., 2015, Xylem Transport and Gene Expression Play Decisive Roles in Cadmium Accumulation in Shoots of Two Oil–seed Rape Cultivars *Brassica napus*, *Chemosphere*, 119, 1217–1223.
- Wu Z, Yin X, Banuelos G S, Lin Z Q, Liu Y, Li M, vd., 2016, Indications of Selenium Protection Against Cadmium and Lead Toxicity in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). *Frontiers in Plant Science*, 7, 1875.
- Xia J, Yamaji N, Kasai T, Ma J F, 2010, Plasma Membrane–localized Transporter for Aluminum in Rice, *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 107, 18381–18385.
- Xie Y J, Zhang C, Lai I W, 2014, Hydrogen Sulfide Delays Gatriggered Programmed Cell Death in Wheat Aleurone Layers by the Modulation of Glutathione

- Homeostasis and Heme Oxygenase-1 Expression, *Journal of Plant Physiology*, 171, 53–62.
- Xiong J, Lu H, Lu K, Duan Y, An L, Zhu C, 2009, Cadmium Decreases Crown Root Number by Decreasing Endogenous Nitric Oxide, Which is Indispensable for Crown Root Primordia Initiation in Rice Seedlings, *Planta* 230, 599–610.
- Xu Y, Jin W, Li N, Zhang W, Liu C, Li C, vd., 2016, UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE14 Interacts with ULTRAVIOLET-B INSENSITIVE4 to Regulate Endoreduplication and Cell and Organ Growth in Arabidopsis, *Plant Cell*, 28, 1200.
- Xu L, Zheng Y, Yu Q, Liu J, Yang Z, Chen Y, 2022, Transcriptome Analysis Reveals the Stress Tolerance to and Accumulation Mechanisms of Cadmium in *Paspalum vaginatum* Swartz, *Plants*, 11, 2078.
- Xue J, Wang Y, Yang Z, Huang Z, Yao Y, Liu L, vd., 2024, Exogenous Cysteine Alleviates Cadmium Stress Better than Sulfate by Enhancing Nonenzymatic Antioxidant System in *Brassica juncea*, *Scientia Horticulturae*, 328, 112943.
- Yadav K K, Gupta N, Kumar A, Reece L M, Singh N, Rezaia S, vd., 2018, Mechanistic Understanding and Holistic Approach of Phytoremediation, A Review on Application and Future Prospects, *Ecological Engineering*, 120, 274–298.
- Ya-Fen L, Aarts M G M, 2012, The Molecular Mechanism of Zinc and Cadmium Stress Response in Plants, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69, 3187–3206.
- Yamaguchi N, Mori S, Baba K, Kaburagi-Yada S, Arao T, Kitajima N, vd., 2011, Cadmium Distribution in the Root Tissues of Solanaceous Plants with Contrasting Root-to-Shoot Cd Translocation Efficiencies, *Environmental and Experimental Botany*, 71, 198–206.
- Yamaji N, Sasaki A, Xia J X, Yokosho K, Ma J F, 2013a, A Node-based Switch for Preferential Distribution of Manganese in Rice, *Nature Communications*, 4, 1–11.
- Yamaji N, Xia J, Mitani-Ueno N, Yokosho K, Ma J F, 2013b, Preferential Delivery of Zinc to Developing Tissues in Rice Is Mediated By P-type Heavy Metal *ATPase OsHMA2*, *Plant Physiology*, 162, 927–939.
- Yan N, Doelling J H, Falbel T G, Durski A M, Vierstra R D, 2000, The Ubiquitin-specific Protease Family from Arabidopsis, *atubp1* and 2 are Required

For there Sistance to the Aminoacid Analog Canavanine, Plant Physiology, 124, 1828.

- Yan J, Wang P, Wang P, Yang M, Lian X, Tang Z, vd., 2016, A Loss-of-Function Allele of *OsHMA3* Associated with High Cadmium Accumulation in Shoots and Grain of Japonica Rice Cultivars, Plant, Cell and Environment, 39, 1941–1954.
- Yan L, Riaz M, Wu X, Du C, Liu Y, Jiang C, 2018, Ameliorative Effects of Boron on Aluminum Induced Variations of Cell Wall Cellulose and Pectin Components in Trifoliate Orange (*Poncirus trifoliate* (L.) Raf.) Root Stock, Environmental Pollution, 240,764–774.
- Yan H, Xu W, Xie J, Gao Y, Wu L, Sun L, vd., 2019, Variation of a Major Facilitator Superfamily Gene Contributes to Differential Cadmium Accumulation Between Rice Subspecies, Nature Communications, 10, 1–12
- Yang M, Zhang Y, Zhang L, Hu J, Zhang X, Lu K, vd., 2014, *OsNRAMP5* Contributes to Manganese Translocation and Distribution in Rice Shoots, Journal of Experimental Botany, 65, 4849–4861.
- Yao X, Cai Y, Yu D, Liang G, 2018, *bHLH104* Confers Tolerance to Cadmium Stress in *Arabidopsis thaliana*, Journal of Integrative Plant Biology, 60, 691–702.
- Yeh C M, Chien P S, Huang H J, 2007, Distinct Signalling Pathways for Induction of MAP Kinase Activities by Cadmium and Copper in Rice Roots, Journal of Experimental Botany, 58, 659–671.
- Yen J L, Su N Y, Kaiser P, 2005, The Yeast Ubiquitin Ligase *SCF^{Met30}* Regulates Heavy Metal Response, Molecular Biology of the Cell, 16, 1872–1882.
- Yıldız M, Terzi H, 2021, Exogenous Cysteine Alleviates Chromium Stress via Reducing Its Uptake and Regulating Proteome in Roots of *Brassica napus* L. Seedlings, South African Journal of Botany, 139, 114–121.
- Yoshihara T, Hodoshima H, Miyano Y, Shoji K, Shimada, Goto F, 2006, Cadmium Inducible Fe Deficiency Responses Observed from Macro and Molecular Views in Tobacco Plants, Plant Cell Reports, 25, 365.
- Yu G, Zheng W, Wang W, Dai F, Zhang Z, Yuan Y, vd., 2017, Health Risk Assessment of Chinese Consumers to Cadmium via Dietary Intake, Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 44, 137–145.
- Yu R, Ma Y, Li Y, Li X, Liu C, Du X, vd., 2018, Comparative Transcriptome Analysis

- Revealed Key Factors for Differential Cadmium Transport and Retention in Roots of Two Contrasting Peanut Cultivars, *BMC Genomics*, 19, 1–16.
- Yue R, Lu C, Qi J, Han X, Yan S, Guo S, vd., 2016, Transcriptome Analysis of Cadmium–Treated Roots in Maize (*Zea mays* L.), *Frontiers Plant Science*, 7, 1298.
- Zaripova N R, Kholodova V P, Zubo Y O, Kusnetsov V V, Kuznetsov V V, 2011, Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Chloroplast Gene Expression by Heavy Metals in Barley Seedlings, *Russian Journal of Plant Physiology*, 58, 1040–1047.
- Zawoznik M S, Groppa M D, Tomaro M L, Benavides M P, 2007, Endogenous Salicylic Acid Potentiates Cadmium–induced Oxidative Stress in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Sciences*, 173, 190–197.
- Zayneb C, Bassem K, Zeineb K, Grubb C D, Noureddine D, Hafedh M, vd., 2015, Physiological Responses of Fenugreek Seedlings and Plants Treated with Cadmium, *Environmental Science and Pollution Research International*, 22, 10679–10689.
- Zhan F, Li B, Jiang M, Qin L, Wang J, He Y, vd., 2017, Effects of a Root–colonized Dark Septate Endophyte on The Glutathione Metabolism in Maize Plants under Cadmium Stress, *Journal of Plant Interactions*, 12, 421–428.
- Zhang Y, Wang Z, Chai T, Wen Z, Zhang H, 2008, Indian Mustard Aquaporin Improves Drought and Heavy–Metal Resistance in Tobacco, *Molecular Biotechnology*, 40, 280–292.
- Zhang F, Zhang H, Xia Y, Wang G, Xu L, Shen Z, 2011, Exogenous Application of Salicylic Acid Alleviates Cadmium Toxicity and Reduces Hydrogen Peroxide Accumulation in Root Apoplasts of *Phaseolus aureus* and *Vicia sativa*, *Plant Cell Reports*, 30, 1475–1483.
- Zhang Y, Xu S, Yang S, Chen Y, 2015, Salicylic Acid Alleviates Cadmium–induced Inhibition of Growth and Photosynthesis Through Upregulating Antioxidant Defense System in Two Melon Cultivars (*Cucumis melo* L.), *Protoplasma*, 252, 911–924.
- Zhang J, Zhou M, Zhou H, Zhao D, Gotor C, Romero L C, vd., 2021, Hydrogen Sulfide, A Signaling Molecule in Plant Stress Responses, *Journal of Integrative*

Plant Biology, 63, 146–160.

- Zhao F Y, Han M M, Zhang S Y, Wang K, Zhang C R, Liu T, vd., 2012, Hydrogen Peroxide-mediated Growth of the Root System Occurs via Auxin Signaling Modification and Variations in the Expression of Cell-cycle Genes in Rice Seedlings Exposed to Cadmium Stress, *Journal of Integrative Plant Biology*, 54, 991–1006.
- Zhao J, Zhou H, Li X, 2013, Ubiquitin-Specific Protease 16 Interacts with a Heavy Metal Associated Isoprenylated Plant Protein 27 and Modulates Cadmium Tolerance, *Plant Signaling and Behavior*, 8.
- Zhao F Y, Wang K, Zhang S Y, Ren J, Liu T, Wang X, 2014, Crosstalk Between ABA, Auxin, MAPK Signaling, and the Cell Cycle in Cadmium-stressed Rice Seedlings, *Acta Physiologiae Plantarum*, 36, 1879–1892.
- Zhao Q, 2016, Lignification: Flexibility, Biosynthesis and Regulation, *Trends in Plant Science*, 21, 713–721.
- Zhao Q, Gu C, Sun Y, 2021, Root Defense in Salicylic Acid-Altering Arabidopsis Plants in Responses to Cadmium Stress, *Journal of Plant Growth Regulation*, 40, 1764–1776.
- Zhao R, Yin K, Chen S, 2022, Hydrogen Sulphide Signalling in Plant Response to Abiotic Stress, *Plant Biology*, 24, 523–531.
- Zheng R, Li H, Jiang R, Römheld V, Zhang F, Zhao F J, 2011, The Role of Root Hairs in Cadmium Acquisition by Barley, *Environmental Pollution*, 159, 408–415.
- Zhi-bin L, He J, Polle A, Rennenberg H, 2016, Heavy Metal Accumulation and Signal Transduction in Herbaceous and Woody Plants, Paving the Way for Enhancing Phytoremediation Efficiency, *Biotechnology Advances*, 34, 1131–1148.
- Zhong M, Li S, Huang F, Qiu J, Zhang J, Sheng Z, vd., 2017, The Phosphoproteomic Response of Rice Seedlings to Cadmium Stress, *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 2055.
- Zhou H, Zhao J, Yang Y, Chen C, Liu Y, Jin X, vd., 2012, Ubiquitin-specific Protease 16 Modulates Salt Tolerance in Arabidopsis by Regulating $\text{Na}^{(+)}/\text{H}^{(+)}$ Antiport Activity and Serine Hydroxymethyl Transferase Stability, *Plant Cell*, 24, 5106–5122.
- Zhou Y, Diao M, Cui J X, Chen X J, Wen Z L, Zhang J W, vd., 2018, Exogenous GSH

- Protects Tomatoes Against Salt Stress by Modulating Photosystem II Efficiency, Absorbed Light Allocation and H₂O₂–scavenging System in Chloroplasts, *Journal of Integrative Agriculture*, 17, 2257–2272.
- Zhou M, Zheng S, Liu R, Lu J, Lu L, Zhang C, vd., 2019, Comparative Analysis of Root Transcriptome Profiles Between Low– and High–Cadmium–Accumulating Genotypes of Wheat in Response to Cadmium Stress, *Functional and Integrative Genomics*, 19, 281–294.
- Zhu X F, Jiang T, Wang Z W, Lei G J, Shi Y Z, Li G X, vd., 2012, Gibberellic Acid Alleviates Cadmium Toxicity by Reducing Nitric Oxide Accumulation and Expression of *IRT1* in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Hazardous Materials*, 23, 302–307.
- Zhu X F, Wang Z W, Dong F, Lei G J, Shi Y Z, Li G X, vd., 2013, Exogenous Auxin Alleviates Cadmium Toxicity in *Arabidopsis thaliana* by Stimulating Synthesis of Hemicellulose 1 and Increasing the Cadmium Fixation Capacity of Root Cell Walls, *Journal of Hazardous Materials*, 263, 398–403.
- Zhu J, Zhao P, Nie Z, Shi H, Li C, Wang Y, vd., 2020, ¹Selenium Supply Alters the Subcellular Distribution and Chemical Forms of Cadmium and the Expression of Transporter Genes Involved in Cadmium Uptake and Translocation in Winter Wheat (*Triticum aestivum*), *BMC Plant Biology*, 20, 1–12.
- Zou M, Zhou S, Zhou Y, Jia Z, Guo T, Wang J, 2021, Cadmium Pollution of Soil–Rice Ecosystems in Rice Cultivation Dominated Regions in China: A Review, *Environmental Pollution*, 280, 116965.