



**MISIR (*Zea mays* L.) FİDELERİNDE
TİYOÜRE TEŞVİKLİ KADMİYUM TOLERANSININ
BİYOKİMYASAL VE PROTEOMİK ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nurgül SÖNMEZ

**Danışman
Prof. Dr. Mustafa YILDIZ**

**İkinci Danışman
Doç. Dr. Hakan TERZİ**

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Kasım 2024**

Bu tez çalışması 22.FEN.BİL.38 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 TİYOÜRE TEŞVİKLİ
KADMİYUM TOLERANSININ BİYOKİMYASAL VE
PROTEOMİK ANALİZİ**

Nurgül SÖNMEZ

Danışman

Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

İkinci Danışman

Doç. Dr. Hakan TERZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Kasım 2024

TEZ ONAY SAYFASI

Nurgül SÖNMEZ tarafından hazırlanan “**Mısır (*Zea mays* L.) Fidelerinde Tiyoüre Teşvikli Kadmiyum Toleransının Biyokimyasal ve Proteomik Analizi**” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilişkili maddeleri uyarınca 08/11/2024 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. Yasemin EKMEKÇİ
Hacettepe Üniversitesi,
Fen Fakültesi

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

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

08 / 11 / 2024

Nurgül SÖNMEZ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MISIR (*Zea mays* L.) FİDELERİNDE TİYOÜRE TEŞVİKLİ KADMİYUM TOLERANSININ BİYOKİMYASAL VE PROTEOMİK ANALİZİ

Nurgül SÖNMEZ

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

İkinci Danışman: Doç. Dr. Hakan TERZİ

Toprağın kadmiyum (Cd) ile kirlenmesi, bitkilere olan yüksek toksisitesi nedeniyle dünya genelinde önemli bir çevresel sorundur. Hareketliliğinin kolay olması nedeniyle Cd bitkiler tarafından kolaylıkla alınmakta ve tarım ürünlerinin verimini olumsuz etkilemektedir. Tiyoüre (TÜ), kükürt içeren bir bitki büyüme düzenleyicisidir ve bir dizi gelişimsel, fizyolojik ve biyokimyasal değişimde rol oynamaktadır. TÜ uygulamasının, stresli koşullar altında bitkilerin büyümesini ve toleransını artırdığı bilinmesine rağmen, TÜ'nün mısır (*Zea mays* L.) fidelerinde Cd toleransı üzerindeki moleküler düzenleyici mekanizmaları hala net değildir. Bu nedenle, bu araştırma Cd stresi altındaki mısır fidelerinde TÜ uygulamasının iyileştirici etkisini fizyolojik ve proteomik analizlerle değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, hidroponik kültürde yetiştirilen beş günlük mısır fideleri, besin çözeltisine ilave edilen TÜ ve CdCl₂'ün farklı uygulamalarına maruz bırakılmıştır: Kontrol (sadece besin çözeltisi), TÜ (35 µM), Cd (50 µM) ve TÜ+Cd (35 µM TÜ ve 50 µM Cd). Sonuçlar, Cd stresinin fide büyümesi ve klorofil içeriğini azalttığı, Cd stresi koşulları altında TÜ uygulamasının ise büyümeyi ve fotosentetik pigmentleri artırdığını ortaya koymuştur. Cd'a göre TÜ+Cd uygulaması mısır fidelerinin kökleri ve yapraklarında Cd birikimini azaltmıştır. Ek olarak, Cd stresi yaprak dokularındaki malondialdehit (MDA) içeriğini artırmıştır. Buna karşın, TÜ+Cd uygulamasının muhtemelen antioksidan enzimlerin aktivitelerini düzenleyerek MDA üretimini azalttığı belirlenmiştir. Katalaz (CAT) aktivitesindeki Cd teşvikli inhibisyon,

TÜ+Cd uygulaması ile azalmıştır. Ayrıca TÜ+Cd uygulaması askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinde ilave artışa neden olurken, guaiakol peroksidaz (POD) aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. Kontrole göre Cd ve/veya TÜ+Cd uygulamalarına maruz bırakılan yapraklarda 1573 diferansiyal olarak ifade edilen protein (DEP) yüksek verimli proteom analizi (nLC-MS/MS) ile tanımlanmıştır. Bu DEP'ler arasında, 1237 protein artan yönde düzenlenirken, 336 protein azalan yönde düzenlenmiştir. Gen ontolojisi (GO) ve Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi (KEGG) yollarının analizi ile tanımlanan DEP'lerin sitrat döngüsü (TCA döngüsü), fotosentez, glutatyon metabolizması, sistein ve metiyonin metabolizması, pirüvat metabolizması, glikoliz/glukoneogenez, metabolik yollar ve sekonder metabolitlerin biyosentezinde fonksiyon gördüğü saptanmıştır. Sonuç olarak, mısır fidelerinde proteomik analizlerle tespit edilen DEP'lerin TÜ teşvikli Cd toleransında önemli rolleri olduğu ileri sürülebilir.

2024, xi + 94 sayfa

Anahtar Kelimeler: Mısır, Kadmiyum, Tiyoüre, Proteomik, nLC–MS/MS.

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

BIOCHEMICAL AND PROTEOMIC ANALYSIS OF THIOUREA-INDUCED CADMIUM TOLERANCE IN MAIZE (*Zea mays* L.) SEEDLINGS

Nurgül SÖNMEZ

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

The pollution of soil with cadmium (Cd) is an important environmental problem worldwide because of its high toxicity to plants. Due to its ease of mobility, Cd is readily taken up by plants and negatively affect crop yield. Thiourea (TU) is a sulfur containing plant growth regulator and it is involved in a series of developmental, physiological, and biochemical changes. Although exogenous TU application has been found to enhance the growth and tolerance of plants under stressful conditions, the molecular regulatory mechanisms of TU on Cd tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings remain unclear. Therefore, the current research was performed to evaluate the ameliorative effect of TU application by physiological and proteomic analyses in maize seedlings under Cd stress. For this purpose, five-day-old maize seedlings grown in hydroponic culture were exposed to different treatments of TU and CdCl₂ added to the nutrient solution: control (only nutrient solution), TU (35 µM), Cd (50 µM), and TU+Cd (35 µM TU and 50 µM Cd). The results revealed that Cd stress decreased seedling growth and chlorophyll content, while TU application under Cd stress conditions increased growth and photosynthetic pigments. Compared to Cd, TU+Cd application reduced Cd accumulation in roots and leaves of maize seedlings. On the other hand, it was determined that TU+Cd application reduced MDA production, probably by regulating the activities of antioxidant enzymes. Cd-induced inhibition of catalase (CAT) activity was reduced by TU+Cd application. In addition, TU+Cd application

caused an additional increase in ascorbate peroxidase (APX) activity, while it caused a decrease in guaiacol peroxidase (POD) activity. 1573 differentially expressed proteins (DEPs) were identified in leaves exposed to Cd and/or TU+Cd treatments compared to control by high-throughput proteome analysis (nLC-MS/MS). Among these DEPs, 1237 proteins were up-regulated while 336 proteins were down-regulated. Gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways analysis revealed that most of the DEPs were involved in citrate cycle (TCA cycle), photosynthesis, glutathione metabolism, cysteine and methionine metabolism, pyruvate metabolism, glycolysis/gluconeogenesis, metabolic pathways, and biosynthesis of secondary metabolites. In conclusion, it can be suggested that DEPs detected by proteomic analyses in maize seedlings have important roles in TU-induced Cd tolerance.

2024, xi + 94 pages

Keywords: Maize, Cadmium, Thiourea, Proteomics, nLC-MS/MS.

TEŞEKKÜR

Mevcut yüksek lisans tez araştırma 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 ve Arş. Gör. Saliha AYDIN'a teşekkür ederim.

Bu çalışmayı 22.FEN.BİL.38 nolu proje ile destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne katkılarından dolayı teşekkür ederim.

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

Nurgül SÖNMEZ
Afyonkarahisar 2024

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	4
2.1 Mısır Bitkisi ve Önemi	4
2.2 Ağır Metal Stresi	4
2.2.1 Kadmiyum Stresi	5
2.2.2 Bitkiye Kadmiyumun Alınımı ve Taşıyıcı Proteinler.....	6
2.2.3 Kadmiyum Stresinin Fizyolojik ve Biyokimyasal Etkileri.....	8
2.2.5 Kadmiyum Stresinde Diferansiyel Olarak İfade Edilen Proteinler	10
2.3 Kadmiyum Stresi ve İyileştiriciler	16
2.3.1 Kadmiyum Stresi, İyileştiriciler ve Diferansiyel Olarak İfade Edilen Proteinler	20
3. MATERYAL ve METOT	25
3.1 Bitki Materyali ve Tohum Çimlendirilmesi	25
3.2 Fidelerin Hidroponik Kültürde Yetiştirilmesi	25
3.2 Fidelerin Taze ve Kuru Ağırlıklarının Belirlenmesi	26
3.3 Yaprak ve Kök Dokularındaki Kadmiyum Birikiminin ICP/OES Belirlenmesi ..	26
3.4 Klorofil İçeriğinin Belirlenmesi	27
3.5 Malondialdehit İçeriğinin Belirlenmesi	27
3.6 Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	28
3.6.1 Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi.....	28
3.6.2 Guaiakol Peroksidaz (POD) Aktivitesi.....	28
3.6.3 Katalaz (CAT) Aktivitesi.....	29
3.6.4 Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi.....	29

3.7 Mısır Yaprak Dokularından Protein Ekstraksiyonu ve Proteomik Analizler.....	29
3.7.1 Protein Ekstraksiyonu	29
3.7.2 Tripsin ile Proteinlerin Kesimi ve Peptit Örneklerinin Hazırlanması.....	30
3.7.3 Nano–Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometrisi (nLC–MS/MS) Analizleri	31
3.7.4 nLC–MS/MS Veri Analizleri	32
3.7.5 Biyoinformatik Analizler	32
3.8 İstatistiki Analizler	33
4. BULGULAR	34
4.1 Cd ve Tiyoüre Uygulamalarının Büyüme Üzerine Etkisi	34
4.2 Cd ve Tiyoüre Uygulamalarının Cd Birikimi Üzerine Etkisi	35
4.3 Cd ve Tiyoüre Uygulamalarının Klorofil İçeriği Üzerine Etkisi	35
4.4 Cd ve Tiyoüre Uygulamalarının Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi	36
4.5 Cd ve Tiyoüre Uygulamalarının Proteom Değişimleri Üzerine Etkisi	37
4.6 DEP’lerin Fonksiyonel Açıklamaları ve Kategorileri.....	38
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	50
6. KAYNAKLAR.....	62
ÖZGEÇMİŞ.....	94

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

As	Arsenik
Ca	Kalsiyum
Cd	Kadmiyum
CdCl ₂	Kadmiyum klorür
Fe	Demir
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
kDa	Kilodalton
mL	Mililitre
Mn	Mangan
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
mM	Milimolar
N	Azot
O ₂ ^{•-}	Süperoksit radikali
•OH	Hidroksil radikali
S	Kükürt
Se	Selenyum
Zn	Çinko

Kısaltmalar

ABC	ATP bağımlı kaset
APX	Askorbat peroksidaz
BS	Biyolojik süreç
CAT	Katalaz
DEP	Diferansiyel olarak ifade olan protein
GO	Gen Ontolojisi
GR	Glutatyan redüktaz
GSH	Glutatyon
GST	Glutatyon S-transferaz
HB	Hücre sel bileşen
HSP	Isı şoku proteini
HMA	Ağır metal ATPaz
IRT	Demir düzenlenmiş taşıyıcı
KA	Karbonik anhidraz
KEGG	Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi
nLC-MS/MS	Nano-Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometrisi
MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinaz
MDA	Malondialdehit
MF	Moleküler fonksiyon
NRAMP	Doğal dirençle ilişkili makrofaj protein
PC	Fitoşelatinler
PEG	Polietilen glikol
POD	Peroksidaz

PSI	Fotosistem I
PSII	Fotosistem II
ROT	Reaktif oksijen türü
RuBisCO	Rubiloz 1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz
SOD	Süperoksit dismutaz
TCA	Trikarboksilik asit
ZIP	ZRT/IRT benzeri protein



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 4.1 Mısır fidelerinin yaprak dokusunda Cd ve Tü+Cd uygulamalarına yanıt olarak belirlenen DEP'lerin ısı haritası.	38
Şekil 4.2 Gen ontolojisi (GO) analizlerine göre belirlenmiş biyolojik süreç (BS) terimleri.	39
Şekil 4.3 Gen ontolojisi (GO) analizlerine göre belirlenmiş hücresel bileşen (HB) terimleri.	39
Şekil 4.4 Gen ontolojisi (GO) analizlerine göre belirlenmiş moleküler fonksiyon (MF) terimleri.	40
Şekil 4.5 DEP'ler için önemli ölçüde zenginleştirilmiş KEGG yolları.	40
Şekil 4.6 Fotosentezde fonksiyon gören DEP'lerin ısı haritası.	42
Şekil 4.7 Glutasyon metabolizmasında fonksiyon gören DEP'lerin ısı haritası.	42
Şekil 4.8 Glikoliz/Glukoneogenez ile ilişkili DEP'lerin ısı haritası.	43
Şekil 4.9 Sistein metabolizması ile ilişkili DEP'lerin ısı haritası.	44
Şekil 4.10 Sekonder metabolik süreç ile ilişkili DEP'lerin ısı haritası.	45
Şekil 4.11 TCA döngüsü ile ilişkili DEP'lerin ısı haritası.	46
Şekil 4.12 Antioksidan savunma sistemi ile ilişkili DEP'lerin ısı haritası.	47
Şekil 4.13 Protein metabolizması ile ilişkili DEP'lerin ısı haritası.	48
Şekil 4.14 STRING 12.0 ile oluşturulan ve görselleştirilen protein-protein etkileşim ağı.	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 4.1 Mısır fidelerinde gövde ve kökün taze ve kuru ağırlığı üzerine Cd (50 µM) ve TÛ (35 µM) uygulamalarının etkisi.....	34
Çizelge 4.2 Mısır fidelerinde gövde ve kök dokularının Cd içeriği üzerine Cd (50 µM) ve TÛ (35 µM) uygulamalarının etkisi.....	35
Çizelge 4.3 Mısır fidelerinin yaprak dokularında klorofil içeriği üzerine Cd (50 µM) ve TÛ (35 µM) uygulamalarının etkisi	36
Çizelge 4.4 Mısır fidelerinin yaprak dokularında MDA içeriği ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerine Cd (50 µM) ve TÛ (35 µM) uygulamalarının etkisi	37

1. GİRİŞ

Tarımda kimyasal gübre kullanımının artması, atık sular ile sulama ve hızlı sanayileşme toksik metallerin tarımsal topraklarda birikmesine neden olmaktadır (Zhang vd. 2010). Son yıllarda toprak, sucul ekosistemler ve bitkilerde ağır metal birikiminin olumsuz etkileri konusunda endişeler artmaktadır. Hızla gelişen endüstriyel sektörün bir sonucu olarak artan emisyonlardan dolayı yüksek konsantrasyondaki metaloidler ve eser metaller tarımsal toprakların kirlenmesine neden olmaktadır (Zhang vd. 2010). Metal kontaminasyonu, kirlenmiş gıdaların doğrudan tüketilmesi, kirli toprakla fiziksel temas, kirli su içilmesi, gıda kalitesinin düşmesi, tarıma uygun arazilerin azalması ve ardından gıda güvensizliği yoluyla ekosistemleri ve insan sağlığını bozmaktadır (Hassan vd. 2019, Hussain vd. 2021).

Kadmiyumun (Cd) canlılar için oldukça toksik olduğu kabul edilmekte ve karasal ve sucul organizmalarda biyolojik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Chellaiah 2018). Çeşitli ağır metaller arasında Cd, toprakta binlerce yıl kalabilmekte ve tarımsal alanlar için önemli bir çevresel problem olarak kabul edilmektedir (Haider vd. 2021). Bitkilerde, Cd'un yapraklarda kloroza, büyümede inhibisyona, reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimine ve membranların peroksidasyonuna neden olarak toksisiteye yol açtığı bilinmektedir. Bitkilerde Cd toleransını artırmak için farklı stratejiler geliştirilmiştir (Haider vd. 2021). Bitkilerde salisilik asit, poliaminler ve brassinosteroidler gibi bitki büyüme düzenleyicileri, organik asitler, sistein ve silikon gibi kimyasallar bitkilerde Cd toleransının artırılması için kullanılmaktadır (Santos vd. 2018, Guo vd. 2019, Hasanuzzaman vd. 2019).

Yaygın ekim alanı, uyum yeteneği, yüksek verim ve dayanıklılığı nedeniyle hayati bir gıda ve yem bitkisi olan mısır, insan yaşamı ve sağlığını sürdürmede önemli bir rol oynamaktadır (Erenstein vd. 2022). Ancak, Cd stresine karşı hassastır ve mısır ürünlerinin güvenliği doğrudan gıda güvenliğiyle bağlantılıdır (Rizwan vd. 2017a).

Tiyoüre yapısal olarak üreye benzer, ancak oksijen yerine kükürt bulundurması nedeniyle kimyasal özellikleri bakımından üreden farklılık göstermektedir. Tiyoüre bir

bitki büyüme düzenleyicisi olarak, fizyolojik olmayan tiyol bazlı bir ROT temizleyicisidir ve bitkilerde stres kaynaklı redoks dengesizliklerini ve redoksa bağlı hasarı en aza indirebileceği gösterilmiştir (Pandey vd. 2013, Srivastava vd. 2017). Tiyöürenin stres hasarını hafifletme potansiyeli, yapılan çalışmalar sonucunda doğrulanmıştır. Tiyöürenin Cd stresinin neden olduğu hasarı en aza indirdiği mısır (Perveen vd. 2015) ve arpa (Ikram vd. 2014) bitkileri üzerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Tiyöürenin redoks durumunun düzenlenmesi ve antioksidan enzim sentezindeki artış yoluyla tuzluluk ve sıcaklık stresi gibi diğer stresleri iyileştirmedeki rolleri bildirilmiştir (Srivastava vd. 2011, Kaya vd. 2015, Perveen vd. 2015, Singh ve Meena 2020). Ayrıca, stres altındaki bitkilerde yaprak büyümesi, fotosentetik performans ve fotosentetik pigmentlerin seviyesinin tiyöüre uygulaması ile artış gösterdiği bulunmuştur (Srivastava vd. 2017). Tiyöüre uygulaması mahsul verimini artırmış (Pandey vd. 2013), absisik asit ve kalsiyum sinyal yollarını düzenlenmiş (Srivastava vd. 2010a), bitki su alımını korumuş (Srivastava vd. 2010b) ve antioksidan sistemi geliştirmiştir (Srivastava vd. 2011, Hassanein vd. 2015).

Ağır metal stresi koşullarında, bitkilerde metabolik süreçlerin kararlı bir hale gelmesinde transkriptom, proteom ve metabolom mekanizmalarının yeniden programlanması nedeniyle stres toleransını sağlayan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılabilmesi için farklı "omik" yaklaşımların kullanılması önem arz etmektedir (Mosa vd. 2017). Bitkilerde Cd stresine cevap olarak diferansiyal olarak ifade edilen proteinlerin (DEP'ler) kapsamlı şekilde belirlenebilmesi için yüksek verimlilikli proteomik analizlerin güçlü bir araç olduğu kanıtlanmıştır (Majumdar vd. 2019, Huang vd. 2019, Sagonda vd. 2021). Çeşitli ürün bitkilerinde Cd stres tepkileri üzerine proteomik çalışmalar yapılmış olsa da (Xue vd. 2014, Júnior vd. 2015, Jian vd. 2020, Zhang vd. 2020a), Cd stresine yanıt olarak ürün bitkilerinin proteomlarının düzenlenmesi üzerine araştırmaların eksik olduğu bildirilmiştir (Guo vd. 2023). Bu nedenle, hem Cd stresinin hem de bir bitki büyüme düzenleyicisi olan tiyöürenin varlığında Cd toleransının kazanılmasında fizyolojik ve biyokimyasal analizlerin yanı sıra proteomik analizlerin yapılmasının stres toleransının kazanılmasında fonksiyon gören anahtar süreçlerin belirlenmesinde önemli olacaktır. Yapılan literatür taramasında Cd stresinde proteom çalışmaları olmasına rağmen, Cd stresinin iyileştirilmesinde bitki

büyüme düzenleyicisi olan tiyoüenin kullanıldığı proteomik çalışmalara rastlanılmamıştır. Bu bağlamda, Cd stresine maruz bırakılan mısır bitkisinde tiyoüre uygulaması ile DEP profillerinin belirlenmesi önemli olacaktır. Bu nedenle, mevcut tez çalışmasında Cd stresine maruz kalan mısır fidelerinde tiyoüenin iyileştirici etkisinin fizyolojik, biyokimyasal ve proteomik yaklaşımlarla analiz edilmesi amaçlanmıştır.



2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Mısır Bitkisi ve Önemi

Mısır (*Zea mays* L.), dünya çapında yetiştirilen Poaceae familyasına ait bir tahıl bitkisidir.

Alem	Plantae
Bölüm	Magnoliophyta
Sınıf	Liliopsida
Takım	Poales
Familya	Poaceae
Cins	<i>Zea</i>
Tür	<i>Zea mays</i> L.

Dünya'da yetiştirilen mısır çeşitleri başlıca atdışi mısır (*Z. mays indendata*), sert mısır (*Z. mays indurata*), patlak mısır (*Z. mays everta*), şeker mısır (*Z. mays saccharata*), mumsu mısır (*Z. mays ceratina*), unlu mısır (*Z. mays amylaceae*) ve kavuzlu mısır (*Z. mays tunicata*) olmak üzere yedi alttürde incelenmektedir. Bunlardan en çok yetiştirilenler sert mısır ve atdışi mısırdır. Cin mısır ve şeker mısır çeşitleri ise genellikle çerezlik olarak değerlendirmektedir. Diğerlerinin ekonomik değerlerinin düşük olduğu bildirilmiştir (Elçi vd. 1987). Buğday ve çeltikten sonra verim açısından dünyanın üçüncü en önemli tahıl ürünü olan mısır (Iqbal vd. 2014), küresel olarak hayvan yemi, insan tüketimine yönelik tahıl ve etanol üretimi dahil olmak üzere çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır (Lin vd. 2022).

2.2 Ağır Metal Stresi

Ağır metaller, endüstriyel atıklar, gübre uygulamaları, eritme ve kanalizasyon bertarafı gibi antropojenik faaliyetler yoluyla topraklarda uzun süre biriktirilmektedir (Aydinalp ve Marinova 2009). Aşırı ağır metal birikimi sadece toprak ve mahsul verimini azaltmayıp aynı zamanda gıda zinciri aracılığıyla insan sağlığını da tehdit etmektedir (Cobbett ve Goldsbrough 2002). Ağır metallerin bazıları hareketsiz olup biriktikleri

yerden hareket edemezken hareketli olanlar difüzyon, endositoz veya metal taşıyıcıları yoluyla bitki kök sistemi tarafından alınmaktadır (Krzesłowska 2011, Dehghani vd. 2016, Alharbi vd. 2018). Bitkilerde ağır metallerin birikme oranı ve bitkinin ağır metallere toleransı türden türe değişmektedir. Her yıl 20 milyon hektarlık arazinin kirlendiği rapor edilmiştir (Wang vd. 2023). Küresel olarak, 10 milyondan fazla sahada toprak kirliliği ve bu kirliliğin önemli çoğunluğunun %50'yi aşan oranda ağır metal ve/veya metaloidlerin endişe verici konsantrasyonlarını barındırdığı bildirilmiştir (Sánchez–Castro vd. 2023). Ağır metal toksisitesi, bitkilerde bodur büyüme, kloroz ve kökte esmerleşme, azalma ve ölüm gibi çeşitli etkilere neden olmaktadır (Öztürk vd. 2015). Oksidasyon durumlarına bağlı olarak ağır metaller oldukça reaktif olabilir ve bu da bitki hücrelerinde birçok yönden toksisiteye neden olabilir. Ağır metal toksisitesi, hücresel ve moleküler düzeyde bitki metabolizmasının değişmesi, fotosentez inhibisyonu, solunum ve bazı anahtar enzimlerin uyarılmış aktivitelerine neden olan enzimler ve proteinlerin inaktivasyonu ve denatürasyonu, metabolik açıdan önemli moleküllerin fonksiyonel gruplarının bloke edilmesi, biyomoleküllerden ve fonksiyonel hücresel birimlerden temel metal iyonlarının yer değiştirmesi, konformasyonel değişiklikler ve membran bütünlüğünün bozulması dahil olmak üzere farklı fizyolojik süreçlerde değişikliklerle sonuçlanmaktadır (Hossain vd. 2010, Villiers vd. 2011). Ağır metaller çeşitli reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimini uyarmaktadır. Oluşan ROT'lar özellikle hücresel membranların lipid peroksidasyonuna, biyomoleküllerin zarar görmesine ve oksidatif hasar oluşmasına yol açmaktadır (Hossain vd. 2010, Braconi vd. 2011, Ahmad vd. 2012).

2.2.1 Kadmiyum Stresi

Kadmiyum (Cd), yüksek toksisitesi ve ciddi biyoakümüülasyon derecesi nedeniyle en tehlikeli metallerden biridir (Singh vd. 2020). Toprakta kadmiyum birikimi, gübreleme, atık deşarjları, endüstriyel atık sular gibi antropojenik etkilerin yanı sıra madenler, volkanlar vb. gibi doğal kaynaklar aracılığıyla gerçekleşmekte (Sarwar vd. 2010, Sebastian ve Prasad 2013, Singh vd. 2020) ve tarımsal topraklarda Cd sınırı yaklaşık 100 mg/kg'dır (Salt vd. 1995). Cd diğer ağır metallerle karşılaştırıldığında kolayca çözünür ve hareketlidir (Song vd. 2015). Bu nedenle, bitkiler tarafından hızlı bir şekilde

alınmaktadır. Alımdan sonra, Cd farklı yenilebilir bitki kısımlarında yer değiştirmekte ve birikmektedir (Chen vd. 2018a, Adil vd. 2020) ve bu da besin zinciri yoluyla insan sağlığını tehdit ederek karaciğer ve böbrek fonksiyon bozukluğu, kanser ve çeşitli hastalıklara yol açmaktadır (Zhang vd. 2020b). Canlı sistemlerde yüksek birikim oranı, daha uzun yarılanma ömrü ve biyolojik olarak parçalanamayan doğası nedeniyle Cd, düşük konsantrasyonda bile son derece toksiktir (Javed vd. 2019). Topraktaki yüksek Cd içeriği, toprak verimliliği ve bitkinin fizyolojisi ve metabolizmasını etkileyerek büyüme ve verimin azalmasına neden olmaktadır (Mitra vd. 2018). Cd toksisitesi oksidatif strese ve hücrel fitotoksositeye neden olmakta, nükleik asitlere (DNA, RNA) zarar vermekte ve bitkilerde hücrel metabolizmanın yanı sıra hücrel protein profilini değiştirmektedir (Haider vd. 2021, Li vd. 2022, Zulfiqar vd. 2022).

2.2.2 Bitkiye Kadmiyumun Alınımı ve Taşıyıcı Proteinler

Bitkilere kökler yoluyla giren Cd yüksek hareketlilik ve özümsebilirliğe sahiptir. Sürgünlerde özsuyu yükselmesi yoluyla ve/veya taşıyıcılar aracılığıyla iyonik formdaki Cd vasküler demetlere (yani floem ve ksilem) aktarılmaktadır (Dong vd. 2019). Cd, vasküler dokular aracılığıyla farklı bölgelere kolaylıkla taşınmaktadır (Ismael vd. 2019). Bitki kökleri tarafından Cd alımında yer alan mekanizmalar genellikle Cd ve benzer kimyasal özelliklere sahip diğer besin mineralleri arasındaki rekabeti içermektedir (Hasan vd. 2009). Şu ana kadar spesifik bir Cd taşıyıcısı tanımlanmamış olup, Fe, Mn ve Zn taşıyıcıları kullanılarak Cd absorbe edilmekte ve taşınmaktadır (Ogawa vd. 2006, Lekeux vd. 2019). Kökten sürgüne Cd translokasyonu, sürgün ve tanedeki Cd birikiminde merkezi bir rol oynamaktadır (Liu vd. 2014). Kök hücrelerinin plazma zarı boyunca Cd absorpsiyonu, sitozoldeki Cd aktivitesi ile kökün apoplastlarındaki elektrokimyasal potansiyel farkı ile düzenlenmektedir (Benavides vd. 2005). Membran potansiyeli, çok düşük Cd konsantrasyonunda bile Cd alımını sağlamak için yeterli enerji vermektedir (Pinto vd. 2004). Köklerde, Cd absorpsiyonu inorganik kompleksler (yani, $Cd^{2+}SO_4$, $CdCl^+$ ve $CdCl_2$) veya organik formlar (yani fitometalofor kompleksleri) olarak ortaya çıkmaktadır (Kubier vd. 2019). Cd, simplastik yoldan ksileme nüfuz edebilir ve apoplastik yolda daha yüksek bir konsantrasyonda olabilir (Kuriakose ve Prasad 2008). Cd stresi altında önemli bir rol oynayan apoplastik

bariyerler yüksek Cd konsantrasyonlarında zarar görebilir ve bu nedenle Cd iyonlarının köklerden diğer bitki dokularına taşınmasının gecikebileceği bildirilmiştir (Ling vd. 2017). Ksilem elemanlarındaki veya merkezi silindirin trakeidlerindeki Cd bitki sürgünlerine aktarılmaktadır (Jiao vd. 2004).

Cd'un tahıl tanelerine translokasyonu, Cd'un floem aracılı tahıl tanesine taşınmasıyla ilişkilidir (Guo vd. 2018). Floem, Cd'un taneye aktarıldığı birincil yoldur. Cd, sülfidril (SH)'den türetilmiş bileşikler ve floem sapındaki 13 kDa-protein ile bağlanabilmektedir (DalCorso vd. 2008). Kökteki Cd içeriği, Cd ayrımının hareketliliğine bakılmaksızın, toprak üstü bitki dokusundakinden daha yüksektir (Tran ve Popova 2013). Normalde Cd parçacıkları bitki köklerinde tutulmakta ve sadece küçük bir kısmı bitkinin yaprak, gövde ve üreme organlarına taşınmakta ve Cd içeriği kökler>yapraklar>meyveler>tohumlar olarak sıralanmaktadır (Kubier vd. 2019). Çoğu bitkide ksilem yoluyla Cd taşınması sınırlıdır ve tohum ve meyvede konsantrasyonları minimumdur (Ismael vd. 2019). Bununla birlikte, Cd'un meyve ve tanelere taşınma derecesi genellikle ürün bitkileri ve çeşitlere göre değişmektedir (Pinto vd. 2004). Kısacası, bitki türleri, agronomik uygulamalar, çevresel koşullar ve toprak özellikleri gibi çeşitli faktörler, farklı bitki kısımlarında Cd alımını etkilemektedir (Yang vd. 2017).

Hücre çeperi tarafından absorblanmasının yanı sıra, Cd iyonu sitoplazmaya ATP bağımlı kaset (ABC) taşıyıcıları, ağır metal ATPazlar (HMA'lar), çok ilaçlı ve toksik bileşik ekstrüzyon ailesi, doğal dirençle ilişkili makrofaj protein (NRAMP), H⁺/katyon değiştirici, ZRT/IRT benzeri protein (ZIP) ve oligopeptid taşıyıcı vb. ile sitoplazmaya girebilir (Mendoza-Cózatı vd. 2011). Bitkilerde Cd'un absorpsiyonunda, ZIP ailesinden ZRT1 ve IRT1 (demir-düzenlenmiş-taşıyıcı-1) dahil olmak üzere birçok protein rol oynamaktadır (Zheng vd. 2018, Ismael vd. 2019). Metal taşıyıcı ZIP ailesinin temel özelliği, bu proteinlerin metal iyonlarını hücre dışı boşluklardan ve organel lümeninden sitoplazmaya taşıyabilmesidir (Vert vd. 2009). Metal ATPaz, Cd'u membranlar aracılığıyla taşımakta ve Cd'un köklerden sürgünlere taşınmasında önemli bir rol oynamaktadır (Qiao vd. 2019). ATP hidrolizi ile sağlanan enerji, Cd'u membranlar boyunca taşımak için belirli integral membran proteinleri tarafından kullanılmaktadır.

P1B-ATPaz'lar kritik ATPaz'lardan biridir (Ismael vd. 2019). ATP kullanan P-tipi ATPaz'ların bir alt ailesi olan P1B-ATPaz'lar, katyonları membranlar boyunca elektrokimyasal gradientler doğrultusunda pompalamaktadır (Begum vd. 2019). Sitoplazmik metal akışı P1B-ATPaz tarafından düzenlenmekte ve sitoplazmik Cd seviyelerinin korunmasına yol açmaktadır (Argüello vd. 2011). Cd absorpsiyonunda yer alan diğer proteinler, oligopeptid taşıyıcıları ailesinin bir parçası olan ve metal-nikotianamin komplekslerinin bitki hücre zarı boyunca taşınmasında rol oynayan sarı şerit-benzeri taşıyıcılardır (Wang vd. 2013). Katyonları taşıyan diğer bir metal taşıyıcı grubu, doğal dirençle ilişkili makrofaj proteini (NRAMP) ailesinin bir parçası olan proton-bağlı metal-iyon taşıyıcılarıdır (Ishimaru vd. 2012). Genellikle iki değerlikli metal-taşıyıcı-1 ve iki değerlikli katyon-taşıyıcı-1 olarak bilinen NRAMP taşıyıcıları, Cd gibi toksik kirleticiler de dahil olmak üzere birçok metal iyon substratına sahiptir (Sasaki vd. 2012). NRAMP taşıyıcıları, endodermal plazma zarı yoluyla Cd akışında yer aldığı için stelenin Cd akışında önemli bir rol oynamakta ve Cd'un köklerden sürgünlere taşınmasına katkıda bulunmaktadır (Abedi ve Mojiri 2020). Bitkilerde, plazma membranlarının bekçi hücrelerinde bulunan Ca^{2+} kanalları gibi çeşitli kanalların Cd iyonlarına hafif geçirgen olduğu ve Cd'un bekçi hücrelerine Ca kanalları aracılığıyla girebileceği, Cd'un epidermal şeritlerde hiperpolarizasyon-aktif-kalsiyum kanalları, voltaj-yoğun-aktif-kanalları ve depolarizasyon-aktif-kalsiyum kanalları gibi varsayılan Ca kanal inhibitörlerinin etkisi ile kanıtlanmıştır (Lux vd. 2011, Corguinha vd. 2015).

2.2.3 Kadmiyum Stresinin Fizyolojik ve Biyokimyasal Etkileri

Bitkilerde Cd'un absorpsiyonu ve birikmesi bir dizi morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal değişikliğe neden olmakta ve aynı zamanda birçok metabolik süreci de etkilemektedir (Wang vd. 2021). Cd stresinin fotosentez, iyon homeostazı, solunum, protein sentezi, enerji transferi, hücre bölünmesi ve redoks dengesi üzerindeki toksik etkileri farklı bitki türlerinde araştırılmıştır (Kaya vd. 2019, Romero-Puertas vd. 2019). Bitki toksik Cd seviyelerine maruz kaldığında çimlenme baskılanmakta ve sonuç olarak Cd bitki büyümesini ve üretimini engellemekte, fide fizyolojik süreçlerine müdahale etmekte ve tarımsal verimliliği azalmasına neden olmaktadır (Guilherme vd. 2015, Raza

vd. 2020). Şeker pancarı, buğday, ıspanak (Sersen ve Kral'ova 2001, Younis vd. 2016), maş fasulyesi ve fasulye (Wahid vd. 2007) dahil olmak üzere birçok bitki türünde Cd iyonlarının kloroplastların işlevini ve yapısını etkilediği bildirilmiştir. Cd stresi bitkilerde, lateral kök oluşumu, kloroz ve stomatal yoğunluğun inhibisyonu gibi morfolojik, fizikokimyasal ve yapısal değişikliklere neden olmaktadır (Bari vd. 2019, Huybrechts vd. 2020). Cd maruziyetinin çeltik, buğday ve domates dahil olmak üzere çeşitli ürün bitkilerinde kök uzamasını en aza indirdiği gösterilmiştir (Rizwan vd. 2012, Hussain vd. 2015, Abbas vd. 2018). Cd, redoks regülasyonunu bozarak ve membran lipidlerine zarar veren ve bitkilerdeki tüm metabolizmayı bozan reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu uyarak mitokondriyal fonksiyon üzerinde etki göstermektedir (Gallego vd. 2012, Chen vd. 2018a, b, c, Huybrechts vd. 2020). Cd'un süperoksit anyonu ($\bullet\text{O}_2^-$), hidroksil radikalleri ($\text{HO}\bullet$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi ROT'ların aşırı üretimini teşvik ettiği ve böylece lipit peroksidasyonunu artırdığı bildirilmiştir (Gallego vd. 1996, Chaoui vd. 1997, Mittler 2002, Audet ve Charest 2007). Cd ayrıca demir ve magnezyum gibi temel iyonların absorpsiyonunu inhibe ederek, azot metabolizmasını etkileyerek ve su ve mineral alımını azaltarak iyonların homeostazını bozmaktadır (Afzal vd. 2019, Huybrechts vd. 2020). Şeker pancarının köklerinde Cd kaynaklı Fe eksikliği gözlenmiştir (Chang vd. 2003). Bezelyede P, K, S, Ca, Zn, Mn ve B'nin alımının Cd'a maruz kaldıktan sonra güçlü bir şekilde inhibe edildiği bildirilmiştir (Metwally vd. 2005). Cd toksisitesi, yonca kökleri ve sürgünlerindeki N, Ca, Mg ve P içeriğini önemli ölçüde indirmişdir (Zhang vd. 2019). Cd uygulaması, kök bölgesinde düşük amonyak ve azot fiksasyonu asimilasyonu nedeniyle soya nodüllerinin oluşumunu en aza indirmiştir (Karina vd. 2003). Cd, çeşitli yapısal proteinlerin kükürt içeren gruplarına (sülfidril) bağlanıp bunların yanlış katlanmasına yol açarak özellikle elektron taşıma zincirinde redoks reaksiyonlarına müdahale etmektedir. Turpta, Cd toksisitesi sırasında kalsiyumun hücre sinyallemesinde yer alan kalmodulinin kadmiyum ile yer değiştirdiği ve kalmodulin bağımlı fosfodiesteraz aktivitesinin inhibisyonuna neden olduğu gözlenmiştir (Rivetta vd. 1997). Yüksek Cd seviyeleri ayrıca prolin amino asit sentezini ve birikimini teşvik etmektedir (Ghori vd. 2019). Bitkilerde prolin birikimi, bitkilerin stres tolerans kapasitesi ile ilişkili metal toksisitesinin bir belirtisi olarak kabul edilmektedir. Prolin, ozmotik ayarlama, sitozolik pH tamponu ve metal stresi altında bir sinyal molekülü,

hücre zarı bütünlüğünü korumak için ROT birikimi ve hücrel lipitlerin peroksidasyonunu önlemede önemli bir role sahip uyumlu bir çözünen madde olduğu bildirilmiştir (Hossain vd. 2014).

2.2.5 Kadmiyum Stresinde Diferansiyel Olarak İfade Edilen Proteinler

Moleküler biyoloji tekniklerinin sürekli gelişmesiyle birlikte, ağır metal stresine karşı bitki tolerans mekanizmaları üzerine yapılan araştırmalar fizyolojik seviyeden moleküler seviyeye taşınmıştır. Bitkilerin ağır metal stresine tepki verdiği süreç genellikle protein ifadesindeki değişikliklerin sonucudur (Cvjetko vd. 2014). Ağır metale duyarlı genleri veya proteinleri tanımlamak, ağır metal toksisitesi tepkileri ve detoksifikasyon mekanizmalarını karakterize etmede temel bir adımdır (Ahsan vd. 2009). Transkriptomikler, mRNA ifade seviyelerine karşılık gelen proteinlerin fonksiyonunu yansıttığından, gen ifade ağlarının çözülmesi için vazgeçilmez bir yaklaşım sağlamaktadır. Ancak mRNA seviyeleri, transkripsiyon sonrası mekanizmanın aktivitesi veya protein bozulması nedeniyle protein seviyelerini tam olarak temsil etmemektedir (Haider ve Pal 2013). Gen ifadesi ile hücre metabolizması arasında bir bağlantı sunan proteomik tekniği, biyotik ve abiyotik streslere karşı bitki tepkisinin moleküler mekanizmasının analizi için güçlü bir araçtır (Wang vd. 2016). Proteomik teknolojisi, bitki ağır metal stres tepkisi hakkında doğru bilgi elde etmek için güçlü bir araç haline gelmiştir (Cvjetko vd. 2014). Omik yaklaşımları, bitkiler ağır metal toksisitesine maruz kaldığında verdiği tepkilerin moleküler mekanizmalarındaki değişiklikleri anlamak için değerli araçlar olarak ortaya çıkmaktadır (Meena vd. 2017, Raza vd. 2021). Fizyolojik ve biyokimyasal analizler ile ilgili geleneksel karakterizasyon yöntemleri yetersiz görülmekte ve bu nedenle özellikle tüm genom proteomunun ağır metal tepkisi üzerine daha fazla araştırma, ağır metallerin oluşturduğu potansiyel tehditlerle başa çıkmada umut verici bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir (Xie vd. 2019, Kosakivska vd. 2021).

Cd kaynaklı strese tepki olarak fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklerin anlaşılmasını tamamlayan moleküler çalışmalar, bitkilerin çevresel değişikliklere alışmasının stresin moleküler algılanmasıyla başladığını göstermektedir. Daha sonra, stresin neden olduğu

genlerin geniş bir aralığı ifade edildiğinden, gen düzenlemesi arayışında sinyal iletimi gerçekleşmektedir (Kieffer vd. 2009a, Amudha ve Balasubramani 2011). Bu nedenle, abiyotik streslere verilen yanıtlar, stres proteinlerinin ve sinyal moleküllerinin (Sanità di Toppi ve Gabbrielli 1999) sentezini ve bu ifadeyi düzenleyen transkripsiyon faktörlerini uyarmaktadır (Zhang vd. 2005, Amudha ve Balasubramani 2011). Farklı transkripsiyon faktörleri, birkaç genin ifadesini düzenlemeye yardımcı olduğu için abiyotik streslere bitki tepkisini etkilemektedir (Zhang vd. 2005, Amudha ve Balasubramani 2011). Bu nedenle, Cd dahil olmak üzere ağır metallere maruz kalan bitkilerin protein profilinde bir değişiklik meydana gelmektedir (Oliveira vd. 2020). Proteinler bitkilerin hücresel süreçlerini düzenlemek için çok önemlidir. Hücresel protein rolleri, miktarı, tanımlanması, ifade modeli, modifikasyonu ve etkileşimlerini içeren proteomik, stresin bunlar üzerindeki etkisini değerlendirmek için mükemmel bir strateji sağlamaktadır (Alsafran vd. 2022). Proteomik bazlı teknikler, ağır metal maruziyeti altındaki bitkilerin stres tepki mekanizması, protein translasyonu ve moleküler metabolizması hakkında hedef bilgileri elde etmek için güçlü araçlar olarak kullanılmaktadır (Ma vd. 2016, Han vd. 2021, Araújo vd. 2022).

Diferansiyel proteomik analiz, bitkilerin ağır metallere verdiği tepkilerin moleküler mekanizmalarını incelemek için güvenilir, tekrarlanabilir ve yüksek verimli bir yaklaşım olarak büyük başarı elde etmektedir (Brahim vd. 2010, Cvjetko vd. 2014). Bitki proteomiklerindeki son gelişmeler, protein ayırma, nicelik belirleme, kütle spektrometresi (MS) ve biyoinformatikteki yeni teknolojik gelişmeler nedeniyle mümkün olabilmektedir. Kütle spektroskopisi, proteinlerin kütle tahmininin çözünürlüğü, hassasiyeti ve doğruluğunu artıran büyük ölçekli proteom analizinin merkezinde yer almaktadır (Cassidy vd. 2021). Kantitatif proteomik teknikler, geleneksel çift yönlü elektroforez bazlı tekniklerin yerini, daha düşük numune hacimleri gerektiren, daha yüksek hassasiyete sahip ve daha yüksek verimi olan nano-sıvı kromatografi (nLC)-tandem kütle spektrometrisi (MS/MS) bazlı tekniklerin aldığı noktaya kadar gelişmiştir (Schubert vd. 2017). Özellikle *Oryza sativa* ve *Arabidopsis thaliana* gibi model bitkiler üzerinde proteomik araştırmalar önemli ilerlemeler kaydetmiştir.

Proteomik analizler, strese maruz kalan bitkilerde stres tepkisinin çok hızlı gerçekleştiğini göstermektedir (Tran ve Popova 2013). Birçok bitki türünün proteomu incelenmiş ve bitkileri oksidatif, biyotik ve abiyotik stres koşulları da dahil olmak üzere çeşitli streslere karşı koruyan çeşitli proteinler tanımlanmıştır (Fan vd. 2016, Goodin 2018, Kumar vd. 2018). Cd'un varlığı, ATP bağımlı kaset taşıyıcıları (ABC'ler), katyon antiporterleri, ağır metal ATPaz'lar (HMA'lar) ve çinkoyla düzenlenen taşıyıcı proteinler/demirle düzenlenen taşıyıcı protein benzeri proteinler (ZIP'ler) gibi kök taşıma proteinlerinde değişikliklere neden olmaktadır (Das vd. 2016, Fu vd. 2019, Zhao vd. 2019, Zhang vd. 2020c, Ugalde vd. 2021). ABC'ler ve ZIP'ler gibi birçok metal taşıma proteininin, ağır metal stresi altında bitki metal alımında ve homeostazda hayati rol oynadığı gösterilmiştir (Xu vd. 2012). Ek olarak, glutaredoksinler, glutatyon S-transferazlar (GST'ler), süperoksit dismutazlar (SOD'lar) ve katalazlar (CAT'lar) gibi oksidatif hasara karşı korumaya yardımcı olan proteinler de bitkilerin ROT'ları temizlemesine yardımcı olmada önemli roller oynamaktadır (Feng ve Ma 2021). Cd stresine maruz bırakılan *Sorgum bicolor*'un proteomik analizinde glutatyon S-transferaz, ribuloz bisfosfat karboksilaz küçük zinciri, karbonik anhidraz, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz ve sitokrom P450 gibi toplam 33 DEP tespit edilmiştir (Roy vd. 2016).

ZIP gen ailesine ait taşıyıcılar kadmiyum, demir, manganez ve çinko gibi çeşitli farklı katyonların taşınmasından sorumludur (Guerinot 2000). ZIP ailesi, ağır metal homeostazı ve stresleri söz konusu olduğunda hayati öneme sahiptir. Köklerdeki demir ve çinko yüklerine yanıt olarak Arabidopsis'te görüldüğü gibi bazı ZIP proteinlerinin aktive edildiği bildirilmiştir. İlk ZIP taşıyıcılarından biri Arabidopsis'te karakterize edilmiş olup, çeşitli ZIP ailesi üyelerinin kadmiyum, çinko, demir ve magnezyum gibi metal iyonlarını taşıdığını göstermektedir. ZIP1 ve ZIP3 esas olarak köklerde bulunmakta ve özellikle çinko stresi sırasında teşvik edilmektedir. Arabidopsis'te *AtZIP4* köklerde ve sürgünlerde bulunur ve ifadesi Zn kısıtlaması sırasında indüklenir ve çinko beslenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (Manara 2012).

Yüksek bitkilerde, 14-3-3 proteinleri her zaman sinyal moleküllerine bağlanmakta ve stres tepkilerinde ve sinyal iletiminde önemli roller oynamaktadır (Liu vd. 2016). Cd

stresine maruz bırakılan *Populus yunnanensis*'te üç 14–3–3 proteininin artan yönde düzenlendiği bildirilmiştir (Huang vd. 2019). Cd stresi altında *Chlamydomonas reinhardtii*'de glutatyon sentezi, ATP metabolizması, oksidatif strese yanıt ve protein katlanmasında rol oynayan proteinlerin yukarı yönde düzenlendiği bildirilmiştir (Gillet vd. 2006). PR proteinlerinin bolluğu ağır metal streslerine yanıt olarak önemli ölçüde artmaktadır (Xue vd. 2015, Dai vd. 2017). Cr stresine maruz bırakılan mısırdaki PR1 ve PR10 proteinlerinin yukarı yönde düzenlenmesi savunma tepkisinin pozitif olarak düzenlenmesi ile ilişkilendirilmiştir (Terzi ve Yıldız 2021). Ağır metallere maruz kalan bitkilerde, Calvin döngüsünde ve fotosentetik elektron taşıma zincirinde yer alan fotosentezle ilişkili proteinlerin bolluğunun azaldığı bildirilmiştir (D'Alessandro vd. 2013). Karbon fiksasyonu ve ışığa bağlı reaksiyonlarda (örneğin, RuBisCO, karbonik anhidraz) yer alan çoğu enzimin seviyesi, Cd'a kısa ve uzun süre maruz kalma (14–56 gün) sırasında kavak yapraklarında önemli ölçüde azalmış (Kieffer vd. 2008, 2009b, Durand vd. 2010, Visioli vd. 2010, Marmiroli vd. 2013, Yang vd. 2015, Dai vd. 2020), solunumda yer alan enzimlerin seviyeleri ise önemli ölçüde artmıştır (Durand vd. 2010, Yang vd. 2015). Antioksidan enzimlerin artan bolluğu, Cd stresi altında ROT aracılı hasara karşı hücrel korumayı sağlamaktadır (Hossain vd. 2012a). Hossain vd. (2012a), Cd tarafından teşvik edilen savunmayla ilişkili proteinler arasında CAT ifadesindeki artışı göstermiştir. Cd stresine maruz bırakılan *A. thaliana*'da CAT seviyesinin kontrol uygulamasına göre 3,5 kat arttığı bildirilmiştir (Carneiro vd. 2017).

Cd stresine maruz bırakılan buğdayın Cd–toleranslı ve Cd–hassas iki çeşidinin kök dokularında Tandem Kütle Etiketleri teknolojisi kullanılarak proteomik analiz yapıldığında diferansiyel olarak ifade edilen proteinlerin sayısı sırasıyla toplam 310 ve 443 olduğu bildirilmiştir (Zhang vd. 2023). Yapılan GO analizinde, iki buğday çeşidinde de Cd yanıtında yer alan proteinlerin esas olarak biyolojik süreç kategorisinde metabolik süreç ve hücrel süreç; hücrel bileşen kategorisinde hücre ve hücre içi; moleküler fonksiyon kategorisinde katalitik aktivite, bağlayıcı ve antioksidan aktivite şeklinde olduğu ortaya konulmuştur. Bununla birlikte, yapılan KEGG zenginleştirme analizinde, Cd–toleranslı buğday çeşidinde DEP'lerin lipid metabolizması ve doymamış yağ asidi biyosentezi gibi yollarda önemli düzeyde zenginleştirildiği gösterilmiştir. Her iki buğday çeşidinde Cd'a duyarlı DEP'ler, glutatyon metabolizması, alfa–linolenik asit

metabolizması ve fenilpropanoid biyosentez yollarında önemli ölçüde zenginleştirilmiştir. Cd-hassas buğday çeşidinde flavonoid biyosentez, sistein ve metiyonin metabolizması ve nişasta ve sakkaroz metabolizması yolları ve Cd-toleranslı buğday çeşidinde endoplazmik retikulum yolundaki protein işleme ve askorbat ve aldatat metabolizma yollarındaki proteinler önemli düzeyde zenginleştirilmiştir (Zhang vd. 2023).

Chen vd. (2022a), Cd stresine maruz bırakılan marul yapraklarında LC-MS/MS yöntemi ile proteomik analiz yapmıştır. Cd stresine maruz kalan marul yapraklarında HemL, HemY ve PPOX gibi klorofil üretimi için gerekli olan 12 enzimin ifadesinin azalan yönde düzenlendiği ve karotenoidlerin parçalanmasını sağlayan NCED4 ve CCD8 enzimlerinin ifadesinin ise yukarı yönde düzenlendiği bildirilmiştir. Ayrıca, kontrole göre Cd uygulamasında ksantofil döngüsünde yer alan ZEP ve VDE ifadesi önemli düzeyde azalmıştır. Cd uygulamasının ışık toplama komplekslerindeki proteinlerin (Lhca4, Lhcb1, Lhcb3, Lhcb4 ve Lhcb6) ifadesini azalttığı bildirilmiştir. Ek olarak, PSII reaksiyon merkezindeki PsbL, PsbP ve PsbR proteinleri, PSI reaksiyon merkezindeki psaC, psaD, psaD, psaL ve psaN proteinleri, elektron taşınmasıyla ilgili proteinler (Cyt b6/f kompleksi, Fd ve H⁺-ATPaz), karbon fiksasyonu ile ilgili ATPaz alt birimleri ve Rubisco alt birimlerinin ifadesini önemli düzeyde azalttığı belirlenmiştir (Chen vd. 2022a).

Cd stresine maruz bırakılan iki çeltik (*Oryza sativa* L.) çeşidinde (cv. Indica ve Japonica) yapılan proteomik analizde protein ifadelerinde belirgin değişiklikler saptanmıştır (Zhu vd. 2024a). Cd'a maruz bırakılan Indica çeltik çeşidinde kontrole göre 493'ü yukarı yönde düzenlenen ve 568'i aşağı yönde düzenlenen toplam 1061 DEP tespit edilirken, Japonica çeltik çeşidinde kontrole göre 135 yukarı yönde düzenlenen ve 285 aşağı yönde düzenlenen olmak üzere toplam 420 DEP tespit edilmiştir. GO zenginleştirme analizi Cd'a maruz bırakılan Indica çeltik çeşidinde DEP'lerin kontrole göre esas olarak ROT metabolik süreci, hidrojen peroksit metabolik süreci, kloroplast ile ilgili süreçler ve oksidoredüktaz aktivitesinde yer aldığını göstermiştir. Cd'a maruz bırakılan Japonica çeltik çeşidinde yapılan GO zenginleştirme analizi ile kontrole göre esas olarak fotosentez, kloroplast tilakoid, plastid tilakoid,

metabolit ve enerji üretiminin yanı sıra fotosistem I ve fotosistem II ile ilgili süreçlerde yer alan DEP'ler tespit edilmiştir. KEGG zenginleştirilmesi kullanılarak yapılan analizlerde, kontrole göre Cd'a maruz bırakılan *İndica* çeltik çeşidinde DEP'lerin esas olarak azot metabolizması, araşidonik asit metabolizması, histidin metabolizması ve zeatin biyosentezi ile ilişkili bulunurken Japonica çeltik çeşidinde ise fotosentez, fotosentez-anten proteinleri, glutatyon metabolizması, glioksilat ve dikarboksilat metabolizması, karbon metabolizması, biyokimyasal organizmalarda karbon fiksasyonu, fenilalanin metabolizması ve sitrat döngüsü (TCA döngüsü) ile ilişkili bulunmuştur (Zhu vd. 2024a).

Sedum plumbizincicola fideleri 0, 1 veya 4 gün boyunca Cd stresine maruz bırakılmış ve kök, gövde ve yaprak dokularının membran proteinleri Tandem Kütle Etiketleri tabanlı proteom ölçümü ile analiz edildiğinde 1667 DEP tanımlanmıştır (Zhu vd. 2022). Metabolizma, taşıma proteini ve sinyal iletiminde yer alan DEP'lerin sayısı, Cd'a maruz kaldıktan sonra önemli düzeyde artış göstermiştir. Cd'a bir gün süreyle maruz kalan fideler dört gün maruz kalan fidelerle karşılaştırıldığında yukarı yönde düzenlenmiş taşıma proteinlerinin sayısı kök, gövde ve yaprakta sırasıyla 5'ten 112'ye, 16'dan 42'ye ve 18'den 44'e artmıştır. ABC taşıyıcıları, iyon taşıma proteinleri, akuaporinler, proton pompaları ve organik taşıma proteinleri dahil olmak üzere toplam 352 Cd-düzenlenmiş taşıma proteini tanımlanmıştır (Zhu vd. 2022).

Cd stresine maruz bırakılan *Brassica campestris* L.'in kök dokularında oluşan stres yanıt mekanizmalarını ortaya çıkarmak için proteomik çalışma yapılmıştır (Sun vd. 2023). Kantitatif proteomik profillemeye yoluyla, toplam 1424 farklı DEP tanımlanmış ve fenilalanin metabolizması, bitki hormonu sinyal iletimi, sistein ve metiyonin metabolizması, izokinolin alkaloid biyosentezi ve flavon biyosentezi gibi süreçler zenginleştirilmiştir. GO ve KEGG analizleri, DEP'lerin kalsiyum, ROT ve hormon sinyalleme aracılı yanıtta, karbohidrat ve enerji metabolizmasının düzenlenmesinde, glutatyon, fitoşelatinler (PC'ler) ve fenilpropanoid bileşiklerinin biyosentezinde rol oynayarak *B. campestris* L.'in Cd toleransını sağladığı bildirilmiştir (Sun vd. 2023).

2.3 Kadmiyum Stresi ve İyileştiriciler

Bitkiler, karmaşık biyokimyasal ve genomik düzeyde süreçleri içeren ağır metal stresinin üstesinden gelmek için çeşitli moleküler ve fizyolojik mekanizmalara sahiptir (Krzesłowska 2011). Bitkiler abiyotik streslerle başa çıkmak için savunma sistemlerini harekete geçirmektedir. Bu savunma sistemleri, sadece bitki hücrelerini stres kaynaklı oksidatif hasarlardan korumakla kalmayıp aynı zamanda ozmotik ayarlamaya yardımcı olan ozmolitlerin ve enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların birikiminden oluşmaktadır (Jha vd. 2014, Farooq vd. 2017). Bitkiler, ağır metal stresini hafifletmek ve hücrel homeostaziyi yeniden sağlamak için antioksidatif kapasite, alım, birikim, translokasyon ve nihai detoksifikasyonun tolere edilmesine yardımcı olacak karmaşık ve oldukça etkili düzenleyici mekanizmalar geliştirmektedir (El-Amier vd. 2019, Ahmad vd. 2020, Alsahli vd. 2020, Bhat vd. 2021). Bunu başarmak için canlı sistemin fonksiyonel molekülleri, proteinler, özellikle metal şelatörler, taşıyıcılar ve şaperonlar, ağır metal stresinin olumsuz etkisini hafifletmede çok önemli roller oynamaktadır (Saleem vd. 2020). Bu proteinler ağır metal toleransını, ağır metallerin kirli ortam ve sistemlerini bağlama, taşıma ve vakuolar alıkoyma yoluyla detoksifiye etmesini sağlamaktadır (Peco vd. 2020, Dhir 2021, Jogawat vd. 2021). Fiziksel bir bariyer olan bitki kök hücre çeperi, ağır metal iyonlarıyla bağlanabilen çok sayıda işlevsel grup içermekte ve ağır metal iyonlarının sitoplazmaya girişini engellemekte ve pektin ve hemiselüloz gibi bileşenleri de birçok ağır metal iyonunu etkili bir şekilde hareketsizleştirmektedir. Cd stresi altındaki bitkilerde, hücre çeperi iyon absorpsiyonu, taşınması ve temizlenmesi süreçleri önemli roller oynamaktadır (Wei vd. 2023a).

Bitkiler ağır metal maruziyetine karşı toleranslarını güçlendirmek için aktif olarak bir dizi strateji uygulamaktadır: 1) Strese yanıt veren proteinlerin ifadesini artan yönde düzenlerler. 2) Ağır metal stresi tarafından teşvik edilen hücrel ROT'u süpürmek için antioksidan enzimlerin aktivitesini uyarırlar. 3) Ağır metal iyonlarını kısıtlamak için hücre duvarı proteinlerinin ifadesini artan yönde düzenlerler. 4) Ağır metal iyonlarını tutmak için glutatyon (GSH) ve fitoşelatin (PC) ile ilişkili enzimlerin aktivitelerini artırırlar (Huang vd. 2019).

Cd kaynaklı hasarı önlemek için bitkiler, uzun vadeli evrim sürecinde, esas olarak birikim ve dışlama dahil olmak üzere bir dizi Cd direnç mekanizması geliştirmiştir (Tong vd. 2004). Metal iyonlarının sitoplazmaya girmesi için ilk bariyer olan hücre çeperi, bitkilerde Cd'un absorpsiyonu, taşınması ve toleransında önemli rol oynayan birçok ağır metal bağlayıcı radikal grubu ve stresle ilişkili sinyal molekülleri içermektedir (DalCorso vd. 2010, Chen vd. 2013). Cd toleranslı bitkilerde genellikle Cd iyonlarının köklerdeki apoplastik bariyerler tarafından absorpsiyonu, sürgünlere taşınmasını veya aktif olarak Cd iyonlarının atılmasını sınırlamaktadır (Luo vd. 2018).

Bitkilerin Cd stresine karşı detoksifikasyon stratejileri, Cd'un tutulması, kısıtlanması, bozunması, dışlanması ve organik ligandların eksüdasyonu yoluyla etkisizleştirilmesini içermektedir (Saifullah vd. 2014). Glutasyon (GSH) ve fitoşelatinler (PC'ler) gibi sistein bakımından zengin peptidlerin biyosentezi, hücrelerde ağır metal iyonlarının immobilizasyonu, alıkonulması ve detoksifikasyonu için önemli bir süreç olarak kabul edilmektedir (Viehweger 2014). GSH ve PC biyosentez yolu genlerinin yüksek ifadesinin ve PC'lerin Cd stresinin erken aşamasında Cd bağlama yeteneğinin, bitkiye Cd toksisitesine karşı tolerans kazandırdığını göstermiştir (Emamverdian vd. 2015, Pochodylo ve Aristilde 2017). Glutasyon (GSH), bitki hücrelerinde önemli bir non-protein tripeptit tiyoldür ve hücre farklılaşması, serbest radikal ve hidrojen peroksit temizleme, tiyol-disülfid değişimi ve fitoşelatin sentezinde rol oynamaktadır (Vivancos vd. 2010, Cai vd. 2011, Schnaubelt vd. 2013, Waśkiewicz vd. 2014, Diaz-Vivancos vd. 2015). Bitkilerin ağır metal toleransı üzerinde GSH biyosentezi ve rejenerasyon enzim aktivitelerinin önemli etkileri olduğu gösterilmiştir (Singla-Pareek vd. 2006). Iannelli vd. (2002), yüksek GSH ve ASA içerikleri ile APX, CAT, GR, GST ve GPX aktivitelerinin *Phragmites australis*'te Cd toleransının temel nedenleri olduğunu göstermiştir. Ek olarak, GSH aracılı ROT ve Mg metabolizmasının da bitki ağır metal toleransında rol oynadığı rapor edilmiştir (Chen vd. 2010, Hossain vd. 2010, Cai vd. 2011, Hossain vd. 2012b). Fitoşelatinler (PC'ler), metalotiyoneinler, organik asitler vb. kullanılarak Cd'un tutulması ve Cd'un vakuole taşınmasının, Cd'un detoksifikasyonunda önemli bir yol olduğu doğrulanmıştır (Chen vd. 2011). Bitkiler, değişen rizosfer kimyasal özellikleri, ağır metal iyonu kompartımanlaşması ve Cd toksisitesini azaltmak için şelasyon dahil olmak üzere Cd'a karşı spesifik savunma

mekanizmalarına sahiptir (Gu ve Zhou 2002, Zhao vd. 2023). Cd-PC kompleksi, ABCC1 ve ABCC2 gibi ATP bağlayıcı kaset (ABC) vakuolar taşıyıcılar tarafından vakuollere taşınmakta (Park vd. 2012) ve Cd toksisitesini azaltmak için vakuolde stabilize edilmektedir (Emamverdian vd. 2015, Pochodylo ve Aristilde 2017).

Biyoregülatörlerin dışsal uygulaması, abiyotik streslere karşı bitki tepkilerini iyileştirebilir (Waqas vd. 2019, Waraich vd. 2021). Bitkinin stresi tolere etme kapasitesi, stres giderici kimyasalların dışarıdan uygulanmasıyla artırılabilir (Farooq vd. 2009). Kükürt (S), normal bitki büyümesi ve gelişimi için önemli bir elementtir ve S içeren bileşikler, ağır metal toleransı ile yakından ilişkilendirilmektedir (Marschner 2012). Sülfat köklerden alındıktan sonra, amino asitler, GSH, demir-sülfür kümeleri, tiyoredoksinler, vitaminler, kofaktörler ve birçok ikincil metabolit gibi çeşitli S içeren bileşiklere asimile edilmektedir (Rausch ve Wachter 2005). Azot (N), sadece bitki büyümesine ve gelişmesine katılmakla kalmayan (Gan vd. 2016), aynı zamanda bitkilerde Cd detoksifikasyonunu kolaylaştıran bir makro besindir (Zhang vd. 2014, Wang vd. 2019a). Yeterli N ilavesinin enzimatik antioksidanları ve fitohormonları teşvik ederek, klorofil ve gaz değişim kapasitesini geri kazanarak, bitki besin dengesini koruyarak, oksidatif stresi hafifleterek ve bitki büyümesini artırarak bitkilerde Cd toksisitesini azalttığı bildirilmiştir (Chang vd. 2013, Zhang vd. 2017). Önceki çalışmalar, dışsal nitrik oksit (NO) fide kökleri üzerindeki Cd stresinin hasarını hafifletebileceğini göstermiştir (Ahmed vd. 2002). Huang vd. (2019), dışsal N'un, ABC taşıyıcı, vakuolar protein sıralama ile ilişkili protein, kabuk depo proteini gibi proteinlerin ifadelerini artıran yönde düzenleyerek kavak bitkilerinde Cd'un alımını, taşınmasını ve birikimini artırdığını bildirmiştir.

Bir organosülfür bileşiği olan ve %42 kükürt (S) ve %36 nitrojen (N) (Ahmad vd. 2023) içeren tiyoüre [TÜ, SC(NH₂)₂], oksijen atomlarının bir kükürt atomu ile değiştirilmesi dışında yapısal olarak üreye benzemekle birlikte her iki bileşiğin özellikleri farklıdır (Kaya vd. 2015). Bir bitki büyüme düzenleyicisi ve fizyolojik olmayan tiyol bazlı bir ROT temizleyicisi olan TÜ, bitki gelişimini modüle etmekte ve bitkileri abiyotik stresin neden olduğu oksidatif hasardan etkili bir şekilde korumaktadır (Srivastava vd. 2017, Patade vd. 2020, Ahmad vd. 2022a). Tiyoüre ilavesi bitkinin kök ve sürgün ağırlığı,

uzunluğu, yaprak sayısı ve yaprak alanını önemli ölçüde iyileştirmekte ve bu da doğrudan bitkinin çeşitli stres koşulları altında büyüme ve gelişmesinin artmasına neden olmaktadır (Perveen vd. 2015). Tü, köklerden besin alımı ve asimilasyonu, yaprak gaz değişimi, protein biyosentezi ve şeker metabolizmasını iyi yönde etkilemektedir (Wahid vd. 2017). Tü, redoks durumu, hormonal regülasyonu ve kalsiyum sinyalinin modülasyonunda kritik bir işleve sahiptir ve ROT süpürmede rol oynayan antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırarak oksidatif strese bağlı büyüme bozukluğunu iyileştirmektedir (Waqas vd. 2019, Patade vd. 2020, Yadav ve Srivastava 2021, Singh vd. 2022). Tü varlığında ROT dengelemesinin antioksidan enzimlerin (SOD ve GPX) aktivitesindeki azalma ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Yadav ve Srivastava 2021). Tü'nün, bitkilerin fotosentetik aygıtı ve bitki-su ilişkisini korumaya yardımcı olan RbcL, glikolat oksidaz ve glisin dekarboksilaz H alt birimlerinin ifade profilini önemli düzeyde yukarı yönde düzenlediği gösterilmiştir (Vineeth vd. 2016). Tü ilavesi, stresli koşullar altında ozmolit üretimini iyileştirerek membran bütünlüğü, ozmotik denge, protein ve enzim stabilitesi ve oksijen radikallerinin detoksifikasyonunun korunmasına katkıda bulunmakta ve sonuç olarak olumsuz koşullar altında bitkilerin performansını iyileştirmektedir (Blum 2017). Kolzada ısı stresi koşullarında dışsal Tü uygulamasının fotosentetik pigmentlerde artış, gaz değişim özelliklerinin modülasyonu, antioksidan savunmadaki gelişmeler ve ozmotik koruma sayesinde ısı stresi kaynaklı kayıpları etkili bir şekilde azalttığı ve Tü'nün ısı stresine karşı iyileştirici rolü olduğu gösterilmiştir (Ahmad vd. 2022b). Yüksek konsantrasyonda (25 µM) As'e maruz kalan çeltik bitkilerinde Tü uygulamasının amino asitlerin sentezini teşvik ettiği ve çeşitli metabolik yolları (glutasyon, serotonin-triptamin ve fenolamidler) değiştirerek kök sistemi mimarisinin gelişmesine yol açtığı bildirilmiştir (Ghate vd. 2022). Kuraklık ve tuzluluk stresine maruz bırakılan buğday ve inci darısında Tü uygulaması bitki boyunu artırırken, prolin birikimi, lipid peroksidasyonun bir göstergesi olan MDA içeriği ve Na:K oranını azaltmıştır (Yadav vd. 2020). Kuraklık stresine maruz bırakılan buğdayda, sürgün ve kök taze ve kuru ağırlığı gibi büyüme parametreleri önemli düzeyde azalırken, Tü uygulaması ile birlikte sürgün taze ve kuru ağırlıkları ve kök kuru ağırlığının önemli düzeyde arttığı bildirilmiştir (Naz ve Perveen 2021). Kuraklık stresi, buğday bitkilerinin tane verimi, tane sayısı, tane ağırlığı gibi verim parametrelerini olumsuz yönde etkilerken, Tü uygulaması ile birlikte tane verimi artmıştır (Naz ve

Perveen 2021). Tuz stresine maruz bırakılan buğdayda sürgün yüksekliği, yaprak alanı, sürgün taze ve kuru ağırlığı ve bağıl su içeriğinde önemli düzeyde bir azalma olurken, Tü uygulaması tuz stresi altında yetişen buğdayın vejetatif büyüme parametrelerini (sürgün yüksekliği, yaprak alanı, sürgünün taze ağırlığı ve bağıl su içeriği) iyileştirmiştir (Baqer vd. 2020). Bununla birlikte, tuz stresi koşullarında Tü uygulaması ile birlikte APX enzim aktivitesi ile karoten ve askorbik asit konsantrasyonunun iyileştiği belirlenmiştir (Baqer vd. 2020). Cd, mısır bitkisinde yaprak alanı, fotosentez aktivitesi ve oksidatif stresi artırarak bitki büyümesini engellemiştir. Bununla birlikte, Tü uygulaması, mısır bitkilerinin taze biyokütlesi, sürgün uzunluğu, yaprak alanı ve fotosentez oranını kontrole kıyasla artırmıştır. Ek olarak, oksidatif stres değerleri Tü uygulaması ile iyileştirilmiştir. Antioksidan enzim aktiviteleri Tü uygulaması ile artış göstermiştir. Ayrıca, sürgün ve kök Cd konsantrasyonları Tü uygulaması ile azalmıştır (Haider vd. 2022). Isı stresine maruz bırakılan ketencik ve kolzada büyüme ve verimde önemli bir azalma görülmüş ve süperoksit dismutaz, toplam çözünür şekerler, glisin betain ve prolin aktivitelerinin/seviyelerinin kontrol ile karşılaştırıldığında ısı stresi altında tetiklenmiştir. Isı stresi, fotosentetik oranı ve su potansiyelini ketencik ve kanolada azalmıştır. Tü uygulaması gaz değişim özellikleri ve su ilişkilerini koruyarak antioksidanların aktivitelerini/seviyelerini yukarı yönde düzenleyerek her iki bitkinin büyüme ve verim özelliklerini iyileştirmiştir (Ahmad vd. 2021a, b). Cd stresine maruz bırakılan arpada, Tü'nün taze ve kuru ağırlık, makro ve mikro besin içerikleri ve antioksidan enzimlerin (CAT ve SOD) aktivitelerini iyileştirdiği belirlenmiştir (Ikram vd. 2014).

2.3.1 Kadmiyum Stresi, İyileştiriciler ve Diferansiyel Olarak İfade Edilen Proteinler

Bitkilerde ağır metal stresine maruz kaldıklarında bitki proteinlerinde fonksiyon bozukluğu meydana gelebilmektedir (Li vd. 2016). Stresli ortamlarda bitkilerin tepkilerinde rol oynayan proteomik mekanizmaları ortaya çıkarmak için gelişmiş jel temelli olmayan proteomik teknikler kullanılmaktadır (Komatsu vd. 2021). Toksikite azaltıcı iyileştiricilerin dışsal uygulaması transkripsiyon veya translasyonun düzenlenmesi, biyosentetik metabolizma ve bitki savunması ile ilişkili birçok farklı

proteinin teşvik edilmesine yol açmaktadır (Muneer vd. 2014).

İyileştirici olarak kullanılan fulvik asitin (FA) marul bitkisinde, Cd stresinin olumsuz etkilerini azalttığı proteomik analizler ile gösterilmiştir (Chen vd. 2022b). Yapılan bu çalışmada, diferansiyel olarak ifade edilen proteinler (DEP'ler) LC–MS/MS ile belirlenmiş olup, Cd stresi altında FA uygulamasının (1) Cd alımını azalttığı ve taşıyıcı proteinlerin gen ifadesini düzenlediği, (2) kükürt metabolizmasını desteklediği ve (3) oksidatif hasarı azalttığı ve fotosentetik aparatı kararlı hale getirdiği ve fotosentetik elektron taşınmasını koruduğu bildirilmiştir. FA'nın belirlenen iyileştirici etkileri ile ilgili olası mekanizmalar ise şu şekilde değerlendirilmiştir: (1) *IRT1*, *Nramp1* ve *HMA* genleri aşağı yönde düzenlenerek kök sistemi tarafından Cd alımı azaltılmıştır. (2) S metabolizması artırılmış ve hücrelerde redoks homeostazının yeniden oluşturulması sağlanmıştır. (3) Cd stresi altında fotosentetik aygıtın stabilize edilmesi, yüksek fotosentetik karbon asimilasyon verimliliğinin sürdürülmesi ve bitki büyümesinin teşvik edilmesi sağlanmıştır (Chen vd. 2022b).

Cd stresine maruz bırakılan çeltik fidelerine selenyum (Se) uygulanmış ve stres iyileştirme mekanizmasını anlamak için protein ifade seviyelerindeki değişiklikler incelenmiştir (Zhu vd. 2024b). Toplam 8506 proteinden 2396'sı DEP olarak belirlenmiştir. Kontrole göre Cd uygulamasında fotosistem I (PsaN, PsaN, OsPS1, PsaK, PsaD ve PSAH), fotosistem II (PSBS1, OsPsbR3, PsbR ve PsbO) ve oksidoredüktaz (OsFdC1, Fd1, OSFDC1, OsLFNR1) ile ilişkili fonksiyonel proteinler önemli ölçüde aşağı yönde düzenlenmiştir. Cd'a göre Cd+Se uygulamasında OsFdC1 ve Fd1 hariç, fotosentez ile ilgili neredeyse tüm fonksiyonel proteinlerin ve klorofil a/b bağlanmasını kodlayan fonksiyonel proteinlerin (CP29, CabE, CAB2R, CP24) önemli düzeyde yukarı yönde düzenlendiği bildirilmiştir. Yapılan GO analizi, Cd'a göre Cd+Se uygulamasında DEP'lerin esas olarak kloroplast tilakoid membran, plastit tilakoid membran, pigment metabolik süreç ve membran ve tilakoid membranın fotosentetik metabolik sürecinde rol oynadığını göstermiştir. KEGG analizi, Cd'a göre Cd+Se uygulamasında DEP'lerin esas olarak porfirin metabolizması, fotosentetik organizmalarda karbon fiksasyonu, sekonder metabolitlerin biyosentezi, glioksilat ve dikarboksilat metabolizması, karbon metabolizması, karotenoid biyosentezi, pentoz

fosfat yolu, fotosentez ve ribozom süreçlerinde rol oynadığını göstermiştir. Cd+Se uygulamasının fonksiyonel proteinlerin çoğunun yukarı yönde düzenlenmesini sağlayarak Se'un bu yolları geliştirmede ve çeltikte Cd stresinin etkilerini azaltmada önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Zhu vd. 2024b).

Brassica napus yaprak proteom profilinde glutatyonun (GSH) Cd stresini iyileştirici etkisi LC–MS/MS analizi ile belirlenmiştir (Mittra vd. 2024). Bu çalışmada toplam 5244 protein tanımlanmıştır. Kontrole göre Cd uygulamasında 93'ü yukarı yönde 104'ü aşağı yönde düzenlenmiş 197 DEP, kontrole göre GSH uygulamasında 21'i yukarı yönde 42'si aşağı yönde düzenlenmiş toplam 63 DEP ve kontrole göre Cd+GSH uygulamasında 50'si yukarı yönde 60'ı aşağı yönde düzenlenmiş toplam 110 DEP tespit edilmiştir. Biyolojik süreç (BS) kategorisinde, 32 DEP translasyonla ilişkili bulunmuş ve bunu fotosentez (19 DEP), sitoplazmik translasyon (11 DEP), protein–kromofor bağlantısı (8 DEP), ATP sentezine bağlı proton taşınması (6 DEP), trikarboksilik asit döngüsü (6 DEP), klorofil biyosentetik süreci (5 DEP), fotosistem I (5 DEP), oksidatif strese hücresel yanıt (5 DEP) ve ribozomal küçük alt birim düzeneği (5 DEP) izlemiştir. Hücresel bileşen (HB) kategorisinde sitoplazma (67 DEP), sitozol (28 DEP), kloroplast (27 DEP), sitozolik büyük ribozomal alt birim (21 DEP), mitokondri (18 DEP) ve kloroplast tilakoid membran (12 DEP) kategorileri baskın zenginleştirme puanları göstermiştir. Moleküler fonksiyon (MF) ile ilişkili olarak ise ribozom bileşeni (43 DEP), RNA bağlanması (23 DEP), kalsiyum iyonu bağlanması (13 DEP), mRNA bağlanması (13 DEP), magnezyum iyonu bağlanması (11 DEP), oksidoredüktaz aktivitesi (11 DEP), büyük ribozomal alt birim rRNA bağlanması (10 DEP), piridoksal fosfat bağlanması (8 DEP), klorofil bağlanması (7 DEP) ve rRNA bağlanması (6 DEP) GO terimleri belirlenmiştir (Mittra vd. 2024).

Silikon (Si) uygulamasının Cd stresini iyileştirici etkisi *Cannabis sativa* yaprak dokularında iyon hareketliliği ayırma–yüksek tanımlı kütle spektrometresi (IMS–HDMSE) tekniği ile araştırılmıştır (Luyckx vd. 2021). Cd'a maruz bırakılan *C. sativa*'da oksijen gelişen artırıcı protein, plastosiyanin (PC), fotosistem I reaksiyon merkezi (alt birimler N, VI), ferredoksin (Fd) ve Fd–NADP⁺ redüktaz (NADP⁺ redüktaz), RCA, RBCS büyük alt birim bağlayıcı protein (rbcL), CBBY ve

ribuloz–fosfat 3–epimeraz (PPE), protoklorofilid redüktaz, hidroksimetilbilan sentaz ve koproporfirinojen III oksidazın proteinleri önemli düzeyde azalırken Cd’a göre Cd+Si uygulamasına maruz kalan bitkilerde sadece Fd ve rbcS proteinleri önemli düzeyde yukarı yönde düzenlenmiştir. Cd stresi altında metiyonin sentaz, alanin aminotransferaz, spermidin sentaz ve glutamin sentetaz ile ilgili enzimler yukarı yönde düzenlenmiştir. Si uygulaması L–valin bozunma yolunda yer alan bir proteinin ve bir aminometiltransferazın ifadesini artırmıştır. Cd’a maruz bırakılan bitkilerde, V tipi proton ATPazın A alt biriminin bolluğu artarken Si uygulaması bu protein sınıfının ifade seviyesini etkilememiştir. Sinyal iletimi ve metabolizma düzenlemesinde işlevi olan proteinlerin çoğu Cd stresi altında yukarı yönde düzenlenirken Cd uygulamasına göre Cd+Si uygulamasında genel düzenleyici faktör iki olarak tanımlanan proteinlerin daha yüksek bir bolluğa sahip olduğu bildirilmiştir. Cd maruziyeti PR1, PR ile ilişkili bir protein, iki taumatin benzeri protein, iki endokitinaz ve üç kalloz ile ilişkili enzimi (glukan endo–1,3–beta–glukozidaz) yukarı yönde düzenlemiştir. Cd’a maruz bırakılan *C. sativa* yapraklarında oksidatif stres yanıtı ile ilişkili olan peroksidazlar (PRX2, PRX12, PRX15 ve protein P21 benzeri), iki muhtemel nükleoredoksin, muhtemel bir aldo–keto redüktaz, iki aldehit dehidrogenaz, muhtemel bir NAD(P)H dehidrogenaz (quinone) FQR1–like1 ve stres koşulları altında askorbat sentezini düzenleyen ve askorbat ve hücre duvarı monosakkarit biyosentezi arasındaki dengeyi ayarlayan bir GDP–D–mannoz 3’–5’–epimeraz proteinleri yüksek bollukta tespit edilmiştir. Ayrıca, Cd stresi format dehidrogenazın bolluğunu artırırken, muhtemel bir mannitol dehidrogenaz, bir peroksiredoksin ve bir glukan sentaz benzeri 11 kontrole göre daha az miktarda bulunmuştur. Cd’a göre Si uygulamasında ise bir FDH ve bir BG’nin bolluğunun arttığı tespit edilmiştir (Luyckx vd. 2021).

Cd stresine maruz bırakılan *Brassica napus*'da sitrik asitin (SA) proteomik profil üzerindeki stresi iyileştirici etkisi LC–MS/MS analizi kullanılarak incelenmiştir (Mittra vd. 2023). Proteom analizi sonucunda belirlenen DEP’ler biyolojik süreç, hücre sel bileşen ve moleküler işlevlerine göre sınıflandırılmıştır. Yapılan proteomik analizde, 476 farklı şekilde ifade edilen protein tanımlanmıştır. Kontrole göre Cd (30 µM) uygulamasında 141 yukarı yönde düzenlenmiş ve 62 aşağı yönde düzenlenmiş olmak üzere 203 DEP tespit edilmiştir. Kontrole göre Cd+SA uygulamasında 80 yukarı yönde

düzenlenmiş ve 50 aşağı yönde düzenlenmiş toplam 130 DEP tanımlanmıştır. Kontrole göre SA uygulamasında toplam 143 DEP belirlenmiş ve bunlardan 95'i yukarı yönde düzenlenirken ve 48 protein aşağı yönde düzenlenmiştir. Tanımlanan DEP'ler öncelikle enerji ve karbohidrat metabolizması (20 DEP), CO₂ asimilasyonu ve fotosentez (12 DEP), sinyal iletimi ve protein metabolizması (25 DEP), stres ve antioksidan savunma (7 DEP), kükürt asimilasyonu ve ağır metal detoksifikasyonu (10 DEP), bitki gelişimi (6 DEP) ve hücre iskeleti ve hücre duvarı yapısı (3 DEP) gibi çeşitli biyolojik işlevlerle ilişkili bulunmuştur (Mittra vd. 2023).

Literatür taraması sonucunda Cd stresi x Tiyoüre (TÜ) x mısır etkilşiminde proteom analizlerinin çalışılmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle, mevcut tez çalışmasında Cd stresine maruz kalan mısır fidelerinde TÜ'nin iyileştirici etkisinin fizyolojik ve biyokimyasal bazı parametrelerin yanı sıra proteomik yaklaşımlarla da analiz edilmiştir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Bitki Materyali ve Tohum Çimlendirilmesi

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.

3.2 Fidelerin Hidroponik Kültürde Yetiştirilmesi

Yaklaşık aynı kök uzunluğuna sahip mısır fideleri 0.5 L Hoagland besin çözeltisi (pH=6.0±0.1) içeren hidroponik kültür ortamına transfer edilmiştir. Hidroponik kültür için 1 L'lik kapaklı plastik kaplar kullanılmıştır. Kapaklara beş adet falkon tüpü yerleştirilecek şekilde delikler açılmıştır. Falkon tüplerin altı kesilmiş ve plastik file lastik ile tutturulmuştur. İki günlük fideler beş adet falkon tüpün tabanındaki plastik filenin üzerine besin çözeltisi ile temas edecek şekilde yerleştirilmiştir. Fideler, 25±1°C sıcaklık, 12:12 saat (gece:gündüz) fotoperiyot, 260 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foton akış yoğunluğu ve %60 nem koşullarına sahip kontrollü iklim kabininde 5 gün boyunca büyütülmüştür.

Yedi günlük mısır fideleri, 50 μM Cd stresi [kadmiyum klorür (CdCl_2)] ve/veya 50 μM Tü'nin 4 farklı uygulamasına 10 gün boyunca maruz bırakılmıştır. Literatür taramaları dikkate alınarak etkili Cd (50–100 μM) ve Tü (25–50 μM) test konsantrasyonlarını belirlemek için ön çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Cd konsantrasyonu büyüme inhibisyonu temelinde 50 μM olarak belirlenmiştir. Etkili Tü konsantrasyonu ise Cd'un neden olduğu büyüme inhibisyonunu azaltma etkisi temelinde 35 μM olarak belirlenmiştir. Mısır fidelerinin 10 gün boyunca maruz bırakıldığı Cd ve Tü uygulamaları aşağıdaki gibidir:

- 1) Kontrol: Mısır fideleri sadece Hoagland besin çözeltisinde büyütülmüştür.
- 2) Tü: Mısır fideleri sadece 35 μM Tü içeren Hoagland besin çözeltisinde büyütülmüştür.
- 3) Cd: Mısır fideleri sadece 50 μM Cd içeren Hoagland besin çözeltisinde

büyütülmüştür.

4) TÛ+Cd: Mısır fideleri 35 µM TÛ ve 50 µM Cd içeren Hoagland besin çözeltisinde büyütülmüştür.

Kaplardaki besin çözeltileri gün aşırı değiştirilmiştir.

Uygulamaları takiben fide büyümesi ve Cd birikimi analizleri için toplam gövde ve kök dokuları örneklenmiştir. Diğer taraftan, klorofil içeriği, lipid peroksidasyonu, antioksidan enzim aktiviteleri ve nLC-MS/MS ile diferansiyel olarak ifade edilen proteinlerin (DEP'lerin) analizleri için mısır fidelerinin tam gelişmiş 2. ve 3. yaprak dokuları örneklenmiş ve sıvı azot (-196°C) ile dondurularak kullanılıncaya kadar derin dondurucuda (-80°C) saklanmıştır.

3.2 Fidelerin Taze ve Kuru Ağırlıklarının Belirlenmesi

Kontrol, TÛ, Cd ve TÛ+Cd uygulamalarından elde edilen mısır fidelerinin gövde ve kök dokuları ayrılmıştır. Dokuların taze ağırlıkları (TA, mg fide⁻¹) belirlendikten sonra etüvde kurutulmuş (80°C, 48 saat) ve gövde ve kök kuru ağırlıkları (KA, mg fide⁻¹) belirlenmiştir.

3.3 Yaprak ve Kök Dokularındaki Kadmiyum Birikiminin ICP/OES Belirlenmesi

Kontrol, TÛ, Cd ve TÛ+Cd uygulamalarına maruz kalan mısır fidelerine ait gövde ve kök dokuları (0.5 g) 80°C'lik etüvde kurutulmuş ve gövde ve kök dokularında Cd birikimi NMKL (1998)'ye göre saptanmıştır. Doku örnekleri, mikrodalga fırında (Berghof Products + Instruments, Germany) 10 mL HNO₃ (%65) kullanılarak yakılmıştır. Yakılan doku örnekleri filtrelenmiş ve son hacimleri 100 mL olacak şekilde dH₂O ile 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 mg L⁻¹ olacak şekilde ayarlanmıştır. Cd birikimi µg g⁻¹ KA olarak hesaplanmıştır.

3.4 Klorofil İçeriğinin Belirlenmesi

Kontrol, TÛ, Cd ve TÛ+Cd uygulamalarına maruz bırakılan mısır fidelerinin yaprak dokularındaki (50 mg) toplam klorofil içerikleri belirlenmiştir (Wellburn 1994). Bistüri ile dilimlenen yaprak dokuları, soğutulmuş metanol (10 mL) içeren ağzı vidalı kapaklı cam test tüplerine alınmış ve parafilm ile sıkıca sarılmıştır. Dokuları içeren tüpler +4°C’de 48 saat süresince karanlıkta bekletilmiştir. Her uygulamaya ait yaprak dokularındaki klorofil a (Klo a) ve klorofil b (Klo b) içerikleri sırasıyla 666 ve 653 nm dalga boylarında, spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir. Klo a ve Klo b içerikleri taze ağırlık (TA) temelinde mg g⁻¹ TA olarak aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Wellburn 1994):

$$\text{Klorofil a (Klo a)} = (15,65 \times A_{666}) - (7,34 \times A_{653}) \times S^*$$

$$\text{Klorofil b (Klo b)} = (27,05 \times A_{653}) - (11,21 \times A_{666}) \times S^*$$

* S: Seyreltme katsayısı

3.5 Malondialdehit İçeriğinin Belirlenmesi

Kontrol, TÛ, Cd ve TÛ+Cd uygulamalarına maruz bırakılan mısır fidelerinin yaprak dokularında lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) miktarı belirlenmiştir (Heath ve Packer 1968). Yaprak dokuları (250 mg), %5’lik 5 mL trikloroasetik asit (TCA) ile havan ve tokmağı kullanılarak homojenize edilmiştir. Falcon tüplerine alınan homojenatlar +4°C ve 12.000 ×g’de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Süpernatandan 1 mL alınarak üzerine 4 mL %0,5 tiyobarbütirik asit (TBA) çözeltisi (%20’lik TCA çözeltisi ile hazırlanmış) ilave edilmiştir. Bu karışım sıcak su banyosunda (95°C) 30 dakika süreyle tutulmuştur. Bu süre sonunda tüpler sıcak su banyosundan çıkarılmış ve dokulardaki MDA ile TBA arasındaki reaksiyonları durdurmak için buz banyosuna alınmıştır. Daha sonra test tüplerine (2 mL) alınan dokular 10.000 ×g’de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatantların

absorbansları, kuvars küvet kullanılarak TU-1880 Double Beam UV-VIS spektrofotometrede 532 ve 600 nm dalga boylarında ölçülmüştür. Kör olarak %0,5 TBA içeren %20'lik TCA çözeltisi kullanılmıştır. Yaprak dokularındaki MDA içerikleri, molar ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak $\mu\text{mol g}^{-1}$ TA olarak belirlenmiştir.

3.6 Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Kontrol, T $\ddot{U}$, Cd ve T $\ddot{U}$ +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 metiyonin, 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 absorban değerleri 470 nm’de ölçülmüştür. Toplam POD aktivitesi, guaiakolun ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein olarak belirlenmiştir.

3.6.3 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 H₂O₂ ve enzim ekstraktından hazırlanmıştır. Askorbik asidin oksidasyon oranı, spektrofotometre kullanılarak 3 dakika için 290 nm’de absorbanstaki azalmayı takiben belirlenmiştir. Toplam APX aktivitesi, askorbatın ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak EU dk⁻¹ mg⁻¹ protein olarak hesaplanmıştır.

3.7 Mısır Yaprak Dokularından Protein Ekstraksiyonu ve Proteomik Analizler

3.7.1 Protein Ekstraksiyonu

Dört farklı uygulamadan elde edilen yaprak dokularında, toplam protein ekstraksiyonu için polietilen glikol (PEG) fraksiyonlama ile kombine edilmiş fenol ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır (Alam vd. 2013). Yaprak dokuları (2 g), sıvı azot ile öğütülmüş ve 12 mL Mg/NP-40 ekstraksiyon tamponu (0.5 M Tris–HCl (pH 8.3), %2 (v/v) NP-40, 20 mM MgCl₂, %2 2–merkaptoetanol ve 1 mM PMSF) ile homojenize

edilmiştir. Homojenatlar 1 dakika vortekslelendikten sonra, her örnek 15 dakika boyunca 5000 $\times g$ 'de santrifüjlenmiş ve elde edilen süpernatant PEG fraksiyonlamasına maruz bırakılmıştır. Stok PEG solüsyonu (%50) kullanılarak, son hacim %15 olacak şekilde süpernatantlara PEG eklenmiş ve 30 dk buz üzerinde inkübe edilmiştir. Örnekler 5000 $\times g$ 'de ve 4°C'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant toplanmıştır. Her bir süpernatanta 10 mL Mg/NP-40 ekstraksiyon tamponu eklendikten sonra eşit hacimde (yaklaşık 20 mL) Tris ile doyurulmuş fenol ilave edilmiştir. Örnekler vortekslelendikten sonra son konsantrasyon 0.7 M olacak şekilde sükröz eklenmiş ve tüpler vortekslelendikten sonra 15 dk 5000 $\times g$ 'de santrifüj edilmiştir. Fenolik faz temiz tüplere toplanmış ve tüplere 0.1 M amonyum asetat içeren dört hacim metanol eklenerek proteinler gece boyu -20°C'de çöktürülmüştür. Bu süre sonunda, örnekler 5000 $\times g$ 'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve protein peletleri 0.1 M amonyum asetat içeren metanol ile üç kez yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra protein peletleri vakum altında kurutulmuş ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.7.2 Tripsin ile Proteinlerin Kesimi ve Peptit Örneklerinin Hazırlanması

Proteinlerden peptit havuzlarının oluşturulması ve nLC-MS/MS analizlerinin gerçekleştirilebilmesi için filtre yardımcı örnek hazırlama (FASP) (Abcam, USA) metodu kullanılmıştır. Kesim işlemi için üretici firmanın önerdiği protokol izlenmiştir (FASP Protein Digestion Kit, Abcam). FASP kesimi için 300 μg protein özütü (30 μL aşmayan hacim içerisinde) 200 μL 8 M üre tamponu içerisinde çözülerek protein denatürasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha örnekler 30 kDa'lık membran filtre üzerine aktarılmıştır. Filtreler kit içerisindeki özel 1.5 mL'lik tüplere yerleştirildikten sonra 10 dakika 15.000 $\times g$ 'de santrifüj edilmiştir. Üre ile yıkama işleminin tekrarı için filtrelerin üzerine üre tamponundan 100 μL eklenerek santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Ardından üre aracılığı ile bozulan disülfid bağlarının alkilasyonu ve tekrar oluşumunun engellenmesi için üre tamponu ile hazırlanan iyodoasetamid tamponu (10 mM) membran üzerine eklenerek kısa bir vorteksleme yapılmış ve karanlık ortamda 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından santrifüj işlemi tekrar edilmiştir. Örnekler iki kez 100 μL 50 mM amonyum bikarbonat solüsyonu eklenerek santrifüj işlemleri tekrarlanmıştır. Üre ve diğer kirlleticilerin uzaklaştırılmasının ardından 50 mM

amonyum bikarbonat içinde hazırlanan tripsin çözeltisinden (53 ng/μL tripsin) 50 μL filtre ürerine konularak proteinler gece boyu 37°C’de triptik kesimi için inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından filtreler yeni tüplere alınmış ve üzerindeki örnekler sırasıyla 40 μL amonyum bikarbonat (2 kez) ve 50 mM NaCl eklenip santrifüj edilmiş ve peptit örnekleri filtreden geçerek tüpün içinde toplanmıştır. Ardından örnekler SpeedVac santrifüj cihazı (Eppendorf, ABD) yardımıyla kurutulmuş ve peptitler örnekleri 30 μL %0,1’lik formik asit (FA) tamponu içerisinde süspanse edilmiştir. Peptit örneklerinin konsantrasyonları Qubit cihazı (Thermo Fisher) kullanılarak belirlenmiştir.

3.7.3 Nano–Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometrisi (nLC–MS/MS) Analizleri

Hazırlanan peptit örnekleri Q–Exactive kütle spektrometresi (Thermo Scientific, ABD) ile kombine edilmiş Ultimate 3000 RSLC nano (nLC–MS/MS) sistemi (Dionex, Thermo Scientific, CA, ABD) kullanılarak kullanılarak analiz edilmiştir. Tüm analiz cihazları ve sistemleri Xcalibur 4.0 yazılımı (Thermo Fisher Scientific, CA, ABD) kullanılarak kontrol edilmiştir. Sistemde ayırma için iki farklı mobil faz kullanılmıştır: mobil faz A (0.1% formik asit) ve mobil faz B (80% asetronitril + 0.1% formik asit). İşlemden peptitler, C18 tabanlı tuzak kolonu üzerinden geçirilerek konsantre edilmiş ve temizlenmiştir (desalting). Kromatografik ayırma işlemi için 75 μm x 15 cm x 2 μm, 100 Å çapa sahip Acclaim PepMap RSLC C18 analitik kolonu (Thermo Scientific, CA, ABD) kullanılmıştır. Bu süreçte uygulanan ayırma gradyanı, ilk sekiz dakika için %6 B, 62 dakika için %6–20 B, 45 dakika için %20–35 B, 10 dakika için %35–90 B, 5 dakika için %90 B, 5 dakika için %90–6 B ve 5 dakika için %6 B olacak şekilde 140 dakikalık toplam çalışma süresinde 300 nL/dakika akış hızıyla gerçekleştirilmiştir. Analiz sırasında MS1 spektrumlarının elde edilmesinde aşağıdaki parametrelerle kullanıldı: çözünürlük 70.000, tarama aralığı 250–2000 m/z, hedef otomatik kazanç kontrolü (AGC) 3×E6, maksimum enjeksiyon süresi 60 ms, püskürtme voltajı 2.4 kV. Diğer taraftan, MS2 analizinde ilk on iyon analiz için seçilmiştir. Aşağıdaki parametrelerle çarpışma kaynaklı ayrışmadan [yüksek enerjili çarpışmalı ayrışma (higher–energy collisional dissociation– HCD)] oluşan MS2 analizi, çözünürlük 17.500, AGC 1E6; sistem maksimum enjeksiyon süresi 100 ms, izolasyon penceresi 2.0 m/z ve çarpışma

enerjisi (NCE) 27 olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Cihaz, her analizden önce standart bir pozitif kalibratör ile (LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution, Pierce, ABD) kalibre edilmiştir.

3.7.4 nLC–MS/MS Veri Analizleri

LC–MS/MS verilerin analizi ve örnekler içerisindeki proteinlerin tanımlanmaları için Proteom Discoverer 2.2 yazılımı (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. Analizlerde peptit kütle toleransı 4 ppm, MS/MS kütle toleransı 0.3 Da, kütle doğruluğu 2 ppm, minimum peptit uzunluğu 6 amino asit, sabit değişiklikler olarak sistein karbamidometilasyonu, kararsız değişiklikler metiyonin oksidasyonu ve asparajin deaminasyonu parametreleri kullanılmıştır. Elde edilen proteinlerin seçimi için tanımlanan özgün peptit sayısı en az 1 olarak alınmıştır.

3.7.5 Biyoinformatik Analizler

Analizi sonucu belirlenen proteinlerin karşılaştırmalı analizleri etiketsiz miktar ölçümü (label-free quantification) yöntemi kullanılarak Proteom Discoverer 2.2 yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Analizlerde uniprot veri bankasından alınan mısır bitkisine ait protein veritabanı (UP000007305) kullanılmıştır. Yapılan analizlerde normalizasyon için total peptit intensitesi kullanılmıştır. Proteinlere ait sonuçlar değerlendirilerek gruplar arasında diferansiyel olarak ifade olan proteinler (DEP'ler) belirlenmiştir. Protein-protein etkileşimlerinin belirlenmesi için STRING (<https://string-db.org>) kullanılmıştır. Yolak zenginleştirme analizi, Gen Ontolojisi (GO) (<http://www.geneontology.org>) ve Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) veri tabanları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Proteinler GO açıklamasına göre biyolojik süreç (BS), hücresel bileşen (HB) ve moleküler fonksiyon (MF) olmak üzere üç kategoriye sınıflandırılmıştır. Her kategori için, farklı şekilde ifade edilen proteinin tüm tanımlanmış proteinlere karşı zenginleşmesini test etmek için two-tailed Fisher testi kullanılmıştır. Düzeltilmiş *p* değeri < 0,05 olan GO anlamlı kabul edilmiştir. KEGG veri tabanı, zenginleştirilmiş yolları tanımlamak için kullanılmıştır. Düzeltilmiş *p* değeri <

0,05 olan yolak anlamlı kabul edilmiştir. Bu yolaklar KEGG web sitesine göre hiyerarşik kategorilere sınıflandırılmıştır.

3.8 İstatistiki Analizler

Kontrollü iklim kabininde yetiştirilen bitkilere ait saksılar rastgele deneme deseninde düzenlenmiştir. Veriler en az üç tekrarlı ve iki bağımsız denemeden elde edilmiştir. 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 tiyoürenin (TÜ) 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 diferansiyel olarak ifade edilen proteinler (DEP'ler=Differential Expression Proteins) analiz edilmiş ve değerlendirilmiştir.

4.1 Cd ve Tiyoüre Uygulamalarının Büyüme Üzerine Etkisi

Kontrol, TÜ (35 µM), Cd (50 µM) ve TÜ+Cd uygulamalarına maruz bırakılan mısır fidelerinde büyüme verileri değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1). Kontrole göre Cd uygulamasında gövde taze ve kuru ağırlığında önemli düzeyde azalma belirlenmiştir. Cd stresi, kontrole kıyasla gövde taze ağırlığını %58,7 ve gövde kuru ağırlığını %40,6 azaltmıştır. Cd uygulamasına göre TÜ+Cd uygulaması, gövde taze ağırlığını %23,7 ve gövde kuru ağırlığı %13,2 artırmıştır. Kontrole göre Cd uygulamasında kök taze ağırlığı önemli düzeyde azalmıştır (%42,8). Cd'a göre TÜ+Cd uygulamasında kök taze ağırlığında bir artış olmasına rağmen bu artış önemsiz bulunmuştur. Kontrole göre Cd uygulamasında kök kuru ağırlığında bir azalma (%18,8) belirlenirken, TÜ uygulamasına göre TÜ+Cd uygulamasındaki artış (%8,8) önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Mısır fidelerinde gövde ve kökün taze ve kuru ağırlığı üzerine Cd (50 µM) ve TÜ (35 µM) uygulamalarının etkisi

Uygulamalar	Gövde Taze ağırlık (mg fide ⁻¹)	Gövde Kuru ağırlık (mg fide ⁻¹)	Kök Taze ağırlık (mg fide ⁻¹)	Kök Kuru ağırlık (mg fide ⁻¹)
Kontrol	3163,3 ± 137,2 ^{a*}	183,0 ± 9,5 ^a	941,7 ± 19,1 ^a	37,3 ± 1,5 ^{ab}
TÜ	3340,0 ± 89,6 ^a	196,0 ± 3,5 ^a	894,3 ± 60,8 ^a	34,0 ± 1,0 ^{ab}
Cd	1306,7 ± 76,2 ^c	108,7 ± 2,9 ^c	538,3 ± 27,0 ^b	30,3 ± 0,7 ^a
TÜ+Cd	1616,7 ± 38,4 ^b	123,0 ± 2,1 ^b	605,7 ± 49,0 ^b	33,0 ± 2,1 ^{ab}

*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.

4.2 Cd ve Tiyoüre Uygulamalarının Cd Birikimi Üzerine Etkisi

Kontrol, T $\ddot{U}$, Cd ve T $\ddot{U}$ +Cd uygulamalarına maruz kalan mısır fidelerinin gövde ve kök dokularında Cd içeriği belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Kontrol ve T $\ddot{U}$ 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 T $\ddot{U}$ +Cd uygulamasında, gövde ve kök dokularındaki Cd birikimi önemli düzeyde azalmış olup, bu oran gövdede %31,8 ve kökte ise %24,3 düzeyindedir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Mısır fidelerinde gövde ve kök dokularının Cd içeriği üzerine Cd (50 μ M) ve T $\ddot{U}$ (35 μ M) uygulamalarının etkisi

Uygulamalar	Gövde Cd birikimi (mg kg ⁻¹ KA)	Kök Cd birikimi (mg kg ⁻¹ KA)
Kontrol	ND	ND
T $\ddot{U}$	ND	ND
Cd	291,7 $\pm$ 19,6 ^a	1662,3 $\pm$ 98,53 ^a
T $\ddot{U}$ +Cd	198,7 $\pm$ 21,6 ^b	1258,7 $\pm$ 35,5 ^b

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

4.3 Cd ve Tiyoüre Uygulamalarının Klorofil İçeriği Üzerine Etkisi

Kontrol, T $\ddot{U}$, Cd ve T $\ddot{U}$ +Cd uygulamalarına maruz kalan mısır fidelerinin yaprak dokularında klorofil içerikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Buna göre, kontrole göre Cd ve T $\ddot{U}$ +Cd uygulamalarında klorofil içeriğindeki azalma önemli düzeyde iken, Cd uygulamasına göre T $\ddot{U}$ +Cd uygulaması klorofil içeriğini önemli düzeyde artırmıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Mısır fidelerinin yaprak dokularında klorofil içeriği üzerine Cd (50 µM) ve TÛ (35 µM) uygulamalarının etkisi

Uygulamalar	mg/g TA
Kontrol	37,57 ± 1,30 ^{b*}
TÛ	40,36 ± 0,81 ^a
Cd	14,60 ± 0,93 ^d
TÛ+Cd	22,73 ± 1,44 ^c

*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.

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

Kontrol, TÛ, Cd ve TÛ+Cd uygulamalarına maruz kalan mısır fidelerinin yaprak dokularındaki lipid peroksidasyon seviyeleri malondialdehit (MDA) içerikleri ölçülerek belirlenmiştir (Çizelge 4.4). MDA içeriği bakımından kontrol ile TÛ uygulaması arasındaki fark önemsizdir. Kontrole göre Cd uygulaması MDA içeriğini önemli düzeyde artırırken, Cd'a göre TÛ+Cd uygulaması MDA içeriği önemli düzeyde azaltarak kontroldeki seviyesine ulaştırmıştır (Çizelge 4.4).

Kontrole göre TÛ uygulamasında yalnızca POD aktivitesi önemli düzeyde artmıştır (Çizelge 4.4). Kontrole göre Cd uygulamasında, POD ve APX aktivitesi önemli düzeyde artarken, CAT aktivitesi önemli düzeyde azalmıştır. Kontrole göre TÛ+Cd uygulamasında POD ve APX aktiviteleri önemli düzeyde artarken, SOD ve CAT aktiviteleri önemli düzeyde azalmıştır. Cd uygulamasına göre TÛ+Cd uygulamasında CAT ve APX 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 (50 µM) ve TÛ (35 µM) uygulamalarının etkisi

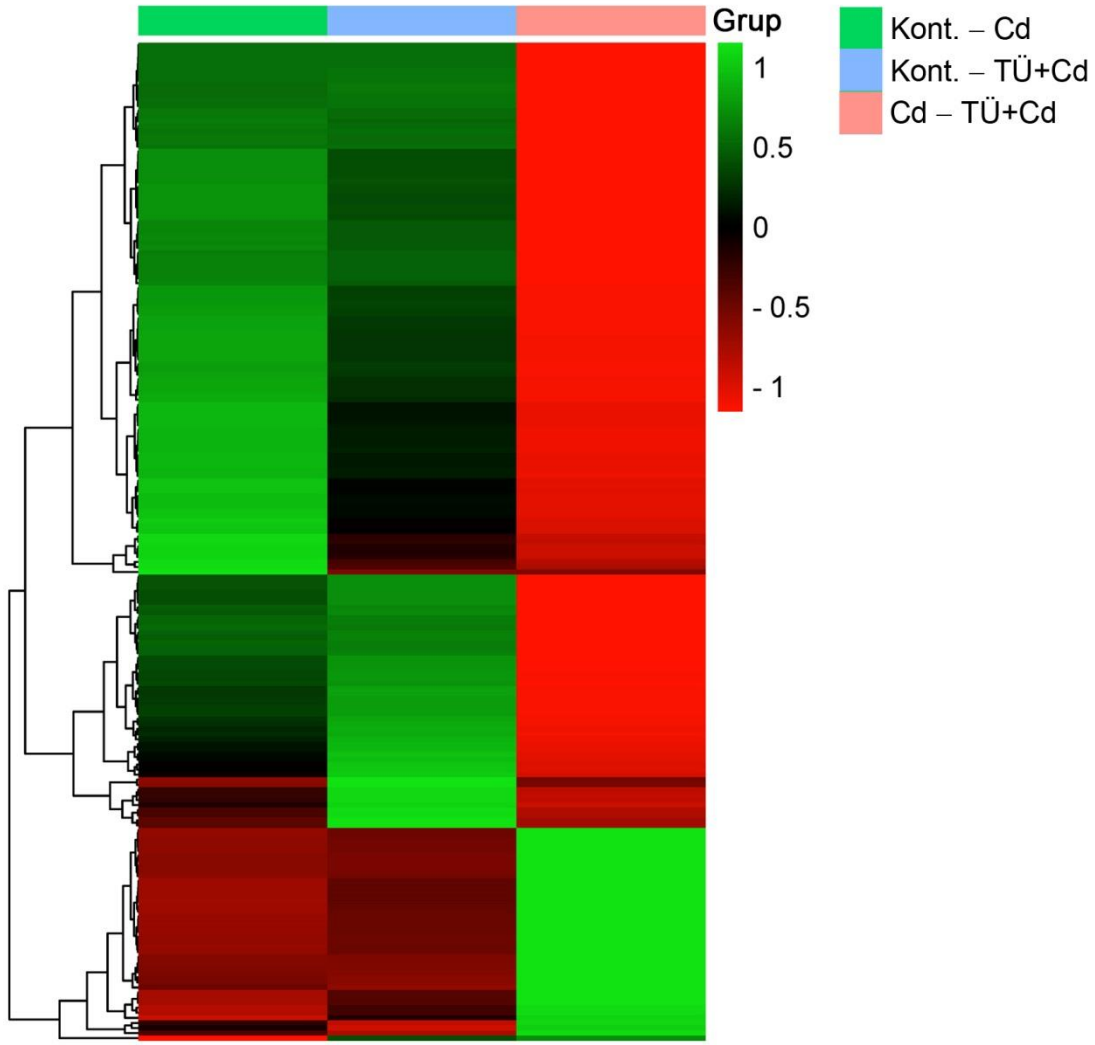
Parametreler	Uygulamalar			
	Kontrol	TÛ	Cd	TÛ+Cd
MDA içeriği <i>nmol g⁻¹ TA</i>	19,4 ± 0,49 ^a	19,9 ± 2,31 ^a	27,5 ± 1,67 ^b	19,4 ± 1,61 ^a
SOD aktivitesi <i>Unit mg⁻¹ protein</i>	30,8 ± 1,83 ^a	21,0 ± 1,11 ^b	26,2 ± 1,29 ^{ab}	23,5 ± 2,46 ^b
POD aktivitesi <i>µmol min⁻¹ mg⁻¹ protein</i>	35,6 ± 4,08 ^a	27,4 ± 0,90 ^a	112,2 ± 2,72 ^c	78,6 ± 3,55 ^b
CAT aktivitesi <i>µmol min⁻¹ mg⁻¹ protein</i>	0,108 ± 0,003 ^a	0,086 ± 0,003 ^b	0,073 ± 0,003 ^c	0,090 ± 0,003 ^d
APX aktivitesi <i>µmol min⁻¹ mg⁻¹ protein</i>	6,97 ± 0,37 ^a	8,71 ± 1,03 ^a	13,38 ± 0,85 ^b	24,04 ± 1,47 ^c

*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.

4.5 Cd ve Tiyoüre Uygulamalarının Proteom Değişimleri Üzerine Etkisi

Mısır fidelerinin yaprak dokularında TÛ ve Cd uygulamalarına bağlı olarak diferensiyel olarak ifadesinde değişiklik gösteren proteinlerin (DEP'ler) belirlenmesi için geniş ölçekli kantitatif bir proteomik yaklaşım (nLC–MS/MS) kullanılmıştır. Elde edilen kütle spektrumlarından, tüm uygulamalarda %1'den daha düşük bir FDR (false discovery rate = yanlış keşif oranı) altında toplam 1573 protein tespit edilmiştir. Mısır yaprak proteinleri analiz edildiğinde, kontrole göre Cd veya TÛ+Cd uygulamasında 1237 proteinin artan yönde düzenlendiği buna karşın 336 proteinin azalan yönde düzenlendiği belirlenmiştir (Şekil 4.1).

Kontrol, Cd ve TÛ+Cd uygulamalarına maruz bırakılan mısır fidelerinin yaprak dokularında tespit edilen DEP'lerin sayısı Cd uygulamasında nispeten daha yüksek bulunmuştur. Artan DEP'ler için >2,0 kat ve azalan DEP'ler için <0,5 kat değişim eşiği belirlenmiştir. Kontrole göre Cd uygulamasında iki kat ve üzerinde farklılık gösteren toplam 1451 DEP tespit edilmiştir. Bu DEP'lerin 1115'i artan ve 336'sı azalan yönde değişiklik göstermiştir. Bununla birlikte, kontrole göre TÛ+Cd uygulamasında iki kat ve üzerinde farklılık gösteren toplam 1193 DEP tespit edilirken bu proteinlerden 996'sı artan yönde, 197'si ise azalan yönde düzenlenmiştir.

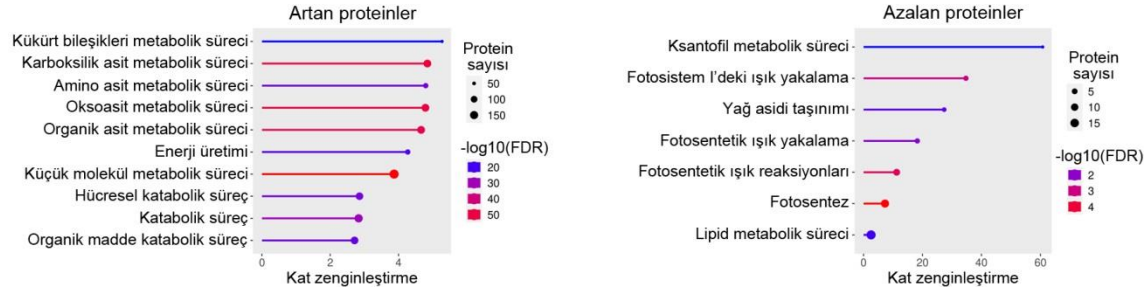


Şekil 4.1 Mısır fidelerinin yaprak dokusunda Cd ve Tü+Cd uygulamalarına yanıt olarak belirlenen DEP'lerin ısı haritası.

4.6 DEP'lerin Fonksiyonel Açıklamaları ve Kategorileri

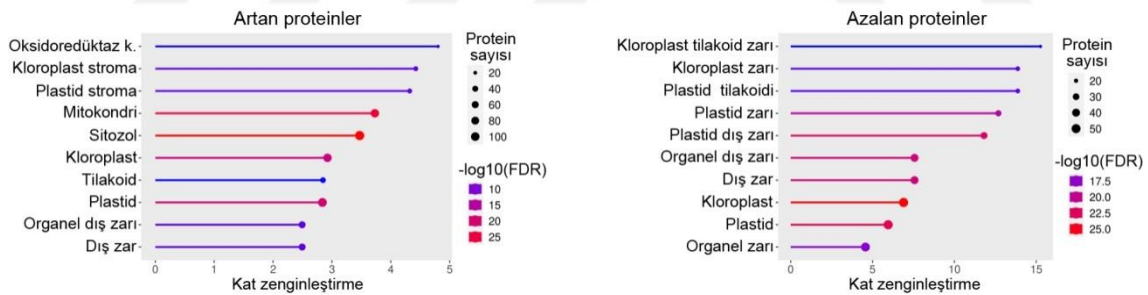
Mısır fidelerinin yaprak dokularında diferansiyel olarak ifade edilen proteinlerin (DEP'ler), yolak analizleri biyoinformatik yaklaşımlar kullanılarak analiz edilmiştir. Artan ve azalan yönde düzenlenen proteinler için farklı biyolojik süreç (BS), hücresel bileşen (HB) ve moleküler fonksiyon (MF) gibi gen ontolojisi (GO) terimleri önemli ölçüde zenginleştirilmiştir. Gen ontolojisi hiyerarşisine göre önemli ölçüde zenginleştirilmiş ilk on BS terimi Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Artan DEP'ler için BS analizinde kükürt bileşikler metabolik süreci en fazla zenginleştirilen terim olarak belirlenirken, bunu karboksilik asit metabolik süreci ve hücresel amino asit metabolik süreci terimleri takip etmiştir. Diğer taraftan, azalan DEP'ler için ksantofil metabolik

süreci en fazla zenginleştirilen terim olarak belirlenirken, bunu Fotosistem I'deki ışık yakalama ve yağ asidi taşınımı terimleri takip etmiştir.



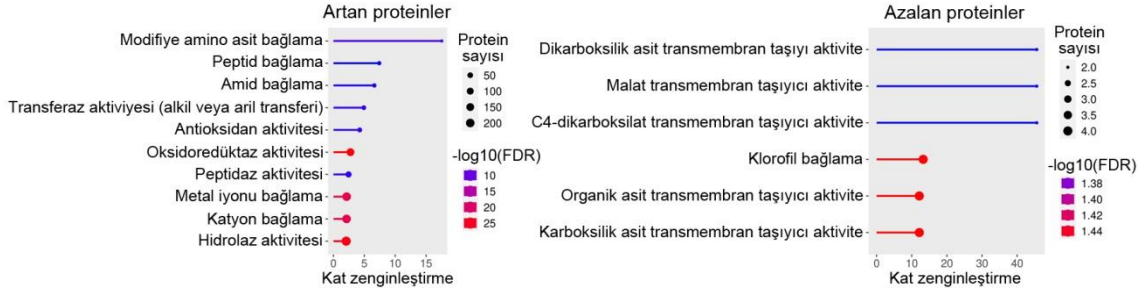
Şekil 4.2 Gen ontolojisi (GO) analizlerine göre belirlenmiş biyolojik süreç (BS) terimleri.

Gen ontolojisi hiyerarşisine göre önemli ölçüde zenginleştirilmiş ilk on HB terimi Şekil 4.3'de gösterilmiştir. Artan DEP'ler için HB analizinde oksidoredüktaz kompleksi en fazla zenginleştirilen terim olarak belirlenirken, bunu kloroplast stroması ve plastid stroması terimleri takip etmiştir. Bununla birlikte, azalan DEP'ler için kloroplast tilakoid zarı en fazla zenginleştirilen HB terimi olarak belirlenirken, bunu kloroplast zarı ve plastid tilakoidi terimleri takip etmiştir.



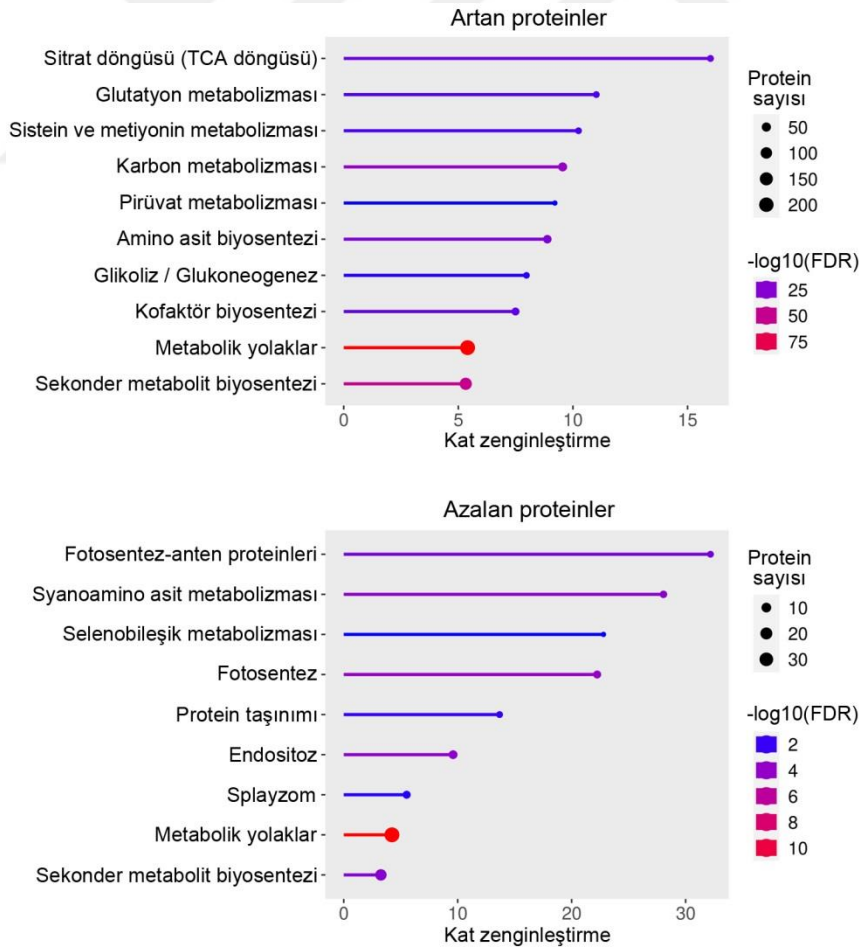
Şekil 4.3 Gen ontolojisi (GO) analizlerine göre belirlenmiş hücresel bileşen (HB) terimleri.

Gen ontolojisi hiyerarşisine göre önemli ölçüde zenginleştirilmiş ilk on MF terimi Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Artan DEP'ler için MF analizinde modifiye amino asit bağlama en fazla zenginleştirilen MF terimi olarak belirlenirken, bunu peptit bağlama ve amid bağlama terimleri takip etmiştir. Bununla birlikte, azalan DEP'ler için dikarboksilik asit transmembran taşıyıcı aktivite en fazla zenginleştirilen MF terimi olarak belirlenirken, bunu malat transmembran taşıyıcı aktivite ve C4-dikarboksilat transmembran taşıyıcı aktivite terimleri takip etmiştir.



Şekil 4.4 Gen ontolojisi (GO) analizlerine göre belirlenmiş moleküler fonksiyon (MF) terimleri.

KEGG analizi, birçok primer metabolizma yolağının ve ayrıca sekonder metabolitlerin biyosentezinin önemli ölçüde zenginleştiğini ortaya çıkarmıştır (Şekil 4.5). Özellikle artan yönde düzenlenen proteinlerin sitrat döngüsü, glutatyon metabolizması ve sistein ve metiyonin metabolizması terimlerinde önemli ölçüde zenginleştirilmiştir. Bununla birlikte, azalan DEP'ler için fotosentez-anten proteinleri en fazla zenginleştirilen KEGG terimi olarak belirlenirken, bunu syanoamino asit metabolizması ve selenobileşik metabolizması terimleri takip etmiştir.

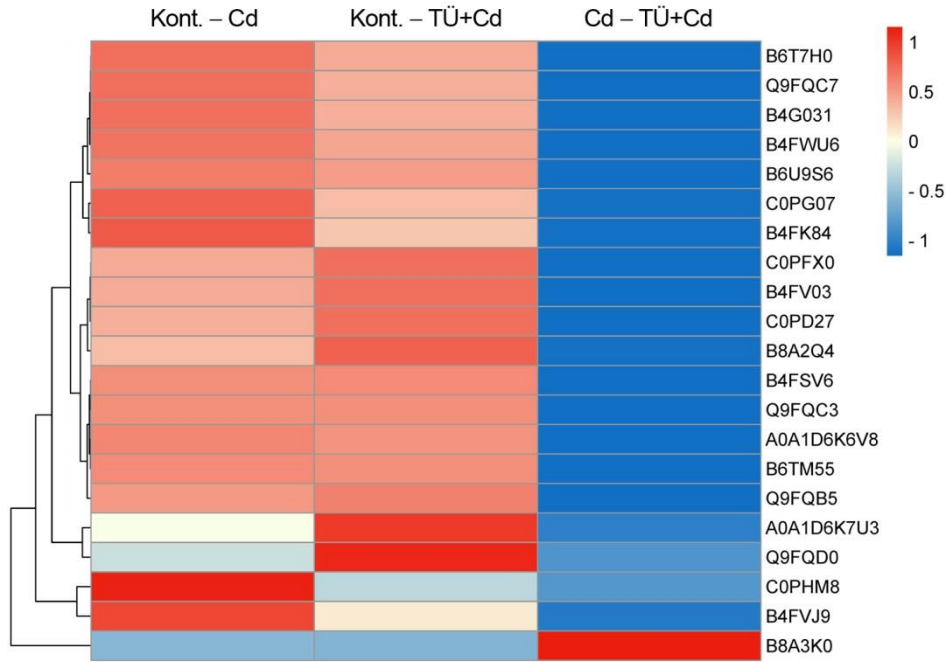
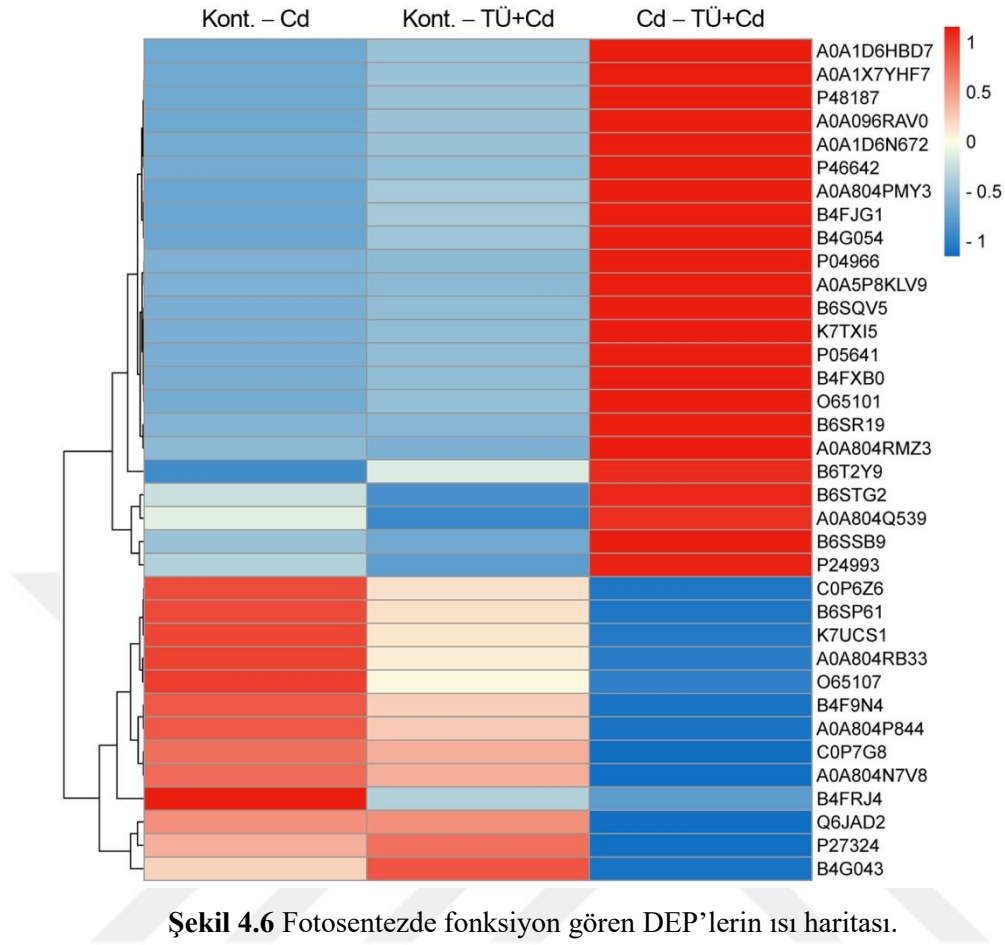


Şekil 4.5 DEP'ler için önemli ölçüde zenginleştirilmiş KEGG yolaqları.

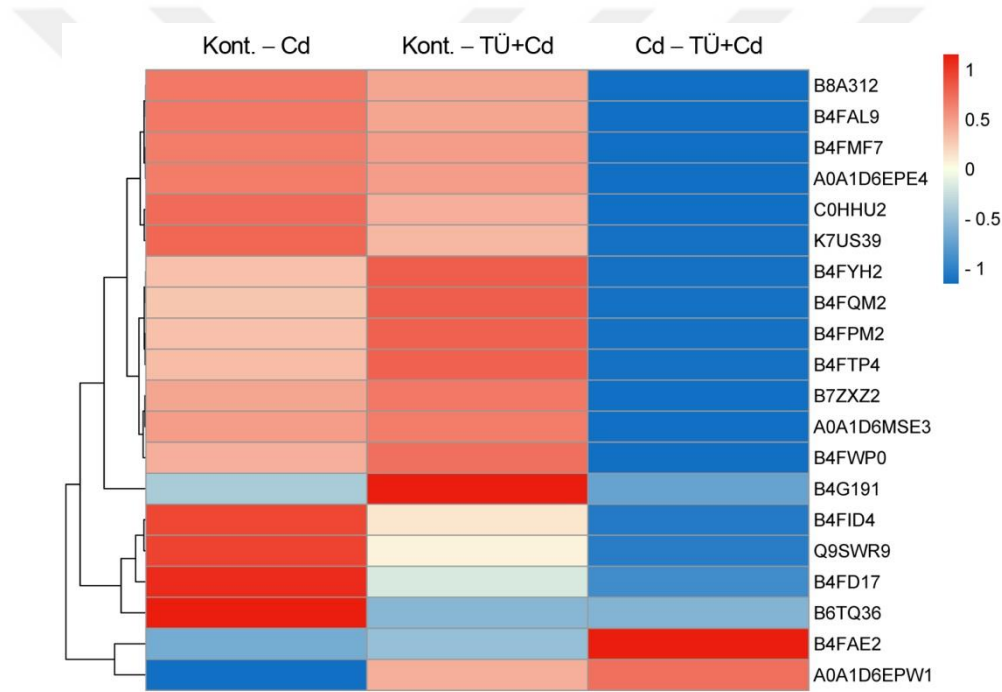
Diferensiyal olarak ifadesinde değişiklik gösteren proteinlerin sayısının çokluğu nedeniyle GO ve KEGG yolak analizlerinden elde edilen DEP'lere odaklanılarak hedefler daraltılmış ve daha spesifik hale getirilerek fotosentez (38 protein), glutatyon metbolizması (22 protein), glikoliz/glukoneogenez (21 protein), sistein metabolizması (23 protein), sekonder metabolik süreç (133 protein), TCA döngüsü (23 protein), antioksidan aktivitesi (49 protein) ve protein metabolizması (63 protein) olmak üzere 8 fonksiyonel kategoride değerlendirilmesine karar verilmiştir.

Fotosentezle ilişkili DEP'ler kontrole göre Cd ve TÛ+Cd uygulamalarında değişiklik göstermiştir (Şekil 4.6). Bunlar arasında plastokinol-plastosianin redüktaz, ferredoksin-NADP redüktaz ve ferredoksin gibi 15 proteinin ifade seviyesi kontrole göre Cd uygulamasında artan yönde düzenlenmiştir. Bununla birlikte, plastosianin, lümenal konum 2'nin fotosentetik NDH alt birimi, fotosistem I P700 klorofil a apoproteinleri, fotosistem II CP43 reaksiyon merkezi proteini ve klorofil a-b bağlayıcı proteini gibi DEP'ler Cd uygulamasında azalan yönde düzenlenmiştir. Ayrıca TÛ+Cd uygulaması fotosistem I reaksiyon merkezi alt birimi III, fotosistem II alt birimi PsbS1, alt kompleks B 5'in fotosentetik NDH alt birimi, fotosistem I montaj proteini Ycf4, fotosistem I P700 klorofil a apoproteinleri, fotosistem I reaksiyon merkezi alt birimi VI, fotosistem II D2 proteini ve klorofil a-b bağlayıcı protein gibi proteinlerin ifade seviyesindeki Cd teşvikli azalmayı iyileştirmiştir (Şekil 4.6).

Mevcut araştırmada, kontrole göre Cd ve TÛ+Cd uygulamaları glutatyon metabolizması ile ilgili 22 proteinin ifade seviyesinde değişikliğe neden olmuştur (Şekil 4.7). Kadmiyum stresi glutatyon sentaz, glutatyon redüktaz, glutatyon transferaz ve glutatyon dehidrogenaz gibi 19 proteinin ifade seviyesinde artışa neden olurken, 1 glutatyon transferaz proteinin ifade seviyesinde azalmaya neden olmuştur. Bununla birlikte, Cd uygulamasına göre TÛ+Cd uygulaması glutatyon sentaz proteininin ifadesini azalan yönde düzenlerken, 3 glutatyon transferaz proteinini artan yönde düzenlemiştir (Şekil 4.7).



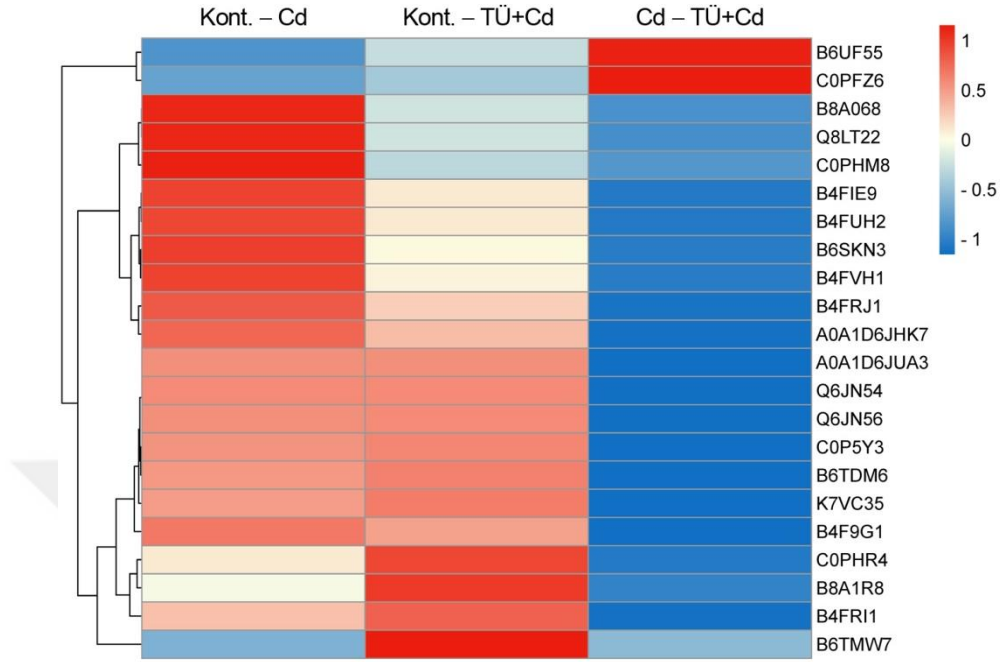
Glikoliz/glukoneogenez ile ilişkili 21 proteinin ifade seviyesi kontrole göre Cd ve Tü+Cd uygulamalarında değişiklik göstermiştir (Şekil 4.8). Bunlar arasında pirüvat kinaz, aldoz 1-epimeraz, fruktoz-bisfosfat aldolaz, pirüvat dehidrogenaz E1 bileşen alt birim beta ve fosfoglisarat mutaz gibi 17 proteinin ifade seviyesi kontrole göre Cd uygulamasında artan yönde düzenlenmiştir. Bununla birlikte, 4-kumarat-CoA ligaz proteini Cd uygulamasında azalan yönde düzenlenmiştir. Ayrıca Tü+Cd uygulaması ATP-bağımlı 6-fosfofruktokinaz proteinin ifade seviyesinde artışa neden olurken, pirüvat dehidrogenaz kompleksinin dihidrolipoamid asetiltransferaz, E1 bileşeni beta alt birimi ve asetiltransferaz bileşenlerinin ifade seviyelerinde azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 Glikoliz/Glukoneogenez ile ilişkili DEP'lerin ısı haritası.

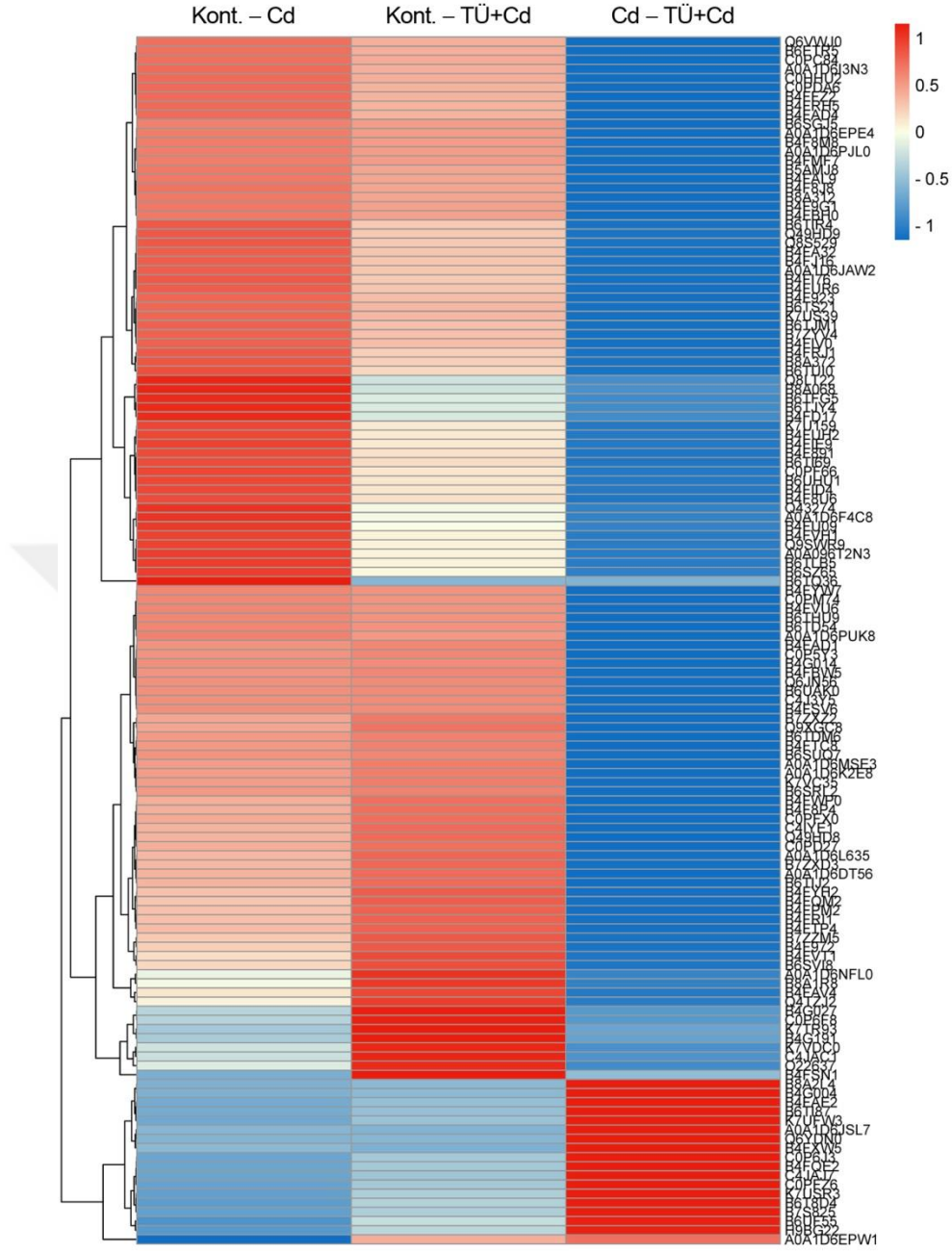
Mevcut araştırmada, kontrole göre Cd ve Tü+Cd uygulamalarında sistein metabolizması ile ilgili 23 DEP değerlendirilmiştir (Şekil 4.9). Kadmiyum stresi S-adenosilmetiyonin sentaz, S-metil-5-tiyoriboz kinaz, aminosiklopropankarboksilat oksidaz ve serin O-asetiltransferaz gibi 19 proteinin ifade seviyesinde artışa neden olurken, 5-metiltetrahidropteroiltriglutam- homosistein S-metiltransferaz ve aminosiklopropankarboksilat oksidaz proteinlerinin ifade seviyesinde azalmaya neden olmuştur. Sentezinde Cd kaynaklı azalma gösteren bu proteinlerin ifade seviyesi

TÜ+Cd uygulamasında artmıştır (Şekil 4.9).



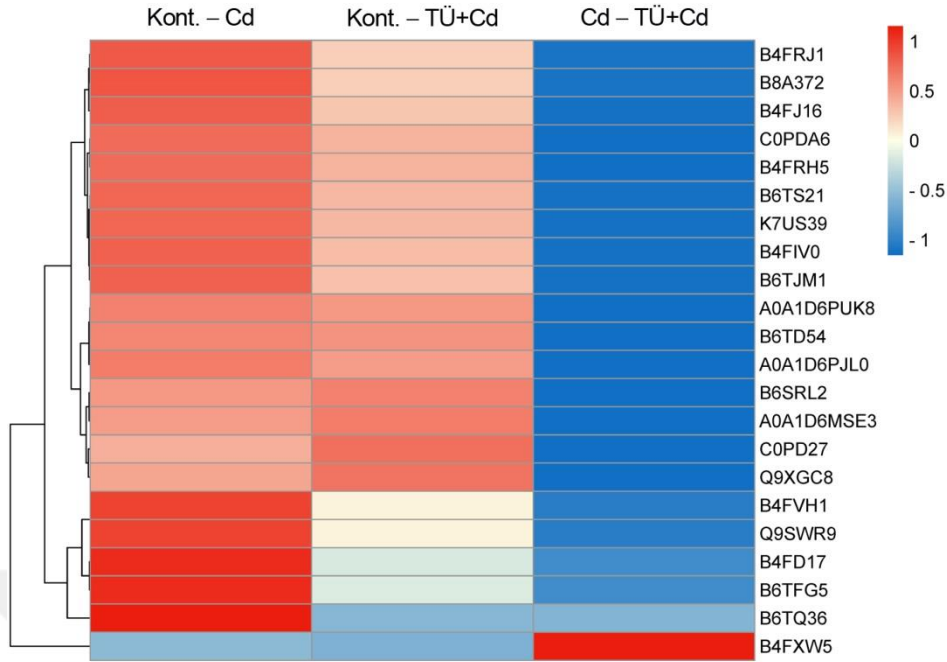
Şekil 4.9 Sistein metabolizması ile ilişkili DEP'lerin ısı haritası.

Sekonder metabolik süreç ile ilişkili 133 proteinin ifade seviyesi kontrole göre Cd ve TÜ+Cd uygulamalarında değişiklik göstermiştir (Şekil 4.10). Bunlar arasında kafeoil-KoA O-metiltransferaz, 3-izopropilmalat dehidrogenaz, dihidrolipoil dehidrogenaz, allen oksit sentezi 3, 12-okso-fitodienoik asit redüktaz ve sinnamil-alkol dehidrogenaz gibi 106 proteinin ifade seviyesi kontrole göre Cd uygulamasında artan yönde düzenlenmiştir. Bununla birlikte, 5-metiltetrahydropteroylglutamat-homosistein S-metiltransferaz, 4-kumarat-CoA ligaz, inozitol-3-fosfat sentaz ve nitrilaz 1 gibi 17 proteininin ifade seviyesi Cd uygulamasında azalan yönde düzenlenmiştir. Ayrıca TÜ+Cd uygulaması aldol 1-epimeraz, fosfoserin aminotransferaz, izoamilaz SU1 ve tiyolaz 1 proteinleri gibi 10 proteininin ifade seviyesinde artışa neden olmuştur. TÜ uygulaması 5-metiltetrahydropteroylglutamat-homosistein S-metiltransferaz, 1-asil-sn-gliserol-3-fosfat asiltransferaz zeta, likopen epsilon-siklaz, alfa-dioksijenaz 1, siyanoalanin nitrilaz, aminosiklopropankarboksilat oksidaz, terpen siklaz/mutaz ailesi üyesi ve nitrilaz 1 gibi proteinlerin ifade seviyesindeki Cd teşvikli azalmayı hafifletmiştir (Şekil 4.10).



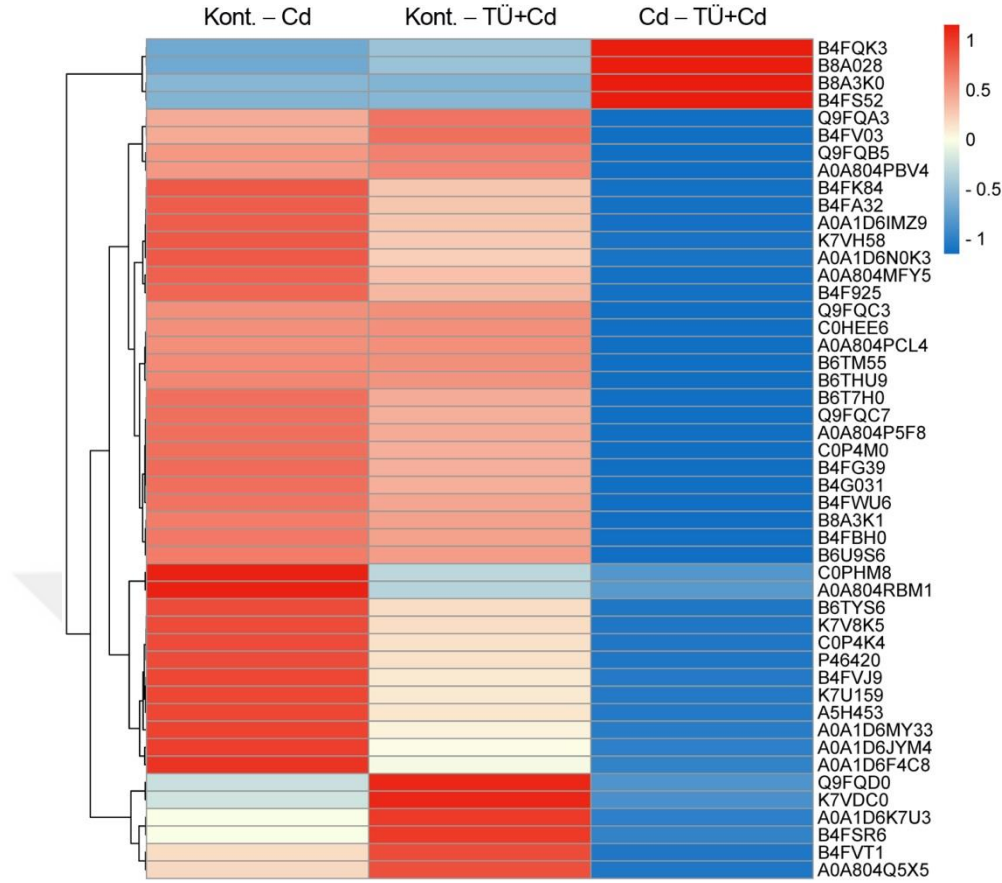
Şekil 4.10 Sekonder metabolik süreç ile ilişkili DEP'lerin ısı haritası.

Mevcut araştırmada, kontrole göre Cd ve Tü+Cd uygulamaları TCA döngüsü ile ilgili 23 proteinin ifade seviyesinde değişikliğe neden olmuştur (Şekil 4.11). Kadmiyum stresi izositrat dehidrogenaz [NAD], süksinat dehidrogenaz, malat dehidrogenaz ve süksinat-CoA ligaz gibi 22 proteinin ifade seviyesinde artışa neden olurken, ATP sitrat sentaz proteininin ifade seviyesinde azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.11).



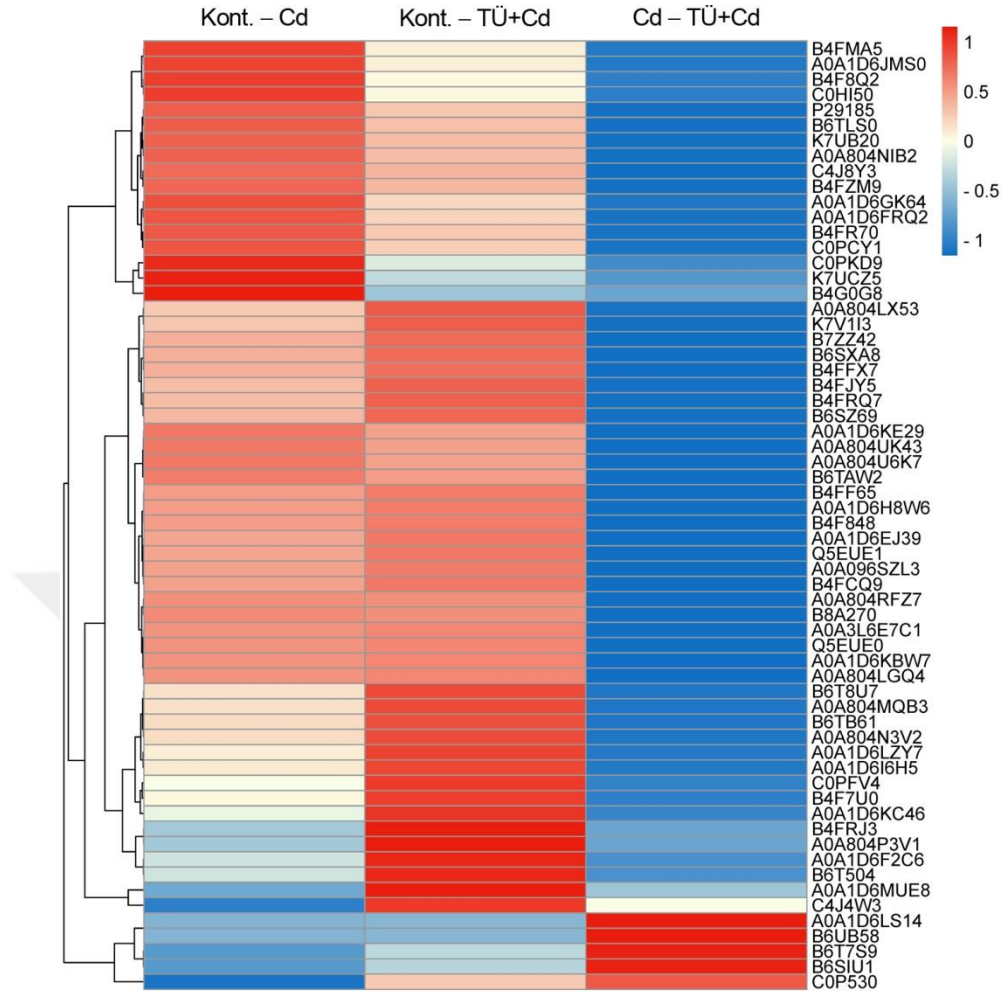
Şekil 4.11 TCA döngüsü ile ilişkili DEP'lerin ısı haritası.

Antioksidan savunma sistemi ile ilişkili 49 proteinin ifade seviyesi kontrole göre Cd ve Tü+Cd uygulamalarında değişiklik göstermiştir (Şekil 4.12). Bunlar arasında katalaz, glutatyon S-transferaz, L-askorbat peroksidaz, monodehidroaskorbat redüktaz, peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi 43 proteinin ifade seviyesi kontrole göre Cd uygulamasında artan yönde düzenlenmiştir. Bununla birlikte, 3 adet glutatyon S-transferaz ve 1 adet monodehidroaskorbat redüktaz proteininin ifade seviyesi Cd uygulamasında azalan yönde düzenlenmiştir. Ayrıca Tü uygulaması glutatyon S-transferaz ve monodehidroaskorbat redüktaz proteininin proteinlerin ifade seviyesindeki Cd teşvikli azalmayı hafifletmiştir. Diğer taraftan, Cd stresi altındaki mısır fidelerine Tü uygulaması bazı antioksidan enzimlerin protein seviyelerinde ilave artışa neden olmuştur (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 Antioksidan savunma sistemi ile ilişkili DEP'lerin ısı haritası.

Mevcut araştırmada, kontrole göre Cd ve Tü+Cd uygulamaları protein metabolizması ile ilgili 63 proteinin ifade seviyesinde değişikliğe neden olmuştur (Şekil 4.13). Kadmiyum stresi 26S proteazom, şaperonin, E1 ubiquitin aktive edici enzim, ısı şoku 70 kDa protein, ısı şoku proteini 90, proteazom alt birim alfa tipi, protein disülfür izomeras, ubiquitin karboksi-terminal hidrolaz, ubiquitin reseptörü RAD23 gibi 53 proteinin ifade seviyesinde artışa neden olurken, E3 ubiquitin-protein ligase RGLG1, ısı şoku proteini bağlayıcı protein, ubiquitin-konjuge edici enzim E2 ve ubiquitin benzeri proteinin ifade seviyelerinde azalmaya neden olmuştur. Bununla birlikte, Tü uygulaması bu proteinlerin ifade seviyelerindeki Cd teşvikli azalmayı iyileştirmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 Protein metabolizması ile ilişkili DEP'lerin ısı haritası.

Mevcut araştırmada, Cd ve TÛ+Cd uygulamaları ile ilişkili DEP'lerin etkileşim ağı, çevrimiçi analiz yazılımı STRING kullanılarak oluşturulmuştur (Şekil 4.14). STRING analizlerinde etkileşen proteinlerin üç ana kümesi oluşturulmuştur. Karbohidrat ve enerji metabolizması ile ilişkili proteinler etkileşim ağının merkezi kısmında yer almıştır. Fotosentezle ilişkili proteinler ikinci etkileşim kümesini oluştururken, protein metabolizması ile ilişkili proteinler diğer etkileşim kümesini oluşturmuştur. Bununla birlikte, GST ile ilişkili proteinlerin ayrı bir küme oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 4.14).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kadmiyum (Cd), bitkilerin normal yaşamsal aktivitelerini bozarak büyüme ve gelişmede inhibisyona yol açabilen oldukça toksik bir abiyotik stres faktörüdür (Wei vd. 2023b). Genel olarak bitkilerde spesifik Ca^{2+} taşıyıcıları ile Cd^{2+} formunda topraktan alınmaktadır. Bu toksik iyon ayrıca bitkilerin içindeki metal iyonlarının birikimini ve taşınmasını da engelleyerek fizyolojik ve biyokimyasal tepkilerde değişikliklere yol açabilmekte ve sonuçta bitkilerin hem toprak üstü hem de toprak altı organların biyokütlesini azaltabilmektedir (Luo ve Zhang 2021). Bitkilerde, büyümenin gecikmesi, kloroz, fotosentetik mekanizmanın bozulması, proteinin denatürasyonu, azot asimilasyonunda azalma, besinlerin translokasyonu ve hatta bitki hücresi ölümü Cd toksisitesinin neden olduğu oksidatif stres sırasında yaşanan en yaygın fenomenler olarak bilinmektedir (Gill vd. 2013, Kaya vd. 2020, Khator ve Shekhawat 2020).

Bu çalışmada, Cd stresi fotosentetik pigmentlere zarar vererek ve fizikokimyasal özellikleri etkileyerek mısır fidelerinin büyüme parametrelerinde önemli bir azalmaya neden olmuştur. Büyüme düzenleyicilerinin, biyostimülanların ve/veya antioksidanların uygulamalarının ağır metal toksisitesinin hafifletilmesi için çevre dostu ve ümit verici bir yaklaşım olduğu bildirilmiştir (Rahman vd. 2020). Mevcut çalışmada, TÛ uygulaması, büyüme parametrelerinde önemli bir iyileşmeye neden olmuştur. Bitki büyümesindeki TÛ teşvikli iyileşme, ağır metal birikimindeki azalma ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Ghate vd. 2022). Araştırmamızda, Cd stresi altında TÛ uygulaması hem kök hem de yaprak dokularında Cd birikiminde azalmaya neden olmuştur. Haider vd. (2022), mısır dokularındaki Cd konsantrasyonlarındaki TÛ teşvikli azalmanın TÛ'nün hücre çeperi lignifikasyonundaki işlevi ile ilişkili olabileceğini bildirmiştir. Diğer taraftan, bitkilerde kuru madde birikimi, fotosentezin ışık reaksiyonlarında indirgeyici güçlerin (ATP ve NADPH) üretimine ve fotoasimilatların üretiminde indirgeyici güçlerin kullanımına bağlıdır. Stresli koşullar altında fotosentetik pigmentlerin ve optimum yaprak gazı değişiminin sürdürülmesi, nihai üretkenliğin temel belirleyicileridir (Wahid vd. 2010). Bu araştırmada, Cd stresi klorofil birikiminde azalmaya neden olurken, TÛ+Cd uygulamasında klorofil içeriğinde artış belirlenmiştir. Klorofil içeriğindeki azalmanın klorofil yıkımı, klorofil sentezindeki azalma ve pigment protein komplekslerinin duyarlılığı ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Nahar vd. 2016,

Khator ve Shekhawat 2020). Fotosentez ve bitki savunmasının sürdürülmesi için optimum düzeyde fotosentetik pigmentler gerekmektedir. T  uygulamasına yanıt olarak Cd stresi altındaki bitkilerde klorofil pigmentlerinin geri kazanılması ve/veya restore edilmesi, T  uygulamasının büyüme ve biyokütle verimini iyileştirmede önemli bir fonksiyonu olduğunu göstermektedir.  nceki  alı malarda, T  uygulamasının bitkilerde ağır metal stresi altında fotosentetik performansın sürdürülmesine yardımcı olduğu ve bitki büyümesini olumlu etkilediği gösterilmiştir (Haider vd. 2022, U urlar ve Kaya 2023, Zahid vd. 2024). Sonuç olarak, Cd stresi koşullarında T  uygulaması mısır fidelerinde Cd birikimini azaltarak ve klorofil içeriğini artırarak Cd toleransına katkıda bulunmuş olabilir.

Normal gelişim koşulları altında, bitkiler genellikle ROT oluşumu ve eliminasyonu arasında bir denge sa lar; ancak bu denge Cd stres koşulları tarafından bozulur. Kadmiyum elektron taşıma zincirini ve hücre zarının bütünlüğünü bozabilir ve bu da sitoplazmik zarların depolarizasyonuna neden olarak hüresel redoks homeostazisinde dengesizliğe yol açabilmektedir (Kov  ik vd. 2019, Kaya vd. 2020). Mevcut araştırma sonuçları, Cd stresi koşullarında aşırı ROT üretiminin lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA içeriğinde artışa neden olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, T +Cd uygulamasının MDA içeriğini azaltmış olması T 'n n hücre zarı bütünlüğünü koruyarak mısır fidelerinde Cd toleransını artırabileceğini ileri sürebilir. Tiyoüre bitki büyümesi için bir biyoreg lat r görevi görür ve iyi bilinen bir ROT temizleyicisidir. T 'n n stres iyileştirme potansiyelinin ardındaki mekanizmanın bitkilerin redoks durumunu düzenleme ve ROT üretimini hafifletme yeteneği olabileceği öne sürülmüştür (Wahid vd. 2017, Patade vd. 2020). Bitkilerde ROT seviyelerini ayarlamak için ROT detoksifikasyonunun bileşenleri moleküler antioksidanlar arasında askorbat, glutatyon, fenolikler, prolin, karotenoidler vb. ve enzimatik antioksidanlar arasında CAT, SOD, APX, GPX ve GR gibi antioksidan enzimler yer almaktadır (Kaya vd. 2015, Awasthi vd. 2018). Bu çalışmada incelenen antioksidan enzimler olan SOD, CAT, APX ve POD T  uygulaması ve Cd stresi altında farklı tepkiler göstermiştir. Cd stresi SOD ve CAT aktivitelerinde azalmaya neden olurken APX ve POD aktivitelerinde artışa neden olmuştur. T  uygulaması, MDA seviyeleriyle negatif ve biyokütle birikimiyle pozitif korelasyon gösteren CAT ve APX aktivitelerinde artışa neden olmuştur. Bununla

birlikte, Cd stresi koşullarında T $\ddot{U}$ uygulaması CAT aktivitesindeki inhibisyonu iyileştirirken APX aktivitesinde ilave artışa neden olmuştur. Bununla birlikte, Cd uygulamasına göre T $\ddot{U}$ +Cd uygulamasının hücre çeperi ve vakuolde lokalize olduğu bildirilen POD aktivitesinde (Asada 1992) azalmaya neden olması düşük Cd birikimi ile açıklanabilir.

Mevcut araştırmada, mısır fidelerinin yaprak dokularında kontrol, Cd ve T $\ddot{U}$ +Cd uygulamalarının proteom üzerine etkileri nLC–MS/MS ile analiz edilmiştir. Sonuç olarak, |Kat Değişim (FC)| kriterine göre Cd ve T $\ddot{U}$ +Cd uygulamalarında çok sayıda DEP belirlenmiştir. Ayrıca GO ve KEGG yolak analizleri, T $\ddot{U}$ teşvikli Cd toleransında rolü olan proteinleri açıkça ortaya koymuştur. KEGG analizleri T $\ddot{U}$ uygulaması ve Cd stresi ile ilişkili anahtar süreçlerin fotosentez, sitrat döngüsü (TCA döngüsü), glutatyon metabolizması, sistein ve metiyonin metabolizması, glioksilat ve dikarboksilat metabolizması ve pirüvat metabolizması olduğu belirlenmiştir.

Çevresel stres koşullarında, sağlıklı bitki büyümesi açısından fotosentezin iyileştirilmesi, artırılmış ürün verimi için önemli bir garantidir. Tiyoürenin Cd stresi altında bitki büyüme ve gelişimini iyileştirdiği gösterilmiştir (Haider vd. 2022). Bu nedenle, T $\ddot{U}$ 'nün bitki fotosentezi üzerindeki etkisi sürekli olarak araştırılmaktadır. Çalışmalar, T $\ddot{U}$ uygulamasının As, Co ve Cd gibi ağır metal stresi altında fotosentezi iyileştirdiği bildirilmiştir (Yadav ve Srivastava 2021, Haider vd. 2022, Zahid vd. 2024). Mevcut çalışmada, Cd stresi tarafından engellenen fotosentezle ilgili bazı proteinlerin T $\ddot{U}$ uygulaması ile kısmen artan yönde düzenlenmesi ve bunun da Cd stresi altında artan bitki büyümesinin temeli olabileceği gösterilmiştir. Fotosentez iyi organize edilmiş ve ardışık bir süreçtir ve fotosistemdeki herhangi bir bileşen, örneğin fotosentetik pigmentler ve klorofil–protein kompleksleri veya karbon asimilasyon yolundaki biyokimyasal reaksiyonların Cd tarafından hasar görebildiği belirtilmiştir (Parmar vd. 2013). Her fotosistem, birkaç yüz klorofil ve karotenoid molekülü ve ilişkili membran proteinlerinden oluşan bir komplekstir. Tilakoid membrandaki elektron ve proton transferi fotosistem II (PS II), fotosistem I (PS I), Cyt b6/f kompleksi ve H⁺–ATPaz kompleksi olmak üzere dört protein kompleksi tarafından vektörel olarak gerçekleştirilmektedir (Huang vd. 2017, Xue vd. 2018). Fotosentetik aygıtın kararlılığı,

bitkilerin normal fotosentetik işlevinin temelidir. Ancak fotosistem proteinlerinin parçalanması, Cd stresinin fotosentetik aygıtı dengesizleştirdiğini göstermektedir (Jiang vd. 2006). Mevcut proteomik bulgular, Cd stresi koşullarında fide büyümesindeki azalma fotosentez ile ilişkili DEP'lerin azalan yönde düzenlenmesinden kaynaklanmış olabilir.

Mevcut araştırmada, Cd stresi PSI reaksiyon merkezi alt birimi III (PsaF), PSII alt birimi PsbS1 (PsbS1), alt kompleks B5'in fotosentetik NDH alt birimi, PSI montaj proteini Ycf4, PSI P700 klorofil a apoprotein A1 (PsaA), PSI P700 klorofil a apoprotein A2 (PsaB), PSI reaksiyon merkezi alt birimi VI (PsaH), PSII CP47 reaksiyon merkezi proteini (PsbB), PSII protein D1 (PsbA) ve PSII protein D2 (PsbD) gibi fotosentezle ilişkili çok sayıda proteinin ifade seviyesinde azalmaya neden olurken, T +Cd uygulaması bu proteinlerin ifade seviyesini artırmıştır. PsaA/PsaB, PSI'nin ışık toplayan pigmentlerinin çoğuyla birlikte elektron taşınmasının yardımcı faktörlerini koordine eden PSI reaksiyonunun çekirdek proteinleridir (MacGregor–Chatwin vd. 2017). Kloroplastlarda PsbA/PsbD reaksiyon merkezi heterodimeri, PSII'nin birincil elektron vericisi olan P680'e ve ayrıca birkaç sonraki elektron alıcısına bağlanmaktadır. D2 proteininin, kararlı bir PSII kompleksinin bir araya getirilmesi için gerekli olduğu bildirilmiştir (Knoppová vd. 2022). PSI ve PSII'deki anten pigmentlerinin koordinatörü olan klorofil a–b bağlayıcı proteinlerinin (Lhcb), Cd stresi altındaki mısır yapraklarında azalan yönde düzenlenmiştir. Lhcb proteinleri esas olarak fotonları yakalamak ve bitkilerin fotosentetik sistemini uyarmak için klorofil–protein kompleksi (LHC) oluşturmada rol oynamaktadır (Jenny vd. 2003, Damkjaer vd. 2009). Lhcb proteinleri ve yukarıda belirtilen proteinlerin azalan seviyeleri Cd stresinin PSII'den PSI'e fotosentetik elektron taşınmasını önemli düzeyde olumsuz etkilediği ileri sürülebilir. Diğer taraftan, Lhcb ve diğer fotosentetik elektron transferinde yer alan proteinlerin ifadesinin T  uygulaması ile artan yönde düzenlenmesi, T 'nün fotosentez üzerindeki olumlu etkilerini kanıtlamaktadır.

Karbondioksit özümlemesi ve Calvin–Benson döngüsü enzimlerinin aktiviteleri de Cd stresine oldukça duyarlıdır. Cd stresinin stoma iletkenliği önemli ölçüde azalttığı (Rizwan vd. 2017b, Wang vd. 2019b) ve Calvin döngüsünde hız sınırlayıcı enzim olan

RuBisCO'nun aktivitesi güçlü bir şekilde engellediği bilinmektedir (Lee ve Roh 2003, Wang vd. 2019c). Sonuç olarak, Cd stresi net CO₂ özümlemesi ve karbohidrat birikiminin bozulmuş bir oranına yol açmaktadır (Dias vd. 2013). Dışsal olarak uygulanan düzenleyicilerin Cd stresini hafifletme yeteneğinin, Calvin döngüsünde karbon akışının düzenlenmesi ve RuBisCO aktivitesiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Siddiqui vd. 2022). Karbonik anhidraz (KA), tüm canlı organizmalarda bulunan ve CO₂ ile HCO₃⁻'un birbirine dönüşümünü kataliz eden bir metaloenzimdir. Bitki KA'larının muhtemelen olumsuz koşullara adaptasyonda rol oynayan strese duyarlı enzimler olduğunu gösteren çok sayıda kanıt bulunmaktadır (Polishchuk 2021). Karbonik anhidraz yüksek bitkilerin yapraklarındaki kloroplast stromasında RuBisCO'dan sonra en bol bulunan proteindir (Rudenko vd. 2015). Çeşitli KA ailelerinin (α , β ve γ) üyeleri solunum, fotosentez, stoma hareketi ve lipid biyosentezinde rol oynadığı bildirilmiştir (Polishchuk 2021). Karbondioksit özümlemesi için Calvin–Benson döngüsündeki ana enzim olan RuBisCO büyük alt birimi ve küçük alt birimlerini içermektedir (Banda vd. 2020). Karbon özümlemesi sırasında RuBisCO aktivitesinin, fotosentezin en önemli biyokimyasal sınırlamalarından biri olduğu bildirilmiştir (Mathan vd. 2021). Mevcut araştırmada, Cd stresi bir KA ve üç RuBisCO proteininin ifade seviyesinde artışa neden olurken, T $\ddot{U}$ +Cd uygulaması sadece KA ifade seviyesinde artışa neden olmuştur. Bu sonuç, T $\ddot{U}$ 'nün CO₂ özümlemesi ve karbohidrat birikimini artırabileceğini gösterebilir. Ayrıca, proteom analizi Cd stresi altında malik enzimin T $\ddot{U}$ tarafından önemli ölçüde teşvik edildiğini göstermiştir. Malik enzim, L–malik asidin pirüvat, CO₂'e ve NAD(P)H'ye geri-dönüşümlü oksidatif dekarboksilasyonunu katalize eden bir enzimdir (Chang ve Tong 2003). Bu bilgiler ışığında, mevcut araştırmamızda Cd stresi altındaki mısır fidelerinde T $\ddot{U}$ uygulaması tarafından malik enzimin teşvik edilmesi, CO₂'in dekarboksilasyon yoluyla salınımını artırdığı ve bunun da CO₂ özümleme sürecini desteklediği ileri sürülebilir.

Stresli koşullarda normal büyüme ve gelişmeyi sürdürmek için bitkilerin glikoliz, trikarboksilik asit (TCA) döngüsü ve oksidatif fosforilasyon gibi enerji üreten katabolik yolları düzenlemesi gerekmektedir. Mevcut araştırmada, Cd stresi ATP'ye bağımlı 6–fosfofruktokinaz, fruktoz–bisfosfat aldolaz, fosfoglisarat mutaz, fosfopirüvat hidrataz ve pirüvat kinaz gibi glikolitik enzimlerin ifade seviyesinde artışa neden olmuştur.

Bununla birlikte, T $\ddot{U}$ +Cd uygulaması ATP'ye bağımlı 6-fosfofruktokinaz ve fosfopirüvat hidrataz enzimlerinin ifadesinde ilave artışa neden olmuştur. Dai vd. (2017) ve Gong vd. (2017), Cd stresi altındaki *Medicago sativa* ve *Cucumis sativus* bitkilerinde fruktoz-6-fosfatı fruktoz-1,6-bisfosfata dönüştüren ve glikolizin temel düzenleyici enzimi olan ATP-bağımlı 6-fosfofruktokinazın (PFK) artan yönde düzenlendiğini bildirmiştir. Bu verilere göre, PFK'nin bitkilerin Cd toleransında önemli bir rol oynadığı söylenebilir. Fosfopirüvat hidrataz, glikoz metabolizmasında 2-fosfat-gliserik asidi fosfoenolpirüvik aside dönüştüren enzimdir (Li vd. 2017). Glikolizle ilişkili fosfopirüvat hidratazın artan yönde düzenlenmesi, Cd stresi altında mısır fidelerinin glikolitik yolak aracılığıyla daha fazla ATP üretiminin teşvik edildiğinin bir göstergesi olabilir.

Pirüvat, glikolizin son ürünüdür ve mitokondriyal solunum için önemli bir substrat olarak karbon metabolizmasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Mitokondriyal pirüvat oksidasyonu, trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne karbon iskeletleri sağlamak için pirüvat dehidrogenaz kompleksi (PDC) tarafından katalize edilir ve tükenmesi metabolizmada kapsamlı değişikliklere, anormal organ gelişimine ve bitkilerde ciddi büyüme geriliğine yol açmaktadır (Yu vd. 2012, Ohbayashi vd. 2019). PDC ve malat dehidrogenaz (MDH), sitrat sentezi için sırasıyla asetil-CoA ve oksaloasetat substratları sağlamak üzere birlikte fonksiyon görmektedir (Selinski ve Scheibe 2019). Mevcut araştırmada, Cd stresi PDC'nin farklı alt birimlerinin yanı sıra MDH proteinlerinin ifade seviyesinde artışa neden olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, TCA döngüsünün enzimleri olan ATP sitrat sentaz, akonitat hidrataz, izositrat dehidrogenaz, süksinat dehidrogenaz ve fumarat hidrataz proteinlerinin ifade seviyesinde artışa neden olmuştur. Cd (Marino vd. 2007) ve Ni (Galvez vd. 2005) gibi ağır metallere maruz kalan bitkilerde, izositrat dehidrogenazın yüksek ifadesi bildirilmiştir. Süksinat dehidrogenaz, mitokondride bulunan bir sitokrom oksidazdır ve mitokondriyal elektron taşıma zincirinde ve trikarboksilik asit (TCA) döngüsünde önemli roller oynamaktadır (Fuentes vd. 2011). Bu çalışmada, TCA döngüsünde fonksiyon gören enzimlerin ifade seviyelerindeki artış, bitkinin Cd toksisitesine karşı koyabilmek için ATP, NADH ve FADH₂ üretebildiğini göstermektedir.

Bitki mitokondrilerinin Cd'nin hedefleri arasında yer aldığı ve elektron taşıma zincirinin Cd toksisitesinden ciddi şekilde etkilendiği iyi bilinmektedir (Finger–Teixeira vd. 2021). Mevcut araştırmada, mitokondriyal elektron taşıma zinciri kompleks I alt birimlerinin (NADH dehidrogenaz [ubikinon] 1 beta alt kompleks alt birimi 9, NADH dehidrogenaz [ubikinon] flavoprotein 1, NADH dehidrogenaz [ubikinon] demir–kükürt proteini 4, NADH dehidrogenaz [ubikinon] demir–kükürt proteini 6, NADH ubikinon oksidoredüktaz 1 ve NADH–ubikinon oksidoredüktaz 24 kDa alt birimi) ifade seviyesi artan yönde düzenlenmiştir. Bununla birlikte, Tü+Cd uygulaması NADH ubikinon oksidoredüktaz 1 proteinin ifade seviyesinde ilave artışa neden olmuştur. Sitokrom c elektronları, mitokondriyal elektron taşıma zincirindeki son protein taşıyıcısı olan sitokrom oksidaz kompleksine aktarmaktadır. Mevcut araştırmada, Tü+Cd uygulaması iki sitokrom c proteinin ifade seviyesinde artışa neden olmuştur. Bununla birlikte, Cd stresi sitokrom c oksidaz polipeptid Vb, sitokrom c oksidaz alt birimi 1, sitokrom c oksidaz alt birimi 2 ve sitokrom c oksidaz alt birimi 5C proteinlerinin ifade seviyesini azalan yönde düzenlerken, Tü+Cd uygulaması bu proteinlerinin ifadesini Cd uygulamasına göre artırmıştır. Sitokrom c oksidaz, solunum zincirinin son bileşenidir (kompleks IV) ve iç mitokondriyal membranda bulunur. Moleküler oksijenin suya indirgenmesini katalize eder, su oluşumunun serbest enerjisini membran boyunca proton taşınmasına bağlar, böylece sonunda ATP sentezlemek için kullanılan bir transmembran proton gradyanı üretir (Richter ve Ludwig 2003). Mitokondrinin iç zarında yaygın olarak bulunan ATP sentaz (kompleks V), bitkilerin büyüme, gelişme ve strese yanıt verme süreçlerinde enerji sağlamak amacıyla oksidatif fosforilasyonda önemli bir rol oynamaktadır (Kerblar vd. 2019). Mevcut araştırmada ATP sentaz delta zinciri, ATP sentaz alt birimi alfa, ATP sentaz alt birimi d ve ATP sentaz alt birimi gama proteinlerinin ifade seviyesi Cd uygulamasında azalan yönde düzenlenmiştir. Bu bulgular, enerji metabolizmasında rol alan proteinlerin Tü aracılı düzenlenmesinin mısır bitkisinde Cd toksisitesine toleransın artmasına yardımcı olabildiğini düşündürmektedir.

Normal koşullarda antioksidan savunma mekanizmaları ROT'ları düşük bir seviyede tutar ancak ROT üretimi ile detoksifikasyon arasındaki denge, Cd stresi gibi abiyotik streslerin ortaya çıkmasından sonra bozulmaktadır (Sharma ve Dietz 2009). Bitkiler Cd

stresine karşı koruma sağlamak için çeşitli koruyucu mekanizmalar geliştirmiş, bunların arasında en sık bildirilenler anti-ROT aktivasyonu ve antioksidan savunmalardır (Guo vd. 2015, Sun vd. 2016). Mevcut çalışmada, karşılaştırmalı proteomik verilerden antioksidan savunma sisteminde yer alan çok sayıda enzim, kontrole göre Cd uygulamasında daha yüksek seviyelerde ifade edilmiştir. Katalaz (CAT, 2 protein), L-askorbat peroksidaz (APX, 5 protein), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR, 1 protein), peroksidaz (POD, 17 protein) ve süperoksit dismutaz (SOD, 1 protein) proteinlerinin ifade seviyeleri Cd ve Tü+Cd uygulamalarında artış göstermiştir. Chen vd. (2020), SOD süperoksit radikalini H₂O₂'e dönüştürebilirken, POD, APX ve CAT, H₂O₂'yi moleküler oksijene ve suya dönüştürdüğünü bildirmiştir. Bu veriler ışığında, artan yönde düzenlenen antioksidan savunma proteinleri, Cd stresi altındaki mısır fidelerinde ROT dengesinin korunması ve dolayısıyla Cd toleransının artırılmasında önemli olabilir.

Kadmiyum stresi genellikle bitkilerde çeşitli koruyucu proteinlerin birikmesine neden olmaktadır (Sun vd. 2016). Örneğin, GSH-AsA döngüsü, H₂O₂'in ortadan kaldırılması yoluyla redoks homeostazının düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Li vd. 2018, Kaya vd. 2020). Bitki hücresindeki antioksidanlar arasında indirgenmiş glutatyon (GSH), milimolar düzeyde bolluğu ile önemli bir üyedir ve yüksek oranlarda doğrudan oksitlenebilmektedir (Pasternak vd. 2008). Ayrıca metal şelasyonunda temel malzeme olarak da görev yapmaktadır. Bu nedenle, GSH'nin hücre içi varlığı, bitkinin toksik metallerle karşı direnci için kritik öneme sahiptir. Mevcut çalışmada, GSH sentez yolları ve metabolizması ile ilişkili birçok proteinin mısır yapraklarında Cd stresinden sonra artan yönde düzenlendiği belirlenmiştir. GSH metabolizmasında önemli bir enzim olan glutatyon-S-transferaz (GST), oksidatif strese karşı korur ve ağır metallerin sekestrasyonuna yardımcı olmaktadır (Kumar vd. 2013). Mevcut araştırmada, çok sayıda GST proteininin ifade seviyesi Cd ve Tü+Cd uygulamasında artan yönde düzenlenmiştir. GST'ler, GSH'nin ağır metaller gibi toksik maddelere bağlanmasını katalize etmekte ve oluşan kompleks ATP bağlayıcı taşıyıcı ile vakuole taşınmaktadır (Edwards vd. 2000). Bununla birlikte, glutatyon sentaz, glutatyon redüktaz, glutatyon dehidrogenaz ve laktoylglutatyon liyaz gibi GSH metabolizması ile ilişkili birçok protein Cd ve Tü+Cd uygulamalarında artan yönde düzenlenmiştir. ROT temizlemede

önemli olan GSH, abiyotik streslere yanıt olarak koruyucu bir moleküldür; konsantrasyonu ve redoks durumu, ROT'lardan kaynaklanan oksidatif sinyallerin iletilmesinde ve antioksidan yanıtı aktive etmede çok önemlidir (Ball vd. 2004). Ayrıca tiyoredoksin bağımlı peroksiredoksinlerin, bitkilerde ROT detoksifikasyonuna ve Cd toksisitesine karşı antioksidan savunmaya yol açan AsA ve GSH metabolizmasında yer alan ortak gen ağlarını paylaşan önemli bir antioksidan proteinleri olduğu bildirilmiştir (Das vd. 2021). Bitkilerde glutaredoksinlerin ağır metal detoksifikasyonunu ve redoks durumunun homeostazını düzenleyen önemli enzimler olduğu bildirilmiştir (Rouhier 2010). Mevcut araştırmada, Cd ve Tü+Cd uygulamaları çok sayıda tiyoredoksin, glutaredoksin ve glutaredoksin-bağımlı peroksiredoksin proteinin ifade seviyelerini artırmıştır. Bu sonuçlar, mısır fidelerinde Cd stresini tolere edebilmek için adaptif yanıtları desteklemede GSH'nin rolü olabileceğini göstermektedir.

Proteinin doğru katlanması ve taşınmasının, çeşitli çevresel streslere maruz kalan bitkilerde normal hücrel işlevlerin sürdürülmesi için oldukça önemli olduğu belirtilmiştir (Wang vd. 2004). Isı şoku proteinleri (HSP'ler), moleküler şaperonlar olarak hareket etmekte ve protein katlanması, taşınması, bozunması ve protein yapı stabilizasyonunu düzenlemeye katkıda bulunmaktadır (Wang vd. 2004, Sadura vd. 2020). Ayrıca HSP'ler, strese duyarlı proteinler olarak adlandırılır ve ağır metal stresi altında proteinlerin korunması ve onarılmasında ve hücrel homeostazda önemli bir rol oynarlar. HSP'ler, moleküler kütlelerine göre HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100 ve küçük HSP'ler (sHSP'ler) olmak üzere altı ana alt aileye ayrılmaktadır (Wang vd. 2004). HSP70, en çok çalışılan HSP türüdür ve N-terminal ATPaz domaini, substrat bağlanma domaini ve değişken bir C-terminal kapak bölgesi domaini ile karakterize edilmektedir (Dragovic vd. 2006). HSP90, normal koşullar altında gelişim evresindeki hücrelerin önemli bir bileşenidir ve protein translokasyonu, katlanması ve parçalanmasına yardımcı olmaktadır (Pratt vd. 2001). Mevcut araştırmada, Cd ve Tü+Cd uygulamaları mısır yapraklarında ısı şoku 70 kDa proteini (HSP70), ısı şoku ile ilişkili 70 kDa proteini 2, ısı şoku proteini 90 (HSP90) ve HSP70-HSP90 düzenleyici proteini 3 gibi çok sayıda HSP'nin ifade seviyesinde artışa neden olmuştur. Önceki çalışmalarda, HSP70 ve HSP90 proteinlerinin Cd stresi tarafından artan yönde düzenlendiği bildirilmiştir (Huang vd. 2019, Zhang vd. 2022). HSP'lere ek olarak

mevcut araştırmada çok sayıda farklı şaperon proteininin (ClpC1, dnaJ 10, dnaJ A6, CPN60, CPN10 ve eř-şaperon proteini p23) ifade seviyesi Cd uygulamasında artan yönde düzenlenirken T+Cd uygulaması bazı şaperonin proteinlerinin ifadesinde ilave artışa neden olmuştur. Bu sonuçlara dayanarak, Cd stresi altındaki mısır fidelerinde HSP ve şaperon proteinleri sayesinde protein denatürasyonu ve yanlış katlanmaların engellenebileceği ve/veya zarar görmüş proteinlerin renatrasyonunun sağlanabileceği ileri sürülebilir.

Hücrelerde ařırđ Cd birikimine bağlı olarak oluşan ROT'lar proteinlerdeki amino asitlerinin modifikasyonlarına yol açabilmektedir. Oksitlenmiş proteinlerin birikimi, protein oksidasyonu ve oksitlenmiş protein bozunma oranını yansıtmaktadır. Oksitlenmiş proteinlerin proteazlar tarafından bozunması en önemli mekanizmadır (Pena vd. 2006). Bitkiler hasarlı veya yanlış katlanmış proteinleri, translasyon sonrası modifiye edilmiş proteinleri ve yabancı proteinleri yeniden kullanılmak üzere amino asitlere parçalayabilir ve böylece normal bitki yaşam aktivitelerini sürdürebilir (Chen vd. 2017). Bitki proteazomu, proteinlerin seçici degradasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Ubikitin ve proteazom bileşenleri gibi proteazom aracılı protein bozunmasında yer alan çeşitli proteinlerin, Cd stresi altında farklı şekilde ifade edildiği bildirilmiştir (Marmioli vd. 2015, Xu vd. 2017). Ubikitin proteazom yolağı, ubikitin-aktifleştirici enzim (E1), ubikitin-konjüge edici enzim (E2) ve ubikitin-protein ligaz (E3) enzimlerinden oluşmaktadır (Liu vd. 2020). Mevcut araştırmada, Cd ve T+Cd uygulamaları E1 ubikitin-aktifleştirici ve E2 ubikitin-konjüge edici enzimlerinin ifade seviyelerinde artışa neden olurken, E3 ubikitin-protein ligaz RGLG1 enziminin ifadesini azaltmıştır. Bununla birlikte, Cd'a göre T+Cd uygulaması E3 ubikitin-protein ligaz RGLG1 enziminin ifadesini kontrol seviyesine getirmiştir. Ökaryotik hücrelerde 26S proteazomun, ubikitin ile işaretlenmiş proteinlerini küçük peptitlere sindiren büyük bir proteolitik kompleks olduğu bildirilmiştir (Collins ve Goldberg 2017). Mevcut araştırmada, 26S proteazom ATPaz dıřđ düzenleyici alt birimlerinin yanı sıra proteazom alt birimi alfa ve beta proteinlerinin ifade seviyelerinin Cd ve T+Cd uygulamalarında artan yönde düzenlendiği belirlenmiştir. Sonuç olarak, Cd stresine cevapta yer alan bu DEP'ler, mısır fidelerinde yanlış katlanmış proteinlerin uzaklaştırılmasına yardımcı olduğu söylenebilir.

Kadmiyum stresinin bitkilerde sinyalleme yollarını aktive ettiği ve bu sinyallerin bitkilerde toksik metallerle karşı savunma mekanizmasının harekete geçirilmesi için gerekli olduğu bildirilmiştir (Li vd. 2023). Bitki gelişimi sırasında gen ifadesini koordine eden ve bitkinin Cd ve diğer ağır metal sinyallerine yanıt vermesini sağlayan bir dizi iç sinyal bulunmaktadır (Chmielowska-Bak vd. 2014). Mevcut proteomik analizler, sinyal iletiminde rol oynayan 14-3-3 benzeri proteinleri, anneksin ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) proteinlerinin Cd ve Tü+Cd uygulamalarında artan yönde düzenlendiğini göstermiştir. Benzer olarak, MAPK gibi bir dizi sinyal molekülü ile etkileşen 14-3-3 protein grubu, hücrenin çeşitli yollarıyla ilişkili yaygın ve çok işlevli düzenleyiciler içermektedir (Ormancey vd. 2017). Önceki çalışmalar, 14-3-3 proteinlerinin yüksek bitkilerde çeşitli proteinlerin aktivitesini düzenleyerek stres cevaplarında ve sinyal iletiminde önemli roller oynadığını göstermiştir (Chen vd. 2015, Zhang vd. 2022). Ayrıca, H⁺-ATPaz'lar ile 14-3-3 proteinleri arasındaki etkileşimlerin bitkinin ağır metal toleransını etkilediği gösterilmiştir (Xie vd. 2017, Szuba vd. 2020). MAPK basamakları ökaryotlarda sinyal iletiminin evrensel modülleridir ve biyotik ve abiyotik stres tepkilerinde önemli bir rol oynarlar (Ichimura vd. 2002). Hidrojen peroksit gibi ROT'ların MAPK kaskadlarını aktive ettiği iyi bilinmektedir (Asai vd. 2008). MAPK yolunun Cd kaynaklı ROT'lar ile aktive edildiği rapor edilmiştir (Chen vd. 2008). Anneksin proteinlerinin endomembran ve plazma membranında Ca²⁺-geçirgen bir kanal olarak görev yaptığı bilinmektedir (Kurusu vd. 2015). Wu vd. (2022), bitki anneksin proteinlerinin abiyotik strese karşı olumlu yanıt verdiğini belirtmiştir. Sonuç olarak sinyal iletim yolağında fonksiyon gören bu proteinlerin Cd stresi altında mısır fidelerinde sinyalleme, transkripsiyon aktivasyonu ve savunmada yer alan hedef proteinleri düzenlemek de dahil olmak üzere çeşitli stres yanıtlarını düzenlemede rolü olabilir.

Araştırmamızda, Cd toksisitesi fide büyümesini ve klorofil içeriğini ciddi şekilde azaltmış buna karşın Tü uygulaması bu azalmaları önemli ölçüde hafifletmiştir. Ayrıca Tü'nün güçlü bir antioksidan gibi davrandığını ve ROT'ların doğrudan veya dolaylı detoksifikasyonu yoluyla Cd'un neden olduğu oksidatif strese karşı hücrel koruma sağladığını da göstermiştir. Ayrıca mevcut araştırmada, mısır fidelerinde Cd stresi

koşullarında T  uygulamasının Cd toksisitesinin hafifletilmesine ilişkin proteom profilleri ortaya çıkarılmıştır. Etiketsiz nLC–MS/MS yaklaşımı kullanılarak, %1 FDR ile toplam 3215 proteininin ifade seviyesi güvenli bir şekilde değerlendirilmiştir. Ayrıca, Cd ve/veya T +Cd uygulanmış mısır fidelerinde tanımlanan 1573 proteinin bolluğu önemli değışiklikler göstermiştir. Kontrole göre Cd veya T +Cd uygulamasında DEP’lerin 1237 proteinin artan yönde ve 336 proteinin azalan yönde düzenlendiğı belirlenmiştir. GO ve KEGG yolak analizleri ile tanımlanan proteinlerin enerji ve karbohidrat metabolizması, CO₂ asimilasyonu ve fotosentezi, sinyal iletimi ve protein metabolizması ve antioksidan savunması dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde yer aldığı ortaya konulmuştur. Sonuç olarak, mısır fidelerinde proteomik analizlerle tespit edilen DEP’lerin T  teşvikli Cd toleransında önemli rolleri olduğı ileri sürülebilir.

6. KAYNAKLAR

- Abbas T, Rizwan M, Ali S, Adrees M, Zia-ur-Rehman M, Qayyum M F, vd., 2018, Effect of Biochar on Alleviation of Cadmium Toxicity in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Grown on Cd-Contaminated Saline Soil, Environmental Science and Pollution Research, 25, 25668–25680.
- Abedi T, Mojiri A, 2020, Cadmium Uptake by Wheat (*Triticum aestivum* L.): An Overview, Plants, 9, 500.
- Adil M F, Sehar S, Chen G, Chen Z H, Jilani G, Chaudhry A N, vd., 2020, Cadmium–Zinc Cross–Talk Delineates Toxicity Tolerance in Rice via Differential Genes Expression and Physiological/Ultrastructural Adjustments, Ecotoxicology and Environmental Safety, 190, 110076.
- Aebi H, 1984, Catalase in Vitro, In Methods in Enzymology, 105, 121–126.
- Afzal M, Yu M, Tang C, Zhang L, Muhammad N, Zhao H, vd., 2019, The Negative Impact of Cadmium on Nitrogen Transformation Processes in a Paddy Soil is Greater under Non-Flooding than Flooding Conditions, Environment International, 129, 451–460.
- Ahmad P, Ozturk M, Gucel S, 2012, Oxidative Damage and Antioxidants Induced by Heavy Metal Stress in Two Cultivars of Mustard (*Brassica juncea* L.) Plants, Fresenius Environ Bull, 21, 2953–2961.
- Ahmad R, Ali S, Rizwan M, Dawood M, Farid M, Hussain A, vd., 2020, Hydrogen Sulfide Alleviates Chromium Stress on Cauliflower by Restricting Its Uptake and Enhancing Antioxidative System, Physiologia Plantarum, 168, 289–300.
- Ahmad M, Waraich E A, Hussain S, Ayyub C M, Ahmad Z, Zulfiqar U, 2021a, Improving Heat Stress Tolerance in *Camelina sativa* and *Brassica napus* Through Thiourea Seed Priming, Journal of Plant Growth Regulation, 1–17.
- Ahmad M, Waraich E A, Zulfiqar U, Ullah A, Farooq M, 2021b, Thiourea Application Improves Heat Tolerance in Camelina (*Camelina sativa* L. Crantz) by Modulating Gas Exchange, Antioxidant Defense and Osmoprotection, Industrial Crops and Products, 170, 113826.
- Ahmad S, Aziz A U R, Ullah A, Raza M A, 2022a, Effect of Vermicompost and Organic Matter in Enhancing Wheat Tolerance Against Drought Stress,

- International Journal of Agriculture and Biosciences, 11, 165–167.
- Ahmad M, Waraich E A, Zulfiqar U, Hussain S, Yasin M U, Farooq M, 2022b, Thiourea Application Improves the Growth and Seed and Oil Yields in Canola by Modulating Gas Exchange, Antioxidant Defense, and Osmoprotection under Heat Stress, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 22, 3655–3666.
- Ahmad M, Waraich E A, Zulfiqar U, Ullah A, Farooq M, 2023, Thiourea Application Increases Seed and Oil Yields in Camelina under Heat Stress by Modulating the Plant Water Relations and Antioxidant Defense System, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 23, 290–307.
- Ahmed S, Nawata E, Hosokawa M, Domae Y, Sakuratani T, 2002, Alterations in Photosynthesis and Some Antioxidant Enzymatic Activities of Mungbean Subjected to Waterlogging, *Plant Science*, 163, 117–123.
- Ahsan N, Renaut J, Komatsu S, 2009, Recent Developments in the Application of Proteomics to the Analysis of Plant Responses to Heavy Metals, *Proteomics*, 9, 2602–2621.
- Alam I, Sharmin S A, Kim K H, Kim Y G, Lee J J, Lee B H, 2013, An Improved Plant Leaf Protein Extraction Method for High Resolution Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Comparative Proteomics, *Biotechnic and Histochemistry*, 88, 61–75.
- Alharbi O M, Khattab R A, Ali I, 2018, Health and Environmental Effects of Persistent Organic Pollutants, *Journal of Molecular Liquids*, 263, 442–453.
- Alsafran M, Usman K, Ahmed B, Rizwan M, Saleem M H, Al Jabri H, 2022, Understanding the Phytoremediation Mechanisms of Potentially Toxic Elements: A Proteomic Overview of Recent Advances, *Frontiers in Plant Science*, 13, 881242.
- Alsahli A A, Bhat J A, Alyemeni M N, Ashraf M, Ahmad P, 2020, Hydrogen Sulfide (H₂S) Mitigates Arsenic (As)–Induced Toxicity in Pea (*Pisum sativum* L.) Plants by Regulating Osmoregulation, Antioxidant Defense System, Ascorbate Glutathione Cycle and Glyoxalase System, *Journal of Plant Growth Regulation*, 1, 2515–2531.

- Amudha J, Balasubramani G, 2011, Recent Molecular Advances to Combat Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants, *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 6, 31–58.
- Araújo M J, Sousa M L, Fonseca E, Felpeto A B, Martins J C, Vázquez M, vd., 2022, Proteomics Reveals Multiple Effects of Titanium Dioxide and Silver Nanoparticles in the Metabolism of Turbot, *Scophthalmus maximus*, *Chemosphere*, 308, 136110.
- Argüello J M, Gonzalez–Guerrero M, Raimunda D, 2011, Bacterial Transition Metal P1B–ATPases: Transport Mechanism and Roles in Virulence, *Biochemistry*, 9940–9949.
- Asada K 1992, Ascorbate Peroxidase–A Hydrogen Peroxide Scavenging Enzyme in Plants, *Physiologia Plantarum*, 85, 235–241.
- Asai S, Ohta K, Yoshioka H, 2008, MAPK Signaling Regulates Nitric Oxide and NADPH Oxidase–Dependent Oxidative Bursts in *Nicotiana benthamiana*, *The Plant Cell*, 20, 1390–1406.
- Audet P, Charest C, 2007, Heavy Metal Phytoremediation from a Meta–Analytical Perspective, *Environmental Pollution*, 147, 231–237.
- Awasthi S, Chauhan R, Dwivedi S, Srivastava S, Srivastava S, Tripathi R D, 2018, A Consortium of Alga (*Chlorella vulgaris*) and Bacterium (*Pseudomonas putida*) for Amelioration of Arsenic Toxicity in Rice: A Promising and Feasible Approach, *Environmental and Experimental Botany*, 150, 115–126.
- Aydinalp C, Marinova S, 2009, The Effects of Heavy Metals on Seed Germination and Plant Growth on Alfalfa Plant (*Medicago sativa*), *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 15, 347–350.
- Ball L, Accotto G P, Bechtold U, Creissen G, Funck D, Jimenez A, vd., 2004, Evidence for a Direct Link Between Glutathione Biosynthesis and Stress Defense Gene Expression in Arabidopsis, *The Plant Cell*, 16, 2448–2462.
- Banda D M, Pereira J H, Liu A K, Orr D J, Hammel M, He C, vd., 2020, Novel Bacterial Clade Reveals Origin of Form I Rubisco, *Nature Plants*, 6, 1158–1166.
- Baqer R A, Al–Kaaby H K, Adul–Qadir L H, 2020, Antioxidant Responses in Wheat Plants (*Triticum aestivum* L.) Treated with Thiourea, *Plant Archives*, 20, 717–22.
- Bari M A, Akther M S, Reza M A, Kabir A H, 2019, Cadmium Tolerance is Associated

- with the Root-Driven Coordination of Cadmium Sequestration, Iron Regulation, and ROS Scavenging in Rice, *Plant Physiology and Biochemistry*, 136, 22–33.
- Beauchamp C, Fridovich I, 1971, Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels, *Analytical Biochemistry*, 44, 276–287.
- Begum N, Hu Z, Cai Q, Lou L, 2019, Influence of PGPB Inoculation on *HSP70* and *HMA3* Gene Expression in Switchgrass under Cadmium Stress, *Plants* 8, 504.
- Benavides M P, Gallego S M, Tomaro M L, 2005, Cadmium Toxicity in Plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 21–34.
- Bhat J A, Ahmad P, Corpas F J, 2021, Main Nitric Oxide (NO) Hallmarks to Relieve Arsenic Stress in Higher Plants, *Journal of Hazardous Materials*, 406, 124289.
- Blum A, 2017, Osmotic Adjustment is a Prime Drought Stress Adaptive Engine in Support of Plant Production, *Plant Cell Environ*, 40, 4–10.
- Braconi D, Bernardini G, Santucci A, 2011, Linking Protein Oxidation to Environmental Pollutants: Redox Proteomic Approaches, *Journal of Proteomics*, 74, 2324–2337.
- 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.
- Brahim S, Joke D, Ann C, Jean-Paul N, Marjo T, Arja T, vd., 2010, Leaf Proteome Responses of *Arabidopsis thaliana* Exposed to Mild Cadmium Stress, *Journal of Plant Physiology*, 167, 247–254.
- Cai Y, Cao F, Cheng W, Zhang G, Wu F, 2011, Modulation of Exogenous Glutathione in Phytochelatins and Photosynthetic Performance against Cd Stress in the Two Rice Genotypes Differing in Cd tolerance, *Biological Trace Element Research*, 143, 1159–1173.
- Carneiro J M T, Chacón-Madrid K, Galazzi R M, Campos B K, Arruda S C 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.
- Cassidy L, Helbig A O, Kaulich P T, Weidenbach K, Schmitz R A, Tholey A, 2021, Multidimensional Separation Schemes Enhance the Identification and Molecular

- Characterization of Low Molecular Weight Proteomes and Short Open Reading Frame-Encoded Peptides in Top-Down Proteomics, *Journal of Proteome Research*, 230, 103988.
- Chang Y, Zouari M, Gogorcena Y, Lucena J J, Abadía J, 2003, Effects of Cadmium and Lead on Ferric Chelate Reductase Activities in Sugar Beet Roots, *Plant Physiology and Biochemistry*, 41, 999–1005.
- Chang G G, Tong L, 2003, Structure and Function of Malic Enzymes, A New Class of Oxidative Decarboxylases, *Biochemistry*, 42, 12721–12733.
- Chang Y S, Chang Y J, Lin C T, Lee M C, Wu C W, Lai Y H, 2013, Nitrogen Fertilization Promotes the Phytoremediation of Cadmium in *Pentas lanceolata*, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 85, 709–714.
- Chaoui A, Mazhoudi S, Ghorbal M H, El Ferjani E, 1997, Cadmium and Zinc Induction of Lipid Peroxidation and Effects on Antioxidant Enzyme Activities in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Plant Science*, 127, 139–147.
- Chellaiah E R, 2018, Cadmium (Heavy Metals) Bioremediation by *Pseudomonas aeruginosa*: A Minireview, *Applied Water Science*, 8, 154.
- Chen L, Liu L, Huang S, 2008, Cadmium Activates the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway via Induction of Reactive Oxygen Species and Inhibition of Protein Phosphatases 2A and 5, *Free Radical Biology and Medicine*, 45, 1035–1044.
- Chen F, Wang F, Wu F B, Mao W H, Zhang G P, Zhou M X, 2010, Modulation of Exogenous Glutathione in Antioxidant Defense System Against Cd Stress in the Two Barley Genotypes Differing in Cd Tolerance, *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 663–672.
- Chen L, Han Y, Jiang H, Korpelainen H, Li C, 2011, Nitrogen Nutrient Status Induces Sexual Differences in Responses to Cadmium in *Populus yunnanensis*, *Journal of Experimental Botany*, 62, 5037–5050.
- Chen G, Liu Y, Wang R, Zhang J, Owens G, 2013, Cadmium Adsorption by Willow Root: The Role of Cell Walls and Their Subfractions, *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 5665–5672.
- Chen Q, Kan Q, Wang P, Yu W, Yu Y, Zhao Y, vd., 2015, Phosphorylation and Interaction with the 14–3–3 Protein of the Plasma Membrane H^+ -ATPase Are

- Involved in the Regulation of Magnesium-Mediated Increases in Aluminum-Induced Citrate Exudation in Broad Bean (*Vicia faba* L.), *Plant and Cell Physiology*, 56, 1144–1153.
- Chen S, Zhao H, Wang M, Li J, Wang Z, Wang F, vd., 2017, Overexpression of E3 Ubiquitin Ligase Gene *AdBiL* Contributes to Resistance Against Chilling Stress and Leaf Mold Disease in Tomato, *Frontiers in Plant Science*, 8, 1109.
- Chen Q, Lu X, Guo X, Pan Y, Yu B, Tang Z, vd., 2018a, Differential Responses to Cd Stress Induced by Exogenous Application of Cu, Zn or Ca in the Medicinal Plant *Catharanthus roseus*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 157, 266–275.
- Chen H, Yang X, Wang P, Wang Z, Li M, Zhao F J, 2018b, Dietary Cadmium Intake from Rice and Vegetables and Potential Health Risk: A Case Study in Xiangtan, Southern China, *Science of the Total Environment*, 639, 271–277.
- Chen H, Zhang W, Yang X, Wang P, McGrath S P, Zhao F J, 2018c, Effective Methods to Reduce Cadmium Accumulation in Rice Grain, *Chemosphere*, 207, 699–707.
- Chen P, Chen T, Li Z, Jia R, Luo D, Tang M, vd., 2020, Transcriptome Analysis Revealed Key Genes and Pathways Related to Cadmium-Stress Tolerance in Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.), *Industrial Crops and Products*, 158, 112970.
- Chen X, Tao H, Wu Y, Xu X, 2022a, Effects of Cadmium on Metabolism of Photosynthetic Pigment and Photosynthetic System in *Lactuca sativa* L. Revealed by Physiological and Proteomics Analysis, *Scientia Horticulturae*, 305, 111371.
- 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-Bąk J, Gzyl J, Rucińska-Sobkowiak R, Arasimowicz-Jelonek M, Deckert J, 2014, The New Insights into Cadmium Sensing, *Frontiers in Plant Science*, 5, 245.
- Cobbett C, Goldsbrough P, 2002, Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis, *Annual Review of Plant Biology*, 53, 159–182.
- Collins G A, Goldberg A L, 2017, The Logic of the 26S Proteasome, *Cell*, 169, 792–806.
- Corguinha A P B, De-Souza G A, Gonçalves V C, Carvalho C D A, De-Lima W E A,

- Martins F A D, vd., 2015, Assessing Arsenic, Cadmium, and Lead Contents in Major Crops in Brazil for Food Safety Purposes, *Journal of Food Composition and Analysis*, 37, 143–150.
- Cvjetko P, Zovko M, Balen B, 2014, Proteomics of Heavy Metal Toxicity in Plants, *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 65, 1–18.
- 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.
- Dai C, Cui W, Pan J, Xie Y, Wang J, Shen W, 2017, Proteomic Analysis Provides Insights into the Molecular Bases of Hydrogen Gas–Induced Cadmium Resistance in *Medicago sativa*, *Journal of Proteome Research*, 152, 109–120.
- Dai H, Wei S, Noori A, 2020, The Mechanism of Chelator Improved the Tolerance and Accumulation of Poplar to Cd Explored Through Differential Expression Protein Based on iTRAQ, *Journal of Hazardous Materials*, 393, 122370.
- DalCorso G, Farinati S, Maistri S, Furini A, 2008, How Plants Cope with Cadmium: Staking All on Metabolism and Gene Expression, *Journal of Integrative Plant Biology*, 50, 1268–1280.
- DalCorso G, Farinati S, Furini A, 2010, Regulatory Networks of Cadmium Stress in Plants, *Plant Signaling and Behavior*, 5, 663–667.
- Damkjaer J T, Kereiche S, Johnson M P, Kovacs L, Kiss A Z, Boekema E J, vd., 2009, The Photosystem II Light–Harvesting Protein Lhcb3 Affects the Macrostructure of Photosystem II and the Rate of State Transitions in Arabidopsis, *The Plant Cell*, 21, 3245–3256.
- Das N, Bhattacharya S, Maiti M K, 2016, Enhanced Cadmium Accumulation and Tolerance in Transgenic Tobacco Overexpressing Rice Metal Tolerance Protein Gene *OsMTP1* Is Promising for Phytoremediation, *Plant Physiology and Biochemistry*, 105, 297–309.
- Das U, Rahman M A, Ela E J, Lee K W, Kabir A H, 2021, Sulfur Triggers Glutathione and Phytochelatin Accumulation Causing Excess Cd Bound to the Cell Wall of Roots in Alleviating Cd–Toxicity in Alfalfa, *Chemosphere*, 262, 128361.
- Dehghani M H, Sanaei D, Ali I, Bhatnagar A, 2016, Removal of Chromium (VI) from Aqueous Solution Using Treated Waste Newspaper as a Low–Cost Adsorbent:

- Kinetic Modeling and Isotherm Studies, *Journal of Molecular Liquids*, 215, 671–679.
- Dhir B, 2021, Role of Transporters of Copper, Manganese, Zinc, and Nickel in Plants Exposed to Heavy Metal Stress, Roychoudhury A, Tripathi D K, Deshmukh R (Ed.), *Metal and Nutrient Transporters in Abiotic Stress* (145–168), Elsevier, 251p, United States.
- Dias M C, Monteiro C, Moutinho–Pereira J, Correia C, Gonçalves B, Santos C, 2013, Cadmium Toxicity Affects Photosynthesis and Plant Growth at Different Levels, *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 1281–1289.
- Diaz–Vivancos P, de Simone A, Kiddle G, Foyer C H, 2015, Glutathione–Linking Cell Proliferation to Oxidative Stress, *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 1154–1164.
- Dong Q, Fang J, Huang F, Cai K, 2019, Silicon Amendment Reduces Soil Cd Availability and Cd Uptake of Two *Pennisetum* Species, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16, 1624.
- Dragovic Z, Broadley S A, Shomura Y, Bracher A, Hartl F U, 2006, Molecular Chaperones of the Hsp110 Family Act As Nucleotide Exchange Factors of Hsp70s, *The EMBO Journal*, 25, 2519–2528.
- Durand T C, Sergeant K, Planchon S, Carpin S, Label P, Morabito D, vd., 2010, Acute Metal Stress in *Populus tremula* x *P. alba* (717–1B4 Genotype): Leaf and Cambial Proteome Changes Induced by Cadmium²⁺, *Proteomics*, 10, 349–368.
- Edwards R, Dixon D P, Walbot V, 2000, Plant Glutathione S–Transferases: Enzymes with Multiple Functions in Sickness and in Health, *Trends in Plant Science*, 5, 193–198.
- El–Amier Y, Elhindi K, El–Hendawy S, Al–Rashed S, Abd–ElGawad A, 2019, Antioxidant System and Biomolecules Alteration in *Pisum sativum* under Heavy Metal Stress and Possible Alleviation by 5–Aminolevulinic Acid, *Molecules*, 24, 4194.
- Elçi S, Kolsarıcı Ö, Geçit H H, 1987, *Tarla Bitkileri*, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ofset Basım, 30, Ankara.
- Emamverdian A, Ding Y, Mokhberdoran F, Xie Y, 2015, Heavy Metal Stress and Some Mechanisms of Plant Defense Response, *The Scientific World Journal*, 2015,

756120.

- Erenstein O, Jaleta M, Sonder K, Mottaleb K, Prasanna B M, 2022, Global Maize Production, Consumption and Trade: Trends and R and D Implications, *Food Security*, 14, 1295–1319.
- Fan K T, Rendahl A K, Chen W P, Freund D M, Gray W M, Cohen J D, vd., 2016, Proteome Scale–Protein Turnover Analysis Using High Resolution Mass Spectrometric Data from Stable–Isotope Labeled Plants, *Journal of Proteome Research*, 15, 851–867.
- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra S M A, 2009, Plant Drought Stress: Effects, Mechanisms and Management, *Agronomy for Sustainable Development*, 28, 185–212.
- Farooq M, Nadeem F, Gogoi N, Ullah A, Alghamdi S S, Siddique K H M, 2017, Heat Stress in Grain Legumes during Reproductive and Grain–Filling Phases, *Crop and Pasture Science*, 68, 985–1005.
- Feng X, Ma Q, 2021, Transcriptome and Proteome Profiling Revealed Molecular Mechanism of Selenium Responses in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.), *BMC Plant Biology*, 21, 584.
- Finger–Teixeira A, Ishii–Iwamoto E L, Marchiosi R, Coelho É M P, Constantin R P, Dos Santos W D, vd., 2021, Cadmium Uncouples Mitochondrial Oxidative Phosphorylation and Induces Oxidative Cellular Stress in Soybean Roots, *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 67711–67723.
- Fu S, Lu Y, Zhang X, Yang G, Chao D, Wang Z, vd., 2019, The ABC Transporter ABCG36 Is Required for Cadmium Tolerance in Rice, *Journal of Experimental Botany*, 70, 5909–5918.
- Fuentes D, Meneses M, Nunes–Nesi A, Araujo W L, Tapia R, Gómez I, vd., 2011, A Deficiency in the Flavoprotein of Arabidopsis Mitochondrial Complex II Results in Elevated Photosynthesis and Better Growth in Nitrogen–Limiting Conditions, *Plant Physiology*, 157, 1114–1127.
- Gallego S M, Benavides M P, Tomaro M L, 1996, Effect of Heavy Metal Ion Excess on Sunflower Leaves: Evidence for Involvement of Oxidative Stress, *Plant Science*, 121, 151–159.
- 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.
- Galvez L, González E M, Arrese-Igor C, 2005, Evidence for Carbon Flux Shortage and Strong Carbon/Nitrogen Interactions in Pea Nodules at Early Stages of Water Stress, *Journal of Experimental Botany*, 56, 2551–2561.
- Gan H H, Jiao Y, Jia J B, Wang X, Li H, Shi W G, vd., 2016, Phosphorus and Nitrogen Physiology of Two Contrasting Poplar Genotypes When Exposed to Phosphorus and/or Nitrogen Starvation, *Tree Physiology*, 36, 22–38.
- Ghate T, Soneji K, Barvkar V, Ramakrishnan P, Prusty D, Islam S R, vd., 2022, Thiourea Mediated ROS–Metabolites Reprogramming Restores Root System Architecture under Arsenic Stress in Rice, *Journal of Hazardous Materials*, 435, 129020.
- Ghori N H, Ghori T, Hayat M Q, Imadi S R, Gul A, Altay V, vd., 2019, Heavy Metal Stress and Responses in Plants, *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16, 1807–1828.
- 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.
- Gillet S, Decottignies P, Chardonnet S, Le Maréchal P, 2006, Cadmium Response and Redoxin Targets in *Chlamydomonas reinhardtii*: A Proteomic Approach, *Photosynthesis Research*, 89, 201–211.
- 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.
- Goodin M M, 2018, Protein Localization and Interaction Studies in Plants: Toward Defining Complete Proteomes by Visualization, *Advances in Virus Research*, 100, 117–144.
- Gu J G, Zhou Q X, 2002, Cleaning up Through Phytoremediation: A Review of Cd Contaminated Soils, *Ecologic Science*, 21, 352–356.
- Guerinot M L, 2000, The ZIP Family of Metal Transporters, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465, 190–198.
- Guilherme M, De F S, Oliveira H M, Silva E D, 2015, Cadmium Toxicity on Seed

- Germination and Seedling Growth of Wheat *Triticum aestivum*, *Acta Scientiarum–Biological Sciences*, 37, 499.
- Guo B, Dai S, Wang R, Guo J, Ding Y, Xu Y, 2015, Combined Effects of Elevated CO₂ and Cd–Contaminated Soil on the Growth, Gas Exchange, Antioxidant Defense, and Cd Accumulation of Poplars and Willows, *Environmental and Experimental Botany*, 115, 1–10.
- Guo J, Islam M A, Lin H, Ji C, Duan Y, Liu P, vd., 2018, Genome–Wide Identification of Cyclic Nucleotide–Gated Ion Channel Gene Family in Wheat and Functional Analyses of TaCNGC14 and TaCNGC16, *Frontiers in Plant Science*, 9, 18.
- Guo B, Liu C, Liang Y, Li N, Fu Q, 2019, Salicylic Acid Signals Plant Defence Against Cadmium Toxicity, *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 2960.
- Guo H, Deng M, Yu F, Li H, Cao Z, Zeng Q, vd., 2023, Phenotypic and Proteomic Insights into Differential Cadmium Accumulation in Maize Kernels, *Genes*, 14, 2204.
- Haider S, Pal R, 2013, Integrated Analysis of Transcriptomic and Proteomic Data, *Current Genomics*, 14, 91–110.
- Haider F U, Liqun C, Coulter J A, Cheema S A, Wu J, Zhang R, vd., 2021, Cadmium Toxicity in Plants: Impacts and Remediation Strategies, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 211, 111887.
- Haider F U, Virk A L, Rehmani M I A, Skalicky M, Ata–ul–Karim S T, Ahmad N, vd., 2022, Integrated Application of Thiourea and Biochar Improves Maize Growth, Antioxidant Activity and Reduces Cadmium Bioavailability in Cadmium–Contaminated Soil, *Frontiers in Plant Science*, 12, 809322.
- Han H, Zhang H, Qin S, Zhang J, Yao L, Chen Z, vd., 2021, Mechanisms of *Enterobacter bugandensis* TJ6 Immobilization of Heavy Metals and Inhibition of Cd and Pb Uptake by Wheat Based on Metabolomics and Proteomics, *Chemosphere*, 276, 130157.
- Hasan S A, Fariduddin Q, Ali B, Hayat S, Ahmad A, 2009, Cadmium: Toxicity and Tolerance in Plants, *Journal of Environmental Biology*, 30, 165–174.
- Hasanuzzaman M, Alhaithloul H A S, Parvin K, Bhuyan M B, Tanveer M, Mohsin S M, vd., 2019, Polyamine Action under Metal/Metalloid Stress: Regulation of Biosynthesis, Metabolism, and Molecular Interactions, *International Journal of*

Molecular Sciences, 20, 3215.

- Hassan S, Mazhar W, Farooq S, Ali A, Musharraf S G, 2019, Assessment of Heavy Metals in Calcium Carbide Treated Mangoes by Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry (ICP–MS), *Food Additives and Contaminants: Part A*, 36, 1769–1776.
- Hassanein R A, Amin A A E, Rashad E S M, Ali H, 2015, Effect of Thiourea and Salicylic Acid on Antioxidant Defense of Wheat Plants under Drought Stress, *International Journal of ChemTech Research*, 7, 346–354.
- Heath R L, Packer L, 1968, Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts: I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189–198.
- Hossain M A, Hasanuzzaman M, Fujita M, 2010, Up–Regulation of Antioxidant and Glyoxalase Systems by Exogenous Glycinebetaine and Proline in Mung Bean Confer Tolerance to Cadmium Stress, *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 16, 259–272.
- Hossain Z, Hajika M, Komatsu S, 2012a, Comparative Proteome Analysis of High and Low Cadmium Accumulating Soybeans under Cadmium Stress, *Amino Acids*, 43, 2393–2416.
- Hossain M A, Piyatida P, da Silva J A T, Fujita M, 2012b, Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation, *Journal of Botany*, 2012, 872875.
- Hossain M A, Hoque M A, Burritt D J, Fujita M, 2014, Proline Protects Plants Against Abiotic Oxidative Stress: Biochemical and Molecular Mechanisms, Ahmad P (Ed.), *Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling* (477–522), Academic Press, 635p.
- Huang M, Zhu H, Zhang J, Tang D, Han X, Chen L, vd., 2017, Toxic Effects of Cadmium on Tall Fescue and Different Responses of the Photosynthetic Activities in the Photosystem Electron Donor and Acceptor Sides, *Scientific Reports*, 7, 14387.
- Huang J, Wu X, Tian F, Chen Q, Luo P, Zhang F, vd., 2019, Changes in Proteome and Protein Phosphorylation Reveal the Protective Roles of Exogenous Nitrogen in

- Alleviating Cadmium Toxicity in Poplar Plants, *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 278.
- Hussain M M, Saeed A, Khan A A, Javid S, Fatima B, 2015, Differential Responses of One Hundred Tomato Genotypes Grown under Cadmium Stress, *Genetics and Molecular Research*, 14, 13162–13171.
- Hussain B, Ashraf M N, Abbas A, Li J, Farooq M, 2021, Cadmium Stress in Paddy Fields: Effects of Soil Conditions and Remediation Strategies, *Science of The Total Environment*, 754, 142188.
- Huybrechts M, Hendrix S, Bertels J, Beemster G T S, Vandamme D, Cuypers A, 2020, Spatial Analysis of the Rice Leaf Growth Zone under Controlled and Cadmium–Exposed Conditions, *Environmental and Experimental Botany*, 177, 104120.
- Iannelli M A, Pietrini F, Fiore L, Petrilli L, Massacci A, 2002, Antioxidant Response to Cadmium in *Phragmites australis* Plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 977–982.
- Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, vd., 2002, Mitogen–Activated Protein Kinase Cascades in Plants: A New Nomenclature, *Trends in Plant Science*, 7, 301–308.
- Ikram S, Javed F, Wahid A, Ahmad R, 2014, *In vitro* Relationship Between Cadmium Stress and Thiourea in Two Barley Genotypes, *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 51, 3.
- Iqbal J, Rabbani M A, Khan S A, 2014, Genetic Variability Assessment of Maize (*Zea mays* L.) Germplasm Based on Total Seed Storage Proteins Ending Pattern Using SDS–PAGE, *European Journal of Academic Research*, 2, 2144–2160.
- Ishimaru Y, Takahashi R, Bashir K, Shimo H, Senoura T, Sugimoto K, vd., 2012, Characterizing the Role of Rice NRAMP5 in Manganese, Iron and Cadmium Transport, *Scientific Reports*, 2, 286.
- 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.
- Javed M T, Tanwir K, Akram M S, Shahid M, Niazi N K, Lindberg S, 2019, Phytoremediation of Cadmium–Polluted Water/Sediment by Aquatic

- Macrophytes: Role of Plant–Induced pH Changes, Hasanuzzaman M, Prasad M N V, Fujita M (Ed.), Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants (495–529), Academic Press, 589p.
- Jenny A, Mark W, Robin G W, Caroline A H, Alexander V R, Peter H, 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.
- Jha U C, Bohra A, Singh N P, 2014, Heat Stress in Crop Plants: Its Nature, Impacts and Integrated Breeding Strategies to Improve Heat Tolerance, *Plant Breeding*, 133, 679–701.
- Jian M, Zhang D, Wang X, Wei S, Zhao Y, Ding Q, vd., 2020, Differential Expression Pattern of the Proteome in Response to Cadmium Stress Based on Proteomics Analysis of Wheat Roots, *BMC Genomics*, 21, 1–13.
- Jiang C D, Jiang G M, Wang X, Li L H, Biswas D K, Li Y G, 2006, Increased Photosynthetic Activities and Thermostability of Photosystem II with Leaf Development of Elm Seedlings (*Ulmus pumila*) Probed by the Fast Fluorescence Rise OJIP, *Environmental and Experimental Botany*, 58, 261–268.
- Jiao Y, Grant C A, Bailey L, 2004, Effects of Phosphorus and Zinc Fertilizer on Cadmium Uptake and Distribution in Flax and Durum Wheat, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 777–785.
- Jogawat A, Yadav B, Narayan O P, 2021, Metal Transporters in Organelles and Their Roles in Heavy Metal Transportation and Sequestration Mechanisms in Plants, *Plant Physiology*, 173, 259–275.
- Júnior C A L, de Sousa Barbosa H, Galazzi R M, Koolen H H F, Gozzo F C, Arruda M A Z, 2015, Evaluation of Proteome Alterations Induced by Cadmium Stress in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Cultures, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 119, 170–177.
- Karina B B, Benavides M P, Gallego S M, Tomaro M L, 2003, Effect of Cadmium Stress on Nitrogen Metabolism in Nodules and Roots of Soybean Plants, *Functional Plant Biology*, 30, 57–64.
- Kaya C, Ashraf M, Sönmez O, 2015, Promotive Effect of Exogenously Applied Thiourea on Key Physiological Parameters and Oxidative Defense Mechanism in

- Salt-Stressed *Zea mays* L. Plants, Turkish Journal of Botany, 39, 786–795.
- Kaya C, Okant M, Ugurlar F, Alyemeni M N, Ashraf M, Ahmad P, 2019, Melatonin–Mediated Nitric Oxide Improves Tolerance to Cadmium Toxicity by Reducing Oxidative Stress in Wheat Plants, Chemosphere, 225, 627–638.
- Kaya C, Ashraf M, Alyemeni M N, Ahmad P, 2020, The Role of Nitrate Reductase in Brassinosteroid–Induced Endogenous Nitric Oxide Generation to Improve Cadmium Stress Tolerance of Pepper Plants by Upregulating the Ascorbate–Glutathione Cycle, Ecotoxicology and Environmental Safety, 196, 110483.
- Kerbler S M, Taylor N L, Millar A H, 2019, Cold Sensitivity of Mitochondrial ATP Synthase Restricts Oxidative Phosphorylation in *Arabidopsis thaliana*, New Phytologist, 221, 1776–1788.
- Khator K, Shekhawat G S, 2020, Cd–and Cu–Induced Phytotoxicity on 2–3 Leaf Stage of *Cyamopsis tetragonoloba* and Its Regulation by Nitrate Reductase and ROS Quenching Enzyme, Acta Physiologiae Plantarum, 42, 120.
- Kieffer P, Dommes J, Hoffmann L, Hausman J F, Renaut J, 2008, Quantitative Changes in Protein Expression of Cadmium–Exposed Poplar Plants, Proteomics, 8, 2514–2530.
- Kieffer P, Schroder J, Dommes J, Hoffmann L, Renaut J, Hausman J F, 2009a, Proteomic and Enzymatic Response of Poplar to Cadmium Stress, Journal of Proteomics, 72, 379–396.
- Kieffer P, Planchon S, Oufir M, Ziebel J, Dommes J, Hoffmann L, vd., 2009b, Combining Proteomics and Metabolite Analyses to Unravel Cadmium Stress–Response in Poplar Leaves, Journal of Proteome Research, 8, 400–417.
- Knoppová J, Sobotka R, Yu J, Bečková M, Pilný J, Trinugroho J P, vd., 2022, Assembly of D1/D2 Complexes of Photosystem II: Binding of Pigments and a Network of Auxiliary Proteins, Plant Physiology, 189, 790–804.
- Komatsu S, Maruyama J, Furuya T, Yin X, Yamaguchi H, Hitachi K, vd., 2021, Proteomic and Biological Analyses Reveal the Effect on Growth under Flooding Stress of Chickpea Irradiated with Millimeter Waves, Journal of Proteome Research, 20, 4718–4727.
- Kosakivska I V, Babenko L M, Romanenko K O, Korotka I Y, Potters G, 2021,

- Molecular Mechanisms of Plant Adaptive Responses to Heavy Metals Stress, *Cell Biology International*, 45, 258–272.
- Kováčik J, Dresler S, Micalizzi G, Babula P, Hladký J, Mondello L, 2019, Nitric Oxide Affects Cadmium–Induced Changes in the Lichen *Ramalina farinacea*, *Nitric Oxide*, 83, 11–18.
- Krzesłowska M, 2011, The Cell Wall in Plant Cell Response to Trace Metals: Polysaccharide Remodeling and Its Role in Defense Strategy, *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 35–51.
- Kubier A, Wilkin R T, Pichler T, 2019, Cadmium in Soils and Groundwater: A Review, *Applied Geochemistry*, 108, 104388.
- Kumar S, Asif M H, Chakrabarty D, Tripathi R D, Dubey R S, Trivedi P K, 2013, Expression of a Rice Lambda Class of Glutathione S–Transferase, *OsGSTL2*, in *Arabidopsis* Provides Tolerance to Heavy Metal and Other Abiotic Stresses, *Journal of Hazardous Materials*, 248, 228–237.
- Kumar V, Singh J, Chopra A K, 2018, Assessment of Plant Growth Attributes, Bioaccumulation, Enrichment, and Translocation of Heavy Metals in Water Lettuce (*Pistia stratiotes* L.) Grown in Sugar Mill Effluent, *International Journal of Phytoremediation*, 20, 507–521.
- Kuriakose S V, Prasad M N V, 2008, Cadmium Stress Affects Seed Germination and Seedling Growth in *Sorghum bicolor* (L.) Moench by Changing the Activities of Hydrolyzing Enzymes, *Plant Growth Regulation*, 54, 143–156.
- Kurusu T, Kuchitsu K, Tada Y, 2015, Plant Signaling Networks Involving Ca^{2+} and Rboh/Nox–Mediated ROS Production under Salinity Stress, *Frontiers in Plant Science*, 6, 427.
- Lee K R, Roh K S, 2003, Influence of Cadmium on Rubisco Activation in *Canavalia ensiformis* L. Leaves, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8, 94–100.
- Lekeux G, Crowet J M, Nouet C, Joris M, Jadoul A, Bosman B, vd., 2019, Homology Modeling and *in vivo* Functional Characterization of the Zinc Permeation Pathway in a Heavy Metal P–Type ATPase, *Journal of Experimental Botany*, 70, 329–41.
- Li G K, Gao J, Peng H, Shen Y O, Ding H P, Zhang Z M, vd., 2016, Proteomic Changes in Maize as a Response to Heavy Metal (Lead) Stress Revealed by iTRAQ Quantitative Proteomics, *Genetics and Molecular Research*, 15.

- Li X, Meng X, Luo K, Luan S, Cao B, Kong J, 2017, cDNA Cloning and Expression Analysis of a Phosphopyruvate Hydratase Gene from the Chinese Shrimp *Fenneropenaeus chinensis*, *Fish and Shellfish Immunology*, 63, 173–180.
- Li X, Zhang X, Wu Y, Li B, Yang Y, 2018, Physiological and Biochemical Analysis of Mechanisms Underlying Cadmium Tolerance and Accumulation in Turnip, *Plant Diversity*, 40, 19–27.
- Li C, Tang Y, Gu F, Wang X, Yang W, Han Y, vd., 2022, Phytochemical Analysis Reveals an Antioxidant Defense Response in *Lonicera japonica* to Cadmium-Induced Oxidative Stress, *Scientific Reports*, 12, 6840.
- Li X, Liu L, Sun S, Li Y, Jia L, Ye S, vd., 2023, Physiological and Transcriptional Mechanisms Associated with Cadmium Stress Tolerance in *Hibiscus syriacus* L, *BMC Plant Biology*, 23, 286.
- Lin K, Williams D V, Zeng M, Ahmed I M, Dai H, Cao F, vd., 2022, Identification of Low Grain Cadmium Accumulation Genotypes and Its Physiological Mechanism in Maize (*Zea mays* L.), *Environmental Science and Pollution Research*, 29, 20721–20730.
- Ling T, Gao Q, Du H, Zhao Q, Ren J, 2017, Growing, Physiological Responses and Cd Uptake of Corn (*Zea mays* L.) under Different Cd Supply, *Chemical Speciation and Bioavailability*, 29, 216–221.
- Liu J G, Qu P, Zhang W, Dong Y, Li L, Wang M X, 2014, Variations Among Rice Cultivars in Subcellular Distribution of Cd: The Relationship Between Translocation and Grain Accumulation, *Environmental and Experimental Botany*, 107, 25–31.
- Liu Q, Zhang S, Liu B, 2016, 14–4–4 Proteins: Macro-Regulators with Great Potential for Improving Abiotic Stress Tolerance in Plants, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 477, 9–13.
- Liu W, Tang X, Qi X, Fu X, Ghimire S, Ma R, vd., 2020, The Ubiquitin Conjugating Enzyme: An Important Ubiquitin Transfer Platform in Ubiquitin-Proteasome System, *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 2894.
- 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.

- Luo J S, Zhang Z, 2021, Mechanisms of Cadmium Phytoremediation and Detoxification in Plants, *The Crop Journal*, 9, 521–529.
- Lux A, Martinka M, Vaculi K M, White P J, 2011, Root Responses to Cadmium in the Rhizosphere: A Review, *Journal of Experimental Botany*, 62, 21–37.
- Luyckx M, Hausman J F, Sergeant K, Guerriero G, Lutts S, 2021, Molecular and Biochemical Insights into Early Responses of Hemp to Cd and Zn Exposure and the Potential Effect of Si on Stress Response, *Frontiers in Plant Science*, 12, 711853.
- Ma J, Sheng H, Li X, Wang L, 2016, iTRAQ–Based Proteomic Analysis Reveals the Mechanisms of Silicon–Mediated Cadmium Tolerance in Rice (*Oryza sativa*) Cells, *Plant Physiology and Biochemistry*, 104, 71–80.
- MacGregor–Chatwin C, Sener M, Barnett S F, Hitchcock A, Barnhart–Dailey M C, Maghlaoui K, vd., 2017, Lateral Segregation of Photosystem I in Cyanobacterial Thylakoids, *The Plant Cell*, 29, 1119–1136.
- Majumdar S, Pagano L, Wohlschlegel J A, Villani M, Zappettini A, White J C, vd., 2019, Proteomic, Gene and Metabolite Characterization Reveal the Uptake and Toxicity Mechanisms of Cadmium Sulfide Quantum Dots in Soybean Plants, *Environmental Science: Nano*, 6, 3010–3026.
- Manara A, 2012, Plant Responses to Heavy Metal Toxicity, Furini A (Ed.), *Plants and Heavy Metals* (27–53), Springer, 86p, Dordrecht.
- Marino D, González E M, Frendo P, Puppo A, Arrese–Igor C, 2007, NADPH Recycling Systems in Oxidative Stressed Pea Nodules: A Key Role for the NADP⁺–Dependent Isocitrate Dehydrogenase, *Planta*, 225, 413–421.
- Marmioli M, Imperiale D, Maestri E, Marmioli N, 2013, The Response of *Populus* spp. to Cadmium Stress: Chemical, Morphological and Proteomics Study, *Chemosphere*, 93, 1333–1344.
- Marmioli M, Imperiale D, Pagano L, Villani M, Zappettini A, Marmioli N, 2015, The Proteomic Response of *Arabidopsis thaliana* to Cadmium Sulfide Quantum Dots, and Its Correlation with the Transcriptomic Response, *Frontiers in Plant Science*, 6, 1104.
- Marschner P (Ed.), 2012, *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, Academic Press, 672p, London.

- Mathan J, Singh A, Jathar V, Ranjan A, 2021, High Photosynthesis Rate in Two Wild Rice Species is Driven by Leaf Anatomy Mediating High Rubisco Activity and Electron Transport Rate, *Journal of Experimental Botany*, 72, 7119–7135.
- Meena K K, Sorty A M, Bitla U M, Choudhary K, Gupta P, Pareek A, vd., 2017, Abiotic Stress Responses and Microbe–Mediated Mitigation in Plants: The Omics Strategies, *Frontiers in Plant Science*, 8, 172.
- Mendoza–Cózatl 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.
- Metwally A, Safronova V I, Belimov A A, Dietz K J, 2005, Genotypic Variation of the Response to Cadmium Toxicity in *Pisum sativum* L., *Journal of Experimental Botany*, 56, 167–178.
- Mika A, Luthje S, 2003, Properties of Guaiacol Peroxidase Activities Isolated from Corn Root Plasma Membranes, *Plant Physiology*, 132, 1489–1498.
- Mitra S, Pramanik K, Sarkar A, Ghosh P K, Soren T, Maiti T K, 2018, Bioaccumulation of Cadmium by *Enterobacter* sp. and Enhancement of Rice Seedling Growth under Cadmium Stress, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156, 183–196.
- Mittler R, 2002, Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance, *Trends in Plant Science*, 7, 406–410.
- Mittra P K, Roy S K, Rahman M A, Naimuzzaman M, Kwon S J, Yun S H, vd., 2023, Proteome Insights of Citric Acid–Mediated Cadmium Toxicity Tolerance in *Brassica napus* L., *Environmental Science and Pollution Research*, 30, 115461–115479.
- Mittra P K, Rahman M A, Roy S K, Kwon S J, Yun S H, Kun C, vd., 2024, Deciphering Proteomic Mechanisms Explaining the Role of Glutathione as an Aid in Improving Plant Fitness and Tolerance Against Cadmium–Toxicity in *Brassica napus* L., *Journal of Hazardous Materials*, 471, 134262.
- Mosa K A, Ismail A, Helmy M, Mosa K A, Ismail A, Helmy M, 2017, Functional Genomics Combined with Other Omics Approaches for Better Understanding Abiotic Stress Tolerance in Plants, *Plant Stress Tolerance: An Integrated Omics Approach*, 55–73.

- Muneer S, Hakeem K R, Mohamed R, Lee J H, 2014, Cadmium Toxicity Induced Alterations in the Root Proteome of Green Gram in Contrasting Response Towards Iron Supplement, *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 6343–6355.
- Nahar K, Hasanuzzaman M, Alam M M, Rahman A, Suzuki T, Fujita M, 2016, Polyamine and Nitric Oxide Crosstalk: Antagonistic Effects on Cadmium Toxicity in Mung Bean Plants Through Upregulating the Metal Detoxification, Antioxidant Defense and Methylglyoxal Detoxification Systems, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126, 245–255.
- 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.
- Naz S, Perveen S, 2021, Response of Wheat (*Triticum aestivum* L. var. galaxy–2013) to Pre-Sowing Seed Treatment with Thiourea under Drought Stress, *Pakistan Journal of Botany*, 53, 1209–1217.
- 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.
- Ogawa I, Nakanishi H, Ishimaru Y, Takahashi M, Mori S, Nishizawa N K, 2006, Fe-Deficiency Enhanced Cd Uptake and Translocation by Fe^{2+} -Transporters, OsIRT1 and OsIRT2, in Rice, *Plant and Cell Physiology*, 47, 231–231.
- Ohbayashi I, Huang S, Fukaki H, Song X, Sun S, Morita M T, vd., 2019, Mitochondrial Pyruvate Dehydrogenase Contributes to Auxin-Regulated Organ Development, *Plant Physiology*, 180, 896–909.
- Oliveira B R M, de Almeida A A F, Pirovani C P, Barroso J P, de C Neto C H, Santos N A, vd., 2020, Mitigation of Cd Toxicity by Mn in Young Plants of Cacao, Evaluated by the Proteomic Profiles of Leaves and Roots, *Ecotoxicology*, 29, 340–358.
- Ormancey M, Thuleau P, Mazars C, Cotellet V, 2017, CDPKs and 14–3–3 Proteins: Emerging Duo in Signaling, *Trends in Plant Science*, 22, 263–272.
- Öztürk M, Ashraf M, Aksoy A, Ahmad M S A, Hakeem K R (Ed.), 2015, *Plants, Pollutants and Remediation*, Springer, 404p, Netherlands.

- Pandey M, Srivastava A K, D'Souza S F, Penna S, 2013, Thiourea, a ROS Scavenger, Regulates Source-to-Sink Relationship to Enhance Crop Yield and Oil Content in *Brassica juncea* (L.), PloS One, 8, e73921.
- 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, The Plant Journal, 69, 278288.
- Parmar P, Kumari N, Sharma V, 2013, Structural and Functional Alterations in Photosynthetic Apparatus of Plants under Cadmium Stress, Botanical Studies, 54, 1–6.
- Pasternak M, Lim B, Wirtz M, Hell R, Cobbett C S, Meyer A J, 2008, Restricting Glutathione Biosynthesis to the Cytosol is Sufficient for Normal Plant Development, The Plant Journal, 53, 999–1012.
- Patade V Y, Nikalje G C, Srivastava S, 2020, Role of Thiourea in Mitigating Different Environmental Stresses in Plants, Roychoudhury A, Tripathi D K (Ed.), Protective Chemical Agents in the Amelioration of Plant Abiotic Stress: Biochemical and Molecular Perspectives (467–482), Wiley–Blackwell, 670p.
- 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 and Environmental Safety, 201, 110784.
- Pena L B, Pasquini L A, Tomaro M L, Gallego S M, 2006, Proteolytic System in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Leaves under Cadmium Stress, Plant Science, 171, 531–537.
- Perveen A, Wahid A, Mahmood S, Hussain I, Rasheed R, 2015, Possible Mechanism of Medium-Supplemented Thiourea in Improving Growth, Gas Exchange, and Photosynthetic Pigments in Cadmium-Stressed Maize (*Zea mays*), Brazilian Journal of Botany, 38, 71–79.
- Pinto A P, Mota A M, de–Varenes A, Pinto F C, 2004, Influence of Organic Matter on the Uptake of Cadmium, Zinc, Copper and Iron by Sorghum Plants, Science of the Total Environment, 326, 239–247.
- Pochodylo A L, Aristilde L, 2017, Molecular Dynamics of Stability and Structures in Phytochelatin Complexes with Zn, Cu, Fe, Mg, and Ca: Implications for Metal

- Detoxification, *Environmental Chemistry Letters*, 15, 495–500.
- Polishchuk O V, 2021, Stress–Related Changes in the Expression and Activity of Plant Carbonic Anhydrases, *Planta*, 253, 58.
- Pratt W B, Krishna P, Olsen L J, 2001, Hsp90–Binding Immunophilins in Plants: The Protein Movers, *Trends in Plant Science*, 6, 54–58.
- Qiao K, Wang F, Liang S, Wang H, Hu Z, Chai T, 2019, Improved Cd, Zn and Mn Tolerance and Reduced Cd Accumulation in Grains with Wheat–Based Cell Number Regulator TaCNR2, *Scientific Reports*, 9, 870.
- Rahman M A, Kabir A H, Mandal A, Roy S K, Song Y, Ji H C, vd., 2020, Glutathione Restores Hg–Induced Morpho–Physiological Retardations by Inducing Phytochelatin and Oxidative Defense in Alfalfa, *Biology*, 9, 364.
- Rausch T, Wachter A, 2005, Sulfur Metabolism: A Versatile Platform for Launching Defence Operations, *Trends in Plant Science*, 10, 503–509.
- Raza A, Habib M, Kakavand S N, Zahid Z, Zahra N, Sharif R, vd., 2020, Phytoremediation of Cadmium: Physiological, Biochemical, and Molecular Mechanisms, *Biology*, 9, 177.
- Raza A, Razzaq A, Mehmood S S, Hussain M A, Wei S, He H, vd., 2021, Omics: The Way Forward to Enhance Abiotic Stress Tolerance in *Brassica napus* L., *GM Crops and Food*, 12, 251–281.
- Richter O M, Ludwig B, 2003, Cytochrome C Oxidase–Structure, Function, and Physiology of a Redox–Driven Molecular Machine, *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 47–74.
- Rivetta A, Negrini N, Cocucci M, 1997, Involvement of Ca^{2+} –Calmodulin in Cd^{2+} Toxicity During the Early Phases of Radish (*Raphanus sativus* L.) Seed Germination, *Plant, Cell and Environment*, 20, 600–608.
- Rizwan M, Meunier J D, Miche H, Keller C, 2012, Effect of Silicon on Reducing Cadmium Toxicity in Durum Wheat (*Triticum turgidum* L. cv. Claudio W.) Grown in a Soil with Aged Contamination, *Journal of Hazardous Materials*, 209, 326–334.
- Rizwan M, Ali S, Qayyum M F, Ok Y S, Zia–ur–Rehman M, Abbas Z, vd., 2017a, Use of Maize (*Zea mays* L.) for Phytomanagement of Cd–Contaminated Soils: A Critical Review, *Environmental Geochemistry and Health*, 39, 259–277.

- Rizwan M, Ali S, Adrees M, Ibrahim M, Tsang D C, Zia-ur-Rehman M, vd., 2017b, A Critical Review on Effects, Tolerance Mechanisms and Management of Cadmium in Vegetables, *Chemosphere*, 182, 90–105.
- Romero-Puertas M C, Terron-Camero L C, Pelaez-Vico M A, Olmedilla A, Sandalio L M, 2019, Reactive Oxygen and Nitrogen Species as Key Indicators of Plant Responses to Cd Stress, *Environmental and Experimental Botany*, 161, 107–119.
- Rouhier N, 2010, Plant Glutaredoxins: Pivotal Players in Redox Biology and Iron-Sulphur Centre Assembly, *New Phytologist*, 186, 365–372.
- 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.
- Rudenko N N, Ignatova L K, Fedorchuk T P, Ivanov B N, 2015, Carbonic Anhydrases in Photosynthetic Cells of Higher Plants, *Biochemistry (Moscow)*, 80, 674–687.
- Sadura I, Libik-Konieczny M, Jurczyk B, Gruszka D, Janeczko A, 2020, HSP Transcript and Protein Accumulation in Brassinosteroid Barley Mutants Acclimated to Low and High Temperatures, *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1889.
- Sagonda T, Adil M F, Sehar S, Rasheed A, Joan H I, Ouyang Y, vd., 2021, Physio-Ultrastructural Footprints and iTRAQ-Based Proteomic Approach Unravel the Role of *Piriformospora indica*-Colonization in Counteracting Cadmium Toxicity in Rice, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 220, 112390.
- Saifullah G C, Bolan N, Bibi S, Iqbal M, Rengel Z, Kunhikrishnan A, vd., 2014, Cellular Mechanisms in Higher Plants Governing Tolerance to Cadmium Toxicity, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 33, 374–391.
- Saleem M H, Ali S, Rehman M, Rizwan M, Kamran M, Mohamed I A, vd., 2020, Individual and Combined Application of EDTA and Citric Acid Assisted Phytoextraction of Copper Using Jute (*Corchorus capsularis* L.) Seedlings, *Environmental Technology and Innovation*, 19, 100895.
- Salt D E, Blaylock M, Kumar N P B A, Dushenkov V, Ensley D, Chet I, vd., 1995, Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants, *Nature Biotechnology*, 13, 468–474.

- Sánchez–Castro I, Molina L, Prieto–Fernández M Á, Segura A, 2023, Past, Present and Future Trends in the Remediation of Heavy–Metal Contaminated Soil–Remediation Techniques Applied in Real Soil–Contamination Events, *Heliyon*, 9, e16692.
- Sanità di Toppi L, Gabbrielli R, 1999, Response to Cadmium in Higher Plants, *Environmental and Experimental Botany*, 41, 105–130.
- Santos L R, Batista B L, Lobato A K S, 2018, Brassinosteroids Mitigate Cadmium Toxicity in Cowpea Plants, *Photosynthetica*, 56, 591–605.
- Sarwar N, Saifullah Malhi S S, Zia M H, Naeem A, Bibi S, Farid G, 2010, Role of Mineral Nutrition in Minimizing Cadmium Accumulation by Plants, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 925–937.
- Sasaki A, Yamaji N, Yokosho K, Ma J F, 2012, Nramp5 Is a Major Transporter Responsible for Manganese and Cadmium Uptake in Rice, *The Plant Cell*, 24, 2155–2167.
- Schnaubelt D, Schulz P, Hannah M A, Yocgo R E, Foyer C H, 2013, A Phenomics Approach to the Analysis of the Influence of Glutathione on Leaf Area and Abiotic Stress Tolerance in *Arabidopsis thaliana*, *Frontiers in Plant Science*, 4, 416.
- Schubert O T, Rost H L, Collins B C, Rosenberger G, Aebersold R, 2017, Quantitative Proteomics: Challenges and Opportunities in Basic and Applied Research, *Nature Protocols*, 2017, 1289–1294.
- Sebastian A, Prasad M N V, 2013, Cadmium Minimization in Rice. A Review, *Agronomy for Sustainable Development*, 34, 155–173.
- Selinski J, Scheibe R, 2019, Malate Valves: Old Shuttles with New Perspectives, *Plant Biology*, 21, 21–30.
- Sersen F, Kral'ova K, 2001, New Facts About CdCl₂ Action on the Photosynthetic Apparatus of Spinach Chloroplasts and Its Comparison with HgCl₂ Action, *Photosynthetica*, 39, 575–580.
- Sharma S S, Dietz K J, 2009, The Relationship Between Metal Toxicity and Cellular Redox Imbalance, *Trends in Plant Science*, 14, 43–50.
- Siddiqui M H, Mukherjee S, Kumar R, Alansi S, Shah A A, Kalaji H M, vd., 2022, Potassium and Melatonin–Mediated Regulation of Fructose–1,6–Bisphosphatase

- (FBPase) and Sedoheptulose-1,7-Bisphosphatase (SBPase) Activity Improve Photosynthetic Efficiency, Carbon Assimilation and Modulate Glyoxalase System Accompanying Tolerance to Cadmium Stress in Tomato Seedlings, *Plant Physiology and Biochemistry*, 171, 49–65.
- Singh A, Meena R S, 2020, Response of Bioregulators and Irrigation on Plant Height of Indian mustard (*Brassica juncea* L.), *Journal of Oilseed Brassica*, 11, 9–14.
- Singh P, Singh I, Shah K, 2020, Alterations in Antioxidative Machinery and Growth Parameters upon Application of Nitric Oxide Donor that Reduces Detrimental Effects of Cadmium in Rice Seedlings with Increasing Days of Growth, *South African Journal of Botany*, 131, 283–294.
- Singh T, Sandhu P S, Chahal G K, Walia S S, 2022, Foliar Thiourea Confers Moisture Stress Tolerance in Rainfed Maize Through Elevated Antioxidative Defence System, Osmolyte Accumulation and Starch Synthesis Grown under Different Planting Methods, *Journal of Plant Growth Regulation*, 42, 199–217.
- Singla-Pareek S L, Yadav S K, Pareek A, Reddy M K, Sopory S K, 2006, Transgenic Tobacco Overexpressing Glyoxalase Pathway Enzymes Grow and Set Viable Seeds in Zinc-Spiked Soils, *Plant Physiology*, 140, 613–623.
- Song W, Chen S, Liu J, Chen L, Song N, Li N, vd., 2015, Variation of Cd Concentration in Various Rice Cultivars and Derivation of Cadmium Toxicity Thresholds for Paddy Soil by Species-Sensitivity Distribution, *Journal of Integrative Agriculture*, 14, 1845–1854.
- Srivastava A K, Ramaswamy N K, Suprasanna P, D'souza S F, 2010a, Genome-Wide Analysis of Thiourea-Modulated Salinity Stress-Responsive Transcripts in Seeds of *Brassica juncea*: Identification of Signalling and Effector Components of Stress Tolerance, *Annals of Botany*, 106, 663–674.
- Srivastava A K, Suprasanna P, Srivastava S, D'Souza S F, 2010b, Thiourea Mediated Regulation in the Expression Profile of Aquaporins and Its Impact on Water Homeostasis under Salinity Stress in *Brassica juncea* Roots, *Plant Science*, 178, 517–522.
- Srivastava A K, Srivastava S, Penna S, D'Souza S F, 2011, Thiourea Orchestrates Regulation of Redox State and Antioxidant Responses to Reduce the NaCl-Induced Oxidative Damage in Indian Mustard (*Brassica juncea* (L.)

- Czern.), *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 676–686.
- Srivastava A K, Sablok G, Hackenberg M, Deshpande U, Suprasanna P, 2017, Thiourea Priming Enhances Salt Tolerance Through Co-Ordinated Regulation of microRNAs and Hormones in *Brassica juncea*, *Scientific Reports*, 7, 45490.
- Sun H, Dai H, Wang X, Wang G, 2016, Physiological and Proteomic Analysis of Selenium-Mediated Tolerance to Cd Stress in Cucumber (*Cucumis sativus* L.), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 133, 114–126.
- Sun Y, Liu X, Li W, Wang X, Zhong X, Gao Y, vd., 2023, The Regulatory Metabolic Networks of the *Brassica campestris* L. Hairy Roots in Response to Cadmium Stress Revealed from Proteome Studies Combined with a Transcriptome Analysis, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 263, 115214.
- Szuba A, Marczak Ł, Kozłowski R, 2020, Role of the Proteome in Providing Phenotypic Stability in Control and Ectomycorrhizal Poplar Plants Exposed to Chronic Mild Pb Stress, *Environmental Pollution*, 264, 114585.
- Terzi H, Yıldız M, 2021, Proteomic Responses of Maize Roots to the Combined Stress of Sulphur Deficiency and Chromium Toxicity, *Biologia*, 76, 1887–1899.
- Tran T A, Popova L P, 2013, Functions and Toxicity of Cadmium in Plants: Recent Advances and Future Prospects, *Turkish Journal of Botany*, 37, 1–13.
- Tong Y P, Kneer R, Zhu Y G, 2004, Vacuolar Compartmentalization: A Second-Generation Approach to Engineering Plants for Phytoremediation, *Trends in Plant Science*, 9, 7–9.
- Ugalde J M, Lamig L, Herrera-Vasquez A, Fuchs P, Homagk M, Kopriva S, vd., 2021, A Dual Role for Glutathione Transferase U7 in Plant Growth and Protection from Methyl Viologen-Induced Oxidative Stress, *Plant Physiology*, 187, 2451–2468.
- Uğurlar F, Kaya C, 2023, Synergistic Mitigation of Nickel Toxicity in Pepper (*Capsicum annuum*) by Nitric Oxide and Thiourea via Regulation of Nitrogen Metabolism and Subcellular Nickel Distribution, *Functional Plant Biology*, 50, 1099–1116.
- 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, 1171–1179.
- Viehweger K, 2014, How Plants Cope with Heavy Metals, *Botanical Studies*, 55, 1–12.

- Vineeth T V, Kumar P, Krishna G K, 2016, Bioregulators Protected Photosynthetic Machinery by Inducing Expression of Photorespiratory Genes under Water Stress in Chickpea, *Photosynthetica*, 54, 234–242.
- Villiers F, Ducruix C, Hugouvieux V, Jarno N, Ezan E, Garin J, vd., 2011, Investigating the Plant Response to Cadmium Exposure by Proteomic and Metabolomic Approaches, *Proteomics*, 11, 1650–1663.
- Visioli G, Marmiroli M, Marmiroli N, 2010, Two-Dimensional Liquid Chromatography Technique Coupled with Mass Spectrometry Analysis to Compare the Proteomic Response to Cadmium Stress in Plants, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 567510.
- Vivancos D P, Wolff T, Markovic J, Pallardo F V, Foyer C H, 2010, A Nuclear Glutathione Cycle within the Cell Cycle, *Biochemical Journal*, 431, 169–178.
- Wahid A, Ghani A, Ali I, Ashraf M Y, 2007, Effects of Cadmium on Carbon and Nitrogen Assimilation in Shoots of Mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] Seedlings, *Journal of Agronomy and Crop Science*, 193, 357–365.
- Wahid A, Arshad M, Farooq M, 2010, Cadmium Phytotoxicity: Responses, Mechanisms and Mitigation Strategies: A Review, Lichtfouse E (Ed.), *Organic Farming, Pest Control and Remediation of Soil Pollutants* (371–403), Springer, 418p, Dordrecht.
- Wahid A, Basra S M A, Farooq M, 2017, Thiourea: A Molecule with Immense Biological Significance in Plants, *International Journal of Agriculture and Biology*, 19, 911–920.
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A, 2004, Role of Plant Heat-Shock Proteins and Molecular Chaperones in the Abiotic Stress Response, *Trends in Plant Science*, 9, 244–252.
- Wang J W, Li Y, Zhang Y X, Chai T Y, 2013, Molecular Cloning and Characterization of a *Brassica juncea* Yellow Stripe-Like Gene, *BjYSL7*, Whose Overexpression Increases Heavy Metal Tolerance of Tobacco, *Plant Cell Reports*, 32, 651–662.
- Wang Y, Xu L, Tang M, Jiang H, Chen W, Zhang W, vd., 2016, Functional and Integrative Analysis of the Proteomic Profile of Radish Root under Pb Exposure, *Frontiers in Plant Science*, 7, 1871.
- Wang J C, Wang H, Chen J, Zhang S M, Xu J T, Han X T, vd., 2019a, Xylem

- Development, Cadmium Bioconcentration, and Antioxidant Defense in *Populus × euramericana* Stems under Combined Conditions of Nitrogen and Cadmium, *Environmental and Experimental Botany*, 164, 1–9.
- Wang Y, Yang R, Zheng J, Shen Z, Xu X, 2019b, Exogenous Foliar Application of Fulvic Acid Alleviate Cadmium Toxicity in Lettuce (*Lactuca sativa* L.), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 167, 10–19.
- Wang Y Y, Wang Y, Li G Z, Hao L, 2019c, Salicylic Acid–Altering Arabidopsis Plant Response to Cadmium Exposure: Underlying Mechanisms Affecting Antioxidation and Photosynthesis–Related Processes, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 169, 645–653.
- Wang R, Lin K, Chen H, Qi Z, Liu B, Cao F, vd., 2021, Metabolome Analysis Revealed the Mechanism of Exogenous Glutathione to Alleviate Cadmium Stress in Maize (*Zea mays* L.) Seedlings, *Plants*, 10, 105.
- Wang J, Deng P, Wei X, Zhang X, Liu J, Huang Y, vd., 2023, Hidden Risks from Potentially Toxic Metal (Loid) s in Paddy Soils–Rice and Source Apportionment Using Lead Isotopes: A Case Study from China, *Science of the Total Environment*, 856, 158883.
- Waqas M A, Kaya C, Riaz A, Farooq M, Nawaz I, Wilkes A, vd., 2019, Potential Mechanisms of Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants Induced by Thiourea, *Frontiers in Plant Science*, 10, 1336.
- Waraich E A, Ahmad M, Soufan W, Manzoor M T, Ahmad Z, Habib–Ur–Rahman M, vd., 2021, Seed Priming with Sulphydral Thiourea Enhances the Performance of *Camelina sativa* L. under Heat Stress Conditions, *Agronomy*, 11, 1875.
- Waśkiewicz A, Gładysz O, Szentner K, Goliński P, 2014, Role of Glutathione in Abiotic Stress Tolerance, Ahmad P (Ed.), *Oxidative Damage to Plants* (149–181), Academic Press, 635p.
- Wei H Y, Li Y, Yan J, Peng S Y, Wei S J, Yin Y, vd., 2023a, Root Cell Wall Remodeling: A Way for Exopolysaccharides to Mitigate Cadmium Toxicity in Rice Seedling, *Journal of Hazardous Materials*, 443, 130186.
- Wei Z, Zhongbing C, Xiuqin Y, Luying S, Huan M, Sixi Z, 2023b, Integrated Transcriptomics and Metabolomics Reveal Key Metabolic Pathway Responses in *Pistia stratiotes* under Cd Stress, *Journal of Hazardous Materials*, 452, 131214.

- 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.
- Wu X, Wang Y, Bian Y, Ren Y, Xu X, Zhou F, vd., 2022, A Critical Review on Plant Annexin: Structure, Function, and Mechanism, *Plant Physiology and Biochemistry*, 190, 81–89.
- Xie C, Hu L, Yang Y, Liao D, Yang X, 2017, Accumulation and Tolerance to Cadmium Heavy Metal Ions and Induction of 14–3–3 Gene Expression in Response to Cadmium Exposure in *Coprinus atramentarius*, *Microbiological Research*, 196, 1–6.
- Xie X, He Z, Chen N, Tang Z, Wang Q, Cai Y, 2019, The Roles of Environmental Factors in Regulation of Oxidative Stress in Plant, *BioMed Research International*, 2019, 9732325.
- Xu J, Sun J, Du L, Liu X, 2012, Comparative Transcriptome Analysis of Cadmium Responses in *Solanum nigrum* and *Solanum torvum*, *New Phytologist*, 196, 110–124.
- Xu L, Wang Y, Zhang F, Tang M, Chen Y, Wang J, vd., 2017, Dissecting Root Proteome Changes Reveals New Insight into Cadmium Stress Response in Radish (*Raphanus sativus* L.), *Plant and Cell Physiology*, 58, 1901–1913.
- Xue D, Jiang H, Deng X, Zhang X, Wang H, Xu X, vd., 2014, Comparative Proteomic Analysis Provides New Insights into Cadmium Accumulation in Rice Grain under Cadmium Stress, *Journal of Hazardous Materials*, 280, 269–278.
- Xue L, Ren H, Li S, Gao M, Shi S, Chang E, vd., 2015, Comparative Proteomic Analysis in *Miscanthus sinensis* Exposed to Antimony Stress, *Environmental Pollution*, 201, 150–160.
- Xue Z C, Li J H, Li D S, Li S Z, Jiang C D, Liu L A, vd., 2018, Bioaccumulation and Photosynthetic Activity Response of Sweet Sorghum Seedling (*Sorghum bicolor* L. Moench) to Cadmium Stress, *Photosynthetica*, 56, 1422–1428.
- Yadav T, Kumar A, Yadav R, Yadav G, Kumar R, Kushwaha M, 2020, Salicylic Acid and Thiourea Mitigate the Salinity and Drought Stress on Physiological Traits Governing Yield in Pearl Millet–Wheat, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27, 2010–2017.

- Yadav P, Srivastava S, 2021, Effect of Thiourea Application on Root, Old Leaf and Young Leaf of Two Contrasting Rice Varieties (*Oryza sativa* L.) Grown in Arsenic Contaminated Soil, *Environmental Technology and Innovation*, 21, 101368.
- Yang Y Q, Li X, Yang S H, Zhou Y L, Dong C, Ren J, vd., 2015, Comparative Physiological and Proteomic Analysis Reveals the Leaf Response to Cadmium-Induced Stress in Poplar (*Populus yunnanensis*), *PLoS One*, 10, e0137396.
- Yang Y, Ge Y, Zeng H, Zhou X, Peng L, Zeng Q, 2017, Phytoextraction of Cadmium-Contaminated Soil and Potential of Regenerated Tobacco Biomass for Recovery of Cadmium, *Scientific Reports*, 7, 7210.
- Younis U, Malik S A, Rizwan M, Qayyum M F, Ok Y S, Shah M H R, vd., 2016, Biochar Enhances the Cadmium Tolerance in Spinach (*Spinacia oleracea*) Through Modification of Cd Uptake and Physiological and Biochemical Attributes, *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 21385–21394.
- Yu H, Du X, Zhang F, Zhang F, Hu Y, Liu S, vd., 2012, A Mutation in the E2 Subunit of the Mitochondrial Pyruvate Dehydrogenase Complex in *Arabidopsis* Reduces Plant Organ Size and Enhances the Accumulation of Amino Acids and Intermediate Products of the TCA cycle, *Planta*, 236, 387–399.
- Zahid A, Ul Din K, Ahmad M, Hayat U, Zulfiqar U, Askri S M H, vd., 2024, Exogenous Application of Sulfur-Rich Thiourea (STU) to Alleviate the Adverse Effects of Cobalt Stress in Wheat, *BMC Plant Biology*, 24, 126.
- Zhang W, Ruan J, Ho T H D, You Y, Yu T, Quatrano R S, 2005, Cis-Regulatory Element Based Targeted Gene Finding: Genome-Wide Identification of Abscissic Acid-and Abiotic Stress-Responsive Genes in *Arabidopsis thaliana*, *Bioinformatics*, 21, 3074–3081.
- Zhang X, Zhang S, Xu X, Li T, Gong G, Jia Y, vd., 2010, Tolerance and Accumulation Characteristics of Cadmium in *Amaranthus hybridus* L, *Journal of Hazardous Materials*, 180, 303–308.
- Zhang F, Wan X Q, Zheng Y X, Sun L X, Chen Q B, Zhu X Q, vd., 2014, Effects of Nitrogen on the Activity of Antioxidant Enzymes and Gene Expression in Leaves of Populus Plants Subjected to Cadmium Stress, *Journal of Plant Interactions*, 9,

599–609.

- Zhang F, Li J Q, Huang J L, Lin L H, Wan X Q, Zhao J L, vd., 2017, Transcriptome Profiling Reveals the Important Role of Exogenous Nitrogen in Alleviating Cadmium Toxicity in Poplar Plants, *Journal of Plant Growth Regulation*, 36, 942–956.
- Zhang F, Liu M, Li Y, Che Y, Xiao Y, 2019, Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Biochar and Cadmium on the Yield and Element Uptake of *Medicago sativa*, *Science of the Total Environment*, 655, 1150–1158.
- Zhang H, Xu Z, Guo K, Huo Y, He G, Sun H, vd., 2020a, Toxic Effects of Heavy Metal Cd and Zn on Chlorophyll, Carotenoid Metabolism and Photosynthetic Function in Tobacco Leaves Revealed by Physiological and Proteomics Analysis, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 202, 110856.
- Zhang X, Li X, Tang L, Peng Y, Qian M, Guo Y, vd., 2020b, The Root Iron Transporter 1 Governs Cadmium Uptake in *Vicia sativa* Roots, *Journal of Hazardous Materials*, 398, 122873.
- Zhang J, Zhang M, Song H, Zhao J, Shabala S, Tian S, vd., 2020c, A Novel Plasma Membrane–Based NRAMP Transporter Contributes to Cd and Zn Hyperaccumulation in *Sedum alfredii* Hance, *Environmental and Experimental Botany*, 176, 104121.
- Zhang G, Yu Z, Zhang L, Yao B, Luo X, Xiao M, vd., 2022, Physiological and Proteomic Analyses Reveal the Effects of Exogenous Nitrogen in Diminishing Cd Detoxification in *Acacia auriculiformis*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 229, 113057.
- Zhang D, Liu J, Zhang Y, Wang H, Wei S, Zhang X, vd., 2023, Morphophysiological, Proteomic and Metabolomic Analyses Reveal Cadmium Tolerance Mechanism in Common Wheat (*Triticum aestivum* L.), *Journal of Hazardous Materials*, 445, 130499.
- Zhao H, Wang L, Zhao F J, Wu L, Liu A, Xu W, 2019, SpHMA1 Is a Chloroplast Cadmium Exporter Protecting Photochemical Reactions in the Cd Hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola*, *Plant, Cell and Environment*, 42, 1112–1124.
- Zhao M, Meng Y, Wang Y, Sun G, Liu X, Li J, vd., 2023, Exogenous Hemin Alleviates

- Cadmium Stress in Maize by Enhancing Sucrose and Nitrogen Metabolism and Regulating Endogenous Hormones, *International Journal of Phytoremediation*, 25, 368–380.
- Zheng X, Chen L, Li X, 2018, Arabidopsis and Rice Showed a Distinct Pattern in ZIPs Genes Expression Profile in Response to Cd Stress, *Botanical Studies*, 59, 1–10.
- Zhu Y, Qiu W, Li Y, Tan J, Han X, Wu L, vd., 2022, Quantitative Proteome Analysis Reveals Changes of Membrane Transport Proteins in *Sedum plumbizincicola* under Cadmium Stress, *Chemosphere*, 287, 132302.
- Zhu S, Sun S, Zhao W, Yang X, Chen Z, Mao H, vd., 2024a, Comprehensive Physiology and Proteomics Analysis Revealed the Resistance Mechanism of Rice (*Oryza sativa* L) to Cadmium Stress, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 278, 116413.
- Zhu S, Sun S, Zhao W, Yang X, Mao H, Sheng L, vd., 2024b, Utilizing Transcriptomics and Proteomics to Unravel Key Genes and Proteins of *Oryza sativa* Seedlings Mediated by Selenium in Response to Cadmium Stress, *BMC Plant Biology*, 24, 360.
- Zulfiqar U, Jiang W, Xiukang W, Hussain S, Ahmad M, Maqsood M F, vd., 2022, Cadmium Phytotoxicity, Tolerance, and Advanced Remediation Approaches in Agricultural Soils; A Comprehensive Review, *Frontiers in Plant Science*, 13, 773815.