



**ARPA (*Hordeum vulgare* L.) FİDELERİNDE NİTRİK OKSİT  
TEŞVİKLİ KADMİYUM TOLERANSININ ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kübra ALP

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Hakan TERZİ

İkinci Danışman

Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

Ocak 2022

Bu tez çalışması, 19.FEN.BİL.43 numaralı proje ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ARPA (*Hordeum vulgare* L.) FİDELERİNDE NİTRİK OKSİT  
TEŞVİKLİ KADMİYUM TOLERANSININ ARAŞTIRILMASI**

**Kübra ALP**

**Danışman**

**Dr. Öğr. Üyesi Hakan TERZİ**

**İkinci Danışman**

**Prof. Dr. Mustafa YILDIZ**

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI**

**Ocak 2022**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### ARPA (*Hordeum vulgare* L.) FİDELERİNDE NİTRİK OKSİT TEŞVİKLİ KADMİYUM TOLERANSININ ARAŞTIRILMASI

Kübra ALP

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

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

**İkinci Danışman:** Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

Tarım topraklarında kadmiyum (Cd) kirliliği yaygın bir çevre sorunudur ve gıda güvenliği için potansiyel tehditler oluşturmaktadır. Nitrik oksit (NO), çevresel stres tepkilerini düzenleyen gaz halinde biyoaktif bir sinyal molekülüdür. NO'nun Cd toksisitesini hafiflettiği bildirilmiş olsa da, arpa fidelerinde NO teşvikli Cd toleransı hakkında moleküler düzeyde sınırlı bilgi mevcuttur. Bu nedenle bu çalışmada, NO'nun Cd stresine yanıtındaki potansiyel rolü arpa (*Hordeum vulgare* L.) fidelerinin yapraklarında fizyolojik, biyokimyasal ve proteomik analizlerle incelenmiştir. Sonuçlar, 50 µM Cd stresinin bitki büyümesini ve klorofil içeriğini önemli ölçüde azalttığını ve lipid peroksidasyonu ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğini artırdığını göstermiştir. Bununla birlikte, dışsal 100 µM sodyum nitroprussit (SNP; NO donörü) uygulaması, fide büyümesindeki Cd kaynaklı inhibisyonu ve klorofil içeriğindeki azalmayı önemli ölçüde hafifletmiş ve yaprak malondialdehit (MDA) birikimini önemli ölçüde azaltmıştır. Cd stresi, süperoksit dismutaz (SOD), guaiakol peroksidaz (POD) ve askorbat peroksidaz (APX) aktivitesini önemli ölçüde artırmıştır. Diğer taraftan, dışsal SNP uygulaması, Cd uygulamasına göre APX aktivitesinde daha fazla artışa neden olurken, SOD ve POD seviyelerini önemli ölçüde azaltmıştır. İfade seviyelerinde değişiklik (2 kat ve üzeri) gösteren yaprak proteinleri, iki boyutlu jel elektroforezi (2-DE) ile ayrıştırılmıştır. Otuz dört protein, MALDI TOF/TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/ time-of-flight) kütle spektrometrisi ile başarıyla tanımlanmıştır. Kontrol ile

karşılaştırıldığında, 28 proteinin ifade seviyesi artarken, 6 protein ifade seviyesi SNP ve/veya Cd stresi tarafından azaltılmıştır. Bununla birlikte, dışsal SNP uygulaması, protein seviyelerini farklı şekilde düzenlemiştir. Farklı şekilde ifade olan proteinler fonksiyonel olarak fotosentez ve karbohidrat biyosentezi (%47.1), protein metabolizması (%23.5), primer metabolizma (%11.8), enerji metabolizması (%11.8), stres savunma (%5.9) ve sinyal iletimi (%2.9) olmak üzere altı gruba ayrılmıştır. Metabolik yolak analizleri, fotosentez, protein sentezi, redoks homeostazı ve sinyal iletimi gibi Cd stresi tarafından bozulmuş yolların SNP uygulaması tarafından belirgin şekilde iyileştirildiğini göstermiştir. Dışsal SNP uygulaması ile enerji metabolizması ile ilgili proteinlerin artan yönde düzenlenmesi artan enerji üretimini ihtiyacını göstermektedir. Protein metabolizmasında fonksiyon gören proteinlerin SNP uygulaması ile artan yönde düzenlenmesi, NO'nun stres direnci ve proteomun yeniden düzenlenmesindeki rolünü göstermektedir. Bu sonuçlar, NO'nun daha fazla enerji için fotosentezin teşvik edilmesi, proteinlerin korunması ve stres savunmasının aktivasyonu yoluyla Cd'un neden olduğu büyüme inhibisyonunu hafifletebileceğini ileri sürebilir.

**2021, x + 80 sayfa**

**Anahtar kelimeler:** Arpa, Kadmiyum stresi, Nitrik oksit, Proteomik

## ABSTRACT

M.Sc. Thesis

### INVESTIGATION OF THE NITRIC OXIDE-INDUCED CADMIUM TOLERANCE IN BARLEY (*Hordeum vulgare* L.) SEEDLINGS

Kübra ALP

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

**Supervisor:** Asst. Prof. Hakan TERZİ

**Co-Supervisor:** Prof. Mustafa YILDIZ

Cadmium (Cd) contamination in agricultural soils is a prevalent environmental issue and poses potential threats to food security. Nitric oxide (NO) is a gaseous bioactive signaling molecule regulates environmental stress responses. Although NO is reported to alleviate the Cd toxicity, limited information is existing about the NO-induced Cd tolerance at molecular level in barley seedlings. In this study, therefore, the potential role of NO in response to Cd stress was examined by physiological, biochemical, and proteomic analyses in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. The results showed that 50  $\mu$ M Cd stress dramatically reduced plant growth and chlorophyll content, and increased lipid peroxidation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content. However, exogenous application of 100  $\mu$ M sodium nitroprusside (SNP; NO donor) significantly alleviated Cd-induced growth inhibition and reductions in chlorophyll content, and dramatically reduced leaf malondialdehyde (MDA) accumulation. Cd stress significantly increased the activities of superoxide dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (POD) and ascorbate peroxidase (APX). On the other hand, application of exogenous SNP further increased the activity of APX, and significantly decreased the levels of SOD and POD activity as compared to Cd stress. The leaf proteins exhibiting significant abundance changes (2.0-fold change) were separated by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). Thirty-four protein spots were successfully identified by MALDI TOF/TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/ time-of-flight) mass spectrometry. When compared

with control, 28 proteins were up-regulated and 6 proteins were up-regulated by SNP and/or Cd stress. Meanwhile, exogenous SNP treatment differentially regulated the levels of proteins. Differentially-expressed proteins were functionally classified into six groups including photosynthesis and carbohydrate biosynthesis (47.1%), protein metabolism (23.5%), primer metabolism (11.8%), energy metabolism (11.8%), stress defense (5.9%), and signal transduction (2.9%). Metabolic pathway analysis indicated that several Cd-disruptive pathways were markedly reversed by SNP treatments, including photosynthesis, protein synthesis, redox homeostasis, and signal transduction. Exogenous SNP up-regulated proteins involved in energy metabolism implying an enhancement in energy generation. Proteins involved in protein metabolism were differently regulated by SNP which indicated the roles of NO in stress resistance and proteome rearrangement. These findings suggest that NO may alleviate Cd-induced growth inhibition through the promotion of photosynthesis to generate more energy, protection of proteins, and activation of stress defense.

**2021, x + 80 pages**

**Keywords:** Barley, Cadmium stress, Nitric oxide, Proteomics

## TEŞEKKÜR

Lisansüstü tez çalışmam süresince değerli bilgi ve tecrübelerini paylaşan, deneysel çalışmalar ve tezin tamamlanması basamaklarının her aşamasında yapmış olduğu önemli katkılarından dolayı tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hakan TERZİ ve ikinci danışmanın Sayın Prof. Dr. Mustafa YILDIZ'a teşekkür ederim. Kütle spektrometresi analizlerinde bilgi ve tecrübelerini paylaşan Sayın Prof. Dr. Murat KASAP (Kocaeli Üniversitesi)'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını 19.FEN.BİL.43 nolu proje ile destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Tez çalışmaları sırasında yardımlarını esirgemeyen doktora öğrencisi Sayın Emre PEHLİVAN'a ve yüksek lisans öğrencileri Sayın Melike ELDEN, Haktan DOĞUŞ, Hakan YALÇIN ve TUĞÇE DEMİRCİ'ye teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında sabırla bana destek olan, her türlü konuda maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve bana olan inançlarını ve sevgilerini her zaman hissettiren en büyük motivasyon kaynağım sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Son olarak hayatımda her zaman özel olan, paylaşımlarla hayatı daha yaşanabilir ve keyifli kılan, beni motive eden, birlikte güzel zamanlar geçirebildiğim tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Kübra ALP  
Afyonkarahisar 2022

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ .....	4
2.1 Bitkilerde Kadmiyumun Alımı, Taşınımı ve Depolanması .....	4
2.2 Bitkilerde Kadmiyum Stresinin Etkileri .....	6
2.3 Bitkilerin Kadmiyuma Verdiği Hücreyel Cevaplar.....	7
2.4 Bitkilerin Kadmiyuma Verdiği Proteomik Cevaplar .....	10
2.4.1 Kadmiyum Stresi ve Enerji Metabolizması ile İlişkili Proteinler .....	11
2.4.2 Kadmiyum Stresi ve Savunma Sistemi ile İlişkili Proteinler .....	12
2.4.3 Kadmiyum Stresi ve Sinyal İletimi ile İlişkili Proteinler .....	14
2.4.4 Kadmiyum Stresi ve Fotosentez ile İlişkili Proteinler .....	15
2.4.5 Kadmiyum Stresi ve Metal Taşınımı ile İlişkili Proteinler .....	16
2.4.6 Kadmiyum Stresi ve Protein Metabolizması ile İlişkili Proteinler .....	18
2.5 Bitkilerde Nitrik Oksit ve Biyolojik Etkileri .....	19
2.6 Bitkilerde Nitrik Oksit ve Ağır Metal Toleransı.....	20
3. MATERYAL ve METOT .....	23
3.1 Büyüme Koşulları ve Stres Uygulaması .....	23
3.2 Klorofil İçeriğinin Belirlenmesi.....	23

3.3 Malondialdehit İçeriğinin Belirlenmesi .....	24
3.4 Hidrojen Peroksit ve Lipid Peroksidasyonunun Histokimyasal Belirlenmesi .....	24
3.5 Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi .....	25
3.6 Protein Ekstrasyonu .....	26
3.7 İki-Yönlü (2-D) Poliakrilamid Jel Elektroforezi .....	26
3.8 Görüntü Analizleri ve Jelde Triptik Kesim.....	27
3.9 Kütle Spektrometresi Analizleri .....	28
3.10 İstatistiksel Analizler .....	29
4. BULGULAR .....	30
4.1 Fide Büyümesi Üzerine SNP ve Cd Uygulamalarının Etkisi .....	30
4.2 Klorofil İçeriği Üzerine SNP ve Cd Uygulamalarının Etkisi .....	31
4.3 MDA İçeriği Üzerine SNP ve Cd Uygulamalarının Etkisi.....	31
4.4 Hidrojen Peroksit Birikimi ve Lipid Peroksidasyonu Üzerine SNP ve Cd Uygulamalarının Etkisi .....	31
4.5 Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine SNP ve Cd Uygulamalarının Etkisi .....	33
4.6 Proteom Değişimleri Üzerine SNP ve Cd Uygulamalarının Etkisi .....	34
5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	43
KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	80

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

---

Cd	Kadmiyum
dH <sub>2</sub> O	Distile su
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
μM	Mikromolar
mA	Miliamper
mM	Milimolar
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre

### Kısaltmalar

---

APX	Askorbat peroksidaz
CAT	Katalaz
CHAPS	3-[(3-kolamidopropil) dimetilammonyo]-1- propansülfonat
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DTT	Ditiyotreitol
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
IEF	İzoelektrik fokuslama
IPG	İmmobilize pH gradiyenti
MALDI-TOF/TOF	Matrix- assisted laser desorption ionization time-of-flight/ time-of-flight
MDA	Malondialdehit
NBT	Nitroblue tetrazolium
NO	Nitrik oksit
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforez
PMSF	Fenilmetil sülfonil florür
POD	Guaiakol peroksidaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SOD	Süperoksit dismutaz
SNP	Sodyum nitroprussid
TCA	Trikloroasetik asit
TFA	Trifloroasetik asit

---

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Çizelge 3.1</b> Protein tanımlamada kullanılan parametreler .....	29
<b>Çizelge 4.1</b> SNP ve/veya Cd uygulamalarına maruz bırakılan arpa fidelerinin yaprak dokularında MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ile tanımlanmış proteinler .....	35



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Savunma ile ilişkili genlerin aktivasyonuna ve ekspresyonuna yol açan Cd kaynaklı sinyal iletim yolunun genel şeması .....	8
Şekil 2.2 Bitkilerde Cd iyonlarının içsel alıkonması veya dışa atılması ile ilişkili olası mekanizmalar. ....	9
Şekil 2.3 Farklı bitki türlerinde proteomik analizler ile tanımlanmış proteinlerin fonksiyonları (a) ve hücrel lokalizasyonları (b).....	11
Şekil 2.4 Bitkilerdeki abiyotik stres cevapları ve sinyal iletim yolları.....	15
Şekil 2.5 Bitkilerin ağır metallere verdiği cevaplarda nitrik oksidin rolleri .....	22
Şekil 4.1 Arpa fidelerinin sürgün ve kök büyümesi üzerine SNP uygulaması ve Cd stresinin etkisi.....	30
Şekil 4.2 Arpa fidelerinin klorofil içeriği üzerine SNP uygulaması ve Cd stresinin etkisi. ....	31
Şekil 4.3 Arpa fidelerinin MDA içeriği üzerine SNP uygulaması ve Cd stresinin etkisi. ....	32
Şekil 4.4 Arpa yapraklarında hidrojen peroksit ve lipid peroksidasyonunun histokimyasal olarak belirlenmesi. ....	32
Şekil 4.5 Arpa fidelerinin yaprak dokularında antioksidan enzim aktiviteleri üzerine SNP uygulaması ve Cd stresinin etkisi. ....	33
Şekil 4.6 Kontrol, SNP, Cd ve SNP+Cd uygulamalarına maruz bırakılan arpa fidelerinin yaprak dokularından ekstrakte edilen proteinlerin iki-yönlü (2-D) elektroforetik profilleri.....	34
Şekil 4.7 STRING ( <a href="http://string.embl.de">http://string.embl.de</a> ) kullanılarak hazırlanan protein etkileşim haritası. ....	41
Şekil 4.8 BiNGO tarafından üretilmiş moleküler fonksiyon ağları.....	42

## 1. GİRİŞ

Tarımın kimyasal gübrelere olan bağımlılığının artması, atık sular ile sulama ve hızlı sanayileşme, toksik metallerin tarımsal topraklarda birikmesine neden olmaktadır. Son yıllarda, toprak, sucul ekosistemler ve bitkilerde ağır metal birikiminin olumsuz etkileri konusunda endişeler artmaktadır. Çeşitli ağır metaller arasında kadmiyum (Cd), toprakta binlerce yıl kalabilmekte ve tarımsal alanlar için önemli bir çevresel problem olarak kabul edilmektedir (Kumar 2013). Kadmiyumun gıda zincirine girmesi tüm dünyada küresel bir sorun ve ciddi bir sağlık problemi haline gelmektedir. Dünya genelinde potansiyel olarak tarıma elverişli arazilerin yaklaşık %40'ının Cd ile kirlenmiş olduğu ve Cd seviyesinin hala yükselişte olduğu tahmin edilmektedir (Saha vd. 2017). Bu nedenle, bitkilerin Cd stresine verdiği cevapların araştırılması büyük önem taşımaktadır.

Bitkiler diğer iki değerlikli iyonlarla birlikte Cd'ü kolaylıkla almaktadırlar (Liu vd. 2016). Kadmiyum büyüme ve gelişme için gerekli olmayan bir ağır metaldir ve Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı Cd'ü potansiyel bir kanserojen olarak sınıflandırmaktadır (Hermand vd. 2014). Zehirli Maddeler ve Hastalık Sicil Dairesi, tehlikeli maddelerin öncelik listesinde Cd yedinci sırada yer almaktadır (ATSDR 2017). Bitkilerde, Cd'un yapraklarda kloroza, büyümede inhibisyona, reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimine ve membranların peroksidasyonuna neden olarak toksisiteye yol açtığı bilinmektedir (Rady ve Hemida 2015, Sidhu vd. 2017). Diğer taraftan, Cd stresi karbohidrat metabolizması (Gill ve Tuteja 2010), fotosentez (Paunov vd. 2018), amino asit sentezi (Sharma ve Dietz 2006, Rady vd. 2016) ve poliamin birikimi (Groppa ve Benavides 2008; Rady ve Hemida 2015) gibi metabolik olayları etkilemektedir.

Bitkiler ağır metal stresine adapte olmak ve hayatta kalmak ve ağır metallerin zararlı etkilerinin detoksifikasyonu için önemli savunma sistemleri geliştirmiştir (Clemens 2006). Kadmiyum stresine bağlı olarak ROT'ların seviyesindeki artış antioksidan enzimlerin aktivasyonuna, strese cevap ile ilişkili genlerin ifade seviyelerinin artmasına ve peptitlerin, hormonların ve metabolitlerin sentezine neden olmaktadır (Baxter vd. 2013). Bununla birlikte, bitki hücre zarı sistemleri, metal alımı ve homeostazı için

gerekli olan çeşitli taşıyıcılara sahiptir. Plazma zarı ve tonoplast üzerinde bulunan metal taşıyıcılar, bitki hücrelerindeki ağır metallerin fizyolojik konsantrasyonlarının düzenlenmesi için oldukça önemlidir (Mendoza-Cózatı vd. 2011). Bununla birlikte, bitkilerde Cd toleransını artırmak için farklı stratejiler geliştirilmiştir. Bitkilerde salisilik asit, poliaminler ve brassinosteroidler gibi bitki büyüme düzenleyicileri (Belkadhi vd. 2014, Fariduddin vd. 2014, Nahar vd. 2016), organik asitler (de Araújo vd. 2017, Al Mahmud vd. 2018), selenyum (Wu vd. 2016) ve silikon (Tang vd. 2015) gibi kimyasallar bitkilerde Cd toleransının artırılması için kullanılmaktadır.

Nitrik oksit (NO), hücre zarlarından geçebilen gaz halinde serbest bir radikaldir. Son yıllarda, NO'nun ağır metallerle verilen yanıtlar da dahil olmak üzere bitkilerde çok sayıda fizyolojik ve patofizyolojik süreçte rol oynadığı bulunmuştur (Domingos vd. 2015, Sahay ve Gupta 2017, Umbreen vd. 2018). Çok sayıda çalışma NO'nun potansiyel bir sinyal molekülü olduğunu ve Cd stresine maruz kalan bitkilerde NO üretiminin arjinin bağımlı yolla olduğu bildirilmiştir (Rodríguez-Serrano vd. 2006, De Michele vd. 2009). Nitrik oksit, proteinlerin demir-kükürt veya hem merkezlerine ve sistein veya tirozin kalıntılarına bağlanıp proteinleri modifiye ederek Cd toleransında rol oynayan pek çok proteini düzenlemektedir (Arasimowicz-Jelonek ve Floryszak-Wieczorek 2011). Ayrıca birçok fitohormon, NO-teşvikli sinyal yollarını etkilemekte ve böylelikle birçok genin ifadesini düzenlemekte ve ağır metal stresi altında geniş bir savunma cevabı aralığı oluşturmaktadır (Pedranzani ve Vigliocco 2017). Çok sayıda çalışma, NO donörlerinin [sodyum nitroprussid (SNP) gibi] dışsal uygulamalarının bitkileri ağır metal kaynaklı hasara karşı koruduğunu göstermiştir (Terrón-Camero vd. 2019). Bitkilerde SNP uygulamasının ROT üretimini ve lipid peroksidasyonunu azalttığı ve böylece oksidatif stresi azaltarak ağır metal stresine karşı koruma sağladığı bilinmektedir (Terrón-Camero vd. 2019). Diğer taraftan, NO kök hücre çeperlerinin yapısını etkileyerek Cd'un kök dokusunda birikimini artırmakta ve toprak üstü dokularda birikimini azaltmaktadır (Liu vd. 2015). Dışsal SNP uygulamasının Cd stresi altındaki bitkilerde oksinin parçalanmasını azalttığı ve antioksidan etkinliği arttırdığı belirtilmiştir (Iqbal vd. 2017). Ayrıca Cd stresinin bezelye fidelerinde NO üretimini baskıladığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, Cd stresi altındaki çavdar ve acı bakla

bitkilerinde salisilik asit, hidrojen peroksit ve NO arasında çapraz bir etkileşim olduğu bildirilmiştir (Asgher vd. 2017).

Bitkilerde stres toleransını sağlayan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılabilmesi için metabolomik, transkriptomik ve proteomik gibi farklı “omik” yaklaşımları kullanılabilir (Mosa vd. 2017). Yüksek verimlilikli proteomik analizlerin, bitkilerde Cd stresine cevap olarak ifade seviyesi değişen proteinlerin kapsamlı şekilde belirlenebilmesi için güçlü bir araç olduğu kanıtlanmıştır. Önceki araştırmalarda, birçok farklı bitki türünün farklı dokularında 4720'den fazla Cd'a duyarlı protein tanımlanmıştır (Bagheri vd. 2015, Sun vd. 2016, Cao vd. 2017, Carneiro vd. 2017). Bu proteinlerin esas olarak fotosentez, enerji metabolizması, stres savunma, transkripsiyon ve translasyon, protein modifikasyonu, taşıma ve sinyal iletimi gibi süreçlerle ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Diğer taraftan, SNP uygulamasına maruz bırakılan çeltik yapraklarında 53 proteinin farklı şekilde ifade olduğu ve süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz, katalaz, askorbat peroksidaz, peroksidaz, monodehidroaskorbat redüktaz ve glutatyon S-transferaz gibi antioksidan savunma ile ilgili proteinlerin artan yönde düzenlendiği bildirilmiştir (Lee vd. 2019). Kadmiyum stresi altındaki salatalık bitkilerinde NO'nun fotosentez ile ilişkili proteinleri artırdığı, glutatyon metabolizmasında rol oynayan proteinleri düzenlediği rapor edilmiştir (Gong vd. 2017). Bitkilerde Cd gibi ağır metal toksisitesinin hafifletilmesinde dışsal SNP'nin rollerini araştıran çok sayıda çalışma olmasına karşın, bu iyileştirici etkilerin altında yatan moleküler mekanizmaları araştıran çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle, bu araştırmada Cd stresi altındaki arpa yapraklarında fizyolojik, metabolik ve proteomik değişiklikleri NO'nun nasıl düzenlediği hakkında kapsamlı bilgilerin elde edilmesi amaçlanmıştır.

## 2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

### 2.1 Bitkilerde Kadmiyumun Alımı, Taşınımı ve Depolanması

Son iki yüzyıl boyunca artan endüstriyel faaliyetler ve madencilik nedeniyle, çevre kirliliği dünya çapında önemli bir sorun haline gelmiştir. Çevre kirliliğine neden olan çeşitli faktörler arasında kadmiyum (Cd), kurşun ve cıva gibi tehlikeli ağır metaller, antropojenik aktiviteler sonucu çevreye yüksek oranlarda yayılmalarından dolayı ağır metal kirliliğinin önemli bir bölümünden sorumludurlar (Pinto vd. 2004). Toprakta kalma süresi binlerce yıl olabileceğinden Cd tarım sistemi için önemli bir çevresel endişe olarak kabul edilmektedir (Kumar 2013). Kadmiyum 2B grubunda bulunan bir geçiş metalidir ve iyi bir iletken ve korozyona karşı direnç gösterir. Cd'un bu özellikleri alaşım, boya, Ni-Cd pil, pigment ve plastik endüstrilerinde kullanımını artırmaktadır (Sebastian ve Prasad 2014). Kirlenmemiş topraklarda bulunan Cd konsantrasyonları genellikle  $0.5 \text{ mg kg}^{-1}$ 'in altındadır, ancak toprak ana materyallerine bağlı olarak  $3.0 \text{ mg kg}^{-1}$ 'a kadar çıkabildiği bildirilmiştir (Nazar vd. 2012). Bununla birlikte, madencilik faaliyetleri, kanalizasyon atıkları ve fosfat gübrelerinin kullanımı gibi aktiviteler topraklarda Cd konsantrasyonlarının artmasına yol açmaktadır (Rehman vd. 2015, Huang vd. 2017).

Cd'un bitkilerde önemli bir işlevi yoktur, ancak kökler tarafından kolayca alınmakta ve yenilebilir bitki kısımlarına taşınmaktadır (Adams vd. 2004). Ağır metaller, uygun taşıma sistemleri ile bitki gövdelerine girerler. Yüksek bitkilerde, topraktan inorganik besinlerin ve ağır metal iyonlarının alımı kök salgıları ve rizosferik mikroorganizmalar tarafından düzenlenmektedir. Cd gibi ağır metal iyonları için herhangi bir biyolojik fonksiyonun bulunmaması, bitkilerdeki spesifik bir taşıyıcısının bulunmaması anlamına gelmektedir (Ghosh ve Roy 2019). Bitki hücre zarı sistemleri, metal alımı ve homeostaz için gerekli olan çeşitli taşıyıcılara sahiptir. Plazma zarı ve tonoplast üzerinde bulunan metal taşıyıcıları, bitki hücrelerindeki ağır metallerin fizyolojik konsantrasyonlarının düzenlenmesi için oldukça önemlidir. Bitki köklerinde Cd alımı ve taşınması hem apoplastik hem de simplastik yollarla gerçekleşmektedir (Lux vd. 2011). Bitkilerde P tipi ATPaz ağır metal taşıyıcıları (HMA'lar), doğal dirençle ilişkili makrofaj proteini

(NRAMP) ve ZIP protein ailesi Cd alımında ve taşınmasında rol oynayan önemli taşıyıcı aileleridir (Persans vd. 2001, Sebastian ve Prasad 2014). *Arabidopsis halleri* köklerindeki ZIP6 ve ZIP9 ve *Thlaspi caerulescens* bitkilerindeki ZTN1 ve ZTN2 gibi ZIP ailesi taşıyıcıları, Zn ile birlikte Cd'un alımında işlev görmektedir (Weber vd. 2006). *Arabidopsis thaliana*'da, ZIP taşıyıcı ailesinin bir başka üyesi olan IRT1'in, Cd, Fe, Mn, Ni ve Zn gibi iki değerlikli katyonların taşınmasında rol oynadığı gösterilmiştir (Rogers vd. 2000).

Kök hücrelerindeki taşıyıcılarla alındıktan sonra ağır metal iyonları, ksilem elemanlarına girmekte ve çeşitli metal iyon şelatörleri ile kompleksler oluşturarak toprak üstü kısımlara taşınmaktadır. ATP-bağlayıcı kaset taşıyıcı (ABC) ailesi üyesi bir taşıyıcının, buğday bitkilerinde Cd'un ksileme yüklenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Kretschmar vd. 2011). Ksilem yüklemesi ATP'ye bağımlı bir işlem olduğundan, Cd'un toprak üstü organlara taşınması, mitokondriyal solunum ve fotosentetik elektron taşınması gibi ATP üretici yollara bağlıdır. Cd'un köklerden toprak üstü kısımlara taşınması, HMA ailesine ait taşıyıcılar yardımıyla gerçekleşmektedir (Uraguchi vd. 2009). *A. thaliana*'da AtHMA4 proteini, plazma zarı P tipi ATPaz olarak işlev görmekte ve sitozolik serbest  $Ca^{+2}$ 'un seviyelerini koruyarak Cd detoksifikasyonunda rol oynamaktadır. Bununla birlikte, bir Zn/Cd taşıyıcı olarak işlev gören AtHMA3 proteininin Cd ve Zn homeostazının düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Mills vd. 2005, Mendoza-Cózatl vd. 2011). Kadmiyumun vakuollerde depolanması fotosentez gibi metabolik yolların çalışmasını sağlamak için gereklidir. Cd'un vakuollerde alıkonması, metal hiperakümülatör bitkilerinin karakteristik bir özelliği olan yapraklarda Cd'un daha fazla birikmesini sağlamaktadır. Arpa gibi tahıl bitkileri ise yapraklara kıyasla kökte daha fazla Cd biriktirmektedir (Harris ve Taylor 2013). ABC taşıyıcıları ağır metallerin vakuole taşınmasında çok önemli bir rol oynamaktadır. *Arabidopsis*'teki ABC taşıyıcı ailesinin iki önemli üyesi olan AtMRP1 ve AtMRP2'nin fitoşelatin-Cd komplekslerinin vakuole taşınmasında rol oynadığı bildirilmiştir (Song vd. 2014). Diğer taraftan, diğer bir ABC ailesi taşıyıcısı olan AtPDR8'in, kök tüyleri ve epidermal hücrelerin plazma zarında Cd'un dışa atılması için bir pompa işlevi göerek ağır metal toleransını sağladığı bildirilmiştir (Kim vd. 2007).

## 2.2 Bitkilerde Kadmiyum Stresinin Etkileri

Esansiyel olmayan ve toksik bir element olan Cd, çevreye zararlı kirleticilerden biridir. Bitkilerde, Cd birikiminden kaynaklanan toksisite belirtileri arasında kloroz, solma, büyüme inhibisyonu ve hatta hücre ölümü bulunur (Gill vd. 2013). Kadmiyumun bitkilerde reaktif oksijen türlerinin oluşumunu teşvik ederek ve proteinlerin karboksil veya tiyol grupları ile doğrudan etkileşime girerek önemli metabolik yolları bozduğu ileri sürülmüştür (Xiong vd. 2010). Bitkilerde Cd stresinin neden olduğu toksisite belirtileri birçok ağır metal için belirtilen durumlara benzemektedir (Sharma vd. 2016). Cd stresi Fe ve Ca gibi elementlerin hücre içi seviyelerinde bozulmalara yol açmaktadır (Gupta vd. 2017). Antioksidan savunma sistemindeki dengesizlik, Cd iyonlarının metaloproteinlerdeki Cu ve Fe iyonlarının yerine geçmesi ve solunum zinciri bozukluğu nedeniyle Fenton reaksiyonlarının tetiklenmesine bağlı olarak oksidatif strese neden olan redoks durumu dengesizliğine neden olmaktadır (Cuypers vd. 2016). Proteinlerin sistein rezidülerine Cd'un bağlanması (Schützendübel ve Polle 2002) ve proteinlerin fonksiyonel bölgelerindeki metallerin Cd ile yer değiştirmesi (Clemens 2006) enzim inaktivasyonuna neden olmaktadır.

Cd'un yapraklara girişi ksilem yoluyla gerçekleşmektedir (Song vd. 2017). Yaprakta yüksek miktarda Cd birikimi, fotosentez gibi metabolik yollarda değişikliklere neden olarak verimliliği azaltmaktadır (Paunov vd. 2018). Fotosentetik aktivitedeki bu düşüş pigment seviyelerindeki azalmanın yanı sıra, CO<sub>2</sub> asimilasyon hızı ve RuBisCO aktivitesindeki azalmadan kaynaklanabilmektedir (Asgher vd. 2014). Fotosentezin ışık reaksiyonlarındaki hasarın fotooksidatif strese neden olduğu iyi bilinmektedir. Bu nedenle, Cd stresi altında fotosentetik ışık reaksiyonunun engellenmesi yapraklardaki oksidatif stresi hızlandırmaktadır (Sebastian ve Prasad 2019). Bununla birlikte, Cd stresi azot asimilasyonunu ve besin elementlerinin alımını etkileyebilmektedir (Sebastian ve Prasad 2015). Cd stresi altında besin elementlerinin alımındaki azalmanın, Cd'un taşıyıcılar için diğer elementlerle rekabetinden veya demir taşıyıcı protein olan IRT1'de olduğu gibi metal girişini önlemek için taşıyıcıların inhibisyonundan kaynaklanmaktadır (Rizwan vd. 2016). Bununla birlikte, *Arabidopsis* bitkilerinde Cd'un köklere girişinde ve toprak üstü dokulara taşınımının düzenlenmesinde NADPH oksidazların önemli bir

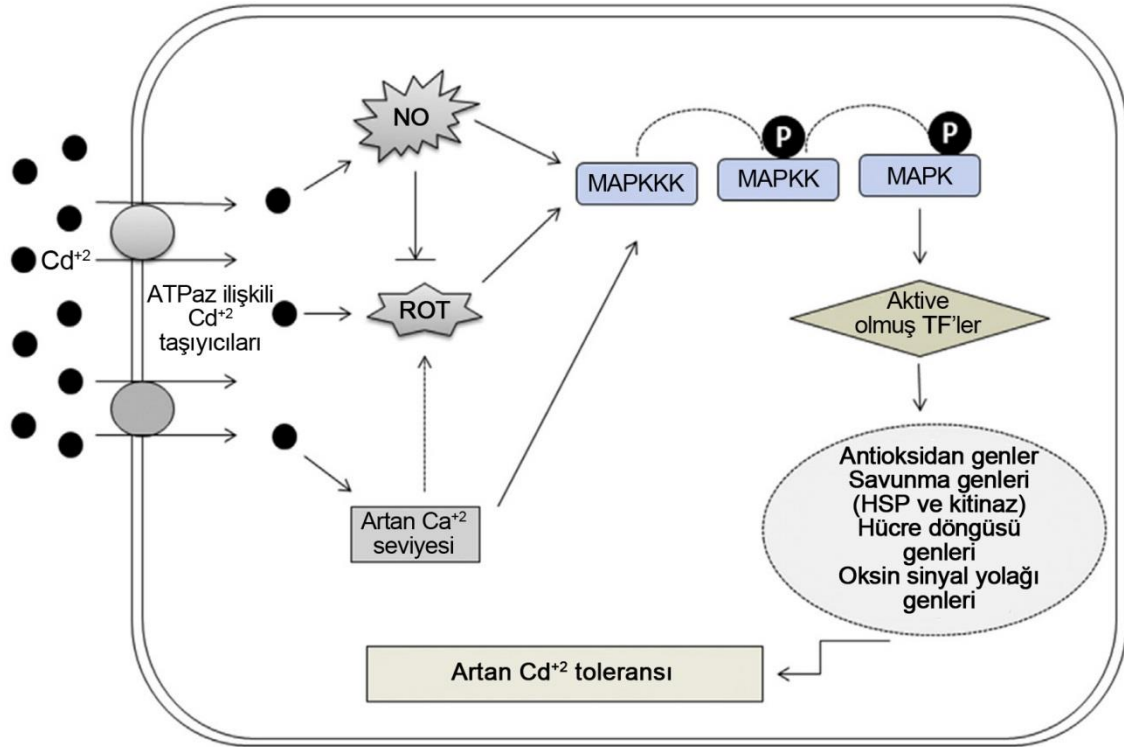
rolü olabileceği gösterilmiştir (Gupta vd. 2017). Cd toksisitesinin tüm semptomları sonuçta bitki büyümesini ve verimini azaltmakta ve bazen bitki ölümüne yol açan genotoksositeye neden olmaktadır. Bununla birlikte, toksisitenin şiddeti, bitkinin büyüme aşamasına, metal konsantrasyonuna, maruz kalma süresine ve bitkinin tolerans mekanizmalarına bağlıdır (Romero-Puertas vd. 2019).

### **2.3 Bitkilerin Kadmiyuma Verdiği Hücresel Cevaplar**

Bitkilerin ağır metallere duyarlılığı etkileşim halinde olan fizyolojik ve moleküler mekanizma ağına bağlıdır. Bu mekanizmalar (1) hücre dışı salgılara ve hücre çeperi bileşenlerine bağlanarak metallerin alınması ve birikmesi, (2) ağır metallerin sitozol gibi biyoaktif bölgelerden uzaklaştırılması için vakuollere taşınması, (3) ağır metal iyonlarının hücre içinde organik ve amino asitler, fitoşelatinler (PC'ler) ve metalotiyoneinler gibi çeşitli bileşikler ile kompleks oluşturması, (4) ozmolitlerin ve ozmotik koruyucu bileşiklerin birikmesi ve antioksidatif enzimlerin artan seviyeleri ve (5) metabolik yolların yeteri kadar çalışmasına ve hasarlı hücrelerin hızlı bir şekilde onarılmasına izin vermek için bitki metabolizmasının düzenlenmesini içermektedir (Cho vd. 2003).

Kadmiyum stresinin olumsuz etkilerinin üstesinden gelinebilmesi için bitki hücreleri Cd stresini algılayabilmeli ve Cd'a tolerans sağlayacak şekilde tepki verebilmelidir. Kadmiyum stresinin algılanması ve tolerans mekanizmaları, gen ve proteinlerin ifadesindeki değişiklikler gibi karmaşık fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerin koordinasyonunu gerektirmektedir (Urano vd. 2010). Bir stres koşuluna yanıt olarak gen ekspresyonu ve gen regülasyonundaki değişikliklerin iyi anlaşılması, sinyal iletim yolları hakkındaki bilgi sağlamak için önemlidir. Metabolom, transkriptom ve proteom seviyesindeki araştırmalar Cd kaynaklı sinyalleme mekanizmalarını ortaya koymak için gerçekleştirilmiştir (Arruda ve Azevedo 2009). Sinyal yolları, bitkilerde Cd alımını ve taşınımını düzenlemeye yardımcı olmaktadır (DalCorso vd. 2010). Sinyal iletim yolları genellikle Cd'a duyarlı genlerin transkripsiyonuna yol açmaktadır. Bu tür sinyal iletim yolları protein komplekslerinin aktivasyonu, hormon aracılı düzenleme, reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi ve stresle ilişkili genlerin

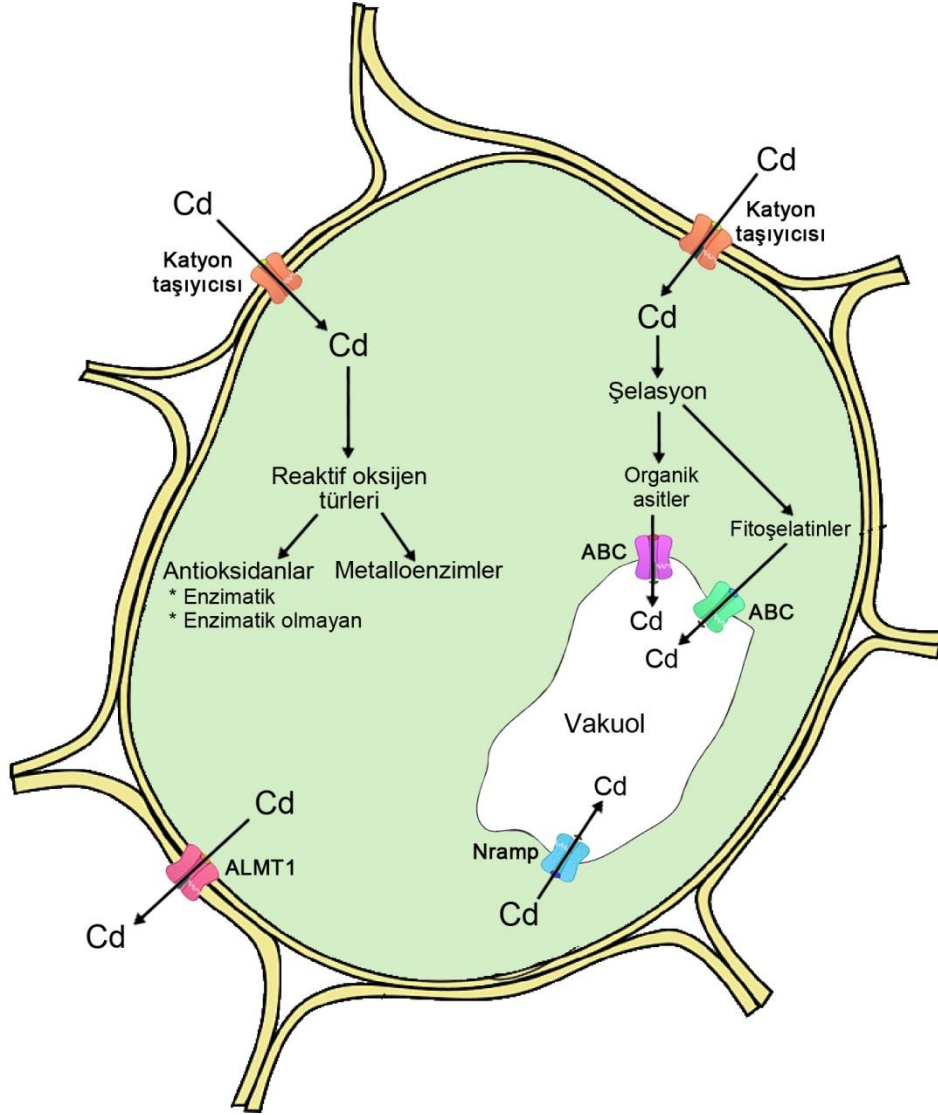
transkripsiyonunu sağlayan transkripsiyon faktörlerini (TF'leri) aktive eden ikincil habercilerin sentezi gibi farklı mekanizmaları içermektedir (Şekil 2.1) (DalCorso vd. 2010).



**Şekil 2.1** Savunma ile ilişkili genlerin aktivasyonuna ve ifadesine yol açan Cd kaynaklı sinyal iletim yolunun genel şeması (Amir vd. 2019'tan değiştirilerek).

Bitkilerde Cd sinyallerine aracılık eden anahtar moleküller ROT'lar ve nitrik oksitir (Besson-Bard vd. 2009). Cd stresi altında ROT üretimi, NADPH oksidaz, fotosentez ve solunumun aktivitesi yoluyla gerçekleşir (Heyno vd. 2008). Cd stresine bağlı olarak artan ROT seviyesi, antioksidan enzimlerin (SOD, CAT, APX, POD ve GR gibi) aktivasyonuna yol açan mitokondriyal ve ER streslerine neden olmaktadır. Antioksidan savunma sistemine ek olarak, kalsiyum-sinyal yolları ile strese duyarlı genlerin aktivasyonu ve diğer birçok bitki hormonu ve metabolitin sentezi stresin etkilerini hafifletmektedir (Baig vd. 2019). Bitkilerde hücresel düzeyde, mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) şelalesi adı verilen üç ardışık protein kinazdan oluşan bir ağ, MAPKKK (MAPK kinaz kinaz), MAPKK (MAPK kinaz) ve MAPK'yı içeren stres sinyalleme mekanizmasında yer almaktadır (Widmann vd. 1999). Bu tür birçok

fosforilasyon şelalesinin, Cd aracılı stres sinyal iletiminde rol oynadığı düşünülmektedir (Jonak vd. 2004). MAPK kinaz bağımlı sinyal yollarının aktivasyonu, Cd stresi altındaki bitkilerde rapor edilmiştir (Sinha vd. 2011).



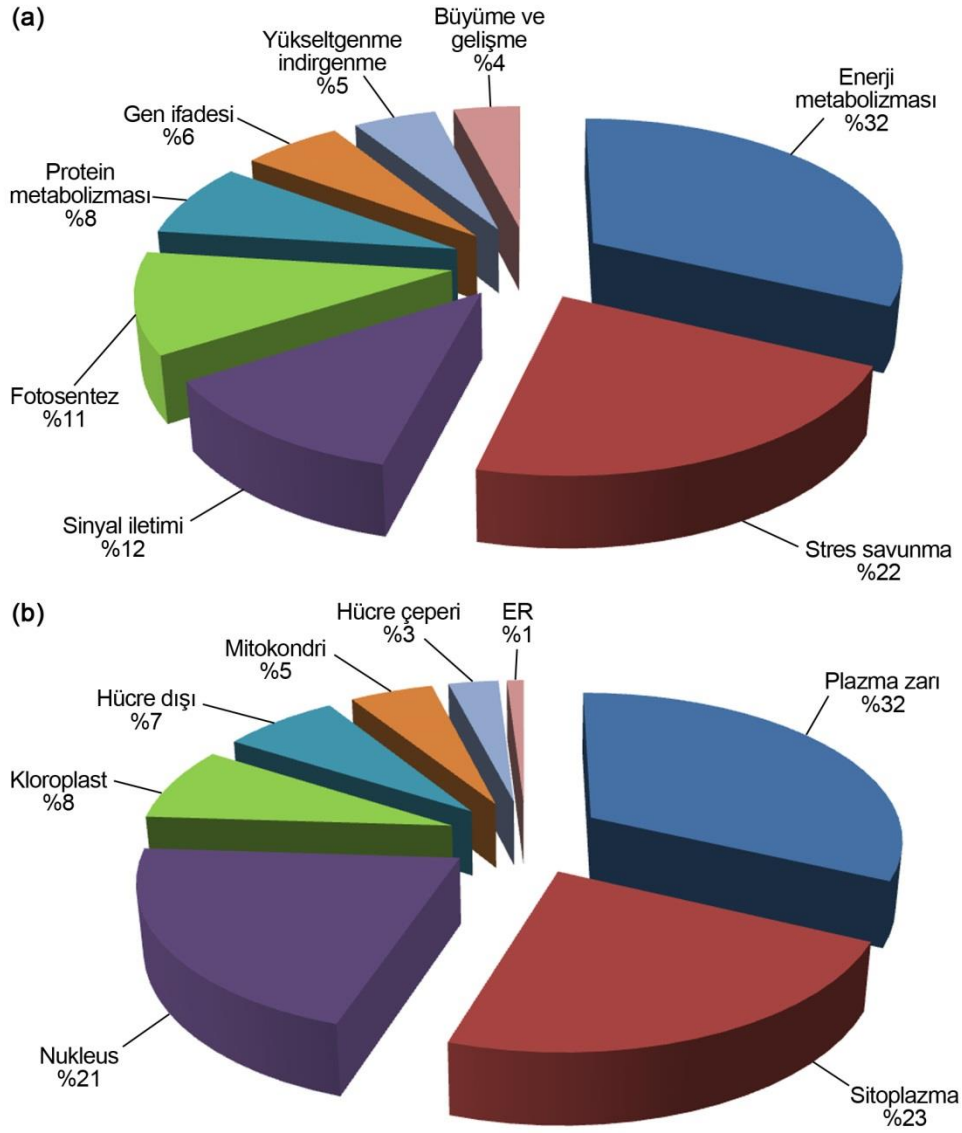
**Şekil 2.2** Bitkilerde Cd iyonlarının içsel alıkonması veya dışa atılması ile ilişkili olası mekanizmalar (Sebastian ve Prasad 2019'tan değiştirilerek).

Cd hücreye girdikten sonra en iyi karakterize edilmiş bitki yanıtlarından biri de ağır metalleri şelatlayan bir peptid olan fitoşelatinlerin (PC'ler) sentezidir (Mendoza-Cózatl vd. 2010). PC'ler, substrat olarak GSH'un kullanıldığı ve fitoşelatin sentaz (PCS) ile enzimatik olarak sentezlenen sistein açısından zengin peptitlerdir (Al-Huqail vd. 2017). Kadmiyum stresine maruz kalan bitkilerde PCS'm etkinleştiği bildirilmiştir (Thangavel vd. 2007). Bitkilerde Cd-PC kompleksleri oluşuktan sonra vakuol içine ABC

taşıyıcıları (Vögeli-Lange ve Wagner 1990), Cd/proton antiportörleri (Berezin vd. 2008) ve V-ATPaz veya V-PPaz (Sharma vd. 2016) proteinleri ile taşınmaktadır (Şekil 2.2). Cd detoksifikasyonunda anahtar rol oynayan vakuolun hacmi ve şekli ağır metal stresine yanıt olarak değişmektedir (Sharma vd. 2016). Diğer taraftan, transkripsiyon sonrası düzeyde TF'leri ve stresle ilişkili spesifik mRNA'ları negatif olarak düzenleyen mikroRNA'ların (miRNA'lar) da ağır metal toleransında rol oynadığı bulunmuştur (Cuypers vd. 2016).

#### **2.4 Bitkilerin Kadmiyuma Verdiği Proteomik Cevaplar**

Son yıllarda, “Omik” yaklaşımları, çevresel streslerin neden olduğu değişikliklerin kapsamlı şekilde analizlerine izin vermektedir. Bitkilerde transkriptomik, metabolomik ve proteomik gibi farklı yaklaşımlardan elde edilen verilerin analiz edilmesi, stres toleransı altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır (Mosa vd. 2017, Ahmad vd. 2018). Proteomik ve metabolomik veriler, transkriptomik düzeyde regülasyonu ve karmaşık hücresel ağları bütünsel olarak anlamak için transkriptom profilleri ile ilişkilendirilebilir (Urano vd. 2010). Farklı omik verilerin birlikte yorumlanması metabolizma, büyüme, gelişme ve stres tepkisini kontrol eden fonksiyonel ağların belirlenmesine yardımcı olmaktadır (Moreno-Risueno vd. 2010). Proteomik, ağır metal toleransı ve hücresel detoksifikasyon ilişkili mekanizmalarda yer alan proteinler, etkileşim ağları ve metabolik yollar hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır (Hossain ve Komatsu 2013). Proteomik, Cd gibi stres koşulları altındaki bitkilerin proteomları karşılaştırmak için kullanılabilir. Proteomik yaklaşım, Cd stresi ile ilişkili birçok proteinin tanımlanması için *Arabidopsis thaliana* (Carneiro vd. 2017), *Oryza sativa* (Liu vd. 2020), *Cucumis sativus* (Gong vd. 2017), *Solanum lycopersicon* (Borges vd. 2019) ve *Brassica napus* (Luo ve Zhang 2019) gibi birçok bitki türünde kullanılmıştır. Bu proteinlerin ağırlıklı olarak fotosentez ve enerji metabolizması, stres savunma ve detoksifikasyon, gen ifadesi, protein metabolizması ve sinyal iletimi gibi olaylarda işlev gördüğü bildirilmiştir. Bununla birlikte, bu proteinlerin farklı hücresel lokalizasyonlara sahip olduğu bulunmuştur (Şekil 3.3) (Ahmad vd. 2019).



**Şekil 2.3** Farklı bitki türlerinde proteomik analizler ile tanımlanmış proteinlerin fonksiyonları (a) ve hüresel lokalizasyonları (b) (Ahmad vd. 2019'tan değiştirilerek).

#### 2.4.1 Kadmiyum Stresi ve Enerji Metabolizması ile İlişkili Proteinler

Bitkilerde, karbohidrat ve enerji metabolizması stres koşullarında metabolik yolların ve karbohidrat dengesinin korunması için önemli biyolojik süreçlerdir. Karbohidratlar en fazla bulunan metabolitlerdir ve abiyotik stres koşullarında enerji kaynakları ve sinyal molekülleri olarak hizmet etmektedirler. Glikoliz, glikozu pirüvat dönüştüren ve enerji üreten metabolik bir süreçtir (Ahmad vd. 2019). Glikoliz ve ATP sentezindeki bazı anahtar enzimler Cd stresine cevapta önemli rol oynamaktadır. Fruktokinaz

seviyesindeki artışın karbohidrat metabolizması homeostazisinin yeniden kurulması için faydalı olabildiği, hasarlı proteinlerin ve zarların korunması ve restorasyonunda rol oynayabildiği bildirilmiştir (Bah vd. 2010). Fosfogliserat kinaz proteininin buğday fidelerinde oksidatif stresin etkilerinin üstesinden gelmede yardımcı olduğu bildirilmiştir (Mohapatra ve Mittra 2016). Triozfosfat izomeraz glikolizde önemli bir rol oynamakta ve verimli enerji üretimi için gerekli olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte, glikoliz ve trikarboksilik asit (TCA) döngüsü ile ilişkili proteinlerin hassas domates genotipinde güçlü bir şekilde azaldığı ve bu azalmanın büyümedeki inhibisyon ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Borges vd. 2019).

Glikolizin yanı sıra TCA döngüsü de Cd stresi altındaki bitkilerde farklı şekilde düzenlenebilmektedir. TCA döngüsü, karbohidratlar, yağlar ve proteinler gibi moleküllerden elde edilen asetil-CoA'nın karbondioksite oksidasyonu ile ATP ve NADH formunda enerji depolayabilen bir dizi kimyasal reaksiyondur. TCA döngüsü ile ilişkili proteinler arasında süksinat dehidrogenaz hem TCA döngüsünde hem de elektron taşıma zincirinde fonksiyon görmektedir ve stres koşullarında mitokondrinin işlevliğini koruyan önemli bir enzimdir (Jardim-Messeder vd. 2015). Sitrat sentaz ve izositrat dehidrogenaz da önemli işleve sahiptir, çünkü bu enzimler sitrik asit döngüsünün bir düzenleme noktası olarak işlev görmektedir. Karbohidrat metabolizması ile ilgili bu tür enzimlerin artan yönde düzenlenmesi, bitkilerin Cd stresi ile başa çıkmak için sürekli enerji gereksiniminin önemli olduğunu göstermektedir (Ahmad vd. 2019).

#### **2.4.2 Kadmiyum Stresi ve Savunma Sistemi ile İlişkili Proteinler**

Kadmiyum, bitki hücrelerine zarar veren reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimini teşvik etmektedir (Cuypers vd. 2016). Bitkiler, oksidatif stresin etkilerini en aza indirmek için ROT temizleme mekanizmasının geliştirilmesi gerekmektedir. Bu mekanizmalar arasında antioksidan savunma sistemi süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi çeşitli antioksidan enzimlerin aktivasyonu ile ilişkilidir. Bu enzimler, ağır metal kaynaklı ROT'ların detoksifikasyonuna katılmaktadırlar (Štolfa vd. 2015). Antioksidan savunma sisteminin ilk enzimi olan SOD süperoksit radikallerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye dönüşümünü kataliz

etmekte ve Cd stresi altındaki bitki türlerinde SOD proteinlerinin arttığı gösterilmiştir (Ma vd. 2015, Borges vd. 2019). Bitkilerde, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğinin düzenlenmesinde CAT ve APX proteinlerinin ifade seviyelerinin Cd stresi koşullarında artan yönde düzenlendiği bildirilmiştir (Sun vd. 2016, Xu vd. 2017, Zhong vd. 2017). Bununla birlikte, proteomik analizler, Cd stresinin glutatyon–askorbat döngüsü enzimleri olan GR, dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) ve monodehidroaskorbat redüktaz (MDAR)'ın ifade seviyelerinde değişikliklere neden olduğunu göstermiştir (Cao vd. 2017, Gong vd. 2017, Xu vd. 2017). Hücre çeperinde lokalize olan peroksidazların (POD) bolluğunun Cd stresi altında arttığı ve bu durumun hücre çepri lignifikasyonuna, sertleşmesine ve sonuç olarak büyüme bozukluğuna yol açtığı ileri sürülmüştür (Gutsch vd. 2018).

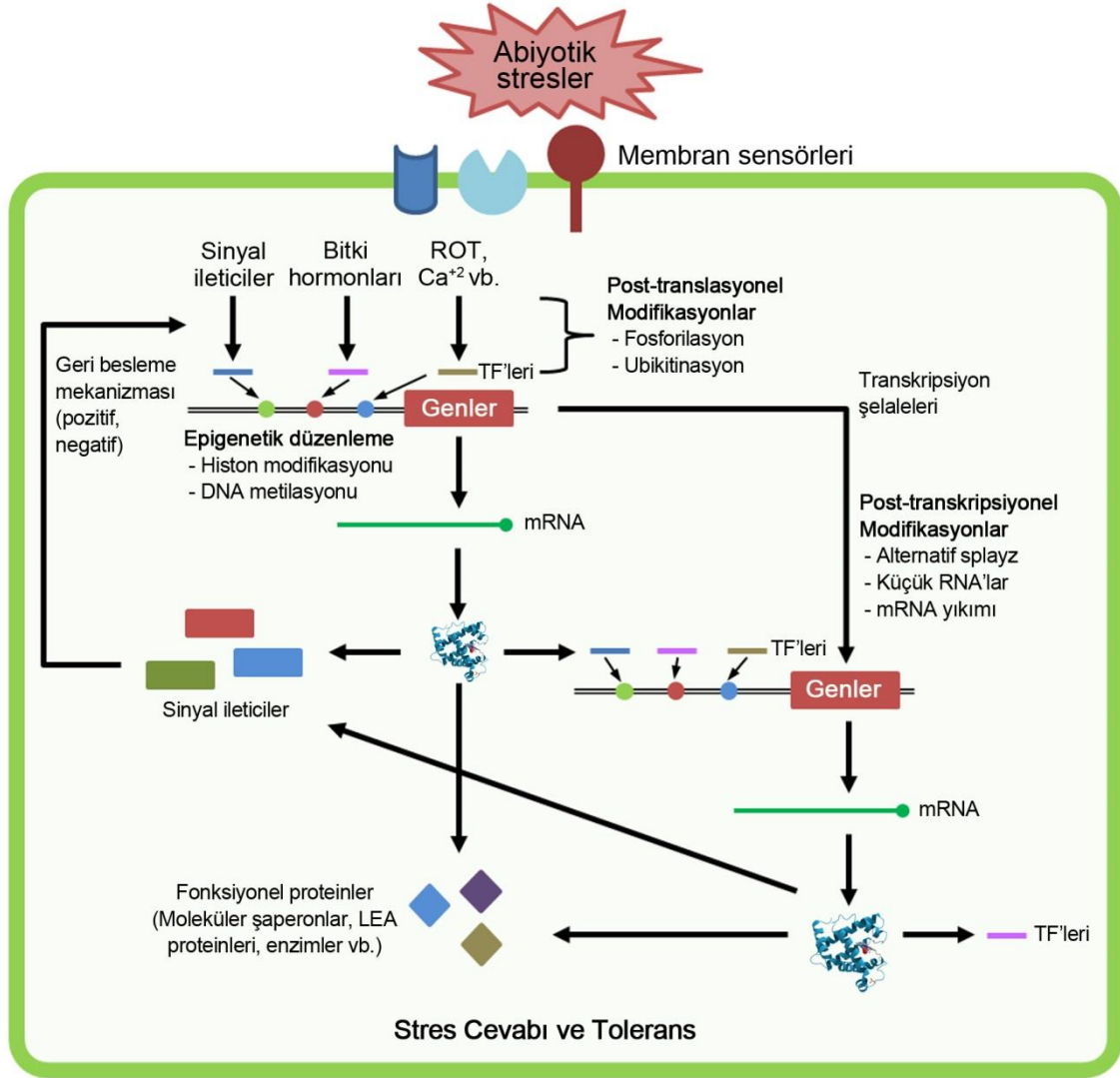
Stres koşullarında normal hücre fonksiyonlarının sürdürülmesi direkt olarak protein fonksiyonlarının sürdürülmesi ile ilişkilidir. Zarar görmüş proteinlerin onarılmasına ve doğal yapılarının tekrar kazanılmasına yardımcı olan ısı şoku proteinleri (HSP) ağır metaller gibi birçok stres koşulunda hücrelerde yüksek seviyelerde birikmektedir (Ahsan vd. 2009). Cd stresi, HSP'ler ve şaperonlar gibi çeşitli düzenleyici proteininin bolluğunda değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (Sun vd. 2016, Xu vd. 2017, Zhong vd. 2017). Örneğin, HSP90 ve HSP40/DnaJ'lerin bitki savunmasında yer aldığı bildirilmiştir (Park ve Seo 2015). Bununla birlikte, tütün bitkilerinde yonca-DnaJ (MsD-JLP) proteininin aşırı ifadesinin yüksek sıcaklık ve soğuk streslerine karşı toleransı artırdığı bulunmuştur (Lee vd. 2018).

Bitkiler kendilerini stres kaynaklı yaralanmalardan korumak için çok çeşitli savunma cevaplarını aktive ederler. Hastalığa dirençli yanıt proteini ve patogenezle ilişkili (PR) proteinlerin savunma yanıtlarında rol oynadığı bilinmektedir (Buchanan vd. 2005). Bazı PR protein izoformlarının, Cd stresi altındaki çeşitli bitki türlerinde önemli seviyede arttığı bildirilmiştir (Dai vd. 2017, Xu vd. 2017, Zhong vd. 2017). Kitinazlar genellikle patogenezle ilişkili proteinler olarak kabul edilmekte ve bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır. Patojen stresine karşı bitki yanıtlarındaki rollerine rağmen, kitinazlar çeşitli abiyotik streslerde de rol oynamaktadır (Grover 2012). Kitinaz proteininin ifade seviyesindeki artış Cd stresi altındaki bazı bitki türlerinde de belirlenmiştir (Daud vd.

2015, Gutsch vd. 2018). Bu bulgular, Cd'un bitki-patojen etkileşimi tarafından üretilen aşırı duyarlı yanıtta benzer bir yanıtı teşvik ettiğini göstermektedir (Ahmad vd. 2019).

### 2.4.3 Kadmiyum Stresi ve Sinyal İletimi ile İlişkili Proteinler

Kadmiyum stresi altında gen ifadesinin regülasyonu spesifik sinyal iletim yolları ile gerçekleştirilmektedir. Bu tür sinyal yolları, protein komplekslerinin aktivasyonu, hormon aracılı düzenleme ve ikinci habercilerin sentezi gibi farklı mekanizmaları içermektedir (Şekil 2.4) (DalCorso vd. 2010). 14-3-3 proteinleri, tipik olarak fosforilasyona bağlı etkileşimlerle fonksiyonel olarak farklı yüzlerce proteini ve enzimleri düzenlemektedir (Chang vd. 2009). Bu proteinlerin, kalsiyum bağımlı protein kinaz (CDPK) ve mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) gibi bir dizi sinyal iletim molekülü ile etkileştiği bildirilmiştir (Ormancey vd. 2017). CDPK'ler, doğrudan  $Ca^{+2}$  sinyallerini ileten ve çoklu çevresel uyaranlara yanıt olarak bitkilerdeki serbest  $Ca^{+2}$  seviyelerinin yükselmesini tetikleyen önemli bir  $Ca^{+2}$  sensör proteindir (Gao vd. 2014). Proteomik çalışmalarda, 14-3-3 proteinlerinin Cd stresi altındaki bazı bitki türlerinde farklı şekilde ifade olduğu belirlenmiştir (Xie vd. 2014, Zhong vd. 2017). Bununla birlikte, *Escherichia coli* bakterisinde *Hevea brasiliensis* 14-3-3c proteininin aşırı ifadesinin Co, Cu ve Zn ağır metallerine karşı toleransı artırdığı bildirilmiştir (Yang vd. 2012). Sonuç olarak, 14-3-3 proteinlerinin sinyal iletimi, transkripsiyonun aktivasyonu ve savunma ile ilişkili hedef proteinlerin düzenlenmesi gibi çeşitli hücresel cevapların oluşmasında rol oynayabildiği bildirilmiştir (Ahmad vd. 2019). Diğer bir sinyal iletimi ile ilişkili protein olan MAPK biyotik ve abiyotik stres yanıtlarında önemli bir rol oynamaktadır (Ichimura vd. 2002). MAPK yolunun ROT indüksiyonu yoluyla Cd tarafından aktive edildiği bildirilmiştir (Dai vd. 2017). Diğer taraftan, kalmodulin ve CDPK proteinlerinin Cd stresi altında azalan yönde düzenlendiği ve Cd stresi altında  $Ca^{+2}$  sinyal yollarının inhibe olduğu rapor edilmiştir (Xu vd. 2017).



Şekil 2.4 Bitkilerdeki abiyotik stres cevapları ve sinyal iletim yolları (Baig vd. 2019'tan değiştirilerek).

#### 2.4.4 Kadmiyum Stresi ve Fotosentez ile İlişkili Proteinler

Kadmiyum stresinin karbon asimilasyonu ve fotosentetik elektron transferi gibi fotosentetik süreçlerde belirgin bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Bashir vd. 2015). Cd stresi sırasında fotosentezdeki azalmanın, Cd'un RuBisCO (ribuloz-1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz) aktivitesi üzerindeki zararlı etkisinin sonucudur. Birçok araştırmada, RuBisCO'nun büyük ve küçük altbirimlerinin yanı sıra gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz, sedoheptuloz-1,7 bifosfataz, transketolaz ve karbonik anhidraz (CA) gibi CO<sub>2</sub> özümleme yollarında işlev gören birçok proteinin Cd stresi altında

farklı şekilde ifade edildiği gösterilmiştir (Sergeant vd. 2014, Roy vd. 2016, Gong vd. 2017, Rao vd. 2017). Yapraklar yüksek dozlarda Cd'a maruz kaldığında CA proteinin fotosistem bileşenlerini değiştirebilmekte ve sonuç olarak CO<sub>2</sub> homeostazının düzenlenmesinin bozulmasını hızlandırmakta ve bu da CO<sub>2</sub> tükenmesini ve O<sub>2</sub> birikimini teşvik etmektedir (D'Alessandro vd. 2013). CA'nın, özellikle karboksilasyon/dekarboksilasyon gibi birçok biyolojik süreçte önemli bir enzim olduğu düşünülmektedir (Moroney vd. 2001).

Kadmiyum stresi sadece CO<sub>2</sub> özümlemesi ile ilgili enzimlerin değil aynı zamanda fotosentezin ışık reaksiyonlarından sorumlu birçok proteinin de ifade seviyesinde değişimlere neden olmaktadır. Kadmiyum stresinin ışık-yakalayan klorofil a/b bağlayıcı protein (LHCB), oksijen üretici kompleks (OEC) ve oksijen üreten arttırıcı protein (OEE) gibi proteinleri etkileyerek fotosistem II aktivitesini değiştirdiği bildirilmiştir (Roy vd. 2016, Sun vd. 2016, Gong vd. 2017). Ferredoksin-NADP redüktaz (FNR), ferredoksin NADP<sup>+</sup>'ya fotosentetik elektron taşınmasında rol oynar ve bitkilerdeki CO<sub>2</sub>'nin asimilasyonu için gereklidir (Musumeci vd. 2012). Cd stresi altındaki bitkilerde FNR proteininin azalması fotosistemin bütünlüğünü bozduğuna işaret etmektedir (Gong vd. 2017, Rao vd. 2017).

#### **2.4.5 Kadmiyum Stresi ve Metal Taşınımı ile İlişkili Proteinler**

Bitkilerin toprak üstü kısımlarında Cd birikimi, kök dokuları içine Cd'un apoplastik olarak girişi, hücre çeperi tarafından tutulması, membranlardan enerji bağımlı taşınımı, vakuollerde alıkonulması ve ksileme yüklenmesi gibi çeşitli işlemlerle kontrol edilmektedir (Loix vd. 2017). Proteomik çalışmalar, farklı taşıma proteinlerinin Cd stresinden önemli ölçüde etkilendiğini göstermiştir. Bitkilerde doğal dirençle ilişkili makrofaj proteinleri (Nramp) (Takahashi vd. 2011), çinko/demir taşıyıcıları (ZIP-IRT) (Milner vd. 2013) ve P1B-ATPaz'lar (Takahashi vd. 2012) gibi çeşitli metal taşıyıcı protein aileleri Cd'un taşınmasına aracılık etmektedir. Transgenik çeltik hatlarında plazma zarında lokalize olmuş OsNramp1'in aşırı ifadesinin hücresel sürgünlerde Cd birikimini artırdığı ve bu proteinin hücresel Cd alımında rol oynadığı ileri sürülmüştür (Takahashi vd. 2011). Ayrıca, plazma zarında lokalize olmuş OsHMA2 (Takahashi vd.

2012) ve AtHMA4 (Verret vd. 2004) proteinlerinin ksileme Cd'un yüklemesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Bazı ABC taşıyıcı ailesi üyelerinin Cd'un alınması ve translokasyonuna katıldığı doğrulanmıştır (Briat vd. 2007). Yüksek oranda Cd biriktirebilen yarfıstığı genotipinde sekiz adet ABC taşıyıcı proteinin (ABCB11, ABCB25, ABCC2, ABCC4, ABCC14, ABCG8-benzeri, ABCF1 ve ABCF3) artan yönde düzenlendiği gösterilmiştir (Yu vd. 2019). AtABCC2 ilk olarak *Arabidopsis*'te PC-As komplekslerini vakuole taşıyan bir protein olarak tanımlanmış ve kök vakuollerinde Cd'u alıkoyarak Cd toleransında rol oynadığı gösterilmiştir (Park vd. 2012). Bununla birlikte, salatalık bitkilerinde CsPDR12/CsABCG40 taşıyıcılarının Cd stresi altında artan yönde düzenlendiği rapor edilmiştir (Migocka vd. 2017). Bu taşıyıcı proteinlerin Cd stresi altında artan yönde düzenlenmesinin, vakuolar alıkonulmayı ve simplasttan apoplasta geçişi artırarak Cd detoksifikasyonunu sağlayabildiği ileri sürülmüştür (Yu vd. 2019).

Vakuolar alıkonmanın, bitki hücrelerinde ağır metal detoksifikasyonu için önemli bir mekanizma olduğu bilinmektedir (Hall 2002). Vakuolar tip ATPaz'lar (V-ATPaz), iyon taşınımı için enerji sağlayan tonoplastta lokalize olmuş bir proton pompasıdır (Dietz vd. 2001). Cd'un tonoplast boyunca vakuollere taşınması, büyük ölçüde V-ATPaz aktivitesine bağlı olan bir proton gradiyenti gerektirmektedir (Dietz vd. 2001). Kadmiyum stresinin *A. thaliana*, *O. sativa* ve *C. sativus* gibi bitki türlerinde H<sup>+</sup>-ATPaz proteinlerinin seviyesinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (Carneiro vd. 2017, Gong vd. 2017, Zhong vd. 2017). Bununla birlikte, bazı V-ATPaz altbirimlerinin yüksek oranda Cd biriktiren yarfıstığı genotipinde artan yönde düzenlendiği gösterilmiştir (Yu vd. 2019). Diğer taraftan, Cd/Zn taşıyıcı ATPaz proteinlerinin darı ve pamuk bitkilerinde artan yönde düzenlendiği belirtilmiştir (Deeba vd. 2012, Roy vd. 2016). Ayrıca *Arabidopsis*'te Cd'un köklerden sürgünlere taşınma mekanizmasının Cd/Zn taşıyıcı ATPaz (HMA2 ve HMA4) proteinlerine bağlı olduğu ileri sürülmüştür (Wong vd. 2009).

#### 2.4.6 Kadmiyum Stresi ve Protein Metabolizması ile İlişkili Proteinler

Protein sentezi, protein modifikasyonu ve degradasyonu çevresel streslere karşı bir hücrel yanıtın gerçekleşmesi için önemli düzenleyici yollardır (Araújo vd. 2011). Ağır metal cevapları ve tolerans mekanizmaları hücrel protein sentezi tarafından önemli ölçüde etkilenmektedir. Bitkiler, Cd stresi sırasında proteinleri yenileyerek veya onararak stresin üstesinden gelmektedirler (Chen vd. 2018). Proteomik çalışmalar protein sentezinin farklı bileşenlerinin Cd stresi altında farklı şekilde ifade olduğunu ortaya koymuştur (Carneiro vd. 2017, Zhong vd. 2017, Lan vd. 2018, Yu vd. 2019). Ökaryotik translasyon başlatıcı (eIF) ve peptid uzama faktörleri (EF) protein sentezinde önemli rol oynamaktadır (Fan vd. 2015). Kadmiyum stresi altındaki *Raphanus sativus* bitkilerinin köklerinde eIF ve EF proteinlerinin ifade seviyesindeki artışın protein sentezini hızlandığı ve bu durumun sentez ve degradasyon arasındaki dengeye katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür (Xu vd. 2017).

Protein degradasyonu sadece bitki solunumu için moleküler substratlar sağlamakla kalmaz, aynı zamanda çeşitli abiyotik streslere karşı adaptasyon yanıtlarını da başlatmaktadır (Fan vd. 2015). 26S proteazom, ubikitinlenmiş proteini küçük peptitlere parçalayan büyük bir proteolitik komplekstir (Collins ve Goldberg 2017). Ubikitin/26S proteazom sisteminin bitki büyüme ve gelişimi, sinyal iletimi ve stres tepkileri gibi hücrel süreçlerin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Oh ve Komatsu 2015). Kadmiyum stresi altındaki *Raphanus sativus* bitkilerinin köklerinde 26S proteazom ve ubikitin proteinlerinin arttığı gösterilmiş ve ubikitin/26S proteazom sisteminin Cd stresine cevapta önemli roller oynadığı ileri sürülmüştür (Xu vd. 2017). ClpC proteaz, yanlış katlanmış, kümelenmiş veya istenmeyen proteinlerin seçici olarak uzaklaştırarak plastid gelişimi ve fonksiyonunda merkezi bir rol oynamaktadır (Nishimura ve van Wijk 2015). Proteazom alt birimi alfa, ubikitin-proteazom yolağı yoluyla proteinlerin parçalanmasına katılan 20S proteazom kompleksinin alfa tipi bir alt birimidir (Li vd. 2011). *Amaranthus hybridus* köklerinde Cd stresinden zarar gören proteinlerin ClpC proteaz ve 20S proteazomu tarafından parçalandığı ifade edilmiştir (Jin vd. 2016).

## 2.5 Bitkilerde Nitrik Oksit ve Biyolojik Etkileri

Nitrik oksit (NO), S-nitrosotiyoller, dinitrosil demir kompleksleri ve peroksinitrit gibi reaktif azot türleri normal metabolizmanın bir sonucu olarak üretilmektedir. Bununla birlikte, aşırı üretilen reaktif azot türleri, membran lipidlerinin bozulmasına, enzim inaktivasyonuna, DNA hasarına ve hatta mutasyona neden olarak bitkilere ciddi zararlar verebilmektedir (Romero-Puertas ve Sandalio 2016). Diğer taraftan, çok sayıda çalışma NO'nun tohum çimlenmesi, kök oluşumu, gravitropizma, tohum gelişimi, stoma hareketleri, fotosentez, mitokondri fonksiyonları, yaşlanma, biyotik ve abiyotik stres cevaplarında işlev gördüğünü göstermiştir (Arc vd. 2013, Fancy vd. 2017, Hasanuzzaman vd. 2018, Vaishnav vd. 2018). Hayvan dokularında, NO üretimi nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi yoluyla gerçekleşmektedir. NO'nun bitkilerde işlevsel olarak var olduğu bilinmesine rağmen, nasıl sentezlendiğine hakkında kesin bilgiler bulunamamıştır (Santisree vd. 2019). NO'nun bitkilerde dört farklı yolla sentezlendiği düşünülmektedir: Hayvanlarınkine benzer NO sentez yolu (Negi vd. 2010), nitrat redüktaz (NR) yolu ve diğer enzimatik ve enzimatik olmayan yollar (Sahay ve Gupta 2017). NO üretiminin ayrıca mitokondriyal elektron taşıma sistemi ve ksantin dehidrogenaz/oksidaz gibi indirgeyici yollar yoluyla olduğu ileri sürülmüştür (Sahay ve Gupta 2017). İndirgeyici yolda, nitrit:NO redüktaz aktivitesine sahip olan NR özellikle anoksik ve asidik koşullarda NO'yu sentezleyebilmektedir (Chamizo-Ampudia vd. 2017, Astier vd. 2018). Bununla birlikte, ksantin oksidoredüktaz, sitokrom c oksidaz/redüktaz ile mitokondriyal nitrit indirgenmesi ve kök apoplastlarında nitrit:NO redüktaz indirgeyici yolda işlev görmektedir (Stoimenova vd. 2007). İlâveten, *Chlamydomonas reinhardtii* alglerindeki nitrik oksit oluşturan nitrit redüktazın (NOFNiR), nitriti NO'ya indirgediği bildirilmiştir (Chamizo-Ampudia vd. 2017).

Birçok çalışma bitki hormonu aracılı gelişim ve stres yanıtlarını düzenlemede NO'nun önemli rolünü tanımlamıştır (Asgher vd. 2017). Ayrıca, NO birikiminin stres koşulları ve iyileşme sırasında savunma proteinlerinin gen ifadesini indüklediği gösterilmiştir (Fancy vd. 2017). Bununla birlikte, NO'nun bir antioksidan işlevi görerek oksidatif hasarın şiddetini azaltması ile hücrel homeostazın korunmasında rol oynadığı bildirilmiştir (Hasanuzzaman vd. 2012). Nitrik oksidin muhtemelen post-translasyonel

protein modifikasyonları (PTM'ler) yoluyla enzimlerin ve bazı önemli sinyal bileşenlerinin aktivitesini modifiye ettiği gösterilmiştir. Nitrik oksidin neden olduğu PTM'ler arasında protein S-nitrosilasyonu ve tirozin nitrasyonu bulunmaktadır (Fancy vd. 2017). Stres koşulları altındaki *Arabidopsis thaliana*, *Brassica juncea*, *Citrus aurantium* ve *Zea mays* gibi bitkilerde bir dizi S-nitrosillenmiş protein tanımlanmıştır (Fan vd. 2014, Fancy vd. 2017). Ek olarak NO, stresle ilişkili kinazların ifadesini artırarak ve diğer sinyal molekülleri ve fitohormonlarla etkileşimi yoluyla transkripsiyon seviyesinde bir sinyal molekülü olarak işlev görmektedir (Lozano-Juste ve León 2011). Ayrıca NO'nun stresle ilişkili genlerin aktivasyonuna neden olan MAPK aktivitesini uyardığı gösterilmiştir (Li ve Xue 2010). Salatalık bitkilerinde, MAPK'ların katıldığı NO-bağımlı-sinyalleme yolunun oksin-kaynaklı köklenme işlemi sırasında aktive olduğu gösterilmiş ve MAPK'ların gelişimsel süreçler sırasında NO'nun hedefleri arasında olduğu ileri sürülmüştür (Kalachova vd. 2016).

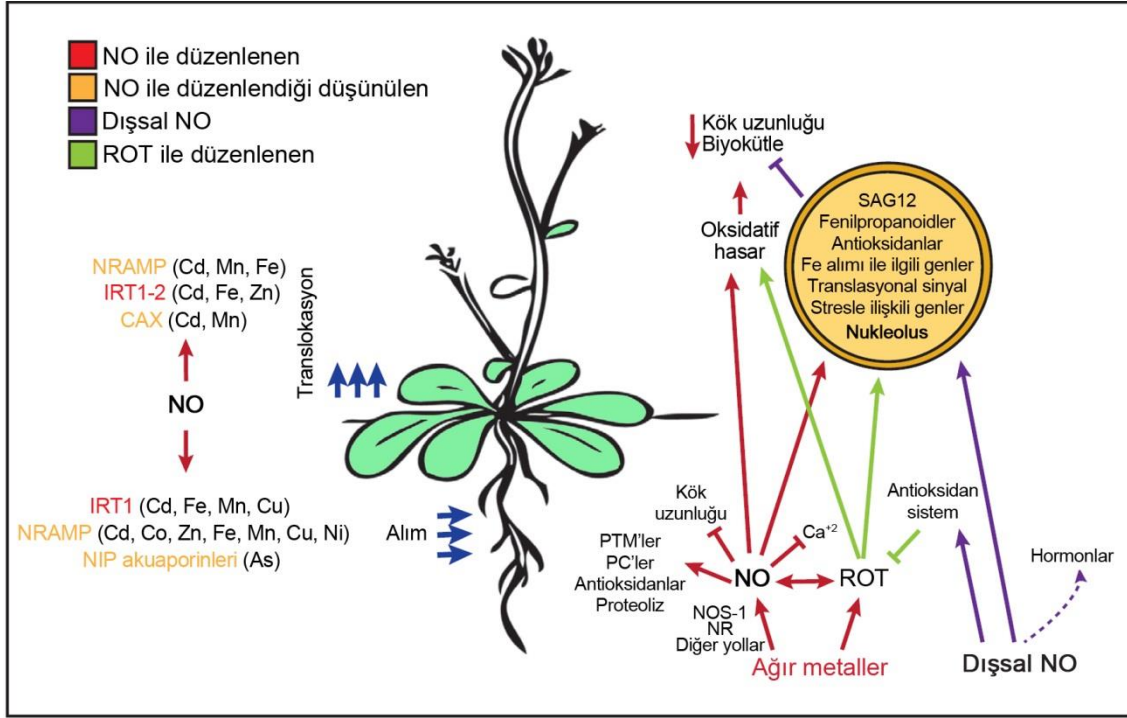
## **2.6 Bitkilerde Nitrik Oksit ve Ağır Metal Toleransı**

Oldukça reaktif bir molekül olan NO, gelişim, yaşlanma ve çevresel streslere yanıtlar gibi fizyolojik süreçlerde rol oynayan gaz formunda bir serbest radikaldir (Astier vd. 2018, Umbreen vd. 2018). NO üretiminin esas olarak nitrik oksit sentaz (NOS) enzim aktivitesine (Förstermann ve Sessa 2012) bağlı olduğu hayvanlardan farklı olarak, bitkiler şu ana kadar tanımlanmış 11 farklı mekanizmayla NO üretebilmektedir (Astier vd. 2018). Tüm bu mekanizmalarda iki ana yol yaygın olarak yer alır: İndirgeyici nitrata bağımlı yolak ile oksidatif arjinin bağımlı ve hidroksilamine bağımlı yolaklar (Fröhlich ve Durner 2011, Mur vd. 2013). Biyokimyasal ve moleküler veriler, bitkilerde arjinin ve NO arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (Astier vd. 2018). Oksidatif yolaklarda arjinin bağımlı nitrik oksit sentaz benzeri (NOS-I) aktivite gözlenmiştir (Moreau vd. 2010). Kadmiyum konsantrasyonu, uygulama süresi ve tür açısından farklılıklar olduğundan Cd stresi altında NO üretimi ile ilgili genel sonuçlar çıkarmak oldukça zordur. Buğday, arpa ve soya fasulyesi gibi farklı bitki türlerinin köklerinde Cd uygulamasından sonra NO seviyesinde artış gözlenmiştir (Groppa vd. 2008, Valentovičová vd. 2010, Pérez-Chaca vd. 2014). Arpa köklerinde NO perisıklı, parankimatik öz hücrelerinde ve protofloemin arkadaş hücrelerinde tespit edilmiştir

(Valentovičová vd. 2010). Bununla birlikte, çeltik köklerinde Cd uygulamasından bir gün sonra ve bezelye kök ve yapraklarında 14 gün sonra NO seviyesinin azaldığı gözlenmiştir (Rodríguez-Serrano vd. 2006, Xiong vd. 2009). *Arabidopsis*'te NO seviyesinin Cd konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak kademeli olarak arttığı buna karşın uygulama süresindeki artışa bağlı olarak azaldığı bildirilmiştir (Gupta vd. 2017). Nitrik oksit seviyelerindeki azalmanın, aşırı ROT ve etilenin neden olduğu erken yaşlanmadan ve Ca eksikliğinin neden olduğu NOS-1 aktivitesinin inhibisyonundan kaynaklandığı bildirilmiştir (Rodríguez-Serrano vd. 2009).

Birçok çalışmada NO verici bileşiklerin [çoğunlukla sodyum nitroprussid (SNP)] dışsal uygulamalarının bitkileri ağır metal kaynaklı hasara karşı koruduğu gösterilmiştir (Gong vd. 2017, Li vd. 2019, Kaya vd. 2020). Nitrik oksit, esas olarak iki strateji ile bitkilerdeki ağır metal toksisitesini hafifletmektedir. İlk stratejide, NO antioksidan enzim aktiviteleri artırarak veya savunma ile ilişkili genlerin ifade seviyesini artıran yönde düzenleyerek bitkilerin ağır metal stresi koşullarında hayatta kalmalarına yardımcı olmaktadır (Ortega-Galisteo vd. 2012). NO vericisi uygulamalarına bağlı olarak süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi ROT'ların üretimi ve lipid peroksidasyonuna neden olan oksidatif hasarın azaldığı bilinmektedir (Şekil 2.5) (Terrón-Camero vd. 2019). Kadmiyum stresine maruz bırakılan *Lolium perenne* bitkilerinde artan ROT üretimi ve lipid peroksidasyonunun, SNP uygulamasına bağlı olarak artan antioksidan enzim aktivitesi ile azaltıldığı gösterilmiştir (Arasimowicz-Jelonek vd. 2011). Ayrıca NO sinyal yollarının, pirinçte kadmiyum toleransını artıran antioksidan enzimler, glutatyon (GSH) ve fosfatidik asit birikimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Yang vd. 2016). GSH'nin sadece Cd şelasyonunu ve içsel alıkonulmasını teşvik etmekle kalmayıp, aynı zamanda NO, S-nitrosotiyoller ve antioksidan sistemi bir redoks bağımlı mekanizma yoluyla uyararak domates fidelerinin Cd stresine karşı toleransını artırdığı ileri sürülmüştür (Hasan vd. 2016). Nitrik oksit, hücrelerdeki serbest metal konsantrasyonunu, köke ağır metal girişini engelleyerek veya hücrel birikimlerini toksik seviyenin altında tutarak düzenlemektedir (Oz vd. 2015). Bitkilere uygulanan NO verici bileşikleri, hücreye esas girişi IRT1 taşıyıcısı gibi görünen Cd'un alımı üzerine daha güçlü bir etkiye sahip olmayabilir. NO'nun As(III) ile muamele edilmiş çeltik bitkilerinde NIP, NRAMP ve ABC gibi metal taşıyıcılarını ve Cd stresi

altındaki *Trifolium repens*, *Arabidopsis* ve tütün bitkilerinde proton pompaları ve antiportörleri (CAX) modüle ettiği gösterilmiştir (Şekil 2.5) (Lee ve Hwang 2015, Liu vd. 2015, Singh vd. 2017, Bahmani vd. 2019).



Şekil 2.5 Bitkilerin ağır metallere verdiği cevaplarda nitrik oksidin rolleri (Terrón-Camero vd. 2019'tan değiştirilerek).

Çeltik bitkilerinde NO uygulamasının kök hücre çeperinde pektin ve hemiselüloz içeriğini arttırarak ve plazma membranında fosforik asit birikimi ve fosfolipaz D aktivitesini teşvik ederek Cd'un köklere girişini engellediği gösterilmiştir (Xiong vd. 2009, Yang vd. 2016). SNP uygulamasının *Arachis hypogaeae* bitkilerinde Cd translokasyonunu azalttığı ve fotosentetik aktivitede artışa neden olduğu bildirilmiştir (Kong vd. 2014). Bununla birlikte, bitkilerin ağır metallere olan cevaplarında yer alan diğer NO-bağımlı sinyal yollarının anlaşılabilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1 Büyüme Koşulları ve Stres Uygulaması

Bu araştırmada kullanılan arpa (*Hordeum vulgare* L. cv. Akar) çeşidine ait tohumlar Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Tohumlar %10'luk ticari çamaşır suyu içerisinde 10 dakika çalkalanarak steril edilmiş ve 5 kez steril distile su ile yıkanmıştır. Steril tohumlar, distile su ile ıslatılmış iki kat filtre kağıdı bulunan çimlendirme kaplarında (20×11.5×5 cm) kontrollü koşullarda (25°C, karanlık) 48 saat çimlendirilmiştir. Yaklaşık aynı kök ve koleoptil uzunluğuna sahip fideler içerisinde 0.5 L modifiye Hoagland besin çözeltisi (pH 6.0) bulunan 1 L'lik hidroponik kültür kaplarına transfer edilmiştir. Fideler 3 gün boyunca kontrollü iklim kabininde (23°C, 14:10 foroperiyot, 250  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddeti ve %60 nem) büyütülmüştür. Bu süre sonunda, kök ortamında 50  $\mu\text{M}$  Cd ve 100  $\mu\text{M}$  sodyum nitroprussid (nitrik oksit donörü) eklenerek 4 farklı uygulama grubu oluşturulmuştur: (1) Kontrol (0  $\mu\text{M}$  SNP ve 0  $\mu\text{M}$  Cd), (2) SNP (100  $\mu\text{M}$  SNP ve 0  $\mu\text{M}$  Cd), (3) Cd (0  $\mu\text{M}$  SNP ve 50  $\mu\text{M}$  Cd) ve (4) SNP+Cd (100  $\mu\text{M}$  SNP ve 50  $\mu\text{M}$  Cd). Besin çözeltisi iki günde bir değiştirilmiştir. Stres uygulamasının 10. gününde fideler hasat edilmiş, sürgün ve kök dokularının taze ağırlıkları (TA, mg bitki<sup>-1</sup>) belirlenmiştir. Dokuların kuru ağırlıkları (TA, mg bitki<sup>-1</sup>) 48 saat 80°C'de inkübe edildikten sonra belirlenmiştir. Bununla birlikte, uygulamalardan elde edilen fidelerin yaprak dokuları sıvı azot ile dondurulmuş ve analizlere kadar -80°C'de saklanmıştır.

#### 3.2 Klorofil İçeriğinin Belirlenmesi

Dört farklı uygulamadan elde edilen fidelerin 2. yapraklarından toplam klorofillerin (klorofil a+b) ekstraksiyonu ve miktarlarının belirlenmesi Welbern (1994)'e göre gerçekleştirilmiştir. Yaprak dokularından 0.1 g alınmış ve küçük parçalara ayrıldıktan sonra 10 mL soğuk metanol içeren tüplere konulmuştur. Tüpler daha sonra 48 saat +4°C'de tutulmuştur. Yaprak dokularındaki klorofiller tamamen metanole geçtikten sonra örneklerin absorbansı 666 ve 653 nm'de spektrofotometre ile ölçülmüştür. Toplam

klorofil konsantrasyonu göre taze ağırlık (TA) temelinde  $\text{mg g}^{-1}$  TA olarak hesaplanmıştır (Wellburn 1994).

### 3.3 Malondialdehit İçeriğinin Belirlenmesi

Dört farklı uygulamadan elde edilen fidelerin 2. yapraklarında, lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA) içeriğinin belirlenmesi Heath ve Packer (1985)'e göre yapılmıştır. Öncelikle 500 mg taze yaprak dokusu 5 mL %0.1'lik trikloroasetik asit (TCA) içerisinde homojenize edilmiştir. Daha sonra homejenatlar  $12000 \times \text{g}'de$  ve  $+4^{\circ}\text{C}'de$  10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatantlar cam deney tüplerine alınmış ve üzerlerine 1:4 oranında %0.5 tiyobarbitirik asit (TBA) içeren %20'lik TCA çözeltisi eklenmiştir. Tüpler 30 dakika boyunca  $95^{\circ}\text{C}'lik$  sıcak su banyosunda tutulmuştur. Bu süre sonunda reaksiyonun durdurulması için tüpler buz üzerinde tutulmuştur. Kuvars küvet kullanılarak karışımların 532 ve 600 nm'de spektrofotometre ile absorbanları ölçülmüştür. Yaprak dokularındaki MDA içeriği molar ekstinksiyon katsayısı ( $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) kullanılarak  $\mu\text{mol g}^{-1}$  TA olarak belirlenmiştir.

### 3.4 Hidrojen Peroksit ve Lipid Peroksidasyonunun Histokimyasal Belirlenmesi

Dört farklı uygulamadan elde edilen fidelerin yaprak dokularında hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ve lipid peroksidasyonu aşağıda belirtilen yöntemler ile boyanmış ve kök segmentleri Olympus SZ61TR Stereozoom mikroskop (Olympus Corporation, Shinjuku, Japan) kullanılarak görünür ışık altında görüntülenmiş ve mikroskoba entegre edilmiş görüntüleme sistemi ile fotoğraflanmıştır. Hidrojen peroksit 3,3'-diaminobenzidin (DAB) boyama metodu kullanılarak belirlenmiştir (Thordal-Christensen vd. 1997). Yaprak dokuları (yaklaşık 3 cm) karanlık koşullar altında 10 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.8), 10 mM sodyum azid ve %0.1 3,3'-diaminobenzidin (DAB) içeren çözeltiye alınmış ve 5 dakika vakumla infiltre edilmiştir. Yapraklar gece boyunca karanlık koşullar altında inkübe edilmiş ve daha sonra %0.15 TCA içeren etanol:kloroform (4:1) içerisinde klorofilleri uzaklaştırılmıştır.

Lipid peroksidasyonunun histokimyasal olarak belirlenmesi aldehidleri tespit eden Schiff reaktifi ile gerçekleştirilmiştir (Yamamoto vd. 2001). Yapraklar, Schiff reaktifinde 60 dakika süreyle inkübe edilmiş ve daha sonra klorofillerin uzaklaştırılması için 60 dakika boyunca kaynayan etanolde bekletilmiştir.

### 3.5 Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Dört farklı uygulamadan elde edilen fidelerin yaprak dokuları (0.5 g) sıvı azotta iyice öğütüldükten sonra 5 mL ekstraksiyon tamponu [50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0), 1 mM EDTA, %1 polivinilpirrolidon ve 5 mM askorbik asit (yalnızca APX için)] ile homojenize edilmiştir. Daha sonra homejantlar 14000 rpm'de ve +4°C'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatandaki protein miktarı Bradford (1976)'a göre belirlenmiştir.

Süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) aktivitesi, nitroblue tetrazolium (NBT)'un fotoindirgenmesinin 560 nm'de ölçülmesi ile belirlenmiştir (Beauchamp ve Fridovich 1971). Reaksiyon karışımı için 50 mM fosfat tamponu (pH 7.8), 0.1 mM EDTA, 13 mM metiyonin ve 75 µM NBT içeren karışıma 50 µL enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Daha sonra bu karışıma ve 2 µM riboflavin eklenmiş ve test tüplerinin 10 dakika için beyaz ışık kaynağı altına yerleştirilmesiyle reaksiyon başlatılmıştır. Örneklerin absorbans değerleri belirlendikten sonra, bir ünite SOD, NBT indirgenmesinde %50 inhibisyona neden olan enzim miktarı olarak ifade edilmiştir. Toplam SOD aktivitesi EU mg<sup>-1</sup> protein olarak hesaplanmıştır.

Toplam katalaz aktivitesi (CAT; EC 1.11.1.6) Aebi (1984)'ye göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0) ve 10.6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içermektedir. Reaksiyon 20 µL enzim ekstraktının ilave edilmesi ile başlatılmıştır. CAT aktivitesi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in 3 dakika için 240 nm'de ( $\epsilon= 39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) bozunması ile EU dk<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein olarak belirlenmiştir.

Guaiakol peroksidaz (POD; EC 1.11.1.7) aktivitesi Mika ve Lüthje (2003)'ye göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 25 mM sodyum-asetat-HCl (pH 5.0), 51.3 mM

guaiakol, 12.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve enzim ekstraktı içermektedir. Reaksiyon enzim ekstraktının ilavesiyle başlatılmış ve absorbanstaki değişim 470 nm'de 3 dakika süre boyunca takip edilmiştir. Toplam POD aktivitesi, guaiakolun ekstinksiyon katsayısı ( $\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) kullanılarak  $\text{EU min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  protein olarak belirlenmiştir.

Askorbat peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11) aktivitesi Nakano ve Asada (1987)'ya göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 50 mM fosfat tamponu (pH 7.0), 0.1 mM EDTA, 0.25 mM askorbat, 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 20  $\mu\text{L}$  enzim ekstraktından oluşmaktadır. Reaksiyon, 100  $\mu\text{L}$  5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in ilavesi ile başlatılmıştır. 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  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  protein olarak hesaplanmıştır.

### **3.6 Protein Ekstraksiyonu**

Dört farklı uygulamadan elde edilen yapraklar (0.5 g) sıvı azot ve havan kullanılarak iyice öğütülmüştür. Öğütülmüş yaprak dokuları %10'luk TCA, 1 mM PMSF ve %0.07  $\beta$ -merkaptotanol içeren soğuk aseton içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenatlar 1 saat boyunca  $-20^\circ\text{C}$ 'de inkübe edildikten sonra  $15000 \times g$ 'de ve  $+4^\circ\text{C}$ 'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı döküldükten sonra kalan peletler %0.07  $\beta$ -merkaptotanol içeren aseton ile üç kez yıkanmıştır. Tüpler santrifüj edildikten sonra protein peletleri vakum altında kurutulmuştur. Peletler rehidrasyon tamponunda (7 M urea, 2 M thiourea, %4 (w/v) CHAPS, 65 mM DTT ve %0.4 Ampholyte pH 3-10) çözülmüş ve protein miktarları Bradford (1976)'a göre hesaplanmıştır. Protein standardı olarak Bovine Serum Albumin (BSA) kullanılmıştır.

### **3.7 İki-Yönlü (2-D) Poliakrilamid Jel Elektroforezi**

Protein profillerindeki polimorfizmler iki-yönlü (2-D) poliakrilamid jel elektroforezi (İzoelektrik Fokuslama/Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi, IEF/SDS-PAJE) tekniği kullanılarak analiz edilmiştir. Elektrofrezin ilk yönü olan IEF'de, Protean IEF Cell (Bio-Rad) sisteminde IPG (Immobilized pH Gradient) stripleri

(pH 4-7, 17 cm) kullanılarak proteinlerin izoelektrik noktalarına göre ayrıştırılması sağlanmıştır. Analitik jeller için 80 µg protein ve preparatif jeller 500 µg protein içeren rehidrasyon tamponuyla muamele edilmiş IPG stripleri Protean i12 IEF Cell sistemine transfer edilmiştir. Stripler benç üzerinde pasif olarak rehidrate edilmiştir. İzoelektrik odaklama 20°C’de ve toplamda 70,000 Vh (30 dakika 250 V sabit akım, 2 saat 10,000 V doğrusal akım ve sabit 10,000 V) olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. IEF’ten sonra stripler -20°C’de saklanmıştır. Elektroforezin ikinci boyutu olan SDS-PAGE için öncelikle stripler 15 dakika dengeleme çözeltisi I [6 M üre, 0.375 M Tris-HCl, pH8.8, %2 (w/v) SDS, %20 (v/v) gliserol ve %2 (w/v) DTT] ve daha sonra 15 dakika dengeleme çözeltisi II [6 M üre, 0.375 M Tris-HClpH 8.8, %2 (w/v) SDS, %20 (v/v) gliserol ve %2.5 (w/v) iodoacetamide] ile muamele edilmiştir. Dengeleme basamağından sonra ikinci yön olan SDS-PAGE %12’lik akrilamid jelde (%30 akrilamid/bisakrilamid, 1.5 M Tris-HCl tamponu, pH 8.8, %10 SDS, %10 amonyum persülfat ve TEMED) gerçekleştirilmiştir. 2-D elektroforez PROTEAN II XL Cell (Bio-Rad) sisteminde gerçekleştirilmiştir. Elektroforez ilk 30 dakika 16 mA/jel ve daha sonra 24 mA/jel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Protein standardı olarak 14.4–97.4 kDa’luk protein standardı (Bio-Rad) kullanılmıştır. Görüntü analizlerinin yapılacağı analitik jellerdeki protein benekleri gümüş boyama (Sinha vd. 2001) ile kütle spektrometrisi analizlerinde kullanılacak jeller ise Coomassie Brilliant Blue (CBB) içeren Blue-Silver boyama ile görünür hale getirilmiştir (Candiano vd. 2004).

### **3.8 Görüntü Analizleri ve Jelde Triptik Kesim**

Gümüş boyalı jeller ChemiDoc™ MP jel görüntüleme sistemi (Bio-Rad) ile görüntülenmiştir. İfade seviyesinde 2.0 kat ve üzeri değişiklik gösteren (ifadesi artan ve/veya azalan yönde düzenlenen) protein benekleri PDQuest yazılımı (versiyon 8.0.1, Bio-Rad) ile saptanmış ve nispi hacimleri temelinde miktarları belirlenmiştir. Belirli bir protein beneğinin yoğunluğu, jel görüntüsündeki beneği oluşturan tüm piksellerin toplam yoğunluğu olarak tanımlanan protein hacmi olarak ifade edilmiştir. Bununla birlikte, protein miktar tayini, örnek yükleme veya jel boyama basamaklarında meydana gelebilecek olası hataları telafi etmek için her bir protein beneğinin hacmi, jelde

bulunan tüm protein beneklerinin toplam hacminin yüzdesi olacak şekilde normalize edilmiştir.

Seçilmiş protein benekleri CBB boyalı jellerden temiz bistüri kullanılarak kesilmiş ve 0.6 mL'lik steril tüplere alınmıştır. Protein beneklerinin triptik kesimi için ticari kit (Thermo Scientific) kullanılmıştır. Jel parçaları, fazla boyanın ve SDS gibi kirleticilerin uzaklaştırılması için amonyum bikarbonat içeren asetonitril çözeltisinde inkübe edilmiştir. Jel parçalarındaki proteinlerin indirgenmesi için tris(2-karboksietil)fosfin çözeltisi kullanılmıştır. Alkilasyon basamağında jel parçaları iyodoasetamid çözeltisinde inkübe edilmiştir. Alkilasyon işleminden sonra jel parçaları yeniden amonyum bikarbonat çözeltisi ile yıkanmıştır. Jel parçalarının dehidrasyonu için konsantre asetonitril kullanılmış ve örnekler oda sıcaklığında kurutulmuştur. Bu işlemde sonra kurumuş jel parçaları üzerine aktive tripsin (10 ng/μL) eklenmiş ve gece boyunca 30°C'de inkübe edilmiştir. Tüpler 15 dakika sonikatörlü su banyosunda tutulduktan sonra tüp içeriği yeni bir tüpe alınmış ve vakum konsantratörde (Eppendorf, Germany) kurutulmuştur. Kurutulmuş peptitler %0.1'lik trifloroasetik asit (TFA) ile süspanse edilmiş ve kütle spektrometrisi analizlerinde kullanılmıştır.

### 3.9 Kütle Spektrometresi Analizleri

Kütle spektrometrisi analizleri için %0.1'lik TFA'da çözülmüş peptidler ZipTip C<sub>18</sub> (Millipore, Bedford, MA, USA) kullanılarak konsantre hale getirilmiştir. Peptid çözeltileri, %50 asetonitril ve %0.1 TFA ile doyurulmuş 10 mg L<sup>-1</sup> α-cyano-4-hydroxycinnamic asit (matriks) ile karıştırılmıştır. Daha sonra yaklaşık 1 μL çözelti MALDI plakasına yerleştirilmiş ve kuruması sağlanmıştır. Kütle spektrometrisi analizleri AB Sceix TOF/TOF 5800 kütle spektrometrisi cihazı (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kütle spektrumu (m/z 800–3000) pozitif iyon reflektör modunda elde edilmiştir. Her bir protein beneği için MS modundan elde edilen 10 pik MS/MS fragmentasyonu için seçilmiştir. MS/MS modu 1 kV'lık çarpışma (collision) enerjisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çarpışma teşvikli fragmentasyon için çarpışma gazı olarak hava kullanılmıştır. Öncü MS spektrumları için internal kalibrasyon olarak otolitik tripsin peptidleri kullanılmıştır. MS/MS verileri GPS

Explorer (Applied Biosystem) ve MASCOT (Matrix Science, London, UK) yazılımları kullanılarak protein veri tabanlarına karşı taranmıştır. Veri tabanı taraması SwissProt veri tabanına karşı yapılmıştır. Arama kriterleri olarak Çizelge 3.1'deki parametreler kullanılmıştır. MS/MS verileri için %95'den daha büyük olarak belirlenen önemli derecede yüksek MASCOT skorları, güvenilir şekilde tanımlanmış protein olarak kabul edilmiştir.

**Çizelge 3.1** Protein tanımlamada kullanılan parametreler

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

Protein-protein etkileşim ağlarının ortaya konulması için mevcut çalışmada tanımlanan proteinler STRING 11.0 ile analiz edilmiştir (Szklarczyk vd. 2011). Tanımlanan tüm proteinler, protein etkileşimlerinin ortaya konulması için *Arabidopsis thaliana* TAIR10 protein veritabanına (<http://www.arabidopsis.org/>) karşı taranmıştır. Biyolojik süreçler ve moleküler fonksiyonlar BiNGO 3.0.3 ile tahmin edilmiştir (Maere vd. 2005). Arama parametreleri için *A. thaliana* taksonomisi seçilmiştir.

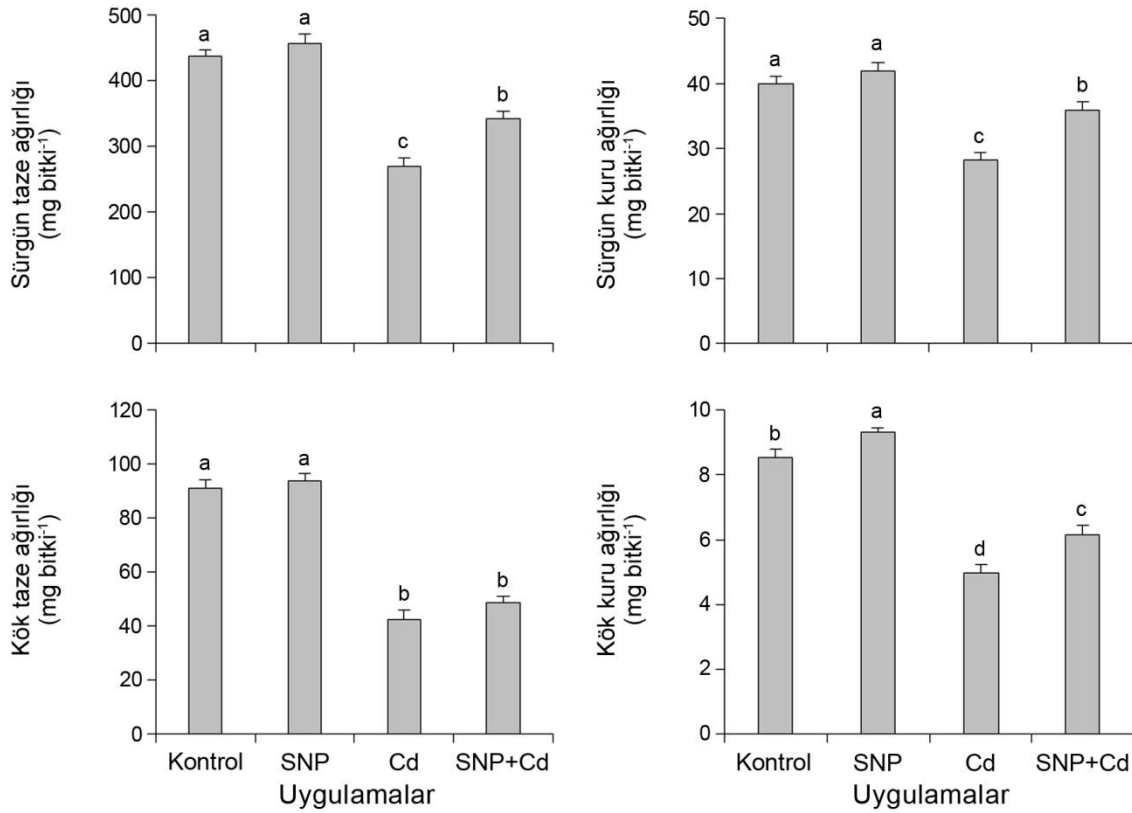
### 3.10 İstatistiksel Analizler

Denemeler, rastgele deneme deseninde düzenlenmiştir. Veriler en az üç tekrarlı olarak düzenlenmiş üç bağımsız denemeden elde edilmiştir. Proteomik çalışmalar dışındaki diğer analizlerden elde edilen verilere SPSS (versiyon 22) paket programı kullanılarak varyans analizi yapılmıştır. Ortalamalar arasındaki önemli farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir ( $P < 0.05$ ).

## 4. BULGULAR

### 4.1 Fide Büyümesi Üzerine SNP ve Cd Uygulamalarının Etkisi

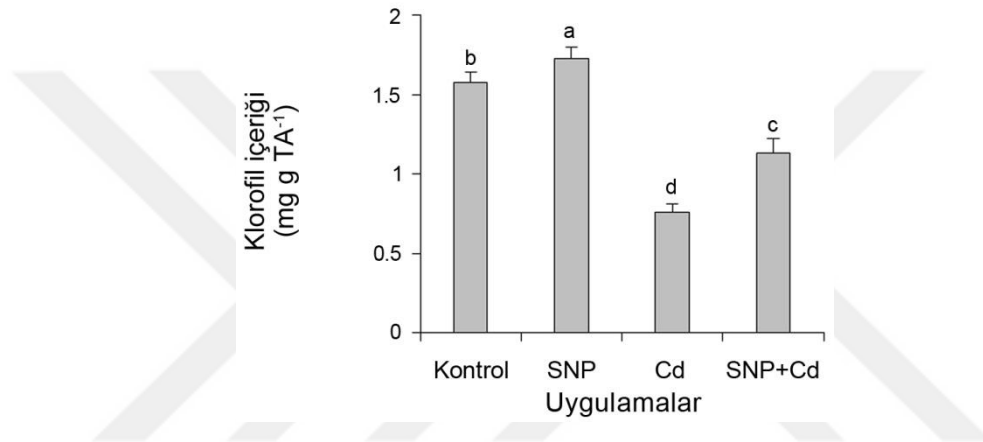
Arpa fidelerinin sürgün ve kök büyüme parametreleri (taze ve kuru ağırlıkları) üzerine dışsal 100  $\mu\text{M}$  SNP uygulaması ve 50  $\mu\text{M}$  Cd stresinin etkisi Şekil 4.1’de verilmiştir. Cd stresi sürgün ve kök taze ağırlıklarını kontrole göre sırasıyla %38.1 ve %53.4 oranlarında azaltırken, kuru ağırlıklarını sırasıyla %29.5 ve %41.9 oranlarında azaltmıştır ( $P < 0.05$ ). Bununla birlikte, SNP+Cd uygulaması kök taze ağırlığı hariç diğer parametrelerde Cd uygulamasına göre önemli artışa neden olmuştur. Bu artış, sürgün taze ağırlığında %26.7, kök kuru ağırlığında %23.8 ve sürgün kuru ağırlığında %27.6 olarak bulunmuştur (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1** Arpa fidelerinin sürgün ve kök büyümesi üzerine SNP, Cd ve SNP+Cd uygulamalarının etkisi. Her bir sütundaki farklı harfler (a-d), istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir ( $P < 0.05$ ).

## 4.2 Klorofil İçeriği Üzerine SNP ve Cd Uygulamalarının Etkisi

Arpa fidelerinin yaprak klorofil (klorofil a + b) içeriği üzerine dışsal 100 µM SNP uygulaması ve 50 µM Cd stresinin etkisi Şekil 4.2’de verilmiştir. Cd stresi klorofil içeriğinde kontrole göre %51.9 oranında azalmaya neden olmuştur ( $P < 0.05$ ). Bununla birlikte, Cd uygulamasına göre SNP+Cd uygulaması klorofil içeriğini %58.7 oranında arttırmıştır. Ayrıca kontrole göre SNP uygulaması klorofil içeriğinde önemli artışa neden olmuştur (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Arpa fidelerinin klorofil içeriği üzerine SNP, Cd ve SNP+Cd uygulamalarının etkisi. Farklı harfler (a-d), istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir ( $P < 0.05$ ).

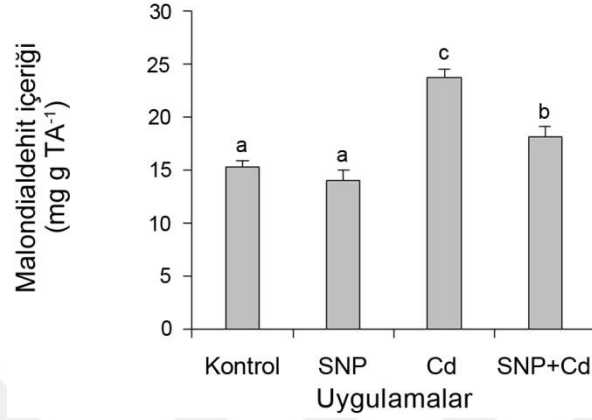
## 4.3 MDA İçeriği Üzerine SNP ve Cd Uygulamalarının Etkisi

Arpa fidelerinin yaprak malodialdehit (MDA) içeriği üzerine 100 µM SNP uygulaması ve 50 µM Cd stresinin etkisi Şekil 4.3’de verilmiştir. Cd stresi MDA içeriğinde kontrole göre 1.55 kat artışa neden olmuştur ( $P < 0.05$ ). Bununla birlikte, Cd uygulamasına göre SNP+Cd uygulaması MDA içeriğini %23.6 oranında azaltmıştır (Şekil 4.3).

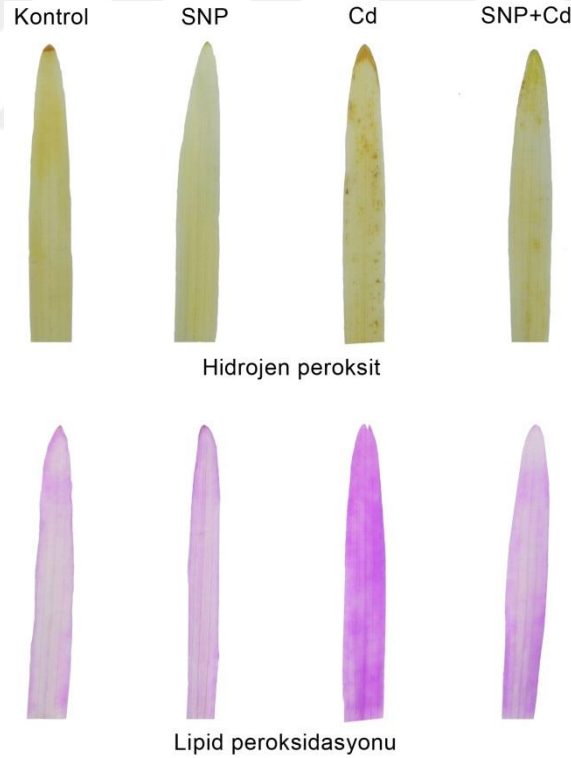
## 4.4 Hidrojen Peroksit Birikimi ve Lipid Peroksidasyonu Üzerine SNP ve Cd Uygulamalarının Etkisi

Arpa fidelerinin yaprak dokularında hidrojen peroksit birikimi ve lipid peroksidasyonu üzerine 100 µM SNP uygulaması ve 50 µM Cd stresinin etkisi Şekil 4.4’de verilmiştir.

Cd stresi belirgin şekilde hidrojen peroksit birikimini ve lipid peroksidasyonunu artırmıştır. Bununla birlikte, Cd uygulamasına göre SNP+Cd uygulaması bu parametrelerde belirgin bir şekilde azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.4).



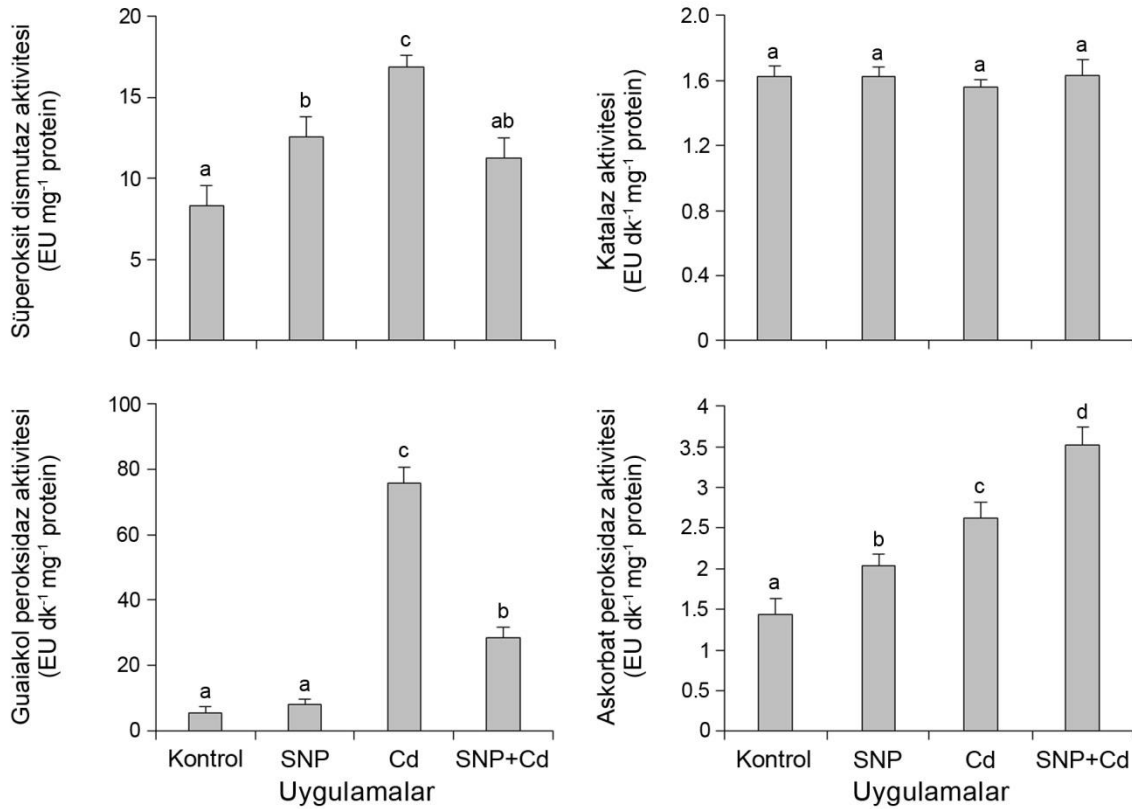
**Şekil 4.3** Arpa fidelerinin MDA içeriği üzerine SNP, Cd ve SNP+Cd uygulamalarının etkisi. Farklı harfler (a-c), istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir ( $P < 0.05$ ).



**Şekil 4.4** Arpa yapraklarında histokimyasal olarak belirlenmiş hidrojen peroksit ve lipid peroksidasyonu üzerine SNP, Cd ve SNP+Cd uygulamalarının etkisi.

#### 4.5 Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine SNP ve Cd Uygulamalarının Etkisi

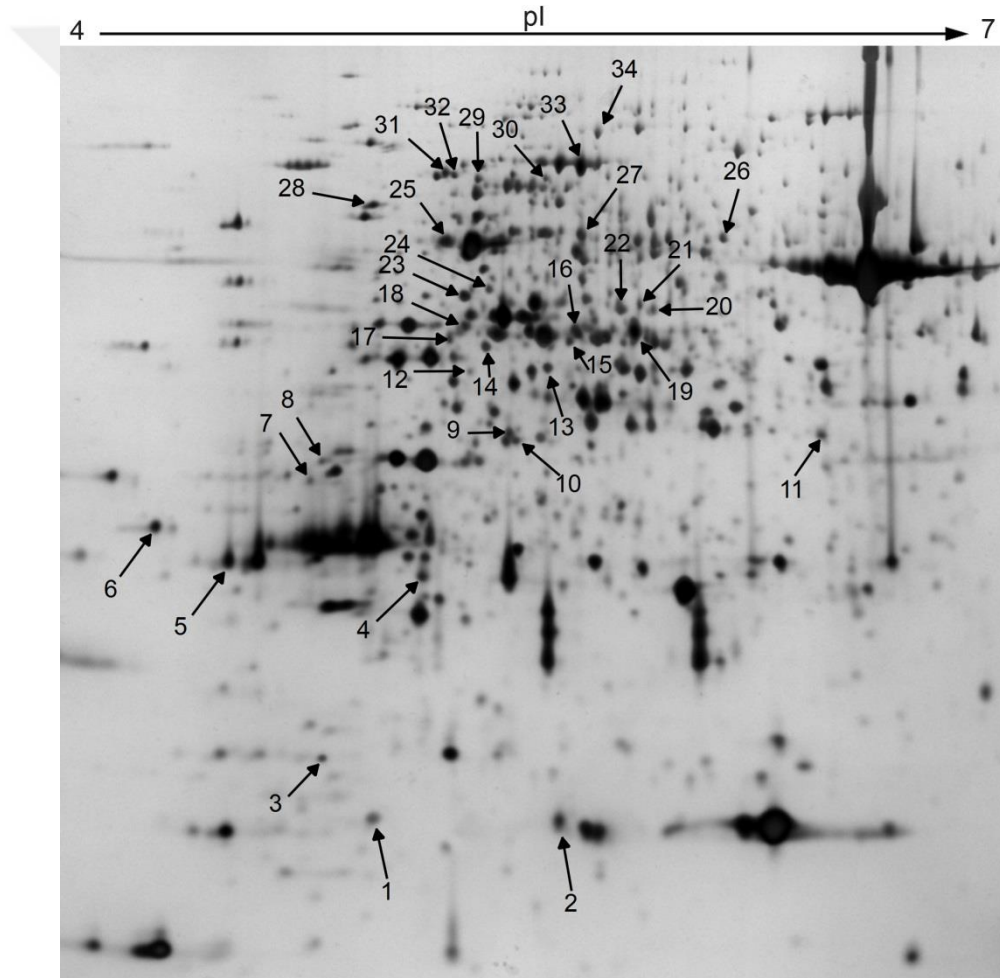
Arpa fidelerinin yaprak dokularında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), guaiakol peroksidaz (POD) ve askorbat peroksidaz (APX) aktiviteleri üzerine dışsal 100  $\mu\text{M}$  SNP uygulaması ve 50  $\mu\text{M}$  Cd stresinin etkisi Şekil 4.5’de verilmiştir. Cd stresi SOD aktivitesinde kontrole göre önemli bir artışa neden olurken, SNP+Cd uygulaması bu artışı ortadan kaldırmıştır. Cd uygulaması POD aktivitesini kontrole göre 13.7 kat artışa neden olurken, SNP+Cd uygulaması bu artışı önemli seviyede düşürmüştür. Bununla birlikte, APX aktivitesinde kademeli bir artış belirlenmiş ve bu artış kontrole göre SNP, Cd ve SNP+Cd uygulamalarında sırasıyla 1.4, 1.8 ve 2.4 kat olarak bulunmuştur ( $P < 0.05$ ). Diğer taraftan, CAT aktivitesi Cd ve/veya SNP uygulamalarında herhangi bir önemli değişim göstermemiştir (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5** Arpa fidelerinin yaprak dokularında antioksidan enzim aktiviteleri üzerine SNP, Cd ve SNP+Cd uygulamalarının etkisi. Farklı harfler (a-d), istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir ( $P < 0.05$ ).

#### 4.6 Proteom Değişimleri Üzerine SNP ve Cd Uygulamalarının Etkisi

Farklı uygulama gruplarına maruz bırakılan fidelerin yapraklarından izole edilmiş proteinler iki boyutlu (2-D) jel elektroforezi (IEF/SDS-PAGE) kullanılarak ayrıştırılmıştır (Şekil 4.6). Jel görüntüleri PDQuest yazılımı ile analiz edilmiştir. PDQuest ile ifade seviyesinde 2.0 kat ve üzeri artış gösteren 39 protein benekli belirlenmiştir. Bu protein benekleri jelde triptik sindirime maruz bırakılmış ve kütle spektrometrisi ile analiz edilmiştir. Kütle spektrometrisi sonuçları Swiss-Prot veri tabanına karşı taranmış ve 34 protein tanımlanmıştır (Çizelge 4.1).



**Şekil 4.6** Kontrol, SNP, Cd ve SNP+Cd uygulamalarına maruz bırakılan arpa fidelerinin yaprak dokularından ekstrakte edilen proteinlerin iki-yönlü (2-D) elektroforetik profilleri. Total proteinler (60 µg) 17 cm'lik IPG striplere (pH 4-7) yüklenmiş ve SDS-PAJE %12'lik jelde gerçekleştirilmiştir. Proteinler gümüş boyama ile görünür hale getirilmiştir. Jel profillerinde oklar ile gösterilmiş ve numaralandırılmış (1-34) proteinler artan ya da azalan şekilde ifade olan proteinlerdir (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1** Arpa fidelerinin yaprak dokularında MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ile tanımlanmış proteinler

Benek	Protein	Aksesyon numarası	Skor	MA pI	Dizi örtüşmesi	Eşleşen peptit	İfade seviyesi
<b>Fotosentez ve karbohidrat biyosentezi</b>							
1	RuBisCO küçük zincir <i>Hordeum vulgare</i>	RBS_HORVU	247	19.4 8.98	%55	18	
2	ATP sentaz epsilon zinciri Kloroplastik <i>Hordeum vulgare</i>	ATPE_HORVU	399	15.2 5.20	%77	15	
5	Klorofil a-b bağlayıcı protein LHCII tip III <i>Hordeum vulgare</i>	CB23_HORVU	101	28.7 4.99	%7	6	
8	Plastid-lipid-ilişkili protein 2 Kloroplastik <i>Oryza sativa</i>	PAP2_ORYSJ	98	33.9 5.04	%4	2	
11	Ferredoksin-NADP redüktaz <i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	FENR_MESCR	115	41.0 8.54	%11	7	
12	ATP sentaz beta altbirimi Kloroplastik <i>Illicium oligandrum</i>	ATPB_ILLOL	74	53.5 5.36	%6	3	
13	RuBisCO aktivaz A <i>Hordeum vulgare</i>	RCAA_HORVU	186	51.0 8.04	%15	7	
15	RuBisCO aktivaz B <i>Hordeum vulgare</i>	RCAB_HORVU	608	47.2 7.59	%44	29	

Çizelge 4.1 Devamı

Benek	Protein	Aksesyon numarası	Skor	MA pI	Dizi örtüşmesi	Eşleşen peptit	İfade seviyesi
<b>Fotosentez ve karbohidrat biyosentezi</b>							
16	RuBisCO aktivaz A <i>Hordeum vulgare</i>	RCAA_HORVU	103	51.0 8.04	%20	10	
17	RuBisCO aktivaz A <i>Hordeum vulgare</i>	RCAA_HORVU	81	51.0 8.04	%27	12	
18	ATP sentaz beta altbirimi Kloroplastik <i>Hordeum vulgare</i>	ATPB_HORVU	412	53.8 5.17	%38	20	
19	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz B Kloroplastik <i>Pisum sativum</i>	G3PB_PEA	278	48.1 7.57	%23	16	
23	RuBisCO aktivaz A <i>Hordeum vulgare</i>	RCAA_HORVU	498	51.0 8.04	%50	28	
24	Glukoz-1-fosfat adeniltransferaz küçük altbirim Kloroplastik <i>Hordeum vulgare</i>	GLGS_HORVU	878	56.0 6.11	%44	27	
25	ATP sentaz beta altbirimi Kloroplastik <i>Hordeum vulgare</i>	ATPB_HORVU	1080	53.8 5.17	%42	24	
33	Transketolaz Kloroplastik <i>Zea mays</i>	TKTC_MAIZE	152	72.9 5.47	%9	10	

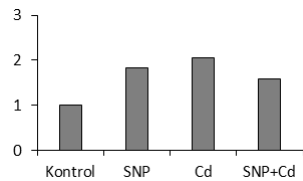
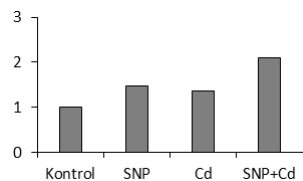
Çizelge 4.1 Devamı

Benek	Protein	Aksesyon numarası	Skor	MA pI	Dizi örtüşmesi	Eşleşen peptit	İfade seviyesi
<b>Protein metabolizması</b>							
3	50S ribozomal protein L12-1 Kloroplastik <i>Secale cereale</i>	RK121_SECCE	227	18.2 5.60	%16	5	
9	Proteaz Do-benzeri 12 Mitokondriyal <i>Arabidopsis thaliana</i>	DGP12_ARATH	40	56.1 9.24	%24	12	
28	Protein disülfid-izomeraz <i>Hordeum vulgare</i>	PDI_HORVU	399	56.4 5.02	%53	33	
29	Hücre bölünmesi proteaz ftsH homolog 1 Kloroplastik <i>Oryza sativa</i>	FTSH1_ORYSJ	90	72.7 5.51	%7	9	
30	Heat shock 70 kDa protein Mitokondriyal <i>Phaseolus vulgaris</i>	HSP7M_PHAVU	127	72.5 5.95	%15	14	
31	Heat shock cognate 70 kDa protein 1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	HSP71_ARATH	184	71.3 5.03	%18	11	
32	Heat shock cognate 70 kDa protein 1 <i>Solanum lycopersicum</i>	HSP71_SOLLC	398	71.2 5.15	%20	19	
34	ATP-bağımlı Clp proteaz ATP-bağlayıcı altbirim clpA homolog Kloroplastik <i>Brassica napus</i>	CLPA_BRANA	69	97.3 5.90	%19	25	

Çizelge 4.1 Devamı

Benek	Protein	Aksesyon numarası	Skor	MA pI	Dizi örtüşmesi	Eşleşen peptit	İfade seviyesi
<b>Primer metabolizma</b>							
14	Glutamin sentetaz sitozolik izozim 1-1 <i>Oryza sativa</i>	GLN11_ORYSJ	445	39.2 5.51	%36	15	
20	S-adenozilmetiyonin sentetaz 2 <i>Hordeum vulgare</i>	METK2_HORVU	694	42.8 5.58	%51	24	
21	S-adenozilmetiyonin sentetaz 3 <i>Hordeum vulgare</i>	METK3_HORVU	352	42.7 5.51	%48	20	
22	S-adenozilmetiyonin sentetaz 1 <i>Hordeum vulgare</i>	METK1_HORVU	567	42.7 5.51	%33	20	
<b>Enerji metabolizması</b>							
6	Adenilat kinaz A <i>Oryza sativa</i>	KAD1_ORYSJ	51	26.4 8.49	%49	15	
26	ATP sentaz alfa altbirimi Mitokondriyal <i>Oryza sativa</i>	ATPAM_ORYS A	656	55.3 5.85	%48	31	
27	Enolaz 1 <i>Hevea brasiliensis</i>	ENO1_HEVBR	48	47.8 5.57	%12	14	
<b>Stres savunma</b>							
4	1-Cys peroksiredoksin PER1 <i>Hordeum vulgare</i>	REHY_HORVU	30	23.9 6.31	%29	8	

Çizelge 4.1 Devamı

Benek	Protein	Aksesyon numarası	Skor	MA pI	Dizi örtüşmesi	Eşleşen peptit	İfade seviyesi
<b>Stres savunma</b>							
10	Laktoylglutasyon liyaz <i>Oryza sativa</i>	LGUL_ORYSJ	151	32.5 5.51	%21	12	
<b>Sinyal iletimi</b>							
7	14-3-3-benzeri protein A <i>Hordeum vulgare</i>	1433A_HORVU	129	29.3 4.83	%38	9	

Arpa fidelerinin yaprak dokusunda tanımlanan 34 protein moleküler fonksiyonlarına göre fotosentez ve karbohidrat metabolizması, protein metabolizması, primer metabolizma, enerji metabolizması, stres savunma ve sinyal iletimi kategorilerine sınıflandırılmıştır (Çizelge 4.1). Fotosentez ve karbohidrat biyosentezi ile ilişkili 16 protein (benek 1, 2, 5, 8, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 23, 24, 25 ve 33) kontrole göre SNP ve/veya Cd uygulamalarında farklı şekilde ifade olmuştur (Şekil 4.6, Çizelge 4.1). Bu proteinlerden ribuloz bifosfat karboksilaz/oksijenaz (RuBisCO) küçük altbirimi (benek 1), ATP sentaz epsilon zinciri (benek 2) ve ferredoksin-NADP redüktaz (benek 11) proteinlerinin ifade seviyeleri Cd stresinde azalırken, dışsal SNP uygulaması bu inhibisyonu azaltmıştır. Diğer taraftan, plastid-lipid-ilişkili protein 2 (benek 8), RuBisCO aktivaz A (benek 13, 16, 17 ve 23), RuBisCO aktivaz B (benek 15), ATP sentaz beta altbirimi (benek 18 ve 25), gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz B (benek 19), Glukoz-1-fosfat adenililtransferaz küçük altbirim (benek 24) ve transketolaz (benek 33) proteinlerinin ifade seviyeleri Cd stresi altındaki fidelerde artarken, SNP+Cd uygulamasında yalnızca Cd uygulamasına göre nispeten azalmıştır. Bununla birlikte, klorofil a-b bağlayıcı protein LHCII tip III (benek 5)'ün ifade seviyesi SNP uygulamasında artan yönde düzenlenmiştir. Ayrıca diğer bir ATP sentaz beta altbirimi (benek 12) proteininin ifadesi kademeli olarak artış göstermiştir.

Protein sentezi ve metabolizması ile ilgili 8 proteinin (benek 3, 9, 28, 29, 30, 31, 32 ve 34) kontrole göre SNP ve/veya Cd uygulamalarında farklı şekilde ifade olduğu

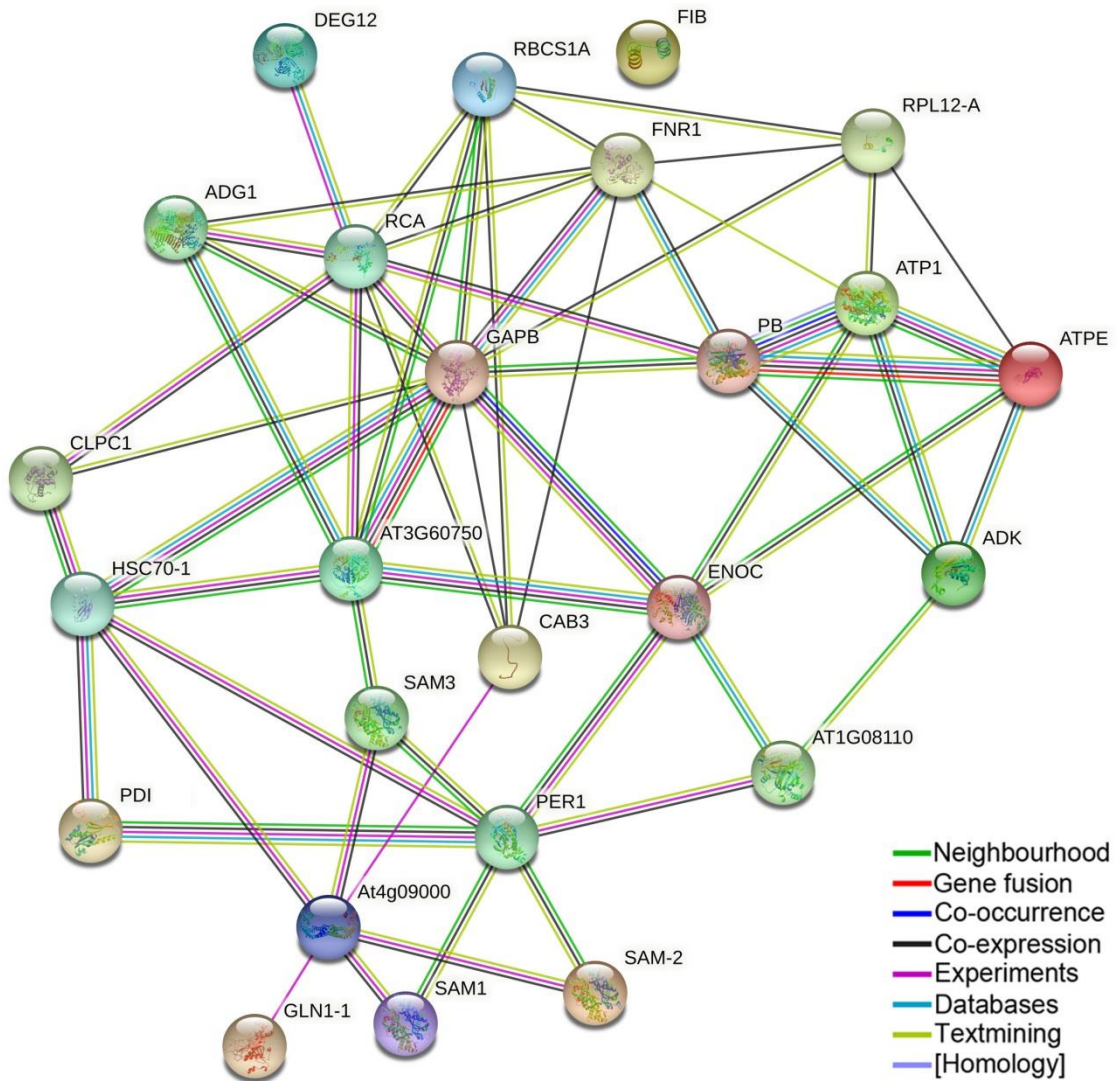
belirlenmiştir (Şekil 4.6, Çizelge 4.1). Kloroplastik 50S ribozomal protein L12-1 (benek 3) proteininin ifadesi Cd uygulamasında azalırken, SNP+Cd uygulaması bu inhibisyonu azaltmıştır. Mitokondriyal proteaz Do-benzeri 12 (benek 9) proteininin ifade seviyesi Cd ve SNP+Cd uygulamalarında artan yönde düzenlenmiştir. Diğer taraftan, protein disülfid-izomeraz (benek 28), hücre bölünmesi proteaz ftsH homolog 1 (benek 29), mitokondriyal heat shock 70 kDa protein (benek 30), heat shock cognate 70 kDa protein 1 (benek 31 ve 32) ve ATP-bağımlı Clp proteaz ATP-bağlayıcı altbirim clpA homolog (benek 34) proteinlerinin ifade seviyeleri Cd uygulamasında artış gösterirken, SNP uygulaması bu artışı azaltmıştır.

Primer metabolizma ile ilgili 4 proteinin (benek 14, 20, 21 ve 22) kontrole göre SNP ve/veya Cd uygulamalarında farklı şekilde ifade olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1, Çizelge 4.1). Glutamin sentetaz sitozolik izozim 1-1 (benek 14) ve farklı S-adenozilmetiyonin sentetaz proteinlerinin (benek 20, 21 ve 22) ifade seviyeleri Cd uygulamasında artış gösterirken, bu artış SNP+Cd uygulamasında yalnızca Cd uygulamasına göre azalmıştır (Çizelge 4.1).

Enerji metabolizması ile ilişkili adenilat kinaz A (benek 6) proteininin ifade seviyesi Cd uygulamasında azalırken, dışsal SNP uygulaması bu etkiyi azaltmıştır. Bununla birlikte, mitokondriyal ATP sentaz alfa altbirimi (benek 26) proteininin ifadesi yalnızca SNP+Cd uygulamasında artmıştır. Diğer taraftan, enolaz 1 (benek 27) proteininin ifadesi kademeli olarak artış göstermiştir (Çizelge 4.1).

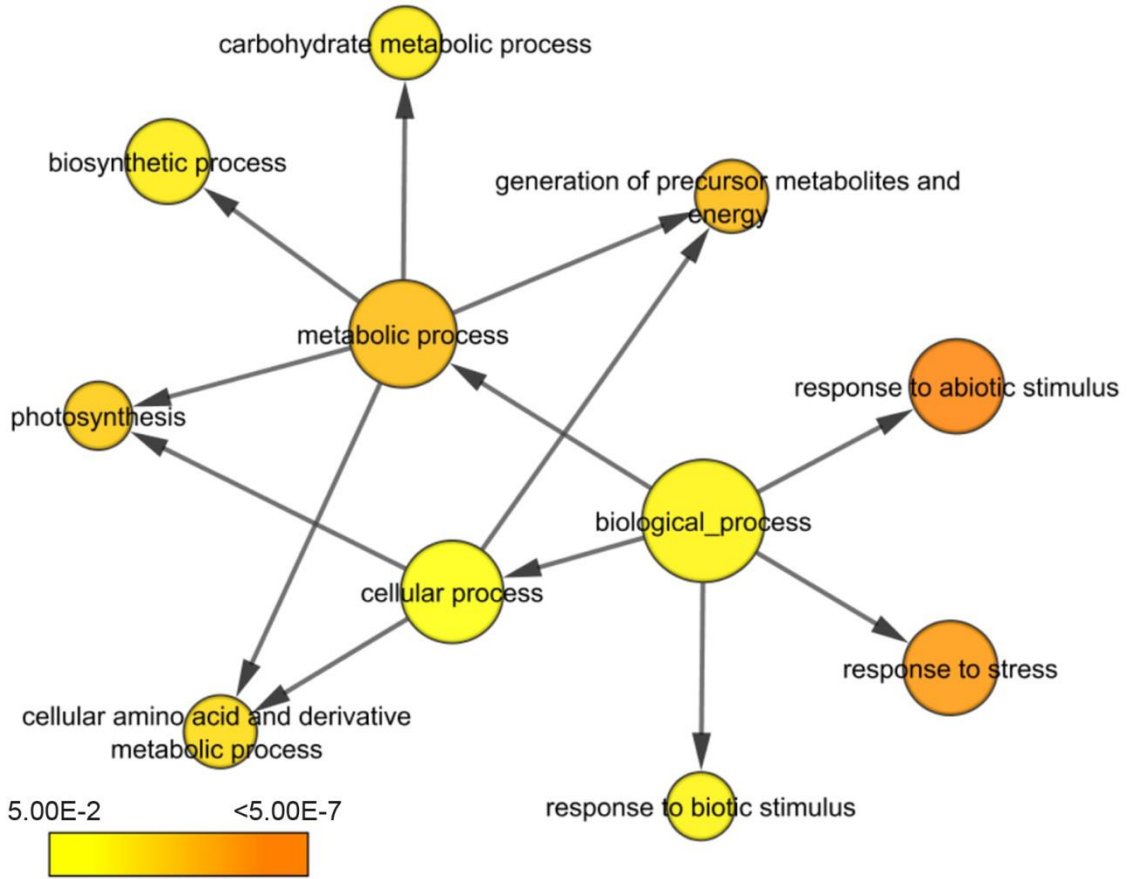
Stres savunma ile ilişkili 1-Cys peroksiredoksin PER1 (benek 4) proteininin ifade seviyesi Cd uygulamasında azalan yönde düzenlenirken, dışsal SNP bu etkiyi ortadan kaldırmıştır. Bununla birlikte, diğer bir stres savunma ile ilişkili protein olan laktoyilglutatyon liyaz (benek 10) proteininin ifade seviyesi Cd uygulamasında artmış, ancak bu artış dışsal SNP uygulaması ile azalmıştır. Son olarak, hücre sinyal iletiminde fonksiyon gören 14-3-3-benzeri protein A (benek 7)'nin ifade seviyesi SNP+Cd uygulamasında artış göstermiştir (Çizelge 4.1).

STRING kullanılarak oluşturulmuş protein–protein etkileşimleri Şekil 4.7’de verilmiştir. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPB), transketolaz (AT3G60750), ATP sentaz proteinleri (ATP1, ATPB, ATPE) ve sitozolik enolaz 1 (ENOC) gibi fotosentez ve enerji metabolizması ile ilişkili proteinlerin önemli etkileşim noktaları olduğu belirlenmiştir. Ayrıca heat shock 70 kDa proteinler (HSC70 ve HSP70), ATP-bağımlı Clp proteaz ATP-bağlayıcı altbirim clpA homolog (CLPC1), protein disülfizomeraz (PDI) ve 1-Cys peroksiredoksin PER1 (PER1) gibi proteinlerin diğer bir etkileşim grubu oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 STRING (<http://string.embl.de>) kullanılarak hazırlanan protein etkileşim haritası. Farklı renkteki çizgiler, protein etkileşim türünü göstermektedir.

Dışsal SNP ve Cd uygulamaları ile ilişkili biyolojik yolları ve moleküler fonksiyonları belirlemek için bu çalışmada belirlenen proteinler web tabanlı BiNGO kullanılarak analiz edilmiştir (Şekil 4.8). Kadmiyum stresi ve SNP uygulamaları, yoğun olarak stres yanıtı ile ilgili proteinleri ve daha az yoğun olarak fotosentez ile ilgili proteinleri teşvik etmiştir.



**Şekil 4.8** BiNGO tarafından üretilmiş moleküler fonksiyon ağları. Halkaların boyutu, bu gruptaki moleküllerin sayısı ile orantılıdır ve halkanın rengi zenginleşmenin önemini ifade etmektedir.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Gaz formunda serbest bir radikal olan nitrik oksidin (NO), çevresel streslere maruz kalan bitkilerin çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal tepkilerini düzenleyebildiği bilinmektedir (Domingos vd. 2015, Prakash vd. 2019). Birçok çalışmada, tuzluluk, ağır metal, ısı ve ışık gibi streslerin toksisitesinin NO ile etkili bir şekilde azaltılabileceği gösterilmiştir (Xu vd. 2010, Charrier vd. 2012, Singh vd. 2020). Kadmiyum (Cd) toksisitesinin, bitkilerin çeşitli fizyolojik, biyokimyasal ve anatomik özellikleri üzerindeki etkisi iyi belgelenmiştir ve çalışmalar Cd'un önemli bitki gelişim süreçlerini bozan oldukça toksik bir element olduğunu göstermiştir (Haider vd. 2021). Singh vd. (2020), NO'nun, Cd ve oksidatif stres belirteçlerinin birikimini azaltarak ve yaprak ve kök yapılarını iyileştirerek buğday fidelerinde Cd toksisitesini önemli ölçüde azalttığını ve dolayısıyla gelişmiş bir büyüme fark edildiğini göstermiştir. NO'nun buğday bitkilerde oksidatif stresi ve Cd alımını azaltarak ve ayrıca antioksidan savunma sistemini ve bazı temel mineral besin maddelerinin alımını artırarak Cd toksisitesine karşı bitki direncini önemli ölçüde iyileştirebileceği gösterilmiştir (Kaya vd. 2020).

Mevcut araştırmada, Cd toksisitesi arpa bitkilerinin toplam sürgün ve kök taze ve kuru ağırlıklarını önemli ölçüde azaltmış ve bu azalma kök dokularında daha fazla bulunmuştur. Bu bulgular, köklerin metal stresine maruz kalan ilk doku olması nedeniyle Cd stresinin inhibitör etkisinin sürgün büyümesine kıyasla kök büyümesi üzerinde daha çarpıcı olduğunu göstermiştir. Büyüme üzerine Cd stresinin bu etkisinin, oksidatif strese neden olan aşırı hücrel Cd birikimi ve sonuç olarak fotosentetik verimin azalması ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Singh vd. 2020). Bununla birlikte, Cd stresi altında bitki büyümesindeki azalmanın besin alımının engellenmesi ve su içeriğindeki düşüştü kaynaklandığı belirtilmiştir (Gomes vd. 2013). Hücre bölünmesi ve doku uzaması gibi büyüme ve gelişme olayları, membran potansiyeli ve ilişkili proton pompaları üzerindeki etkileri nedeniyle ağır metallere geri dönüşümsüz olarak etkilenmektedir (Karcz ve Kurtyka 2007). Mevcut araştırmada, Cd stresine bağlı olarak fide büyümesindeki azalma domates (Ahmad vd. 2018b), bezelye (Baruah, vd. 2019) ve buğday (Kaya vd. 2020) gibi bitki türlerinde de belirlenmiştir. Bununla birlikte, SNP uygulaması, sürgün taze ve kuru ağırlıkları ile kök kuru ağırlığında önemli bir

iyileşmeye neden olmuştur. Benzer olarak, SNP'nin bitkilerde metal toksisitesinin hafifletilmesindeki etkisi farklı bitki türlerinde de rapor edilmiştir (Dong vd. 2020, Kaya vd. 2020, Liu vd. 2020). Bitkilerde NO'nun hücre çeperi gevşemesini sağlayarak ve membran lipidleri üzerine etki ederek membran akışkanlığını arttırdığı ve hücre genişlemesini sağladığı bildirilmiştir (Xiong vd. 2009). Bununla birlikte, Singh vd. (2020) NO teşvikli Cd toleransının, makromoleküllerde oksidatif hasarın oluşumunun en aza indirilmesi için antioksidan savunma sisteminin düzenlenmesi, metal birikiminin azaltılması için kök hücre çeperinin organizasyonu ve strese yanıt genlerinin ifadelerinin düzenlenmesi ile ilişkili olduğunu ileri sürmüştür. Ayrıca NO'nun, salisilik asit ve hidrojen peroksit gibi moleküller ile etkileşime girerek önemli savunma mekanizmalarını etkinleştirdiği ve böylece oksidatif hasarın giderilmesini sağladığı bildirilmiştir (Mostofa vd. 2015). Bu bilgiler ışığında, dışsal SNP uygulaması ile arpa fidelerinde Cd toleransının teşvik edilmesi düşük toksik iyon alımı, reaktif oksijen türlerinin düşük seviyede birikimi, oksidatif savunma sisteminin teşvik edilmesi ve önemli ozmotik koruyucu bileşiklerin yüksek seviyelerde birikimi ile ilişkili olabilir.

Yapraklardaki kloroz Cd toksisitesinin en yaygın semptomlarından biridir. Mevcut araştırmada, Cd stresi arpa fidelerinin klorofil içeriğinde önemli azalmaya neden olmuştur. Kadmiyum stresine bağlı olarak klorofil içeriğindeki azalma Ahmad vd. (2018) ve Dong vd. (2020)'nin bulguları ile uyumludur. Ağır metal birikiminin, klorofil biyosentezindeki ara metabolitleri etkileyerek klorofil pigmentlerinin sentezinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Ahanger vd. 2016). Ayrıca klorofil içeriğindeki azalmanın, klorofil degradasyonu ve pigment protein komplekslerinin duyarlılığından kaynaklandığı belirtilmiştir (Khathwat ve Shekhawat 2020). Mevcut araştırmada, dışsal SNP uygulamasının Cd stresi altındaki arpa fidelerinin yapraklarındaki klorofil hasarına bir dereceye kadar dayanmasına yardımcı olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuç, NO'un klorofil sentezi üzerindeki Cd toksisitesini hafifletebileceğini göstermektedir. Klorofil içeriğindeki NO teşvikli iyileşme, bitki Cd toleransı için önemli olan fotosentezin artmasına ve bitki büyümesine neden olabilir. NO'nun bu olumlu etkisinin, klorofillerin ve ilişkili protein bileşenlerinin de novo sentezi üzerindeki etkisi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Ahmed vd. 2018b). NO'nun, kloroplast zarını stres kaynaklı zararlardan koruyarak pigment içeriğini koruduğu bildirilmiştir (Kausar vd. 2013, Ahmad vd.

2018b). Ayrıca, Dong vd. (2020) klorofil içeriğindeki NO teşvikli artışın, Fe ve Mg gibi besin elementlerinin artışına bağlı olarak klorofil biyosentezindeki artış ile ilişkili olabileceği rapor edilmiştir. Chen vd. (2010), Cd stresi altındaki arpa fidelerinde subselüler yapıların NO teşvikli kararlılığı ve bütünlüğünün, yaprak klorozunun ve fotosentezin inhibisyonunu önlemede etkili rolüne katkıda bulunduğunu bildirmiştir. Sonuç olarak, NO pigmentlerin ve ilgili bileşenlerin seviyelerini koruyarak Cd'nin fotosentez üzerindeki olumsuz etkilerine karşı koymuş olabilir.

Kadmiyum toksisitesi, reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu teşvik ederek doğrudan veya dolaylı olarak bitkilere oksidatif zararlara neden olmaktadır. Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve malondialdehit (MDA), sadece ağır metal stresi altında sinyal molekülleri olarak işlev görmez, aynı zamanda aşırı-duyarlı tepki ve stoma iletkenliği gibi birçok fizyolojik olayda da önemli bir rol oynamaktadır (Cheng ve Song 2006). Mevcut çalışmada, Cd stresi  $H_2O_2$  üretimini belirgin şekilde arttırmış ve böylece lipid peroksidasyonu ve MDA içeriğinde artışa neden olmuştur. Lipid peroksidasyonu, oksidatif stresin büyüklüğünü ölçmek için yaygın olarak kullanılan önemli bir parametredir ve lipoksijenaz aktivitesinin arttırılmasına bağlı olarak lipidlerin artan peroksidasyonundan kaynaklanmaktadır (Macri vd. 1994). Diğer taraftan, mevcut araştırmada dışsal SNP uygulaması, lipid peroksidasyonunun yanı sıra yaprak dokularında MDA ve  $H_2O_2$  içeriğini düşürmede etkili olmuştur. Bu bulgular, NO'nun Cd toksisitesinin neden olduğu oksidatif hasarın azaltılmasında rol oynadığını göstermektedir. Mevcut bulgulara benzer şekilde NO'nun Cd stresi koşullarında ROT oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu önlediği önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Ahmad vd. 2018, Kaya vd. 2020, Khator vd. 2021). Ahmad vd. (2018), Cd stresi koşullarında NO'nun lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu rollerinin serbest radikal üretimini azaltılması ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Mevcut araştırmada, SNP uygulanmış arpa fidelerinde  $H_2O_2$  seviyesi ve lipid peroksidasyonundaki azalma, antioksidan savunma sisteminin uyarılmasından kaynaklanmış olabilir.

Kadmiyum stresinin neden olduğu oksidatif hasarı en aza indirmek için, bitki hücreleri genellikle ROT birikimini güçlü bir şekilde engelleyen ve hücrel redoks durumunu yeniden oluşturan antioksidan savunma mekanizmalarını uyarma kabiliyetine sahiptir

(Nabi vd. 2019). Antioksidan savunma sisteminin düzenlenmesi, Cd stresi altındaki bitkilerde ROT kaynaklı toksisiteyi en aza indirmek için önemli bir tolerans mekanizmasıdır (Kaya vd. 2019). Mevcut araştırmada, süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX) ve guaiakol peroksidaz (POD) antioksidan enzimlerinin aktiviteleri Cd stresi altındaki arpa fidelerinin yaprak dokularında artış gösterirken, katalaz (CAT) aktivitesi değişmeden kalmıştır. Benzer olarak SOD, POD ve APX gibi enzimatik antioksidanların, Cd stresi altındaki bitkilerde önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (Ahmad vd. 2018, Kaya vd. 2019, Singh vd. 2020). Bununla birlikte, dışsal SNP+Cd uygulaması SOD ve POD enzimlerinin aktivitelerini Cd uygulamasına göre önemli ölçüde azaltırken, APX aktivitesini artırmıştır. SNP uygulamasına bağlı olarak antioksidan enzimlerin aktivitesindeki düşüşün, NO'un ağır metal kaynaklı oksidatif strese karşı koymada doğrudan önemli bir rol oynamasından kaynaklandığı bildirilmiştir (Kaur vd. 2015). Antioksidan enzimlerin aktivitelerinde gözlemlenen bu azalma, Cd kaynaklı oksidatif stresin hafifletmesinde NO'nun varsayılan bir rolü ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca APX aktivitesindeki artış, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> temizlenmesinde ve NADH konsantrasyonunu koruyarak fotosentetik elektron transportunun korunmasında NO'nun önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. APX hücresel yapıların korunmasını sağlamak için askorbat-glutasyon yolağında fonksiyon gören bir antioksidan enzimdir. Mevcut çalışmada, APX aktivitesinin NO ile teşvik edilmesi, GSH/GSSH oranını ve askorbat-glutasyon yolağının ilişkili enzimlerini artırarak fotosentetik yapıları koruduğu ileri sürülebilir.

Kentleşme ve sanayileşme, bitkiler için hem sitotoksik hem de genotoksik olan ağır metallerin birikmesine neden olmaktadır. Kadmiyum, oksidatif stresi birden fazla yolak aracılığıyla dolaylı olarak tetiklemekte ve bu da bitkilerde birçok önemli metabolik yolun bozulmasına neden olabilmektedir (Emamverdian vd. 2015). Dışsal SNP ve Cd'a maruz kalan arpa yapraklarının proteomik analizi, dirençte kritik rol oynayan proteinlerin tanımlanmasını ve ağır metalin toksisitesini hafifletebilecek proteinleri kodlayan genlerin genetik mühendisliği ile aktarılması ile Cd'a dirençli çeşitlerin geliştirilmesini sağlayabilir. Bu araştırmada, iki boyutlu (IEF-SDS/PAJE) proteomik yaklaşım kullanılarak arpa fidelerinin yaprak dokularında SNP ve/veya Cd stresinin etkileri değerlendirilmiştir. Protein profillerinin nicel analizi ile ifade seviyesi 2 kat ve

üzerinde artış veya azalış gösteren 39 protein beneği belirlenmiştir. Bu proteinlerden 34'ü MALDI-TOF/TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight) kütle spektrometrisi ve veri tabanı taraması ile başarılı bir şekilde tanımlanmıştır. Protein seviyesindeki değişiklikler fotosentezin büyük ölçüde bozulduğunu ve hasarı hafifletmek için birçok düzenleyici proteinin farklı şekilde ifade olduğunu göstermiştir. İfade seviyesinde farklılık belirlenen proteinlerin fotosentez ve karbohidrat biyosentezi, protein metabolizması, primer metabolizma, enerji metabolizması, stres savunma ve sinyal iletimi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Kadmiyum, klorofil içeriğini azaltarak, fotosentetik hızı yavaşlatarak ve fotosentetik enzimlere doğrudan zarar vererek fotosentezi olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle, Cd'un ağırlıklı olarak fotosentezde yer alan proteinlerin ifade seviyelerinde değişime neden olması sürpriz değildir. Cd stresi altındaki bitkilerde fotosentezin inhibisyonu, Cd'nin elektron taşınması üzerindeki zararlı etkisinden ve azalmış RuBisCO aktivitesinden kaynaklanmaktadır. Mevcut araştırmada, proteomik analizler fotosentezde rol oynayan RuBisCO küçük zincir, ATP sentaz epsilon zinciri ve ferredoksin-NADP redüktaz (FNR) proteinlerinin ifade seviyelerinin Cd stresi altında azaldığını ortaya koymuştur. SNP uygulaması, Cd stresi altındaki fidelerde bu proteinlerin daha yüksek seviyelerini sağlamıştır. RuBisCO, karbondioksit fiksasyonundaki birincil olay olan D-ribuloz 1,5-bifosfatın karboksilasyonunu katalize etmektedir. Küçük alt birim katalitik olmasa da maksimum aktivite için gereklidir. Özellikle, karboksilasyonun katalitik etkinliği ve CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> özgüllüğü için RuBisCO küçük altbiriminin gerekli olduğu rapor edilmiştir (Krech vd. 2012). Tilakoid membranda bulunan kloroplastik ATP sentazlar, elektron transferi ile oluşturulan elektrokimyasal gradiyent ile ATP üretmektedir (Yamori ve Shikanai 2016). Bu proteinin, Cd stresi altındaki bitki türlerinde farklı şekilde düzenlendiği ve Cd toksisitesi altında hayatta kalmak için bitkinin ihtiyacına göre ATP sentezini ayarladığı belirtilmiştir. Proteomik çalışmalar, FNR proteininin ifade seviyesinin Cd stresi altındaki *Arabidopsis thaliana* (Wang vd. 2013), *Populus tremula* (Sergeant vd. 2014), *Cucumis sativus* (Sun vd. 2016, Gong vd. 2017) ve *Oryza sativa* (Zhong ve ark. 2017) farklı şekilde düzenlendiği bildirilmiştir. Ferredoksin-NADP redüktaz enzimi, elektron taşıma zinciri ve kloroplast redoks homeostazının bir bağlantı halkası olarak işlev

görmektedir. Bu proteinin yüksek seviyelerinin, çeşitli proteomik çalışmalarda stres toleransı ile pozitif olarak ilişkili olduğu belirtilmiştir. Fotosentez sırasında fotosistem I'den NADPH'ye elektron aktarmanın yanı sıra FNR'nin oksidatif strese tolerans sağladığı da öne sürülmüştür (Girardini vd. 2005). Dışsal SNP uygulaması, CO<sub>2</sub> fiksasyonunu sağlayan ve Cd stresi tarafından inhibe edilen bu enzimlerin aktivitelerini arttırmıştır. Bu sonuçlar, SNP uygulamasının Cd toksisitesine karşı direnci artırmak için fotosentez ile ilgili proteinlerin birikimini indüklediğini ileri sürmektedir.

Fotosistemlerde ve Calvin döngüsünde yer alan proteinlerin artan ifade seviyeleri, Cd hasarının üstesinden gelmek için düzenlenebilir bir özellik olabilir. Proteomik analizler, fotosentezin farklı evrelerinde fonksiyon gören plastid-lipid-ilişkili protein 2 (fibrillin), RuBisCO aktivaz A, RuBisCO aktivaz B, ATP sentaz beta altbirimi, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz B, transketolaz ve glukoz-1-fosfat adenililtransferaz küçük altbirim proteinlerinin ifade seviyeleri Cd stresi altında artmıştır. Ancak, SNP+Cd uygulaması bu proteinlerin yüksek seviyelerini Cd uygulamasına göre azaltmıştır. Fibrillinler, stres toleransı ve hastalık direnci ile bağlantılı olan büyük bir kloroplastik yapısal protein ailesidir (Singh vd. 2010). Ayrıca fibrillinler, plastoglobül yapısal gelişiminde (Ytterberg vd. 2006), kromoplast pigment birikimi, hormonal tepkiler, fotosentetik aygıtın foto-hasardan korunması ve çeşitli biyotik ve abiyotik streslere karşı bitki direncinin sağlanmasında fonksiyon gördüğü bildirilmiştir (Singh vd. 2010). RuBisCO aktivaz, RuBisCO'nun aktivasyonunu katalize eden kilit bir düzenleyici enzimdir (Ashraf ve Harris 2013). Önceki çalışmalarda, Cd stresinin RuBisCO aktivaz proteinin bolluğunu arttırdığı bulunmuştur (Sergeant vd. 2014, Bagheri vd. 2015, Rao vd. 2017). Bu tür proteinlerin yüksek bolluğu, Cd toleransının geliştirilmesinde bu proteinlerin doğrudan dahil olduğunu göstermektedir. ATP sentazın katalitik nükleotid bağlama bölgesinin beta alt biriminden oluştuğu göz önüne alındığında, Cd stresi altında beta alt biriminin artması, bitkilerin Cd stresi ile baş etmesi için büyük miktarda enerji gerektiğini göstermektedir. Bununla birlikte, SNP uygulamasına bağlı olarak bu proteinlerin Cd stresi altındaki bitkilerde azalması, NO'nun fotosentetik mekanizma üzerine düzenleyici rolünü göstermektedir.

Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) ve transketolaz proteinleri, karbohidrat biyosentezinin bir parçası olan Calvin döngüsünde fonksiyon görmektedir. Kloroplastik GAPDH ile D-gliseraldehit 3-fosfatın 3-fosfo-D-gliseroil fosfata dönüştürülmesi C3 döngüsünün önemli bir adımıdır. Bu basamak, ışık ve karbon özümleme reaksiyonunun birleşim noktasıdır ve NADP<sup>+</sup>'yi yeniden oluşturmak için asimilasyon gücü ATP ve NADPH'yi kullanmaktadır (Hildebrandt vd. 2015). Transketolaz, hem pentoz fosfat yolunda hem de Calvin döngüsünde aktif olarak rol oynamaktadır (Suzuki vd. 2017). Biyosentetik enzimlerin bu şekilde düzenlenmesinin, sadece hücrelerin enerji ve indirgeyici molekül talebine bağlı olarak ATP, NADH ve NADPH üretimini arttırmak için değil, aynı zamanda Cd şelasyonunda yer alan amino asitlerin ve moleküllerin sentezi için karbon iskeletlerini (fosfogliserat, a-ketoglutarat) sentezlemek için gereklidir (Sarry vd. 2006). ADP-glukoz pirofosforilaz olarak da adlandırılan kloroplastik glikoz-1-fosfat adenililtransferaz küçük alt birimi, nişasta biyosentezinde ve sakaroz metabolizmasında rol oynamaktadır. ADP-glukoz pirofosforilaz proteininin Cd stresine maruz bırakılan *Arabidopsis* yapraklarında ve çeltik tanelerinde artan yönde düzenlendiği gösterilmiştir (Semane vd. 2010, Xue vd. 2014). Bu protein Cd stresine adaptasyonda önemli roller oynayabilir.

Tanımlanan proteinlerin sekizi, protein metabolizmasında yer almaktadır ve üç fonksiyonel gruba ayrılmıştır. Birinci grup, kloroplastlarda yeni sentezlenmiş peptid zincirlerinin başlatılmasında doğrudan yer alan 50S ribozomal protein L12'yi içermektedir. Kadmiyum stresinin 50S ribozomal protein L12'nin ifade seviyesini önemli ölçüde azaltması kloroplastlarda protein biyosentezinin Cd stresi altında inhibe edildiğini göstermektedir. Bununla birlikte, dışsal SNP uygulaması Cd stresi altında bu proteinin ifade seviyesini arttırmıştır. İkinci grupta, protein katlanması ve bir araya getirilmesinde görev alan protein disülfit izomeraz, heat shock 70 kDa proteini ve heat shock cognate 70 kDa protein 1 yer almaktadır. Proteomik analizler, bu proteinlerin ifade seviyelerinin Cd stresi altında arttığını ortaya koymuştur. Diğer taraftan, SNP+Cd uygulaması bu proteinlerin ifade seviyesi Cd uygulamasına göre azaltmıştır. Protein yapısının stabilizasyonuna ve bu proteinlerin hücre altı lokalizasyonuna ısı şoku proteinleri (HSP'ler) ve diğer moleküler şaperonlar aracılık etmektedir (Park ve Seo 2015). Cd stresinin HSP'ler/şaperoninler (Carneiro vd. 2017, Xu vd. 2017, Zhong vd.

2017) ve protein disülfid izomeraz (Daud vd. 2015, Wang vd. 2016) gibi çeşitli düzenleyici proteinlerin ifadesinde değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir. Bu proteinlerin, normal protein katlanmasının onarımı ve sürdürülmesi yoluyla stresten zarar görmüş proteinlerin yeniden doğal yapılarının kazanılmasında çok önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Finka vd. 2016). NO, protein katlanmasını kolaylaştırmak ve katlanmama veya yanlış katlanmaya bağlı protein agregasyonunu önlemek için şaperonları düzenleyebilir, böylece normal protein konformasyonunu yeniden kurabilir ve Cd stresine maruz kalındığında hücrel metabolizmayı sürdürebilir. Bu sonuçlar, Cd stresinin protein metabolizmasını olumsuz etkilediğini ve NO'nun muhtemelen farklı mekanizmalar ile proteinleri Cd teşvikli hasara karşı koruduğunu ileri sürebilir.

Protein metabolizması ile ilgili üçüncü grupta, protein yıkımı ile ilişkili üç protein bulunmaktadır. Cd'nin fotosentezi bozduğu ve ROT üretimi ile bitkilerde oksidatif strese neden olduğu iyi bilinmektedir (Schützendübel ve Polle 2002). Reaktif oksijen türlerinin proteinleri oksitleyebildiği ve proteaz aktivitesini arttırabildiği bildirilmiştir (Sandalio vd. 2001). Mevcut araştırmada, Cd stresinin kloroplastik hücre bölünmesi proteaz ftsH homolog 1 ve ATP-bağımlı Clp proteaz ATP-bağlayıcı altbirim clpA homologu proteinlerinin artan yönde düzenlendiği belirlenmiştir. Ayrı ayrı moleküler şaperonlara ve proteolitik aktiviteye sahip olan ClpA ve ClpP, ATP'ye bağımlı Clp proteazın iki ana alt birimidir (Wickner vd. 1994). ATP'ye bağımlı Clp proteazın, anormal veya hasarlı proteinlerin uzaklaştırılmasına yardımcı olduğu bildirilmiştir (Lionaki ve Tavernarakis 2013). Clp homologlarının, Cd'ye maruz kalan pamuk (Daud vd. 2015) ve tütün (Xie vd. 2014) fidelerinin yaprak dokusunda tanımlanmıştır. Bu proteazlar, fonksiyonlarını kaybetmiş proteinlerin birikmesini önlemek için protein dönüşümünde çok önemli bir işlevi olabilir ve böylece savunma ile ilgili proteinlerin sentezi için gerekli olan mevcut amino asit havuzunu artırabilirler. Bununla birlikte, bir serin proteaz olan mitokondriyal proteaz Do-benzeri 12 proteininin ifade seviyesi Cd ve SNP+Cd uygulamalarında artmıştır. Bu sonuçlar, Cd stresine maruz kalan arpa fidelerinin hayatta kalması için protein biyosentezinin, katlanmanın ve kompleks oluşumunun inhibisyonunun ve protein bozulmasının arttırılmasının gerekli olduğunu göstermektedir.

Kadmiyum stresine maruz kalan bitkilerde, nitrat redüktaz ve glutamin sentetaz aktivitelerinin inhibisyonu bağı olarak nitrojen alımı ve taşınımının azaldığı bildirilmiştir. Glutamin sentetaz (GS) amonyum asimilasyonunda fonksiyon görmektedir ve yapraklarda sitozolik glutamin sentetik yolunun önemli bir bileşenidir (Kusano vd. 2011). GS, sürgünlerde ve köklerde amonyum asimilasyonu sırasında metabolik karbon ve azot dengesinin korunmasında önemli bir rol oynamakta ve böylece bitki büyümesini ve gelişimini kontrol etmektedir (Bao vd. 2014). Mevcut proteomik çalışmada, Cd stresi glutamin sentetaz sitozolik izozim 1-1 proteininin ifade seviyesinde artışa neden olmuştur. Bununla birlikte, SNP uygulaması Cd stresine göre ifade seviyesini düşük seviyede azaltmıştır. Glutamin sentaz, glutatyon (GSH) biyosentezinin hız sınırlayıcı bir substratı olarak işlev gören glutamatın temini ile glutatyon homeostazında önemli bir role sahiptir (James vd. 2018). Böylece, GS'nin artan yönde düzenlenmesi Cd stresi altında daha fazla GSH oluşumuna yol açmış olabilir. GSH sentezinin artışı, daha yüksek metal bağlama kapasitesinin yanı sıra oksidatif strese karşı gelişmiş hücresel savunma mekanizması anlamına gelebilir (Verbruggen vd. 2009).

S-Adenozilmetiyonin sentetaz (SAMS), S-adenozilmetiyonin (SAM) sentezi için anahtar bir enzimdir. SAM, hücrelerdeki metabolik reaksiyonlarda bir metil grubu vericisidir ve aynı zamanda poliaminlerin bir öncüsüdür (Aloisi vd. 2016). *Arabidopsis* bitkilerinde MAT3'ün (bir SAM geni) metiyonin birikimi ve büyüme ve gelişmeyi arttıran poliamin biyosentezinde yer aldığı bildirilmiştir (Chen vd. 2016). Ayrıca, SAM ekspresyonu ile bitkilerin tuz stresi altında daha iyi adapte olması için kökün mekanik sağlamlığını sağlayan hücre çeperi lignifikasyonları arasında bir korelasyon bulunmuştur (Rahman vd. 2015). Bununla birlikte, metiyonin ve ATP'den S-adenozilmetiyonin oluşumu, metiyoninin sisteine dönüşümünün ilk adımıdır (Baric vd. 2004). Mevcut çalışmada, Cd uygulaması S-adenozilmetiyonin sentetazın üç izoformunun ifade seviyesini artırırken SNP uygulaması Cd stresine kıyasla bu proteinlerin ifade seviyesinde azalmaya neden olmuştur. Bu nedenle, SAM'lerin Cd stresi altındaki arpa fidelerinde artan seviyeleri, fidelerin Cd toleransını arttırmak için SAM bağımlı metabolizmayı destekleyebileceğini öne sürülebilir.

Bitkilerde karbohidrat ve enerji metabolizmaları, metabolik yolların ve karbohidrat dengesinin sürdürülmesi için hayati biyolojik süreçlerdir. Adenilat kinazlar, bir fosfat grubunun ATP'den AMP'ye transferi yoluyla geri dönüşümlü olarak ADP oluşumuyla adenilat seviyelerini dengeler (Dzeja ve Terzic 2009). Mevcut çalışmada, mitokondriyal adenilat kinazın NO teşvik artan seviyesi, Cd stresi altındaki mitokondrilerde ATP sentezi için daha fazla adenilat substratı sağlayabilir. Bununla birlikte, mitokondriyal ATP sentaz alfa altbirimi ve enolaz 1 proteinlerinin ifade seviyeleri SNP+Cd uygulamasında artan yönde düzenlenmiştir. Mitokondriyal membran ATP sentaz, solunum zincirinin elektron taşıma kompleksleri tarafından oluşturulan proton gradiyenti varlığında ADP'den ATP üretir. Enolaz, tüm organizmalarda tüm dokularda bulunur ve 2-fosfogliseratın fosfoenol pirüvata dönüşümünü katalize eden önemli bir glikolitik enzimdir. Bu enzimlerin artan yönde düzenlenmesi, stres koşullarında artan enerji talebini karşılamak için gerekli olabilir.

Kadmiyumun bitkilerdeki önemli etkilerinden biri, oksidatif stres savunmasında yer alan birkaç enzimin ifadesindeki artıştır. Bu çalışmada, SNP ve Cd uygulamasına bağlı olarak birkaç anahtar antioksidan ve/veya ROT homeostazıyla ilişkili proteinin farklı şekilde düzenlendiği bulunmuştur. Cd stresi 1-Cys peroksiredoksin PER1 proteininin ifade seviyesini azaltırken dışsal SNP uygulaması bu etkiyi ortadan kaldırmıştır. Peroksiredoksin, peroksitleri detoksifiye eden ve ayrıca enzim aktivasyonunda ve redoks algılamasında önemli roller oynayan tiyol spesifik bir peroksidazdır (Barranco-Medina vd. 2009). Peroksiredoksin/tiodoksin (Prx/Trx) yolağının, hidrojen peroksit detoksifikasyonunda temel bir rol oynadığı bildirilmiştir (Gupta vd. 2018). Bu yolak, Prx ile hidrojen peroksidin indirgenmesi ve Trx kullanılarak Prx'in katalitik aktivitesinin tekrar kazanılmasını içermektedir (Zhong vd. 2017). Mevcut araştırmada, Cd uygulaması Cd detoksifikasyonunu gösteren Prx bolluğunda artışa neden olmuştur. Arpa fidelerinde detoksifikasyonu sağlayan diğer bir önemli bileşen de laktoyilglutatyon liyazdır (glioksalaz I). Proteomik analizler, laktoyilglutatyon liyaz bolluğunun Cd stresi altında arttığını ortaya koymuştur. Ancak, SNP uygulaması bu proteinlerin yüksek seviyelerini azaltmıştır. Proteomik araştırmalar, Cd stresinin laktoyilglutatyon liyaz proteinini artan yönde düzenlediği ve metilglioksallerin detoksifikasyonunu kolaylaştıran glioksalaz sisteminin önemli bir enzimi olarak görev

yaptığı bildirilmiştir (Wang vd. 2016, Xu vd. 2017). Bu bulgular, bu enzimlerin arpanın Cd toleransında rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Kadmiyum stresinin toksik etkileriyle başa çıkabilmek için bitki hücreleri Cd stresini algılayabilmeli ve Cd'ye karşı tolerans sağlayacak şekilde hücresel cevapları oluşturmalıdır. Kadmiyum stresinin algılanması ve tolerans tepkilerinin oluşturulması, gen ekspresyonundaki değişimleri, birincil ve ikincil metabolit bileşimindeki değişiklikleri ve protein modifikasyonları gibi karmaşık fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerin koordinasyonunu gerektirmektedir (Urano vd. 2010). Bu nedenle, Cd stresine güçlü bir yanıt, stresle ilgili sinyal yollarının aktivasyonunu gerektirmektedir (DalCorso vd. 2010). 14-3-3 protein grubu, hücredeki çeşitli yolları ile ilişkili çok işlevli düzenleyiciler içermektedir. 14-3-3 proteinleri kalsiyum bağımlı protein kinaz ve mitojenle aktive olan protein kinaz gibi bir dizi sinyal molekülü ile etkileşmektedir (Ormancey vd. 2017). 14-3-3 proteinlerinin, Cd stresini de içeren çeşitli streslere karşı hücresel yanıtların oluşturulmasında rol oynadığı bilinmektedir (Du vd. 2015). Bu proteinler sinyalleme, transkripsiyon aktivasyonu ve savunma ile ilgili hedef proteinlerin düzenlenmesi dahil olmak üzere çeşitli seviyelerde stres yanıtlarının oluşturulmasında rol oynuyor olabilirler. Bu çalışmada, SNP+Cd uygulaması 14-3-3 proteininin ifade seviyesini artırmıştır. Bu sonuçlar, 14-3-3 proteinindeki NO kaynaklı değişikliklerin, Cd stresine yanıtta yer alan birkaç metabolik yolağı düzenlediğini göstermektedir.

Sonuç olarak, Cd stresi klorofil içeriğini önemli azalmaya ve lipid peroksidasyonunu ve  $H_2O_2$  içeriğini artışa neden olarak fide büyümesini olumsuz etkilediği belirlenmiştir. Bununla birlikte, SNP uygulaması klorofil içeriğindeki Cd kaynaklı azalmaları önemli ölçüde hafifletmiş ve antioksidan enzimlerin aktivitesini düzenleyerek lipid peroksidasyonunda azalmaya neden olarak Cd stresi altında arpa fidelerinin büyümesini sürdürmelerine yardımcı olmuştur. Ayrıca, arpa fidelerinde SNP uygulaması ve Cd stresine cevap olarak farklı şekilde ifade olan proteinler proteomik yaklaşım kullanılarak belirlenmiştir. Çoğunlukla ifadesinde artış belirlenen bu proteinlerin Cd toksitesinin üstesinden gelebilmek için bitki metabolizmasını etkilediği ileri sürülebilir. Fotosentez, karbohidrat metabolizması ve glikolizde yer alan anahtar proteinlerin artan

ifade seviyeleri Cd stresi altındaki arpa fidelerinin büyümesi ve metabolizması için gerekli bir enerji kaynağı sağlamıştır. Bununla birlikte, dışsal SNP uygulaması özellikle fotosentez, protein ve enerji metabolizmasını düzenleyerek Cd toleransının gelişmesine katkıda bulunmuştur. Bu bulgular, bitkilerde SNP teşvikli Cd toleransı ile ilişkili moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasını sağlayacak ve sonraki fonksiyonel çalışmalar için bir temel oluşturacaktır.



## KAYNAKLAR

- Adams ML, Zhao FJ, McGrath SP, Nicholson FA, Chambers BJ, 2004, Predicting cadmium concentrations in wheat and barley grain using soil properties, *Journal of Environment Quality*, 33(2), 532–541.
- Aebi H, 1984, Catalase in vitro, *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2017, CERCLA Priority List of Hazardous Substances.
- Ahanger MA, Moad-Talab N, Abd-Allah EF, Ahmad P, Hajiboland R, 2016, Plant growth under drought stress: significance of mineral nutrients. Water stress and crop plants: a sustainable approach, Ed. Ahmad P. Wiley Blackwell. pp. 649–668.
- Ahmad J, Bagheri R, Bashir H, Baig MA, Al-Huqail A, Ibrahim MM, 2018a, Organ-specific phytochemical profiling and antioxidant analysis of *Parthenium hysterophorus* L., *BioMed Research International*, 2018, 9535232.
- Ahmad P, Ahanger MA, Alyemeni MN, Wijaya L, Alam P, 2018b, Exogenous application of nitric oxide modulates osmolyte metabolism, antioxidants, enzymes of ascorbate-glutathione cycle and promotes growth under cadmium stress in tomato, *Protoplasma*, 255(1), 79–93.
- Ahmad J, Baig MA, Amna Ali AA, Qureshi MI, 2019, Proteomics of Cadmium Tolerance in Plants, In: *Cadmium Tolerance in Plants*. pp. 143–175.
- Al-Huqail AA, AL-Rashed SA, Ibrahim MM, El-Gaaly GA, Qureshi MI, 2017, Arsenic induced eco-physiological changes in Chickpea (*Cicer arietinum*) and protection by gypsum, a source of sulphur and calcium, *Scientia Horticulturae*, 217, 226–233.
- Al Mahmud J, Hasanuzzaman M, Nahar K, Bhuyan MB, Fujita M, 2018, Insights into citric acid-induced cadmium tolerance and phytoremediation in *Brassica juncea* L.: coordinated functions of metal chelation, antioxidant defense and glyoxalase systems, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147, 990–1001.

- Aloisi I, Cai G, Serafini-Fracassini D, Del Duca S, 2016, Polyamines in pollen: from microsporogenesis to fertilization, *Frontiers in Plant Science*, 7, 155.
- Amir R, Munir F, Kubra G, Iqbal T, Khan M, 2019, Plant Signaling Molecules and Cadmium Stress Tolerance, In: *Cadmium Tolerance in Plants*. pp. 367–399.
- Arasimowicz-Jelonek M, Floryszak-Wieczorek J, 2011, Understanding the fate of peroxynitrite in plant cells-from physiology to pathophysiology, *Phytochemistry*, 72, 681–688.
- Arasimowicz-Jelonek M, Floryszak-Wieczorek J, Gwozdz EA, 2011, The message of nitric oxide in cadmium challenged plants, *Plant Science*, 181, 612–620.
- Araújo WL, Tohge T, Ishizaki K, Leaver CJ, Fernie AR, 2011, Protein degradation – an alternative respiratory substrate for stressed plants, *Trends in Plant Science*, 16, 489–498.
- Arc E, Galland M, Godin B, Cueff G, Rajjou L, 2013, Nitric oxide implication in the control of seed dormancy and germination, *Frontiers in Plant Science*, 4, 346.
- Arruda M, Azevedo R, 2009, Metallomics and chemical speciation: towards a better understanding of metal-induced stress in plants, *Annals of Applied Biology*, 155 (3), 301–307.
- Asgher M, Per TS, Masood A, Fatma M, Freschi L, Corpas FJ, 2017, Nitric oxide signaling and its crosstalk with other plant growth regulators in plant responses to abiotic stress, *Environmental Science and Pollution Research*, 24(3), 2273–2285.
- Ashraf M, Harris PJC, 2013, Photosynthesis under stressful environments: An overview, *Photosynthetica*, 51(2), 163–190.
- Astier J, Gross I, Durner J, 2018, Nitric oxide production in plants: an update, *Journal of Experimental Botany*, 69, 3401–3411.
- Bagheri R, Bashir H, Ahmad J, Iqbal M, Qureshi MI, 2015, Spinach (*Spinacia oleracea* L.) modulates its proteome differentially in response to salinity, cadmium and their combination stress, *Plant Physiology and Biochemistry*, 97, 235–245.

- Bah AM, Sun H, Chen F, Zhou J, Dai H, Zhang G, 2010, Comparative proteomic analysis of *Typha angustifolia* leaf under chromium, cadmium and lead stress, *Journal of Hazardous Materials*, 184(1), 191–203.
- Bahmani R, Kim D, Na J, Hwang S, 2019, Expression of the tobacco non-symbiotic class 1 hemoglobin gene Hb1 reduces cadmium levels by modulating Cd transporter expression through decreasing nitric oxide and ROS level in *Arabidopsis*, *Frontiers in Plant Science*, 10, 201.
- Baig MA, Ahmad J, Ali AA, Qureshi MI, 2019, Role of Sulfur Metabolism in Cadmium Tolerance, In: *Cadmium Tolerance in Plants*, pp. 335–365.
- Bao A, Zhao Z, Ding G, Shi L, Xu F, Cai H, 2014, Accumulated expression level of cytosolic glutamine synthetase 1 gene (*OsGS1;1* or *OsGS1;2*) alter plant development and the carbon-nitrogen metabolic status in rice, *PLoS ONE*, 9, e95581.
- Baric I, Fumic K, Glenn B, Cuk M, Schulze A, Finkelstein JD, James SJ, Mejaski-Bosnjak V, Pazanin L, Pogribny IP, Rados M, Sarnavka V, Scukanec-Spoljar M, Allen RH, Stabler S, Uzelac L, Vugrek O, Wagner C, Zeisel S, Mudd SH, 2004, S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: a genetic disorder of methionine metabolism, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 101, 4234–4239.
- Barranco-Medina S, Lazaro JJ, Dietz KJ, 2009, The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function, *FEBS Letters*, 583, 1809–1816.
- Baruah N, Subham CM, Farooq M, Gogoi N, 2019, Influence of heavy metals on seed germination and seedling growth of wheat, pea, and tomato, *Water, Air and Soil Pollution*, 230, 273–288.
- Bashir H, Qureshi MI, Ibrahim MM, Iqbal M, 2015, Chloroplast and photosystems: impact of cadmium and iron deficiency, *Photosynthetica*, 53(3), 321–335.
- Baxter A, Mittler R, Suzuki N, 2013, ROS as key players in plant stress signaling, *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1229–1240.
- Beauchamp C, Fridovich I, 1971, Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Analytical Biochemistry*, 44, 276–287.

- Belkadhi A, De Haro A, Soengas P, Obregon S, Cartea ME, Chaibi W, 2014, Salicylic acid increases tolerance to oxidative stress induced by hydrogen peroxide accumulation in leaves of cadmium-exposed flax (*Linum usitatissimum* L.), *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 647–654.
- Berezin I, Mizrachy-Dagry T, Brook E, Mizrahi K, Elazar M, Zhuo S, 2008, Overexpression of AtMHX in tobacco causes increased sensitivity to  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , and  $Cd^{2+}$  ions, induction of V-ATPase expression, and a reduction in plant size, *Plant Cell Reports*, 27, 939–49.
- Besson-Bard A, Gravot A, Richaud P, Auroy P, Duc C, Gaymard F, 2009, Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in *Arabidopsis* by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake, *Plant Physiology*, 149 (3), 1302–1315.
- Borges KLR, Salvato F, Loziuk PL, Muddiman DC, Azevedo RA, 2019, Quantitative proteomic analysis of tomato genotypes with differential cadmium tolerance, *Environmental Science and Pollution Research*, 26(25), 26039–26051.
- Bradford 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.
- Briat JF, Curie C, Gaymard F, 2007, Iron utilization and metabolism in plants, *Current Opinion in Plant Biology*, 10(3), 276–282.
- Buchanan CD, Lim S, Salzman RA, Kagiampakis I, Morishige DT, Weers BD, 2005, *Sorghum bicolor*'s transcriptome response to dehydration, high salinity and ABA, *Plant Molecular Biology*, 58, 699–720.
- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, 2004, Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis, *Electrophoresis*, 25, 1327–1333.
- Cao F, Fu M, Wang R, Cheng W, Zhang G, Wu F, 2017, Genotypic-dependent effects of N fertilizer, glutathione, silicon, zinc, and selenium on proteomic profiles, amino acid contents, and quality of rice genotypes with contrasting grain Cd accumulation, *Functional and Integrative Genomics*, 17(4), 387–397.

- Carneiro JM, Chacón-Madrid K, Galazzi RM, Campos BK, Arruda SC, Azevedo RA, 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.
- Chamizo-Ampudia A, Sanz-Luque E, Llamas A, Galvan A, Fernandez E, 2017, Nitrate reductase regulates plant nitric oxide homeostasis, *Trends in Plant Science*, 22, 163–174.
- Chang IF, Curran A, Woolsey R, Quilici D, Cushman JC, Mittler R, 2009, Proteomic profiling of tandem affinity purified 14-3-3 protein complexes in *Arabidopsis thaliana*, *Proteomics*, 9, 2967–2985.
- Charrier A, Planchet E, Cerveau D, Gimeno-Gilles C, Verdu I, Limami AM, Lelièvre E, 2012, Over expression of a *Medicago truncatula* stress-associated protein gene (*MtSAPI*) leads to nitric oxide accumulation and confers osmotic and salt stress tolerance in transgenic tobacco, *Planta*, 236, 567-577.
- Chen F, Wang F, Sun HY, Cai Y, Mao WH, Zhang GP, Vincze E, Wu FB, 2010, Genotype-dependent effect of exogenous nitric oxide on Cd- induced changes in antioxidative metabolism, ultrastructure, and photosynthetic performance in barley seedlings (*Hordeum vulgare*), *Journal of Plant Growth Regulation*, 29(4), 394–408.
- Chen Y, Zou T, McCormick S, 2016, S-Adenosylmethionine synthetase 3 is important for pollen tube growth, *Plant Physiology*, 172, 244–253.
- Chen Z, Zhu D, Wu J, Cheng Z, Yan X, Deng X, 2018, Identification of differentially accumulated proteins involved in regulating independent and combined osmosis and cadmium stress response in *Brachypodium* seedling roots, *Scientific Reports*, 8(1), 7790.
- Cheng Y, Song C, 2006, Hydrogen peroxide homeostasis and signaling in plant cells, *Science in China - Series C: Life Sciences*, 49, 1–11.

- Cho M, Chardonnens AN, Dietz KJ, 2003, Differential heavy metal tolerance of *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis thaliana*: a leaf slice test, *New Phytologist*, 158, 287–293.
- Clemens S, 2006, Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants, *Biochemie*, 88, 1707–1719.
- Collins GA, Goldberg AL, 2017, The logic of the 26S proteasome, *Cell*, 169(5), 792–806.
- Cuypers A, Hendrix S, Amaral Dos Reis R, De Smet S, Deckers J, Gielen H, 2016, Hydrogen peroxide, signaling in disguise during metal phytotoxicity, *Frontiers in Plant Science*, 7, 470.
- 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 Proteomics*, 152, 109–120.
- DalCorso G, Farinati S, Furini A, 2010, Regulatory networks of cadmium stress in plants, *Plant Signaling and Behavior*, 5(6), 663–667.
- D'Alessandro A, Taamalli M, Gevi F, Timperio AM, Zolla L, Ghnaya T, 2013, Cadmium stress responses in *Brassica juncea*: hints from proteomics and metabolomics, *Journal of Proteome Research*, 12(11), 4979–4997.
- Daud MK, Quiling H, Lei M, Ali B, Zhu SJ, 2015, Ultrastructural, metabolic and proteomic changes in leaves of upland cotton in response to cadmium stress, *Chemosphere*, 120, 309–320.
- De Araújo RP, de Almeida AAF, Pereira LS, Mangabeira PA, Souza JO, Pirovani CP, Ahnert D, Baligar VC, 2017, Photosynthetic, antioxidative, molecular and ultrastructural responses of young cacao plants to Cd toxicity in the soil, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 144, 148–157.
- Deeba F, Pandey AK, Ranjan S, Mishra A, Singh R, Sharma Y, 2012, Physiological and proteomic responses of cotton (*Gossypium herbaceum* L.) to drought stress, *Plant Physiology and Biochemistry*, 53, 6–18.

- De Michele R, Vurro E, Rigo C, Costa A, Elviri L, Di Valentin M, Careri M, Zottini M, di Toppi LS, Schiavo FL, 2009, Nitric oxide is involved in cadmium-induced programmed cell death in Arabidopsis suspension cultures, *Plant Physiology*, 150(1), 217–228.
- Dietz KJ, Tavakoli N, Kluge C, Mimura T, Sharma SS, Harris GC, Chardonnens AN, Golldack D, 2001, Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level, *Journal of Experimental Botany*, 52(363), 1969–1980.
- Domingos P, Prado AM, Wong A, Gehring C, Feijo JA, 2015, Nitric oxide: a multitasked signaling gas in plants, *Molecular Plant*, 8, 506–520.
- Du H, Zhou X, Yang Q, Liu H, Kurtenbach R, 2015, Changes in H<sup>+</sup>-ATPase activity and conjugated polyamine contents in plasma membrane purified from developing wheat embryos under short-time drought stress, *Plant Growth Regulation*, 75(1), 1–10.
- Dzeja P, Terzic A, 2009, Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing, *International Journal of Molecular Science*, 10, 1729–1772.
- 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.
- Fan S, Meng Y, Song M, Pang C, Wei H, Liu J, 2014, Quantitative phosphoproteomics analysis of nitric oxide-responsive phosphoproteins in cotton leaf, *PLoS ONE*, 9, e94261.
- Fan HF, Xu YL, Du CX, Wu X, 2015, Phloem sap proteome studied by iTRAQ provides integrated insight into salinity response mechanisms in cucumber plants, *Journal of Proteomics*, 125, 54–67.
- Fancy NN, Bahlmann AK, Loake GJ, 2017, Nitric oxide function in plant abiotic stress, *Plant, Cell and Environment*, 40, 462–472.
- Fariduddin Q, Yusuf M, Ahmad I, Ahmad A, 2014, Brassinosteroids and their role in response of plants to abiotic stresses, *Biologia Plantarum*, 58, 9–17.

- Finka A, Mattoo RU, Goloubinoff P, 2016, Experimental milestones in the discovery of molecular chaperones as polypeptide unfolding enzymes, *Annual Review of Biochemistry*, 85, 715–742.
- Förstermann U, Sessa WC, 2012, Nitric oxide synthases: regulation and function, *European Heart Journal*, 33, 829–837.
- Fröhlich A, Durner J, 2011, The hunt for plant nitric oxide synthase (NOS): is one really needed? *Plant Science*, 181, 401–404.
- Gao X, Cox KL, He P, 2014, Functions of calcium-dependent protein kinases in plant innate immunity, *Plants*, 3, 160–176.
- Ghosh R, Roy S, 2019, Cadmium Toxicity in Plants: Unveiling the Physicochemical and Molecular Aspects, In *Cadmium Tolerance in Plants*. pp. 223-246.
- Gill SS, Tuteja N, 2010, Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909–930.
- Gill SS, Anjum NA, Hasanuzzaman M, Gill R, Trivedi DK, Ahmad I, Pereira E, Tuteja N, 2013, Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations, *Plant Physiology and Biochemistry*, 70, 204–212.
- Girardini JE, Khayath N, Amirante A, Dissous C, Serra E, 2005, *Schistosoma mansoni*: Ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase and the metabolism of reactive oxygen species, *Exp Parasit*, 110, 157–161.
- Gomes MP, Marques TCLLSM, Soares AM, 2013, Cadmium effects on mineral nutrition of the Cd-hyperaccumulator *Pfaffia glomerata*, *Biologia*, 68(2), 223–230.
- 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.
- Groppa MD, Benavides MP, 2008, Polyamines and abiotic stress: recent advances, *Amino Acids*, 1, 35–45.

- Groppa MD, Rosales EP, Iannone MF, Benavides MP, 2008, Nitric oxide, polyamines and Cd-induced phytotoxicity in wheat roots, *Phytochemistry*, 69, 2609–2615.
- Grover A, 2012, Plant chitinases: genetic diversity and physiological roles, *Critical Reviews in Plant Science*, 31, 57–73.
- Gupta DK, Pena LB, Romero-Puertas MC, Hernández A, Inouhe M, Sandalio LM, 2017, NADPH oxidases differentially regulate ROS metabolism and nutrient uptake under cadmium toxicity, *Plant, Cell and Environment*, 40(4), 509–526.
- Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ, 2018, Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants.
- Gutsch A, Zouaghi S, Renaut J, Cuypers A, Hausman JF, Sergeant K, 2018, Changes in the proteome of *Medicago sativa* leaves in response to long-term cadmium exposure using a cell-wall targeted approach, *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 1–17.
- Haider FU, Liqun C, Coulter JA, Cheema SA, Wu J, Zhang R, Farooq M, 2021, Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 211, 111887.
- Hall JL, 2002, Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance, *Journal of Experimental Botany*, 53, 1–11.
- Harris NS, Taylor GJ, 2013, Cadmium uptake and partitioning in durum wheat during grain filling, *BMC Plant Biology*, 13, 103.
- Hasan MK, Liu C, Wang F, Ahammed GJ, Zhou J, Xu MX, Yu JQ, Xia XJ, 2016, Glutathione-mediated regulation of nitric oxide, S-nitrosothiol and redox homeostasis confers cadmium tolerance by inducing transcription factors and stress response genes in tomato, *Chemosphere*, 161, 536–545.
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Alam MM, Roychowdhury R, Fujita M, 2013, Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants, *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 9643–9684.

- Hasanuzzaman M, Oku H, Nahar K, Bhuyan MB, Al Mahmud J, Baluska F, 2018, Nitric oxide-induced salt stress tolerance in plants: ROS metabolism, signaling, and molecular interactions, *Plant Biotechnology Reports*, 12(2), 77–92.
- Heath RL, Packer L, 1968, Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189–198.
- Hernand V, Julio E, de Borne FD, Punshon T, Ricachenevsky FK, Bellec A, Gosti F, Berthomieu P, 2014, Inactivation of two newly identified tobacco heavy metal ATPases leads to reduced Zn and Cd accumulation in shoots and reduced pollen germination, *Metallomics*, 6, 1427–1440.
- Heyno E, Klose C, Krieger-Liszka A, 2008, Origin of cadmium-induced reactive oxygen species production: mitochondrial electron transfer versus plasma membrane NADPH oxidase, *New Phytologist*, 179(3), 687–699.
- Hildebrandt T, Knuesting J, Berndt C, Morgan B, Scheibe R, 2015, Cytosolic thiol switches regulating basic cellular functions: GAPDH as an information hub? *Biological Chemistry*, 396(5), 523–537.
- Hossain Z, Komatsu S, 2013, Contribution of proteomic studies towards understanding plant heavy metal stress response, *Frontiers in Plant Science*, 3, 310.
- Huang D, Gong X, Liu Y, Zeng G, Lai C, Bashir H, Wan J, 2017, Effects of calcium at toxic concentrations of cadmium in plants, *Planta*, 245(5), 863–873.
- Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H, Wilson C, Heberle-Bors E, Ellis BE, Morris PC, Innes RW, Ecker JR, Scheel D, Klessig DF, Machida Y, Mundy J, Ohashi Y, Walker JC, 2002, Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature, *Trends in Plant Science*, 7, 301–308.
- Iqbal N, Khan NA, Ferrante A, Trivellini A, Francini A, Khan M, 2017, Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones, *Frontiers in Plant Sciences*, 8, 475.
- James D, Borphukan B, Fartyal D, Ram B, Yadav R, Singh J, Manna M, Panditi V, Sheri V, Achary M, Reddy MK, 2018, Concurrent overexpression of *OsGS1;1*

and *OsGS2* genes in transgenic rice (*Oryza sativa* L.): impact on tolerance to abiotic stresses, *Frontiers in Plant Sciences*, 9, 786.

Jardim-Messeder D, Caverzan A, Rauber R, Souza Ferreira E, Margis-Pinheiro M, Galina A, 2015, Succinate dehydrogenase (mitochondrial complex II) is a source of reactive oxygen species in plants and regulates development and stress responses, *New Phytologist*, 208 (3), 776–789.

Jin H, Xu M, Chen H, Zhang S, Han X, Tang Z, Sun R, 2016, Comparative Proteomic Analysis of Differentially Expressed Proteins in *Amaranthus hybridus* L. Roots Under Cadmium Stress, Water, Air, and Soil Pollution, 227(7), 220.

Jonak C, Nakagami H, Hirt H, 2004, Heavy metal stress activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium, *Plant Physiology*, 136(2), 3276–3283.

Kalachova T, Puga-Freitas R, Kravets V, Soubigou-Taconnat L, Repellin A, Balzergue S, Zachowski A, Ruelland E, 2016, The inhibition of basal phosphoinositide-dependent phospholipase C activity in *Arabidopsis* suspension cells by abscisic or salicylic acid acts as a signalling hub accounting for an important overlap in transcriptome remodelling induced by these hormones, *Environmental and Experimental Botany*, 123, 37–49.

Karcz W, Kurtyka R, 2007, Effect of cadmium on growth, proton extrusion and membrane potential in maize coleoptile segments, *Biologia Plantarum*, 51, 713–719.

Kaur G, Singh HP, Batish DR, Mahajan P, Kohli RK, Rishi V, 2015, Exogenous nitric oxide (NO) interferes with lead (Pb)-induced toxicity by detoxifying reactive oxygen species in hydroponically grown wheat (*Triticum aestivum*) roots, *PLoS ONE*, 10, 1–18.

Kausar F, Shahbaz M, Ashraf M, 2013, Protective role of foliar-applied nitric oxide in *Triticum aestivum* under saline stress, *Turkish Journal of Botany*, 37, 1155–1165.

- Kaya C, Ashraf M, Alyemeni MN, Ahmad P, 2020, Responses of nitric oxide and hydrogen sulfide in regulating oxidative defence system in wheat plants grown under cadmium stress, *Physiologia Plantarum*, 168(2), 345–360.
- Khator K, Shekhawat GS, 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.
- Khator K, Saxena I, Shekhawat GS, 2021, Nitric oxide induced Cd tolerance and phytoremediation potential of *B. juncea* by the modulation of antioxidant defense system and ROS detoxification, *BioMetals*, 34(1), 15–32.
- Kim DY, Bovet L, Maeshima M, Martinoia E, Lee Y, 2007, The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance, *The Plant Journal*, 50, 207–218.
- Kong, J, Dong Y, Xu L, Liu S, Bai X, 2014, Effects of foliar application of salicylic acid and nitric oxide in alleviating iron deficiency induced chlorosis of *Arachis hypogaea* L., *Botanical Studies*, 55, 9.
- Krech K, Ruf S, Masduki FF, Thiele W, Bednarczyk D, Albus CA, Bock R, 2012, The plastid genome-encoded Ycf4 protein functions as a nonessential assembly factor for photosystem I in higher plants, *Plant Physiology*, 159, 579–591.
- Kretschmar T, Burla B, Lee Y, Martinoia E, Nagy R, 2011, Functions of ABC transporters in plants, *Essays in Biochemistry*, 50, 145–160.
- Kumar M, 2013, Crop plants and abiotic stresses, *Biomolecular Research and Therapeutics*, 3(1), e125.
- Kusano M, Tabuchi M, Fukushima A, Funayama K, Diaz C, Kobayashi M, Hayashi N, Tsuchiya YN, Takahashi H, Kamata A, Yamaya T, Saito K, 2011, Metabolomics data reveal a crucial role of cytosolic glutamine synthetase 1;1 in coordinating metabolic balance in rice, *The Plant Journal*, 66, 456–466.
- Lan XY, Yan YY, Yang B, Li XY, Xu FL, 2018, Differential expression of proteins in the leaves and roots of cadmium-stressed *Microsorium pteropus*, a novel potential aquatic cadmium hyperaccumulator, *Science of the Total Environment*, 642, 1369–1377.

- Lee BR, Hwang S, 2015, Over-expression of NtHb1 encoding a non- symbiotic class 1 hemoglobin of tobacco enhances a tolerance to cadmium by decreasing NO (nitric oxide) and Cd levels in *Nicotiana tabaccum*, *Environmental and Experimental Botany*, 113, 18–27.
- Lee KW, Rahman MA, Kim KY, Choi GJ, Cha JY, Cheong MS, Shohael AM, Jones C, Lee SH, 2018, Overexpression of the alfalfa DnaJ-like protein (MsDJLP) gene enhances tolerance to chilling and heat stresses in transgenic tobacco plants, *Turkish Journal of Biology*, 42, 12–22.
- Lee KW, Rahman MA, Lee SH, Kim YG, Lee DG, Jones CS, Lee BH, 2019, Nitric oxide-induced proteomic analysis in rice leaves, *Plant Biotechnology Reports*, 13(4), 375–387.
- Li N, Zhang Z, Zhang W, Wei Q, 2011, Calcineurin B subunit interacts with proteasome subunit alpha type 7 and represses hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  activity via the proteasome pathway, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 405(3), 468–472.
- Li SW, Xue L, 2010, The interaction between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO, Ca<sup>2+</sup>, cGMP, and MAPKs during adventitious rooting in mung bean seedlings, *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 46, 142–148.
- Li SW, Li Y, Leng Y, Zeng XY, Ma YH, 2019, Nitric oxide donor improves adventitious rooting in mung bean hypocotyl cuttings exposed to cadmium and osmotic stresses, *Environmental and Experimental Botany*, 164, 114–123.
- Lionaki E, Tavernarakis N, 2013, Oxidative stress and mitochondrial protein quality control in aging, *Journal of Proteomics*, 92, 181–194.
- Liu SL, Yang RJ, Ma MD, Dan F, Zhao Y, Jiang P, Wang MH, 2015, Effects of exogenous NO on the growth, mineral nutrient content, antioxidant system, and ATPase activities of *Trifolium repens* L. plants under cadmium stress, *Acta Physiologia Plantarum*, 37(1), 1721.
- Liu S, Li Y, Liu L, Min J, Liu W, Li X, Deng Q, 2020, Comparative Proteomics in Rice Seedlings to Characterize the Resistance to Cadmium Stress by High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (HPLC-

- MS/MS) with Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ), *Analytical Letters*, 53(5), 807–820.
- Liu X, Wu FH, Li JX, Chen J, Wang GH, Wang WH, Hu WJ, Gao LJ, Wang ZL, Chen JH, Simon M, 2016, Glutathione homeostasis and Cd tolerance in the *Arabidopsis sultr1; 1-sultr1; 2* double mutant with limiting sulfate supply, *Plant Cell Reports*, 35(2), 397–413.
- Loix C, Huybrechts M, Vangronsveld J, Gielen M, Keunen E, Cuypers A, 2017, Reciprocal interactions between cadmium-induced cell wall responses and oxidative stress in plants, *Frontiers in Plant Science*, 8, 1867.
- Lozano-Juste J, Leon J, 2011, Nitric oxide regulates DELLA content and PIF expression to promote photomorphogenesis in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 156, 1410–1423.
- Luo JS, Zhang Z, 2019, Proteomic changes in the xylem sap of *Brassica napus* under cadmium stress and functional validation, *BMC Plant Biology*, 19(1), 1–14.
- Lux A, Martinka M, Vaculík M, White PJ, 2011, Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review, *Journal of Experimental Botany*, 62, 21–37.
- Ma J, Sheng H, Li X, Wang L, 2015, iTRAQ-based proteomic analysis reveals the mechanisms of silicon-mediated cadmium tolerance in rice (*Oryza sativa*) cells, *Plant Physiology and Biochemistry*, 104, 71–80.
- Macri F, Braidot E, Petrusa E, Vianello A, 1994, Lipoxygenase activity associated to isolated soybean plasma membranes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1215, 109–114.
- Maere S, Heymans K, Kuiper M, 2005, BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks, *Bioinformatics*, 21, 3448–3449.
- Mendoza-Cózatl DG, Zhai Z, Jobe TO, Akmakjian GZ, Song WY, Limbo O, Russell MR, Kozlovskyy VI, Martinoia E, Vatamaniuk OK, Russell P, Schroeder JI, 2010, Tonoplast-localized Abc2 transporter mediates phytochelatin accumulation in vacuoles and confers cadmium tolerance, *Journal of Biological Chemistry*, 285, 40416–40426.

- Mendoza-Cózatl DG, Jobe TO, Hauser F, Schroeder JI, 2011, Long-distance transport, vacuolar sequestration and transcriptional responses induced by cadmium and arsenic, *Current Opinion in Plant Biology*, 14(5), 554–562.
- Migocka M, Papierniak A, Rajs A, 2017, Cucumber PDR8/ABCG36 and PDR12/ABCG40 plasma membrane proteins and their up-regulation under abiotic stresses, *Biologia Plantarum*, 61(1), 115–126.
- Mika A, Lüthje S, 2003, Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes, *Plant Physiology*, 132, 1489–1498.
- Mills RF, Francini A, da Rocha PSCF, Baccarini PJ, Aylett M, Krijger GC, Williams LE, 2005, The plant P1B-type ATPase AtHMA4 transports Zn and Cd and plays a role in detoxification of transition metals supplied at elevated levels, *FEBS Letters*, 579, 783–791.
- Milner MJ, Seamon J, Craft E, Kochian LV, 2013, Transport properties of members of the ZIP family in plants and their role in Zn and Mn homeostasis, *Journal of Experimental Botany*, 64(1), 369–381.
- Mohapatra S, Mitra B, 2016, Protein glutathionylation protects wheat (*Triticum aestivum* var. Sonalika) against Fusarium induced oxidative stress, *Plant Physiology and Biochemistry*, 109, 319–325.
- Moreau M, Lindermayr C, Durner J, Klessig DF, 2010, NO synthesis and signaling in plants - where do we stand? *Physiologia Plantarum*, 138, 372–383.
- Moreno-Risueno MA, Busch W, Benfey PN, 2010, Omics meet networks—using systems approaches to infer regulatory networks in plants, *Current Opinion in Plant Biology*, 13 (2), 126–131.
- Moroney J, Bartlett S, Samuelsson G, 2001, Carbonic anhydrases in plants and algae, *Plant, Cell and Environment*, 24(2), 141–153.
- Mosa KA, Ismail A, Helmy M, 2017, Omics and system biology approaches in plant stress research, In: *Plant Stress Tolerance*. Springer, Cham, pp. 21–34.

- Mostofa MG, Fujita M, Tran LSP, 2015, Nitric Oxide Mediates Hydrogen Peroxide and Salicylic Acid Induced Salt Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.) Seedlings, *Plant Growth Regulation*, 77, 265–277.
- Mur LA, Mandon J, Persijn S, Cristescu SM, Moshkov IE, Novikova GV, Hall MA, Harren FJ, Hebelstrup KH, Gupta KJ, 2013, Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge, *AoB Plants*, 5, pls052.
- Musumeci MA, Ceccarelli A, Catalano-Dupuy DL, 2012, The Plant-Type Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> Reductases, In *Advances in Photosynthesis-Fundamental Aspects*; Najafpour, M., Ed. In: Tech: Rijeka, Croatia, pp. 539–562.
- Nabi RBS, Tayade R, Hussain A, Kulkarni KP, Imran QM, Mun BG, Yun BW, 2019, Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress, *Environmental and Experimental Botany*, 161, 120–133.
- Nahar K, Hasanuzzaman M, Alam MM, 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, 1981, Hydrogen-Peroxide Is Scavenged by Ascorbate-Specific Peroxidase in Spinach-Chloroplasts, *Plant and Cell Physiology*, 22, 867–880.
- Nazar R, Iqbal N, Masood A, Khan MIR, Syeed S, Khan NA, 2012, Cadmium toxicity in plants and role of mineral nutrients in its alleviation, *American Journal of Plant Science*, 3, 1476–1489.
- Negi S, Santisree P, Kharshiing EV, Sharma R, 2010, Inhibition of the ubiquitin—proteasome pathway alters cellular levels of nitric oxide in tomato seedlings, *Molecular Plant*, 3, 854–869.
- Nishimura K, van Wijk KJ, 2015, Organization, function and substrates of the essential Clp protease system in plastids, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1847, 915–930.
- Oh M, Komatsu S, 2015, Characterization of proteins in soybean roots under flooding and drought stresses, *Journal of Proteomics*, 114, 161–181.

- Ormancey M, Thuleau P, Mazars C, Cotelle V, 2017, CDPKs and 14-3-3 Proteins: emerging duo in signaling, *Trends in Plant Science*, 22(3), 263–272.
- Ortega-Galisteo AP, Rodríguez-Serrano M, Pazmiño DM, Gupta DK, Sandalio LM, Romero-Puertas MC, 2012, S-Nitrosylated proteins in pea (*Pisum sativum* L.) leaf peroxisomes: changes under abiotic stress, *Journal of Experimental Botany*, 63, 2089–2103.
- Oz MT, Eyidogan F, Yucel M, Öktem HA, 2015, Functional role of nitric oxide under abiotic stress conditions, In: Khan, M., Mobin, M., Mohammad, F., Corpas, F. (Eds.), *Nitric Oxide Action in Abiotic Stress Responses in Plants*. Springer, Cham, pp. 21-41.
- Park J, Song WY, Ko D, Eom Y, Hansen TH, Schiller M, Lee TG, Martinoia E, Lee Y, 2012, The phytochelatin transporters AtABCC1 and AtABCC2 mediate tolerance to cadmium and mercury, *The Plant Journal*, 69(2), 278–288.
- Park CJ, Seo YS, 2015, Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones for plant immunity, *Plant Pathology Journal*, 31, 323–333.
- Paunov M, Koleva L, Vassilev A, Vangronsveld J, Goltsev V, 2018, Effects of different metals on photosynthesis: cadmium and zinc affect chlorophyll fluorescence in durum wheat, *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 787.
- Pedranzani H, Vigliocco A, 2017, Regulation of Jasmonic Acid and Salicylic Acid Levels in Abiotic Stress Tolerance: Past and Present. Nova Science Publishers, In: Singh, V.P., Singh, S., Prasad, S.M. (Eds.), New York, NY, pp. 329–370.
- Pérez-Chaca MV, Rodríguez-Serrano M, Molina AS, Pedranzani HE, Zirulnik F, Sandalio LM, Romero-Puertas MC, 2014, Cadmium induces two waves of reactive oxygen species in *Glycine max* (L.) roots, *Plant, Cell and Environment*, 37(7), 1672–1687.
- Persans MW, Nieman K, Salt DE, 2001, Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*, *Proceedings of the National Academy of the USA*, 98, 9995–10000.

- Pinto A, Mota A, De Varennes A, Pinto F, 2004, Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants, *Science of Total Environment*, 326(1–3), 239–247.
- Prakash V, Singh VP, Tripathi DK, Sharma S, Corpas FJ, 2019, Crosstalk between nitric oxide (NO) and abscisic acid (ABA) signalling molecules in higher plants, *Environmental and Experimental Botany*, 161: 41–49
- Rady MM, Hemida KA, 2015, Modulation of cadmium toxicity and enhancing cadmium-tolerance in wheat seedlings by exogenous application of polyamines, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 119, 178–185.
- Rady MM, Seif El-Yazal MA, Taie HAA, Abdel-Mageed SMA, 2016, Response of *Triticum aestivum* (L.) plants grown under cadmium stress to polyamines pretreatments, *Plant*, 4(5), 29–36.
- Rahman MA, Alam I, Kim Y-G, Ahn N-Y, Heo S-H, Lee D-G, Liu G, Lee B-H, 2015, Screening for salt-responsive proteins in two contrasting alfalfa cultivars using a comparative proteome approach, *Plant Physiology and Biochemistry*, 89, 112–122.
- Rao J, Lv W, Yang J, 2017, Proteomic analysis of saffron (*Crocus sativus* L.) grown under conditions of cadmium toxicity, *Bioscience Journal*, 33(3), 713–720.
- Rehman MZ, Rizwan M, Ghafoor A, Naeem A, Ali S, Sabir M, Qayyum MF, 2015, Effect of inorganic amendments for in situ stabilization of cadmium in contaminated soils and its phyto-availability to wheat and rice under rotation, *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 16897–16906.
- Rizwan M, Ali S, Adrees M, Rizvi H, Zia-ur-Rehman M, Hannan F, Qayyum MF, Hafeez F, Ok YS, 2016, Cadmium stress in rice: toxic effects, tolerance mechanisms, and management: a critical review, *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 17859–17879.
- Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Zabalza A, Corpas FJ, Gomez M, Del Rio LA, Sandalio LM, 2006, Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo, *Plant Cell and Environment*, 29(8), 1532–1544.

- Rogers EE, Eide DJ, Guerinot ML, 2000, Altered selectivity in an Arabidopsis metal transporter, Proceedings of the National Academy of the USA, 97(22), 12356–12360.
- Romero-Puertas MC, Sandalio LM, 2016, Nitric oxide level is self-regulating and also regulates its ROS partners, Frontiers in Plant Science, 7, 316.
- Romero-Puertas MC, Terrón-Camero LC, Peláez-Vico MÁ, Olmedilla A, Sandalio LM, 2019, Reactive oxygen and nitrogen species as key indicators of plant responses to Cd stress, Environmental and Experimental Botany, 161, 107–119.
- Roy SK, Cho SW, Kwon SJ, Kamal AHM, Kim SW, Oh MW, Lee MS, Chung KY, Xin Z, Woo SH, 2016, Morpho-physiological and proteome level responses to cadmium stress in sorghum, PLoS ONE, 11(2), e0150431.
- Saha JK, Selladurai R, Coumar MV, Dotaniya ML, Kundu S, Patra AK, 2017, Assessment of heavy metals contamination in soil, In: Soil Pollution-An Emerging Threat to Agriculture. Springer, Singapore, pp. 155–191.
- Sahay S, Gupta M, 2017, An update on nitric oxide and its benign role in plant responses under metal stress, Nitric Oxide, 67, 39–52.
- Sandalio LM, Dalurzo HC, Gómez M, Romero-Puertas MC, del Río LA, 2001, Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants, Journal of Experimental Botany, 52, 2115–2126.
- Santisree P, Adimulam SS, Sharma K, Bhatnagar-Mathur P, Sharma KK, 2019, Insights Into the Nitric Oxide Mediated Stress Tolerance in Plants, In Plant Signaling Molecules. pp. 385-406.
- Sarry JE, Kuhn L, Ducruix C, Lafaye A, 2006, The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses, Proteomics, 6, 2180–2198.
- Schützendübel A, Polle A, 2002, Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization, Journal of Experimental Botany, 53, 1351–1365.

- Sebastian A, Prasad MNV, 2014, Cadmium minimization in rice, *Agronomy for Sustainable Development*, 34, 155–173.
- Sebastian A, Prasad MNV, 2015, Trace element management in rice, *Agronomy*, 5(3), 374–404.
- Sebastian A, Prasad MNV, 2019, Mitigation of Cadmium Stress in Cereals. In *Cadmium Tolerance in Plants*. pp. 401-422.
- Semane B, Dupae J, Cuypers A, Noben JP, Tuomainen M, Tervahauta A, Vangronsveld J, 2010, Leaf proteome responses of *Arabidopsis thaliana* exposed to mild cadmium stress, *Journal of Plant Physiology*, 167(4), 247–254.
- Sergeant K, Kieffer P, Dommes J, Hausman JF, Renaut J, 2014, Proteomic changes in leaves of poplar exposed to both cadmium and low-temperature, *Environmental and Experimental Botany*, 106, 112–123.
- Sharma SS, Dietz KJ, 2006, The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress, *Journal of Experimental Botany*, 57, 711–726.
- Sharma SS, Dietz KJ, Mimura T, 2016, Vacuolar compartmentalization as indispensable component of heavy metal detoxification in plants, *Plant, Cell and Environment*, 39, 1112–1126.
- Sidhu GPS, Singh HP, Batish DR, Kohli RK, 2017, Tolerance and hyperaccumulation of cadmium by a wild, unpalatable herb *Coronopus didymus* (L.) Sm. (Brassicaceae), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 135, 209–215.
- Singh PK, Maximova SN, Jensen PJ, Lehman BL, Ngugi HK, McNellis TW, 2010, FIBRILLIN4 is required for plastoglobule development and stress resistance in apple and *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 154(3), 1281–1293.
- Singh PK, Indoliya Y, Chauhan AS, Singh SP, Singh AP, Dwivedi S, Tripathi RD, Chakrabarty D, 2017, Nitric oxide mediated transcriptional modulation enhances plant adaptive responses to arsenic stress, *Scientific Reports*, 7, 3592.

- Singh S, Prasad SM, Sharma S, Dubey NK, Ramawat N, Prasad R, Chauhan DK, 2020, Silicon and nitric oxide-mediated mechanisms of cadmium toxicity alleviation in wheat seedlings, *Physiologia Plantarum*, <https://doi.org/10.1111/ppl.13065>
- Sinha P, Poland J, Schnölzer M, Rabilloud T, 2001, A new silver staining apparatus and procedure for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis of proteins after two-dimensional electrophoresis, *Proteomics*, 1, 835–840.
- Sinha AK, Jaggi M, Raghuram B, Tuteja N, 2011, Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress, *Plant Signaling and Behavior*, 6 (2), 196–203.
- Song WY, Mendoza-Cózatl DG, Lee Y, 2014, Phytochelatin–metal(loid) transport into vacuoles shows different substrate preferences in barley and *Arabidopsis*, *Plant, Cell and Environment*, 37 (5), 1192–1201.
- Song Y, Jin L, Wang X, 2017, Cadmium absorption and transportation pathways in plants, *International Journal of Phytoremediation*, 19(2), 133–141.
- Stoimenova M, Igamberdiev AU, Gupta KJ, Hill RD, 2007, Nitrite-driven anaerobic ATP synthesis in barley and rice root mitochondria, *Planta*, 226, 465–474.
- Štolfa I, Pfeiffer TŽ, Špoljarić D, Teklić T, Lončarić Z, Lončarić Z, 2015, Heavy metal-induced oxidative stress in plants: response of the antioxidative system, In: Gupta D, Palma J, Corpas F, Francisco J, (Eds.), *Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants under Stress*, Springer.
- 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.
- Suzuki Y, Kondo E, Makino A, 2017, Effects of co-overexpression of the genes of Rubisco and transketolase on photosynthesis in rice, *Photosynthesis Research*, 131(3), 281–289.
- Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Minguéz P, 2011, The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored, *Nucleic Acids Research*, 39, D561-8.

- Takahashi R, Ishimaru Y, Senoura T, Shimo H, Ishikawa S, Arao T, Nakanishi H, Nishizawa NK, 2011, The OsNRAMP1 iron transporter is involved in Cd accumulation in rice, *Journal of Experimental Botany*, 62(14), 4843–4850.
- Takahashi R, Ishimaru Y, Shimo H, Ogo Y, Senoura T, Nishizawa NK, Nakanishi H, 2012, The OsHMA2 transporter is involved in root-to-shoot translocation of Zn and Cd in rice, *Plant, Cell and Environment*, 35(11), 1948–1957.
- Tang H, Liu Y, Gong X, Zeng G, Zheng B, Wang D, Zeng X, 2015, Effects of selenium and silicon on enhancing antioxidative capacity in ramie (*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.) under cadmium stress, *Environmental Science and Pollution Research*, 22(13), 9999–10008.
- Terrón-Camero LC, Peláez-Vico MÁ, Del-Val C, Sandalio LM, Romero-Puertas MC, 2019, Role of nitric oxide in plant responses to heavy metal stress: exogenous application versus endogenous production, *Journal of Experimental Botany*, 70(17), 4477–4488.
- Thangavel P, Long S, Minocha R, 2007, Changes in phytochelatins and their biosynthetic intermediates in red spruce (*Picea rubens* Sarg.) cell suspension cultures under cadmium and zinc stress, *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, 88(2), 201–216.
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB, 1997, Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley/powdery mildew interaction, *The Plant Journal*, 11, 1187–1194.
- Umbreen S, Lubega J, Cui B, Pan Q, Jiang J, Loake GJ, 2018, Specificity in nitric oxide signaling, *Journal of Experimental Botany*, 69, 3439–3448.
- Uraguchi S, Mori S, Kuramata M, Kawasaki A, Arao T, Ishikawa S, 2009, Root-to-shoot Cd translocation via the xylem is the major process determining shoot and grain cadmium accumulation in rice, *Journal of Experimental Botany*, 60(9), 2677–2688.

- Urano K, Kurihara Y, Seki M, Shinozaki K, 2010, 'Omics' analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses, *Current Opinion in Plant Biology*, 13(2), 132–138.
- Vaishnav A, Sharma SK, Choudhary DK, Sharma KP, Ahmad E., Sharma MP, Ramesh A, Saxena AK, 2018, Nitric Oxide as a Signaling Molecule in Plant-Bacterial Interactions. In: Egamberdieva D, Ahmad P, (Eds.), *Plant Microbiome: Stress Response, Microorganisms for Sustainability*, vol 5. Springer, Singapore.
- Valentovičová K, Halušková L, Huttová J, Mistrik I, Tamás L, 2010, Effect of cadmium on diaphorase activity and nitric oxide production in barley root tips, *Journal of Plant Physiology*, 167, 10–14.
- Verbruggen N, Hermans C, Schat H, 2009, Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants, *Current Opinion in Plant Biology*, 2, 364–372.
- Verret F, Gravot A, Auroy P, Leonhardt N, David P, Nussaume L, Vavasseur A, Richaud P, 2004, Overexpression of *AtHMA4* enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance, *FEBS Letters*, 576(3), 306–312.
- Vögeli-Lange R, Wagner GJ, 1990, Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves: implication of a transport function for cadmium-binding peptides, *Plant Physiology*, 92, 1086–93.
- Wang Y, Wang X, Wang C, Wang R, Peng F, Xiao X, Zeng J, Fan X, Kang H, Sha L, Zhang H, 2016, Proteomic profiling of the interactions of Cd/Zn in the roots of dwarf polish wheat (*Triticum polonicum* L.), *Frontiers in Plant Science*, 7, 1378.
- Weber M, Trampczynska A, Clemens S, 2006, Comparative transcriptome analysis of toxic metal responses in *Arabidopsis thaliana* and the Cd<sup>2+</sup>-hypertolerant facultative metallophyte *Arabidopsis halleri*, *Plant, Cell and Environment*, 29(9), 950–963.
- Wellburn AR, 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.

- Wickner S, Gottesman S, Skowrya D, Hoskins J, McKenney K, Maurizi MR, 1994, A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 91, 12218–12222.
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL, 1999, Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human, Physiological Reviews, 79 (1), 143–180.
- Wong CKE, Cobbett CS, 2009, HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*, New Phytologist, 181(1), 71–78.
- Wu Z, Yin X, Bañuelos GS, Lin ZQ, Liu Y, Li M, Yuan L, 2016, Indications of selenium protection against cadmium and lead toxicity in oilseed rape (*Brassica napus* L.), Frontiers in Plant Science, 7, 1–10.
- Xie L, He X, Shang S, Zheng W, Liu W, Zhang G, Wu F, 2014, Comparative proteomic analysis of two tobacco (*Nicotiana tabacum*) genotypes differing in Cd tolerance, Biometals, 27(6), 1277–1289.
- Xiong J, An L, Lu H, Zhu C, 2009, Exogenous nitric oxide enhances cadmium tolerance of rice by increasing pectin and hemicellulose contents in root cell wall, Planta, 230, 755–765.
- Xiong J, Fu G, Tao L, Zhu C, 2010, Roles of nitric oxide in alleviating heavy metal toxicity in plants, Archives of Biochemistry and Biophysics, 497, 13–20.
- Xu L, Wang Y, Zhang F, Tang M, Chen Y, Wang J, Karanja BK, Luo X, Zhang W, Liu L, 2017, Dissecting root proteome changes reveals new insight into cadmium stress response in radish (*Raphanus sativus* L.), Plant and Cell Physiology, 58(11), 1901–1913.
- Xu Y, Sun X, Jin J, Zhou H, 2010, Protective effect of nitric oxide on light-induced oxidative damage in leaves of tall fescue, Journal of Plant Physiology, 167, 512–518
- Xue D, Jiang H, Deng X, Zhang X, Wang H, Xu X, Qian Q, 2014, Comparative proteomic analysis provides new insights into cadmium accumulation in rice grain under cadmium stress, Journal of Hazardous Materials, 280, 269–278.

- Yamamoto Y, Kobayashi Y, Matsumoto H, 2001, Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots, *Plant Physiology*, 125, 199–208.
- Yamori W, Shikanai T, 2016, Physiological functions of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis and plant growth, *Annual Review of Plant Biology*, 67, 81–106.
- Yang Z, Li H, Guo D, Tian W, Peng S, 2012, Molecular characterization of a novel 14-3-3 protein gene (Hb14-3-3c) from *Hevea brasiliensis*, *Molecular Biology Reports*, 39, 4491–4497.
- Yang L, Ji J, Harris-Shultz KR, Wang H, Wang H, Abd-Allah EF, 2016, The dynamic changes of the plasma membrane proteins and the protective roles of nitric oxide in rice subjected to heavy metal cadmium stress, *Frontiers in Plant Science*, 7, 190.
- Ytterberg AJ, Peltier JB, van Wijk KJ, 2006, Protein profiling of plastoglobules in chloroplasts and chromoplasts. A surprising site for differential accumulation of metabolic enzymes, *Plant Physiology*, 140(3), 984–997.
- Yu R, Jiang Q, Xu C, Li L, Bu S, Shi G, 2019, Comparative proteomics analysis of peanut roots reveals differential mechanisms of cadmium detoxification and translocation between two cultivars differing in cadmium accumulation, *BMC Plant Biology*, 19(1), 1–15.
- Zhong M, Li S, Huang F, Qiu J, Zhang J, Sheng Z, Tang S, Wei X, Hu P, 2017, The phosphoproteomic response of rice seedlings to cadmium stress, *International Journal of Molecular Science*, 18(10), 2055.