



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CIVA VE KADMİYUM STRESİ ALTINDAKİ
BUĞDAY YAPRAKLARINDA ASETİLKOLİN
UYGULAMALARININ BÜYÜME,
FOTOSENTETİK PARAMETRELER,
ANTİOKSİDAN SİSTEM VE TOLERANS
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Buket KOYUKAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Eylül-2024
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Buket KOYUKAN tarafından hazırlanan “Cıva ve Kadmiyum Stresi Altındaki Buğday Yapraklarında Asetilkolin Uygulamalarının Büyüme, Fotosentetik Parametreler, Antioksidan Sistem ve Tolerans Üzerine Etkileri” adlı tez çalışması 19/09/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Ceyda ÖZFİDAN-KONAKÇI

.....

Danışman

Prof. Dr. Evren YILDIZTUGAY

.....

Üye

Doç. Dr. Deniz ULUKUŞ

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Ömer Faruk YÜKSEL
FBE Müdürü

Bu tez çalışması S.Ü. BAP Koordinatörlüğü tarafından 23201069 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Buket KOYUKAN

Tarih: 19.09.2024

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CIVA VE KADMIYUM STRESİ ALTINDAKİ BUĞDAY YAPRAKLARINDA ASETİLKOLİN UYGULAMALARININ BÜYÜME, FOTOSENTETİK PARAMETRELER, ANTIÖKSİDAN SİSTEM VE TOLERANS ÜZERİNE ETKİLERİ

Buket KOYUKAN

**Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Prof.Dr. Evren YILDIZTUGAY

2024, 67 Sayfa

Jüri

**Prof.Dr. Evren YILDIZTUGAY
Prof.Dr. Ceyda ÖZFİDAN-KONAKÇI
Doç.Dr. Deniz ULUKUŞ**

Ağır metaller antropojenik faaliyetler nedeniyle doğada artmakta ve bitkilerin büyümesini, gelişmesini ve verimliliğini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu çalışmada bitkiler tarafından biriktirildiğinde tehlikeli etkilere neden olabilecek toksik metal kirleticilerden cıva (Hg) ve kadmiyum (Cd) araştırılmıştır. Bu metaller tipik olarak önemli enzimleri inhibe eder ve işlevlerini durdurur, böylece bitkilerin fotosentez, solunum ve kaliteli mahsul üretme yeteneklerini olumsuz yönde etkiler. Asetilkolin (ACh), hem ilkel hem de gelişmiş bitki türlerinde bulunan güçlü bir nörotransmitter olarak görev yapar. Çeşitli metabolik süreçlerde, özellikle de büyümenin düzenlenmesinde ve strese adaptasyonda önemli rol oynadığı iyi bilinmektedir. Bu amaçla *Triticum aestivum*'da Hg ve/veya Cd stresi (Hg, 50 µM; Cd, 100 µM) altında asetilkolin'in (ACh1, 10 µM; ACh2, 100 µM) etkileri araştırıldı. Buğday fideleri Hg veya Cd stresi altında yaklaşık %24'lük bir büyüme geriliği sergiledi. Kombine stres koşulları (Cd+Hg), RWC'de yaklaşık %16 oranında bir azalmaya neden oldu. Stres altındaki bitkilere uygulanan iki farklı dozda ACh uygulaması, büyüme parametrelerini olumlu etkilemiş ve su ilişkilerini düzenlemiştir. Stres gruplarında gaz değişimi sınırlıydı ve PSII'nin (F_v/F_m) fotokimyasal kuantum yeterliliği bastırılmıştır. Cd+ACh1 ve Cd+ACh2 uygulamaları stoma iletkenliğinde ve karbon asimilasyon hızında sırasıyla yaklaşık 2 kat ve 1.5 kat iyileşme ile sonuçlandı. Benzer şekilde Hg stresi altındaki buğday fidelerinde ACh uygulamalarıyla iyileşme gözlenmiştir. Cd ve/veya Hg stresi altında yüksek düzeyde H_2O_2 birikmiş ve lipid peroksidasyonu meydana gelmiştir. Sonuçlarımıza göre, Cd ve Hg streslerine uygulanan ACh uygulaması SOD, POX ve APX aktivitesini iyileştirerek oksidatif hasarı azaltmıştır. Sonuç olarak, ACh uygulamasının stres toleransını sağladığı ve ağır metallerin neden olduğu olumsuz etkileri hafiflettiği bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Asetilkolin, Antioksidan sistem, Ağır Metal, Cıva, Kadmiyum

ABSTRACT

MS THESIS

EFFECTS OF ACETYLCHOLINE TREATMENTS ON GROWTH, PHOTOSYNTHETIC PARAMETERS, ANTIOXIDANT SYSTEM AND TOLERANCE IN WHEAT LEAVES UNDER MERCURY AND CADMIUM STRESS

Buket KOYUKAN

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN BIOTECHNOLOGY**

Advisor: Prof.Dr. Evren YILDIZTUGAY

2024, 67 Pages

Jury

**Prof. Dr. Evren YILDIZTUGAY
Prof.Dr. Ceyda ÖZFİDAN-KONAKÇI
Assoc. Prof. Dr. Deniz ULUKUŞ**

Heavy metals increase in nature due to anthropogenic activities and negatively impact the growth, progress, and efficiency of plants. Among the toxic metal pollutants that can cause dangerous effects when accumulated by plants, mercury (Hg) and cadmium (Cd) were investigated in this study. These metals typically inhibit important enzymes and halt their functioning, thereby adversely affecting the capability of plants to achieve photosynthesis, respiration, and produce quality crops. Acetylcholine (ACh) serves as a potent neurotransmitter present in both primitive and advanced plant species. Its significant involvement in diverse metabolic processes, particularly in regulating growth and adaptation to stress, is well recognized. For this aim, effects of acetylcholine (ACh1, 10 μ M; ACh2, 100 μ M) were survey in *Triticum aestivum* under Hg and/or Cd stress (Hg, 50 μ M; Cd, 100 μ M). Wheat seedlings exhibited a growth retardation of about 24% under Hg or Cd stress. Combined stress conditions (Cd+Hg) resulted in a decrease in RWC by approximately 16%. Two different doses of ACh treatment to stressed plants positively affected growth parameters and regulated the water relations. Gas exchange was limited in stress groups, and the photochemical quantum competency of PSII (F_v/F_m) was suppressed. Cd+ACh1 and Cd+ACh2 treatments resulted in approximately 2-fold and 1.5-fold improvement in stomatal conductance and carbon assimilation rate, respectively. Similarly, improvement was observed with ACh treatments in wheat seedlings under Hg stress. Under Cd and/or Hg stress, high levels of H_2O_2 accumulated and lipid peroxidation occurred. According to our results, ACh treatment upon Cd and Hg stresses improved the activities of SOD, POX, and APX, thereby reducing oxidative damage. In conclusion, ACh treatment was found to ensure stress tolerance and limit the adverse effects caused by heavy metals.

Keywords: Acetylcholine, Antioxidant system, Cadmium, Heavy Metal, Mercury

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana deneyim, bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yol göstermiş ve her türlü desteğini esirgememiş olan değerli hocalarımdan, Sayın danışman hocam Prof.Dr. Evren YILDIZTUGAY'a, Dr.Öğr.Üyesi Büşra ARIKAN ABDULVELİ'ye ve Arş. Gör. Fatma Nur ALP TURGUT'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez çalışmalarımın her aşamasında bana yardımcı olan ve beni yalnız bırakmayan, Bitki Fizyolojisi Laboratuvar Ekibindeki arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Eğitim hayatım boyunca her anımda yanımda olan annem Fatma KOYUKAN'a, maddi manevi her konuda emeklerini esirgemeyen babam Nail KOYUKAN'a ve her sıkıntıda yanımda olan beni koşulsuz destekleyen kardeşim Berat KOYUKAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Son olarak bu yolda benimle yürüyen, her zaman destek olan sevgili arkadaşlarıma minnetimi sunarım.

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde maddi destek sağlayan S.Ü. Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü'ne (BAP- 23201069 nolu proje) katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Buket KOYUKAN
KONYA-2024

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER	ix
ÇİZELGELER	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Bitkilerde Ağır Metal Stresi.....	4
2.2. Kadmiyumun Bitkiler Üzerindeki Olumsuz Etkileri	5
2.3. Cıvanın Bitkiler Üzerindeki Olumsuz Etkileri	6
2.4. Bitkilerde Reaktif Oksijen Türleri (ROS).....	7
2.5. Antioksidan Savunma Sistemi	7
2.5.1. Enzimatik olmayan antioksidanlar.....	9
2.5.2. Enzimatik antioksidanlar	10
2.6. Asetilkolin (ACh)	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM	14
3.1. Bitki Materyali ve Deney Dizaynı	14
3.2. Fizyolojik Parametrelerin Belirlenmesi	15
3.2.1. Nisbi sürgün büyüme oranlarının belirlenmesi.....	15
3.2.2. Yaprakların bağıl su içeriklerinin belirlenmesi	15
3.3. Gaz Değişim Parametreleri	16
3.4. Klorofil Flüoresans Ölçümleri	16
3.5. Buğday Yapraklarında Gerçekleştirilen Biyokimyasal Analizler	16
3.5.1. Total protein miktarının belirlenmesi	17
3.5.2. H ₂ O ₂ ve TBARS içeriklerinin analizi	17
3.5.3. Yaprak enzim ekstraktlarının hazırlanması	18
3.5.4. Antioksidan enzimlerin aktivite değişimlerinin belirlenmesi.....	19
3.5.4.1. Süperoksit dismutaz aktivite/izozimlerinin elektroforetik ayrımı	19
3.5.4.2. Katalaz enzim aktivitesinin belirlenmesi	19
3.5.4.3. Peroksidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	19
3.5.4.4. Askorbat peroksidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi	20
3.5.4.5. Glutasyon redüktaz enzim aktivitesinin belirlenmesi	20
3.5.4.6. Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	21
3.5.4.7. Glutasyon S-transferaz enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	21
3.5.4.8. NADPH Oksidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi	21

3.5.4.9. Monodehidroaskorbat redüktaz enzim aktivitesinin belirlenmesi	21
3.5.4.10. Dehidroaskorbat redüktaz enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	21
3.5.5. Enzimatik olmayan antioksidanların içeriklerinde meydana gelen değişimlerinin belirlenmesi.....	22
3.6. İstatistiksel Analizler	22
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	23
4.1. Cıva ve /veya Kadmiyum Stresi Altındaki Buğday Bitkilerine Asetilkolin Uygulamalarının Büyüme Parametreleri ve Prolin İçeriği Üzerine Etkisi	23
4.2. Cd ve /veya Hg Stresi Altındaki Buğday Bitkilerine Asetilkolin Uygulamalarının Gaz Değişim Parametrelerine Etkileri	25
4.3. Cd ve/veya Hg Stresi Altındaki Buğday Bitkilerine Asetilkolin Uygulamalarının Klorofil Flüoresans Parametrelerinde Meydana Getirdiği Değişimler.....	27
4.4. Cd ve/veya Hg Stresi Altındaki Buğday Bitkilerine Asetilkolin Uygulamalarının Oksidatif Stres Belirteçleri Üzerindeki Etkileri.....	30
4.5. Cd ve/veya Hg Stresi Altındaki Buğday Bitkilerine Asetilkolin Uygulamalarının Antioksidan Enzim Profillerine Etkileri	31
4.6. Cd ve/veya Hg Stresi Altındaki Buğday Bitkilerine Asetilkolin Uygulamalarının AsA-GSH Döngüsü Üzerindeki Etkileri.....	37
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	43
5.1. Sonuçlar	43
5.2. Öneriler	44
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	56

ŞEKİLLER

Şekil 3.1. 14 gün boyunca hidroponik ortamda yetiştirilen buğday (<i>Triticum aestivum</i> L. cv. <i>taner</i>) fidelerinin genel görünümü	14
Şekil 3.2. Cıva ve/veya kadmiyum stresi altındaki buğdayda farklı dozlarda asetilkolin uygulamaları ardından fidelerin genel görünümleri	15
Şekil 3.3. Enzim ekstraktlarının hazırlanması	18
Şekil 4.1. Kadmiyum ve/veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin (ACh) uygulamalarının nisbi büyüme oranı (RGR, A), bağıl su içeriği (RWC, B) ve prolin içeriği (Pro, C) üzerine etkileri	25
Şekil 4.2. Kadmiyum ve/veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin uygulamalarının karbon asimilasyon oranı (A, A), stoma iletkenliği (g_s , B) Hücreler arası CO ₂ konsantrasyonu (C _i , C), transpirasyon oranı (E, D), stoma sınırlama değeri (L _s , E) ve karboksilasyon verimliliği (A/C _i , F) üzerine etkileri	27
Şekil 4.3. Kadmiyum ve/veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin (ACh) uygulamalarının klorofil flüoresans parametreleri üzerine etkileri: F _v /F _m (A), F _v /F _o (B) ve F _o /F _m (C)	28
Şekil 4.4. Kadmiyum ve /veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin (ACh) uygulamalarının JIP test parametreleri üzerine etkileri	29
Şekil 4.5. Kadmiyum ve/veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin (ACh) uygulamalarının stomalarda ROS birikimi (A), H ₂ O ₂ içeriği (B) ve TBARS içeriği (C) üzerine etkileri	31
Şekil 4.6. Kadmiyum ve/veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin (ACh) uygulamalarının süperoksit dismutaz (SOD) izoenzimlerinin bant yoğunluğu (A) ve toplam SOD aktivitesi (B) üzerine etkileri	32
Şekil 4.7. Kadmiyum ve/veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin (ACh) uygulamalarının katalaz (CAT) izoenzimlerinin bant yoğunluğu (A) ve toplam CAT aktivitesi (B) üzerine etkileri	33
Şekil 4.8. Kadmiyum ve/veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin (ACh) uygulamalarının peroksidaz (POX) izoenzimlerinin bant yoğunluğu (A) ve toplam POX aktivitesi (B) üzerine etkileri	34
Şekil 4.9. Kadmiyum ve/veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin (ACh) uygulamalarının glutatyon peroksidaz (GPX) izoenzimlerinin bant yoğunluğu (A) ve toplam GPX aktivitesi (B) üzerine etkileri	35
Şekil 4.10. Kadmiyum ve/veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin (ACh) uygulamalarının glutatyon S-transferaz (GST) izoenzimlerinin bant yoğunluğu (A) ve toplam GST aktivitesi (B) üzerine etkileri	36
Şekil 4.11. Kadmiyum ve/veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin (ACh) uygulamalarının NADPH oksidaz (NOX) izoenzimlerinin bant yoğunluğu (A) ve toplam NOX aktivitesi (B) üzerine etkileri.....	37
Şekil 4.12. Kadmiyum ve/veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin (ACh) uygulamalarının askorbat peroksidaz (APX) izoenzimlerinin bant yoğunluğu (A) ve toplam APX aktivitesi (B) üzerine etkileri	38
Şekil 4.13. Kadmiyum ve/veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin (ACh) uygulamalarının glutatyon redüktaz (GR) izoenzimlerinin bant yoğunluğu (A) ve toplam GR aktivitesi (B) üzerine etkileri.....	39
Şekil 4.14. Kadmiyum ve/veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin (ACh) uygulamalarının monodehidroaskorbat redüktaz aktivitesi (MDHAR, A), dehidroaskorbat redüktaz aktivitesi (DHAR, B), toplam askorbat içeriği (tAsA, C), dehidroaskorbat içeriği (DHA, D), glutatyon içeriği (GSH, E), oksitlenmiş glutatyon içeriği (GSSG, F), AsA/DHA oranı (G) ve GSH redoks durumu (H) üzerine etkiler....	41

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Reaktif oksijen türlerini (ROS) temizleyen enzimatik olmayan antioksidanların reaksiyon mekanizmaları.	8
Çizelge 2.2. Reaktif oksijen türlerini (ROS) temizleyen enzimatik antioksidanların reaksiyon mekanizmaları.	9
Çizelge 3.1. Tez çalışmasında tasarlanan uygulama grupları.....	14



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	:	Yüzde
H ₂ O ₂	:	Hidrojen Peroksit
O ₂	:	Oksijen
O ₂ ⁻	:	Süperoksit
OH [•]	:	Hidroksil Radikali

Kısaltmalar

ACh	:	Asetilkolin
APX	:	Askorbat peroksidaz
CAT	:	Katalaz
Cd	:	Kadmiyum
DHAR	:	Dehidroaskorbat redüktaz
EDTA	:	Etilendiamin tetra asetik asit
g	:	Gram
GST	:	Glutasyon-S- transferaz
GR	:	Glutasyon redüktaz
Hg	:	Cıva
KA	:	Kuru ağırlık
KCN	:	Potasyum siyanür
MDA	:	Malondialdehit
MDHAR	:	Monodehidroaskorbat redüktaz
mg	:	Miligram
mL	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
NBT	:	Nitro blue tetrazolium
NOX	:	NADPH oksidaz
POX	:	Peroksidaz
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
RWC	:	Nisbi su içeriği
SOD	:	Süperoksit dismutaz
TA	:	Turgorlu ağırlık
TBA	:	Tiobarbütirik asit
TCA	:	Trikloroasetik asit
YA	:	Yaş ağırlık

1. GİRİŞ

Bitkiler çok sayıda dış stresle sıklıkla karşılaşmaktadır. Tüm abiyotik stres etkenleri arasında yer alan ağır metal stresi, bitki fizyolojisini, toprak sağlığını ve ekosistem sürdürülebilirliğini birçok açıdan olumsuz yönde etkileyen önemli bir ekolojik tehlike olarak öne çıkmaktadır (Mousavi, 2022; Pandey ve ark., 2022). Ağır metallerin toprakta kalıcılığı, kolayca parçalanamadıkları için ekosistemler ve benzer organizmalar için ciddi bir risk oluştururlar (Sharma ve ark., 2022). Ağır metaller atomik yoğunlukları suyunkinden beş kat daha fazla olan metal gruplarından oluşmaktadır. Ağır metal kirliliğinin küresel yaygınlığı, insan faaliyetleri ile çevresel faktörlerin birleşiminden kaynaklanmaktadır ve bu da yüksek düzeyde hasarlanmalara yol açmaktadır (Feng ve ark., 2021). Ağır metal toksisitesinin bitki yapısı üzerinde ciddi etkileri vardır. Aynı zamanda biyokütle birikimini, çimlenme yeteneğini ve fotosentetik pigment biyosentezini de azaltmaktadır (Singh ve ark., 2022). Üstelik bu faktör, fotosentez ve solunum gibi hücresel süreçleri, makro ve mikro besin alımını ve genel bitki fonksiyonlarını engeller ve sonuçta bitki büyümesini geciktirir (Dhalaria ve ark., 2020). Kadmiyum (Cd) ve Cıva (Hg), bitkiler de dahil olmak üzere tüm organizmalarda ciddi toksisiteye neden olabilen, esansiyel olmayan ağır metallerdir. Üstelik çeşitli bitki türlerinin büyümesini ve üremesini tek başına veya kombinasyon halinde olumsuz yönde etkileyebilirler (Ronzan ve ark., 2018). Cd toksik, gümüş-beyaz metalik bir elementtir (Zhao ve ark., 2021). Özellikle düşük konsantrasyonlarda bile oldukça hareketli ve toksiktir (El Rasafi ve ark., 2022). Cd'nin tehlikeleri iki aşamada ifade edilebilir: (1) bitkinin yaşam döngüsüne müdahale ederek verimin azalmasına yol açmak ve (2) bitkiler tarafından emilmesi, birikmesi, besin zincirine girmesine ve hayvanları olumsuz etkilemesine neden olmaktır (Wang ve ark., 2022). Fizyolojik olarak Cd stresi, enzim inaktivasyonu, önemli miktarda ROS birikimi ve metabolik dengesizlik ile karakterize edilebilir (Meng ve ark., 2022). Cd²⁺ iyonları ekin bitkileri tarafından kolaylıkla emilebilir, bu da bitkilerde Cd birikmesine yol açar. Bu durum stoma kapanmasına, lipid ve protein oksidasyonuna, fotosentetik potansiyelde azalmaya ve ardından bitki gelişiminin bozulmasına neden olabilir. Hg, çevrede kalıcılığı ve yüksek hareketliliği nedeniyle en toksik ağır metallerden biri olarak kabul edilir. Bitki büyümesi ve fonksiyonları üzerinde zararlı etkilere neden olabilir. Tarım alanlarındaki yüksek Hg düzeyleri bitki verimliliğini düşürebilmektedir. Düşük konsantrasyonlarda bile Hg bitki büyümesi ve metabolizması üzerinde önemli zararlı etkiler göstererek çimlenme, besin emilimi, fotosentez ve çoğalma gibi temel fizyolojik süreçleri bozmaktadır (Ibrahim ve ark., 2022). Yüksek lipid

çözünürlüğü, biyolojik membranlarda birikimi kolaylaştırarak besin zincirinde biyomagnifikasyonu teşvik eder (Robas Mora ve ark., 2022). Ayrıca Hg, elektron taşıma zincirine müdahale ederek ve oksidatif strese neden olarak hücrel fonksiyonları bozar (Ghori ve ark., 2019). Cd ve Hg stresinin bitkiler üzerindeki kombine etkilerinin açıklığa kavuşturulması, ağır metal kirliliğinin bitki gelişimi üzerindeki çok yönlü etkilerinin incelenmesi ile ilgili çok az çalışma mevcuttur. Bu bilgi açığı, bu iki kirleticinin, özellikle ekonomik açıdan önemli bitkilerde bitki fizyolojisi ve biyokimyası üzerindeki etkileşimli etkilerini ortaya çıkarmayı amaçlayan kapsamlı araştırmalara duyulan ihtiyacın altını çizmektedir. Ağır metal iyonları, oto oksidasyon ve Haber-Weiss döngüsü yoluyla reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini teşvik eder (Li ve ark., 2022). Aşırı ROS üretimi redoks homeostazisini bozar ve hücrel bileşenlere zarar verir. Ayrıca redoks aktif ağır metaller, ROS ile doğrudan etkileşime girerek ROS aracılı hasarı şiddetlendirir ve bunları daha reaktif ve zararlı formlara dönüştürür (Nowicka, 2022). Eş zamanlı olarak hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) ve hidroksil radikali (OH^{\cdot}) organellerle daha fazla reaksiyona girerek hücrel ve DNA hasarına neden olur, adenosin trifosfat (ATP) üretimini inhibe eder ve lipid peroksidasyonuna neden olur (Sachdev ve ark., 2023). Bitkiler tarafından oksidatif strese karşı kapsamlı bir savunma sisteminin enzimatik ve enzimatik olmayan bileşenleri geliştirilmiştir. Enzimatik antioksidanlar arasında APX (askorbat peroksidaz), CAT (katalaz), SOD (süperoksit dismutaz) ve GPX (glutasyon peroksidaz) mevcuttur; enzimatik olmayan sistemler arasında ise glutasyon (GSH), askorbat (AsA), fenolik bileşikler, tokoferoller ve karotenoidler bulunmaktadır (Mansoor ve ark., 2022).

Nörotransmitterler ilk olarak mantarlarda keşfedilmiştir ve daha sonra memelilerde sinyal molekülleri ve düzenleyiciler olarak görev yaptıkları anlaşılmıştır. Kolin ve asetik asidin bir esteri olan asetilkolin (ACh), en iyi bilinen nörotransmitterlerden birisidir (Ewins, 1914). Hayvanlarda ağırlıklı olarak kolin ve asetil-koenzim A'dan (asetil-CoA) sentezlenmektedir; sinaptik kavşaklarda, sinirlerde ve omurgalı kaslarının motor uç plakalarında meydana gelmektedir (Roychoudhury, 2020). Asetilkolinin sentezi, asetilkolin transferaz enzimi tarafından kolaylaştırılan kolinin taşınmasıyla sınırlıdır (Robas Mora ve ark., 2022). ACh, nöronal sinyallemedeki rollerinin ötesinde, bakteriler, algler ve bitkiler de dahil olmak üzere sinir sistemi olmayan türlerin nöronal olmayan hücrelerinde de bulunur (Su ve ark., 2020b). Bitkilerde ACh, melatonin, dopamin, glutamat, serotonin ve gama-aminobütirik asit gibi diğer nörotransmitterlerle birlikte çevresel faktörlere verilen yanıtların modüle edilmesinde çeşitli işlevlere sahiptir (Su ve ark., 2020a).

ACh özellikle fotosentez, kök gelişimi, tohum çimlenmesi, büyüme düzenlemesi, osmoregülasyon, sert hava koşulları, ağır metal toksisitesi ve kuraklık gibi çevresel streslere karşı savunma mekanizmalarına katılır (Chen ve ark., 2022). Aynı zamanda kökler ve sürgünler arasındaki sinyalleşme süreçlerinde rol oynamaktadır (Braga ve ark., 2017). Ek olarak ACh, indoleasetik asit (IAA), etilen (ET) ve giberellik asit (GA) dahil olmak üzere bitki hormonlarıyla iş birliği yaparak antioksidanları, ozmoprotektanları ve strese yanıt veren genlerin ekspresyonunu etkileyerek bitki büyümesini ve gelişimini etkilemektedir (Di Sansebastiano ve ark., 2014). Yapılan çalışmalar, stres faktörlerinin bitki fizyolojisi üzerindeki olumsuz etkilerini hafifletmede eksojen ACh uygulamasının potansiyelini vurgulamıştır. Örneğin, ACh'nin yapraklara püskürtülmesinin veya eksojen uygulamasının *Nicotiana benthamiana*'da tuzluluğun neden olduğu hasarlanmayı hafiflettiği, fotosentetik verimliliği, antioksidan enzim aktivitesini ve ozmotik düzenlemeyi arttırdığı tespit edilmiştir (Qin ve ark., 2021). Farklı bir çalışmada; Yang ve ark. (2023) su mercimeğinin (*Lemna turionifera* 5511)' de Cd stresinin endojen ACh seviyeleri üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Cd stresi altında, ACh takviyesinin kök absisyon oranlarını düşürdüğü, yaprak etiyolasyonunu hafiflettiği ve klorofil floresans özelliklerini arttırdığı belirlenmiştir.

Buğday (*Triticum aestivum* L.) dünya çapında en yaygın şekilde yetiştirilen tahıl ürünlerinden biridir (Wei ve ark., 2022). Buğdayın ağır metallere diğer mahsullere göre daha duyarlı olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir (Ilyas ve ark., 2022). Buğday özellikle lifli kök sistemleri yoluyla, önemli düzeyde ağır metalleri alma ve biriktirme konusunda dikkate değer bir kapasiteye sahiptir. Sonuç olarak, bu metaller bitkilerin sürgünlerine, özellikle de tahıllara taşınır ve bu durum insan sağlığı için potansiyel riskler oluşturur (Qin ve ark., 2020). ACh'nin çevresel streslere karşı bitki tepkilerine aracılık etmedeki önemli rolünün giderek daha fazla tanınmasına rağmen, buğday bitkilerinde ağır metal stresinin hafifletilmesindeki potansiyel etkinliğine ilişkin araştırmalar sınırlı kalmaktadır. Bu nedenle, bu çalışma, Cd ve/veya Hg stres koşulları altında buğday yapraklarında eksojen ACh uygulamasının büyüme, gaz değişim parametreleri, fotokimyasal reaksiyonlar ve antioksidan sistem üzerindeki etkilerini açıklamayı amaçlamaktadır. Bu araştırma ile ağır metal stresine karşı ACh'nin aracılık ettiği toleransa ilişkin mekanik anlayışları açığa çıkararak, buğday bitkilerinin çevresel zorluklara karşı direncini arttırmaya yönelik sürdürülebilir stratejilerin geliştirilmesine katkıda bulunmayı amaçlamaktadır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Bitkilerde Ağır Metal Stresi

Bitkiler doğal olarak biyotik ve abiyotik stres gibi birçok olumsuz çevresel faktöre maruz kalmaktadırlar (Hawkes, 1997). Abiyotik stres faktörlerinden biri olan ağır metal stresi; bitkilerde biyokimyasal tepkilerden ürün verimine kadar değişen tepkileri tetikleyen faktördür. “Ağır Metal” terimi, nispeten yüksek yoğunluğa sahip ve düşük konsantrasyonlarda bile toksik olan herhangi bir metalik elementi ifade etmektedir (Gill, 2014).

Ağır metal stresi, dünya çapında çeşitli karasal ekosistemlerde büyük bir endişe kaynağı haline gelmiştir. Günümüzde kapsamlı sanayileşme, ağır metalleri biriktirerek toprak üzerinde olduğu kadar ürün verimliliği üzerinde de zararlı etkiler yaratmaktadır (Shahid ve ark., 2015). Toprak dokusunun zarar görmesi, yani toprağın pH'sının bozulması, farklı elementlerin varlığı ve ağır metallerin birikmesi, bitkilerin çeşitli fizyolojik ve moleküler aktivitelerini olumsuz yönde etkileyerek bitki büyümesinin doğrudan ve/veya dolaylı olarak azalmasına neden olmaktadır (Panuccio ve ark., 2009). Zn, Cu, Mo, Mn, Co ve Ni gibi ağır metaller, önemli biyolojik süreçler ve gelişimsel yollar için gereklidir (Salla ve ark., 2011; Shahid ve ark., 2015). Bununla birlikte, bu metaller, arsenik (As), kurşun (Pb), kadmium (Cd), cıva (Hg), krom (Cr), alüminyum (Al) ve Berilyum (Be) dahil olmak üzere diğer dört yüksek toksik ağır metal ile birlikte, konsantrasyonları optimal olmayan değerlerin üzerine çıktığında ürün verimliliği büyük ölçüde etkilemektedir (Xiong ve ark., 2014). Bu toksik elementler, bitkilerde verim azalmasına yol açan morfolojik anormalliklere ve metabolik bozukluklara neden olmaktadır (Amari ve ark., 2017). Bu anormallikler aynı zamanda reaktif oksijen türlerinin (ROS), yani süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikal (OH^{\cdot}) üretimine yol açarak hücrelerin redoks homeostazının bozulmasına neden olurlar (Gill ve Tuteja, 2010; Pourrut ve ark., 2011). Bu redoks durumu dengesizliğinin, bitkilerde ağır metal toksisitesinin önemli bir nedeni olduğu düşünülmektedir.

ROS birikimi, bitkilerde antioksidan savunma mekanizmalarını harekete geçirir. ROS, atmosferik oksijenin kısmen indirgenmiş formlarıdır ve normal koşullar altında bitki hücrelerindeki üretimleri temizleme sistemi tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. ROS; DNA, proteinler ve lipitler gibi biyomolekülleri oksitleyerek, bitki büyümesi ve gelişiminin azalmasıyla sonuçlanan oksidatif hasara neden olabilir (Hernández-Jiménez ve

ark., 2002). Bitkiler, ROS seviyesini ve etkilerini kontrol etmek için onları oksidatif hasara karşı koruyan bir dizi antioksidan moleküle ve enzime sahiptir. Antioksidanların aktif formunu yenilerler ve ROS'un neden olduğu hasarı ortadan kaldırır veya azaltırlar (Alscher ve ark., 1997). Oksidatif strese karşı koruma, süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POX) ve katalaz (CAT) gibi enzimatik antioksidanların üretilmesiyle sağlanırken, glutatyon, karotenoidler ve askorbat gibi enzimatik olmayan antioksidanlara da sahiptirler (Hall, 2002; Caregnato ve ark., 2008).

2.2. Kadmiyumun Bitkiler Üzerindeki Olumsuz Etkileri

Kadmiyum (Cd), canlı organizmalar ve insanlar için oldukça toksik bir metal olarak kabul edilir ve karada ve suda yaşayan organizmalar için biyolojik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Chellaiyah, 2018). Günümüzde tarım ve endüstrideki gelişmelerin birçoğu tarımsal topraklarda yüksek Cd konsantrasyonuna yol açmaktadır (Bojórquez ve ark., 2016). Cd çok sayıda antropojenik aktivite ve emisyon yoluyla ekosistemlere dahil olmaktadır. Kirlenmiş topraktaki yüksek hareketliliği nedeniyle Cd'nin bitkilerde birikmesi, hayvan ve insan sağlığı için ciddi sorunlar teşkil etmektedir (Mahajan ve Kaushal, 2018). Cd bitkiler tarafından kolayca alınır ve bitkilerin yenilebilir yaprakları, meyveler ve tohumlar gibi kısımlarında birikmektedir (Kosolsaksakul ve ark., 2014). Bitkilerde kloroz ve düzensiz büyüme, Cd toksisitesinin neden olduğu kolayca tanımlanabilir semptomlar arasında yer almaktadır (Das ve ark., 1997). Daha yüksek toksisite bitki büyümesini engeller ve bitki nekrozuna yol açar (Hermans ve ark., 2011). Cd toksisitesi, karbon fiksasyonunu engelleyerek ve klorofil içeriğini ve fotosentetik aktiviteyi azaltarak bitkileri etkilemektedir (Gallego ve ark., 2012). Topraktaki Cd'ye maruz kalma, yaprakların nisbi su içeriğini, stoma iletkenliğini ve terlemeyi en aza indirerek bitkilerde ozmotik strese neden olur ve böylece fizyolojik hasara yol açar (Rizwan ve ark., 2016).

Kadmiyum toksisitesi, ROS'un aşırı üretimine neden olur ve bitki zarlarında hasara ve hücre biyomolekülleri ile organellerinin tahribatına yol açar (Abbas ve ark., 2018). Kadmiyum ayrıca bitkinin Fe ve Zn alımını azaltarak yaprak klorozuna neden olmaktadır (Xu ve ark., 2017). Hsu ve Kao (2007) tarafından yapılan çalışmada, çeltik (*Oryza sativa* L.) bitkisini 12 gün boyunca hidroponik kaplarda Cd stresine maruz bırakarak yaprakların metabolik değişimleri incelenmiştir. Cd stresinin yaprak klorozu meydana getirdiği ve fotosentezde azalma rapor edilmiştir. Jali ve ark. (2014) 400 μ M CdCl₂ stresi altında yetiştirilen çeltik bitkisinde prolin içeriğinin arttığı; çimlenme oranında, nişasta içeriğini ve

fotosentetik aktiviteyi önemli ölçüde azalttığını tespit etmişlerdir. Lin ve ark. (2007) tarafından yapılan başka bir çalışmada buğday (*Triticum aestivum* L.) fidelerine Cd uygulaması sonucunda malondialdehit (MDA) içeriği, yüksek bir Cd konsantrasyonu ile önemli ölçüde artmıştır. SOD, CAT, GPX, APX ve GR dahil olmak üzere yapraklardaki bazı antioksidan enzimlerin aktivite seviyelerinde, yüksek Cd konsantrasyonlarında artış meydana geldiği rapor edilmiştir.

2.3. Cıvanın Bitkiler Üzerindeki Olumsuz Etkileri

Bir diğer ağır metal türü olan Cıva (Hg), ekosistemde birikime yol açan endüstriyel kirlenme nedeniyle toksik bir ağır metal ve yaygın bir kirleticidir (Gontia-Mishra ve ark., 2016). Ayrıca, cıva madenciliği, altın eritme, yakıt yakma ve alet imalatı da çevrede cıva birikimini artıran faktörler arasındadır (Moreno ve ark., 2008). Çevrede uzun süre kalan biyobirikimli bir toksin olarak sınıflandırılan cıva önemli bir çevresel kirleticidir (Dash ve Das, 2012). Hg; insanlar, hayvanlar ve bitkiler için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır (Bridges ve Zalups, 2004; Patra ve ark., 2004). Sanayileşmeye paralel olarak tarım topraklarının ağır metal kirlenme oranı artış göstermektedir. Toprağa salınan cıvanın esas olarak sülfürler, kil parçacıkları ve organik maddeler aracılığıyla adsorpsiyon yoluyla katı fazda kaldığı bilinmektedir. Oksidasyon reaksiyonlarına giren ve toprağa biriken atmosferik Hg, topraklarda ve sularda Hg birikimini artırır (Lindberg ve ark., 2007). Topraktaki Hg, elementel (Hg^0), iyonik (Hg^{+2}), metil (MeHg), hidroksit ($Hg(OH)_2$) ve sülfür (HgS) formları dahil olmak üzere birçok formda bulunur. Ancak Hg^{+2} bitkiler tarafından kullanılan baskın formudur (Chen ve Yang, 2012). Bitkiler Hg'yi kirlenmiş topraktan kökleri aracılığıyla alır ve köklerde birikme meydana gelir (Abdelgawad ve ark., 2015).

Bitkilerde Hg birikimi, çimlenmenin engellenmesine, büyüme hızının yavaşlamasına, membran geçirgenliğinin ve mitokondriyal aktivitenin azalmasına, fotosentezin bozulmasına ve ROS'u aktive ederek oksidatif strese neden olur (Aysin ve ark., 2020). Aynı zamanda lipid peroksidasyonuna, inaktif enzimatik aktiviteye, DNA ve membran hasarına, bitkilerde büyümenin engellenmesine neden olur (Ding ve ark., 2019). Genel olarak hücre hasarı doğrudan Hg stresinden kaynaklı meydana gelebilmektedir çünkü Hg iyonları biyomolekülleri sülfidril gruplarına bağlayabilir ve çinko, bakır gibi temel elementlerle rekabet edebilir (Cargnelutti ve ark., 2006). Diğer yandan meydana gelen hasar Hg stresi altında indüklenen ROS'un aşırı üretimi ile ortaya çıkabilir (Guedes ve ark., 2021). Aynı zamanda bitkiler Hg stresinin neden olduğu toksisiteyi hafifletmek için glutatyon

(GSH), süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POX), katalaz (CAT) ve aşırı ROS'u temizleyebilen glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimler; Askorbik asit, flavonoidler ve Hg iyonlarını şelatlayabilen karotenoidler gibi enzimatik olmayan antioksidanlar da dahil olmak üzere farklı antioksidan savunma sistemlere sahiptirler (Chen ve ark., 2012; Xiong ve ark., 2021).

2.4. Bitkilerde Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Bitki gelişimi, büyümesi ve hayatta kalması, genotipi ve çevresel faktörler tarafından sürekli olarak şekillenir (Mhamdi ve Van Breusegem, 2018). Bitkiler hareketsiz olduklarından, metabolizmalarını avantaja çeviren ve bu sayede oldukça değişken ortamlarda büyümelerini sağlayan, birincil metabolik ürünleri hayati süreçlere entegre etmek gibi mekanizmalar geliştirmişlerdir. Reaktif oksijen türleri (ROS), bitki büyümesini ve gelişimini düzenleyen metabolik ürünlerden biridir (Mittler, 2017). ROS seviyeleri, üretim ve yıkım arasındaki kontrollü dengeyle belirlenir ve bu denge, karmaşık ve sofistike antioksidan sistemler aracılığıyla sağlanır (Mittler ve ark., 2011). Bu sistemler ve ROS ile ilişkili yolların sıkı kontrolü, bitkilerin değişken koşullar altında esnekliğini belirler ve dolayısıyla bitki büyümesini ve hayatta kalmasını kontrol eder (Waszczak ve ark., 2018).

ROS, oksijen molekülünden (O_2) daha reaktif olan herhangi bir oksijen türevini ifade eder (Foyer ve Noctor, 2009). Her ROS türü kendine özgü ve ayırt edici kimyasal özelliklere sahiptir. Bunlar, singlet oksijen (1O_2) lipidleri, proteinleri ve DNA'nın guanidin kalıntılarını oksitler; süperoksit (O_2^-), singlet oksijen gibi, 1-4 μs 'lik bir yarı ömre sahiptir ve Fe-S proteinleriyle reaksiyona girer ve hidroksil ($^{\bullet}OH$) radikalleri son derece reaktiftir ve 1 ns'lik bir yarı ömre sahiptir (Waszczak ve ark., 2018). Bunun aksine, hidrojen peroksit (H_2O_2) oldukça kararludur (1 ms'den fazla) ve bu nedenle hücrel sinyal iletiminde en baskın ROS olarak kabul edilir. H_2O_2 , hücrel ROS seviyelerini düzenlemede rol oynayan çeşitli hücrel bileşenlerle etkileşime girebilmektedir (Mhamdi ve Van Breusegem, 2018).

2.5. Antioksidan Savunma Sistemi

Genel olarak, bitki hücreleri, ROS'u normal hücrel metabolik aktivitelerin bir sonucu olarak üretilen sınırlar içinde tutmak için yeterli donanıma sahiptir (Gill ve Tuteja, 2010). Bununla birlikte, farklı stres koşulları altında, ROS üretimi genellikle genel hücrel

antioksidatif potansiyeli aşar ve bu da bitki büyümesi ve fizyolojisi üzerinde strese bağlı olumsuz etkilere neden olur. Bitki hücrelerini oksidatif hasardan korumak için dengeli bir kararlı durum gereklidir (Mittler ve ark., 2004).

Antioksidanlar doğrudan veya dolaylı olarak ROS'u temizler ve/veya ROS üretimini kontrol ederler (Carocho ve Ferreira, 2013). Antioksidan savunma sistemi düşük moleküler ağırlıklı enzimatik olmayan antioksidanlardan ve bazı antioksidan enzimlerden oluşmaktadır (Hasanuzzaman ve ark., 2019). AsA, GSH, α -tokoferol, fenolik bileşikler (PhOH), flavonoidler, alkaloidler ve protein olmayan amino asitler gibi enzimatik olmayan antioksidanlar, ROS'un aşırı üretimini engellemek için SOD, CAT, POX, APX, MDHAR, DHAR, GR, GPX ve GST gibi antioksidan enzimlerle koordineli bir şekilde çalışırlar (Nath ve ark., 2018; Laxa ve ark., 2019). Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların katalitik reaksiyonu ve hücresel reaksiyon bölgeleri Çizelge 2.1-2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Reaktif oksijen türlerini (ROS) temizleyen enzimatik olmayan antioksidanların reaksiyon mekanizmaları.

Antioksidan	Katalize Edilen Tepkimeler	Katalitik Reaksiyon Alanları
	Enzimatik olmayan	
Askorbik asit	Süpürücü $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$ ve 1O_2	Kloroplast, peroksizomlar, sitozol, mitokondri, apoplast
Glutasyon	Süpürücü H_2O_2 , $\cdot OH$, ve 1O_2	Kloroplast, peroksizomlar, sitozol, mitokondri, apoplast
Tokoferol	Süpürücü OH^{\cdot} , 1O_2 , ROO^{\cdot} ve $ROOH$	Kloroplastın tilakoid zarı
Karotenoidler	Çoğunlukla süpürücü 1O_2	Kloroplast
Flavonoidler	Süpürücü $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , ve 1O_2	Kloroplast, vakuol
Fenolik asitler	Süpürücü $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, ROO^{\cdot} , ve $ONOO^-$	Hücre duvarı
Alkaloidler	Süpürücü $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, H_2O_2 , ve 1O_2	Vakuol
Protein olmayan amino asitler	Süpürücü $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , ve 1O_2	Sitozol, mitokondri, hücre duvarı

Çizelge 2.2. Reaktif oksijen türlerini (ROS) temizleyen enzimatik antioksidanların reaksiyon mekanizmaları.

Enzimatik		
SOD	$2O_2^{\cdot-} + 2H \rightarrow O_2 + H_2O_2$	Kloroplast, peroksizomlar, sitozol, mitokondri, apoplast
CAT	$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$	Peroksizomlar
POX	$2PhOH + H_2O_2 \rightarrow 2PhO^{\cdot} + 2H_2O$ $2PhO^{\cdot} \rightarrow$ çapraz bağlı maddeler $PhO^{\cdot} + Asc \rightarrow PhOH + MDHA$ $PhO^{\cdot} + MDHA \rightarrow PhOH + DHA$	Hücre duvarı, apoplast, vakuol
APX	$H_2O_2 + AsA \rightarrow 2H_2O + MDHA$	Kloroplast, peroksizomlar, sitozol, mitokondri, apoplast
MDHAR	$MDHA + NAD(P)H \rightarrow AsA + NAD(P)^+$	Kloroplast, sitozol, mitokondri
DHAR	$2GSH + DHA \rightarrow GSSG + AsA$	Kloroplast, sitozol, mitokondri
GR	$GSSG + NADPH + H \rightarrow GSH + NADP^{++}$	Kloroplast, sitozol, mitokondri
GPX	$H_2O_2 + GSH \rightarrow H_2O + GSSG$	Kloroplast, mitokondri
GST	$R-X + GSH \rightarrow GS-R + H-X$	Kloroplast, sitozol, mitokondri

Bitkilerde SOD enzimi doğrudan stresle ilişkilidir ve savunmanın ilk hattını oluşturur ve $O_2^{\cdot-}$ 'yi H_2O_2 'ye dönüştürür. Üretilen bu H_2O_2 , CAT, APX, GPX enzimleri tarafından daha fazla H_2O 'ya dönüştürülebilir veya AsA-GSH döngüsünde katalize edilebilir. Bitki hücrelerinde, AsA-GSH döngüsü veya Asada-Halliwell döngüsü, enzimatik olmayan antioksidanlar AsA ve GSH ile dört önemli enzim APX, MDHAR, DHAR ve GR'den oluşan H_2O_2 'yi detoksifiye etmek için ana antioksidan savunma yoludur. Antioksidan savunma sisteminde, AsA-GSH döngüsü H_2O_2 ve redoks homeostazını en aza indirmek için önemli bir rol oynar (Fotopoulos ve ark., 2010). Ek olarak, GPX ve GST'de H_2O_2 ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu için önemli enzimlerdir (Hasanuzzaman ve ark., 2018a). Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında AsA ve GSH, yüksek bitkilerde en bol bulunan çözünebilir antioksidanlardır (Foyer ve Noctor, 2011). Bunlar elektron vericileri olarak hayati bir rol oynar ve doğrudan AsA-GSH döngüsü aracılığıyla ROS'u temizler (Hasanuzzaman ve ark., 2019). Dahası, beta-karoten, hücresel ROS konsantrasyonlarının azalmasına neden olan $\cdot OH$, $O_2^{\cdot-}$ ve ROO^{\cdot} radikalleriyle reaksiyona girmektedir (Kapoor ve ark., 2019).

2.5.1. Enzimatik olmayan antioksidanlar

Askorbik asit (AsA), elektron verme kapasitesi ve iki form arasındaki rezonans sonucunda elektron dağılımının sağladığı kararlılık nedeniyle ROS'u temizlemede önemli bir rol oynamaktadır (Hasanuzzaman ve ark., 2019). Birçok fitohormon'un biyosentez yolu AsA tarafından düzenlenir. Ayrıca, AsA, α -tokoferol'ü (vitamin E) tokoferoksil

radikalinden yeniden oluşturur ve/veya $\cdot\text{OH}$ ve $\text{O}_2^{\cdot-}$ temizleyerek bu sürece katkıda bulunur (Naz ve ark., 2016; Seminario ve ark., 2017). Aynı zamanda, antioksidan savunma sisteminin bir başka önemli bileşeni olan GSH, hücrel ROS'ları temizlemek ve redoks dengesini sağlamak için AsA-GSH döngüsünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Hasanuzzaman ve ark., 2019). Tokoferol, kloroplastı korur ve fotosentezi sürdüren ROS, özellikle de $^1\text{O}_2$ ve $\cdot\text{OH}$ 'yi temizleyerek fotosentezi destekler (Kumar ve ark., 2013). Karotenoidler, zararlı serbest radikalleri temizlemede bilinen ve ışık toplama kompleks proteinleri ile tilakoid membranının stabilitesini koruyan önemli bir antioksidan molekül sınıfını oluşturur (Hussain ve ark., 2019). Düşük molekül ağırlıklı bileşikler olan flavonoidler ve özellikle dihidroksi B-halkalı flavonlar ve flavonoller, serbest radikalleri temizleme ve lipid peroksidasyonundan kaynaklanan hücre hasarını azaltma potansiyeline sahiptir (Agati ve ark., 2012; Liu ve ark., 2014).

Ayrıca, abiyotik stresler, flavonoid biyosentezi ile ilgili genlerin ekspresyonunu artırır ve antioksidan savunma mekanizmalarını aktive eder (Mehla ve ark., 2017). Antioksidan fenolik asitler genellikle hidrosibenzoik ve hidrosisinnamik asitlerden oluşur; bu asitler serbest radikalleri, özellikle $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$ 'i şelatlar ve temizleyici olarak antioksidan aktivite göstermektedir (Carocho ve Ferreira, 2013). Alkaloidler ayrıca serbest radikal temizleyicisi olarak antioksidan özelliğe sahiptir ve H_2O_2 ile indüklenen oksidasyonu inhibe eder (Tiong ve ark., 2013). Ayrıca, protein olmayan amino asitler de etkili enzim dışı antioksidanlar olarak değerlendirilebilirler (Vranova ve ark., 2011).

2.5.2. Enzimatik antioksidanlar

Süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1), Cu/Zn-SOD, Fe-SOD ve Mn-SOD olmak üzere üç ana izozime ayrılır ve antioksidan savunma sisteminin ilk sırasında yer alır. Bu enzim, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'i H_2O_2 'ye dönüştürerek $\cdot\text{OH}$ oluşum olasılığını azaltır (Gill ve ark., 2015). Antioksidan savunma sisteminde, katalaz (CAT; EC 1.11.1.6) ROS detoksifikasyonunda görev yapan dört alt birimden oluşan bir heme içeren enzimdir ve 1 dakikada 26 milyon H_2O_2 molekülünü H_2O 'ya dönüştürür (Mehla ve ark., 2017). Peroksidaz (EC. 1.11.1.7) genellikle fenol (PhOH) oksitleyerek fenoksil radikalini (PhO \cdot) üretir ve H_2O_2 'i elektron kabul ederek H_2O 'ya dönüştürülür. AsA'nın yokluğunda, PhO \cdot süberin, lignin ve kinonlar üretirken, AsA'nın varlığında PhO \cdot AsA ile reaksiyona girerek monodehidroaskorbat (MDHA) ve ardından DHA üretir (Veljović Jovanović ve ark., 2018).

Bitki hücrelerinde, AsA-bağımlı APX (EC 1.11.1.1) farklı izoformlarda bulunur bunlar; sitoplazmik APX (cAPX), mitokondriyal APX (mtAPX), kloroplastik APX (chlAPX; APX, kloroplastlarda H₂O₂ temizleme kapasitesine sahip tek enzimdir, çünkü CAT mevcut değildir), peroksizomal/glioksizomal APX (mAPX; dahil) ve H₂O₂ temizleyicileridir. AsA-GSH döngüsünde monodehidroaskorbat (MDHA) üretmektedir (Pandey ve ark., 2017). Üretilen MDHA, çeşitli hücreyel yerlerde iki izoformda bulunan NADPH-bağımlı flavin adenin dinükleotid enzim olan MDHAR (EC 1.6.5.4) tarafından AsA'ya dönüştürülür (Hasanuzzaman ve ark., 2019). MDHAR, bir tiyol grubu içererek AsA'yı fenoksil radikal azaltımı ile yeniden oluşturur (García-Caparrós ve ark., 2019). MDHAR, enzim dışı olarak DHA'ya dönüştürülür ve ardından GSH-bağımlı DHAR (EC 1.8.5.1) aktivitesi tarafından AsA'ya geri dönüştürülür (García-Caparrós ve ark., 2019).

Bu reaksiyonda, GSH, NADPH-bağımlı GR (EC 1.6.4.2) enzimi tarafından daha fazla GSSG'ye okside edilir ve bu, redoks dengesinin düzenlenmesi içinde önemlidir (Couto ve ark., 2016). Ayrıca, GPX (EC 1.11.1.9) yüksek reaktif bir tiyol grubuna sahip olan ve GSH ile TRX'leri kullanarak H₂O₂'yi temizleyen, lipidleri ve organik hidroperoksitleri azaltan bir nonheme içeren POX ailesi antioksidan enzimin bir üyesidir (Bela ve ark., 2015). GST (EC 2.5.1.18) aktif bölgelerinde GSH ve elektrofilik substratları konjuge eder, böylece ksenobiyotiklerin (özellikle, herbisitler ve farmasötik olarak aktif bileşikler) metabolize edilmesini ve vakuollere taşınmasını sağlar (Christou ve ark., 2016; Nianiou-Obeidat ve ark., 2017). Ayrıca, peroksitlerin parçalanmasında, hormon biyosentezinde ve stres sinyal iletiminde rol oynar ve GPX aktivitesini artırır (Nianiou-Obeidat ve ark., 2017).

2.6. Asetilkolin (ACh)

Asetilkolin (ACh), kolin ve asetik asidin bir esteridir ve 1914 yılında ilk olarak izole edilen örnek niteliğinde ve en bilinen nörotransmitterdir. Genellikle hayvanlarda sinaptik yollarda, sinirlerde ve omurgalı kasların motor uç plakalarında kolin ve asetil-koenzim A (asetil-CoA) aracılığıyla kolin asetiltransferaz enzimi tarafından sentezlenir. Asetilkolin sentezinin hız sınırlayıcı adımı, kolinin dış sıvıdan sinir terminaline sodyum bağımlı taşıyıcılar aracılığıyla alımı ve taşınmasını içerir (Lester, 1977). Ayrıca Asetilkolin; bakteriler, algler, protozoalar, tübüller, mantarlar, yosunlar, *Equisetum robustum* ve ilkel bitkilerde tespit edilmiştir. Hayvan hücrelerinde gen ekspresyonu, bağışıklık fonksiyonları, diferansiyasyon, proliferasyon, hücre-hücre teması, sitoskeletal organizasyonu, silia aktivitesi, hareket, göç, emilim, salgılama vb. gibi çeşitli fonksiyonların non-nöronal

asetilkolin tarafından düzenlenmesi, bitki bilimcilerini yüksek bitkilerde asetilkolin fonksiyonlarını keşfetmeye yönlendirmiştir. Bitkilerde iyi gelişmiş bir sinir sistemi bulunmamasına rağmen hem asetilkolin hem de asetilkolin hidrolize eden aktivite bitki aleminde geniş çapta tanınmıştır. *Urtica dioica*, asetilkolinin su emilimi ve fotosentez düzenlemesi açısından işlevinin doğrulandığı erken bitki üyelerinden biridir (Roychoudhury, 2020).

ACh'nin normal veya stres koşulları altında bitkilerde büyüme ve gelişmeyi düzenleyen çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal süreçleri düzenlemede önemli bir rol oynadığına dair güçlü kanıtlar vardır (Braga ve ark., 2017; Qin ve ark., 2019). Örneğin, Evans (1972), ACh'nin *Avena sativa* L.'nin hücre duvarı özelliklerini değiştirerek hücre uzama yeteneğini desteklediğini göstermiştir. Dahası, ACh, oksin ile ekspansinlerin ekspresyonunu önemli ölçüde artırarak hücre duvarı özelliklerini değiştirir (Di Sansebastiano ve ark., 2014). Benzer şekilde, Roshchina ve Mukhin (1985), *Pisum sativum* L. cv. *Prevoskhodnii*'de kloroplastlardaki ACh'nin fotofosforilasyonla birlikte membran iyon geçirgenliğini ve elektron taşınımını düzenlediğini bulmuştur. Etiyollenmiş buğday fidesi mezofil protoplastları ile yapılan başka bir çalışmada, Tretyn ve ark. (1990), ACh'nin membran geçirgenliğini ve Ca^{+2} , K^{+} ve Na^{+} girişini düzenleyerek protoplastların hızla şişmesine neden olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde, kuraklık stresiyle ilişkili yaprak solması ve yaprak iyileşmesindeki değişikliklerin, *Macroptilium atropurpureum* (Siratro) yapraklarındaki ACh seviyesindeki değişikliklerle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Momonoki ve Momonoki, 1993). Ek olarak, birkaç rapor, metabolik enzimlerinin reseptörü olan ACh'nin çeşitli bitki dokularında ve organlarında dağıldığını ve ACh'nin temel fizyolojik süreçlerdeki rolü olduğunu göstermiştir. Birkaç araştırma bulgusu, ACh'nin su ve iyon homeostazisi, stoma hareketi, kök ve sürgün arasındaki iletişim gibi çeşitli fizyolojik rollere sahip olduğunu göstermiştir (Qi ve ark., 2023).

ACh'nin oksidatif strese karşı etkileri üzerine literatürde birkaç çalışma bulunmaktadır. Qin ve ark. (2020)'nin tuzluluk stresi altında *Nicotiana benthamiana* üzerinde ACh'nin etkileri araştırılmıştır. Bunun sonucunda ACh'nin stoma iletkenliği, iç CO_2 konsantrasyonu ve terleme hızını arttırdığını, böylece fotosentez üzerindeki tuzluluk etkilerini hafiflettiğini bildirmişlerdir. Ek olarak tuzluluğun neden olduğu lipid peroksidasyonunun artması ve antioksidan enzimlerin aktivasyonunun modülasyonu yoluyla ACh uygulaması sonrası azaldığını rapor etmişlerdir.

Su ve ark. (2020b), Cd stresinin tütün (*Nicotiana benthamiana*) bitkisi üzerinde ACh'nin etkilerini araştırmışlardır. Sonuç olarak Cd kaynaklı azalmaları etkili bir şekilde

hafiflettiğini ve fotosistem II aktivitesini iyileştirdiğini rapor etmişlerdir. Aynı zamanda Cd stresli bitkilerin ACh uygulaması stres toleransını artırdığını ve eksojen olarak uygulanan ACh, Cd birikimini azalttığını, Cd'nin vakuol ve hücre duvarındaki dağılımını modüle ederek Cd kaynaklı hasarı en aza indirdiğini tespit etmişlerdir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali ve Deney Dizaynı

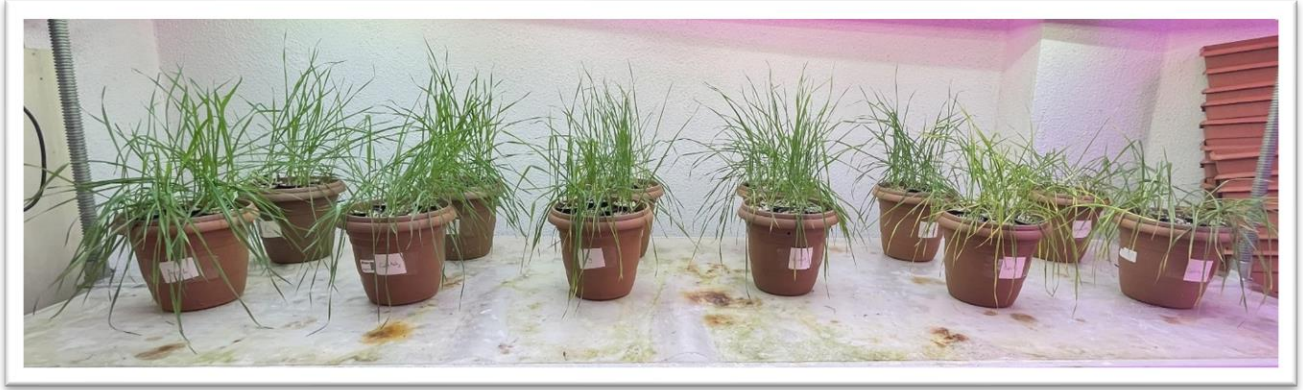
Buğday tohumları (*Triticum aestivum* L. cv. *Taner*) steril edilip, ıslak filtre kâğıdı üzerinde çimlendirilmeye bırakılmışlardır. Çimlenme işleminden sonra fideler iklim odasında kontrollü koşullar altında hidroponik bir ortam olan Hoagland solüsyonunun içine aktarılmıştır. Fideleri su kültürü ortamında totalde 12 grup olacak şekilde yetiştirilmiştir. 14 günlük sağlıklı fideler haline gelen buğdaylar Çizelge 3.1’de sunulan deneme dizaynı tasarlandı, sonra fidelere önceki çalışmalara (Pirzadah ve ark., 2018; Jawad Hassan ve ark., 2020; Qi ve ark., 2023) göre Asetilkolin (ACh1, 10 μ M; ACh2, 100 μ M) ve/veya Cd (100 μ M) ve Hg (50 μ M) stresi uygulanmıştır. 7 günlük uygulama süresinden sonra bitkiler hasat edilerek fizyolojik parametreler ve klorofil flüoresans ölçümleri alınıp ardından biyokimyasal analizler yapılmıştır ve buğday fideleri sıvı azot ile muamele edilerek -80 °C’de saklanmıştır.

Çizelge 3.1. Tez çalışmasında tasarlanan uygulama grupları

1. Grup (C) Kontrol	2. Grup (ACh1) Asetilkolin 10 μ M	3. Grup (ACh2) Asetilkolin 100 μ M	4. Grup (Cd) 100 μ M Kadmiyum
5. Grup (Cd+ACh1) Kadmiyum+ Asetilkolin	6. Grup (Cd+ACh2) Kadmiyum + Asetilkolin	7. Grup (Hg) Cıva 50 μ M	8. Grup (Hg+ACh1) Cıva + Asetilkolin
9. Grup (Hg+ACh2) Cıva + Asetilkolin	10. Grup (Cd+ Hg) Kadmiyum+ Cıva	11. Grup (Cd+Hg+ACh1) Kadmiyum + Cıva + Asetilkolin	12. Grup (Cd+Hg+ACh2) Kadmiyum + Cıva +Asetilkolin



Şekil 3.1. 14 gün boyunca hidroponik ortamda yetiştirilen buğday (*Triticum aestivum* L. cv. *taner*) fidelerinin genel görünümü



Şekil 3.2. Cıva ve/veya kadmiyum stresi altındaki buğdayda farklı dozlarda asetilkolin uygulamaları ardından fidelerin genel görünüşleri

3.2. Fizyolojik Parametrelerin Belirlenmesi

3.2.1. Nisbi sürgün büyüme oranlarının belirlenmesi

Stres uygulamasını takiben, 0. günleri alınan ve hasat günü her bir gruptan alınan rastgele 6 fidenin sürgün yaş ağırlıkları belirlenmiş, örnekler 55 °C’de 24 saat etüvde bekletildikten sonra kuru ağırlıkları kaydedilmiştir. Her gruptan en az üç tekrarlı şekilde gerçekleştirilen ölçümlerin aşağıdaki formülle hesaplanması sonrası bağıl sürgün büyüme oranları belirlenmiştir (Hunt ve ark., 2002).

$$\text{Bağıl Sürgün Büyüme Oranı: } (\log_e \text{KA2} - \log_e \text{KA1}) / (\text{H2} - \text{H1})$$

(KA1: 1. Hasattaki sürgün ağırlığı (mg), KA2: 2. Hasattaki sürgün ağırlığı (mg), H1: 1. Hasat süresi, H2: 2. Hasat süresi)

3.2.2. Yaprakların bağıl su içeriklerinin belirlenmesi

Cıva ve/veya Kadmiyum stresli buğday yapraklarına asetilkolin uygulamalarının yaprak bağıl su içeriklerinde oluşan değişimleri belirlemek için; kontrol, yalnız stres ve stresle birlikte ACh uygulanmış gruplardan rastgele 6’şar tekrar yaprak örnekleri alınarak yaş ağırlıkları (Y.A.) ölçüldü. Ardından örnekler en az 6 saat düşük ışık altında de-iyonize su bulunan petri kaplarında bekletildi. Süre sonunda tartılan yaprakların turgorlu ağırlıkları (T.A.) belirlenmiş oldu. Daha sonra tartılan örnekler 72 saat 55 °C’de etüvde kurutularak

kuru ağırlıkları (K.A.) belirlendi. Her bir gruba ait yaprak örneklerinin bağıl su içeriği aşağıdaki formüle göre % olarak hesaplanmıştır (Smart ve Bingham, 1974):

$$\text{Bağıl su içeriği (\%)} = [(\text{Yaş ağırlık} - \text{Kuru ağırlık}) / (\text{Turgorlu ağırlık} - \text{Kuru ağırlık})] \times 100$$

3.3. Gaz Değişim Parametreleri

Gaz değişim parametreleri, her uygulama grubundan altı bitkinin yapraklarında LCpro+ (ADC, Hoddesdon, UK) sistemi kullanılarak ölçülmüştür. C_i/C_a oranının 1'den farkı stoma sınırlama değeri (L_s) olarak hesaplanmıştır (Ma ve ark., 2012).

3.4. Klorofil Flüoresans Ölçümleri

Hasat sırasında klorofil fluoresans (Plant Efficiency Analyser-Hansatech Instruments Ltd.) ölçümleri kadmiyum ve/veya cıva stresi üzerine ACh uygulanmış buğday yapraklarından her bir gruptan rastgele seçilen 5 farklı örnek alınarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümler oda sıcaklığında karanlıkta gerçekleştirilmiştir. Yapraklar 5 dakika kadar karanlıkta bekletilerek PSII'nin temel flüoresans düzeyine (F_o) indirgenmesi sağlanmıştır. Ayrıca 10, 15, 20 ve 30 dakikalık süreler sonunda da ölçümler yapılmış ve ölçüm yapılan her bitkinin PSII'nin fotokimyasal verimi maksimum kuantum verimi olan F_v/F_m değerleri kaydedilmiştir. Ayrıca çeşitli sürelerde karanlıkta bekletilen örneklerde PSII'nin açık olduğu andaki minimum flüoresans (F_o), karanlıktan ışığa alınan bitkilerde PSII'nin açık olduğu andaki minimum flüoresans (F_o'), karanlıkta bekletilen yapraklarda PSII'nin kapalı olduğu andaki maksimum flüoresans (F_m) ve karanlıktan ışığa alınan yapraklarda PSII'nin kapalı olduğu andaki maksimum flüoresans (F_m'), F_v (değişken flüoresans, F_m/F_o), fotokimyasal kullanılma (qP , $(F_m' - F_o)/(F_m' - F_o)$), fotokimyasal olmayan kullanılma $(1 - (F_m' - F_o')/(F_m - F_o))$ belirlenmiştir.

3.5. Buğday Yapraklarında Gerçekleştirilen Biyokimyasal Analizler

Tez çalışmamızda asetilkolin'in kadmiyum ve/veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında stresin olumsuz etkilerini azaltmadaki rollerini tespit edebilmemiz için yapraklarda;

- 1- Yaprakların protein içeriklerinin tespiti,
- 2- Lipid peroksidasyon oranlarının belirlenmesi,
- 3- Yapraklardaki prolin değişimlerinin belirlenmesi,
- 4- Yaprakların hidrojen peroksit içeriklerinin belirlenmesi,
- 5- Yaprak enzim ekstraktlarının hazırlanması,
- 6- Antioksidan enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesi;
 - 6.1. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesinin densiyometrik olarak belirlenmesi,
 - 6.2. Katalaz enzim aktivitesinin belirlenmesi,
 - 6.3. Peroksidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi,
 - 6.4. Askorbat peroksidaz enziminin aktivite tayini,
 - 6.5. Glutatyon redüktaz enziminin aktivite tayini,
 - 6.6. Monodehidroaskorbat redüktaz enziminin aktivite tayini,
 - 6.7. Dehidroaskorbat redüktaz enziminin aktivite tayini,
 - 6.8. NADPH oksidaz aktivitesi gibi biyokimyasal ölçümler gerçekleştirilmiştir
- 7- Enzimatik olmayan antioksidanların içeriklerinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesi

3.5.1. Total protein miktarının belirlenmesi

Enzim analizlerinde kullanılacak 0.5 g yaprak örneği 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 0.1 mM EDTA, %0,2 TritonX100, 1 mM PMSF ve 2 mM DTT içeren tamponda homojenize edilmiş, homojenizat santrifüj yardımıyla süpernatanttan toplanmıştır. Protein içerikleri, Bradford (1976)'a göre, bovin serum albümin (BSA) standart olarak kullanılarak tespit edilmiştir.

3.5.2. H₂O₂ ve TBARS içeriklerinin analizi

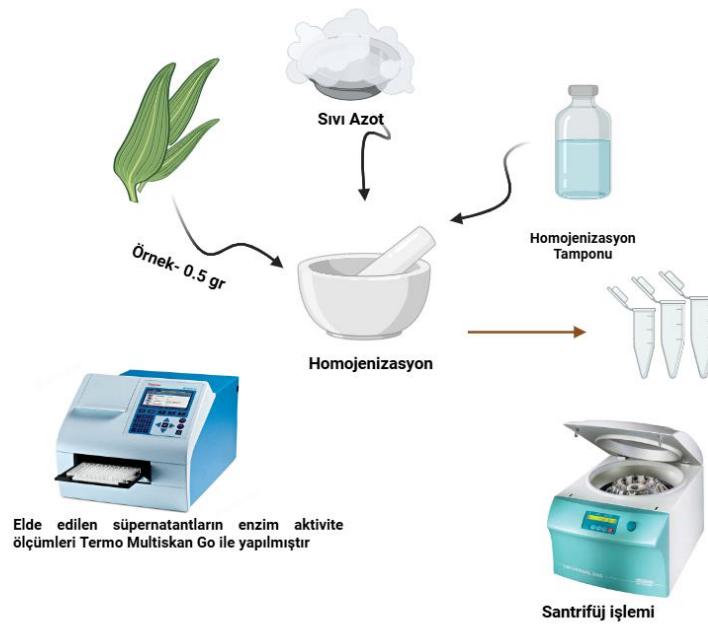
Stres sonucunda lipid peroksidasyon derecesinin belirlenmesi için, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) içeriği ölçülmüştür. MDA miktarı Rao ve Sresty (2000)'e göre belirlenmiştir. Bunun için yaprak örnekleri, trikloroasetik asit (TCA) ile homojenize edilmiştir. Santrifüjden sonra tüplere aktarılan süpernatanta, tiobarbitürik asit (TBA) ve TCA içeren reaksiyon karışımı pipetlenmiş ve tüm deney tüpleri 95 °C'de 30 dk ısıtılmıştır. Karışım 12.000g x 15 dk santrifüjlendikten sonra oluşan süpernatantın 532 ve 600 nm'deki absorbans değerleri okunmuştur. MDA

konsantrasyonu, ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon=155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplanmış ve $\text{nmol g}^{-1} \text{ YA}$ olarak ifade edilmiştir.

H_2O_2 tayini Velikova ve ark. (2000)'na göre yapılmıştır. Her bir gruba ait 0.5 g buğday yaprağı $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de bekletilmiş 25 mM H_2SO_4 içeren asetondan 3 ml alınarak homojenize edilmiş ve 5000 g' de $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant eFOX çözeltisi içeren tüplere alınmış 15 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Örnekler spektrofotometre cihazında, 550 ve 800 nm dalga boylarında okuma yapılmıştır. Örneklerdeki H_2O_2 konsantrasyonları, bilinen H_2O_2 miktarlarına göre hazırlanan standart eğim grafiğine göre hesaplanmıştır.

3.5.3. Yaprak enzim ekstraktlarının hazırlanması

Enzim ekstraksiyonları $\pm 4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de gerçekleştirilmiştir. Hasat edilen her bir gruptaki 0.5'er gram yaprak örneği, soğutulmuş havanda sıvı azot yardımıyla, 0.1 mM EDTA, %0,1 (v/v) Triton-X 100, 1 mM PMSF ve %2 (w/v) PVPP içeren 50 mM TrisHCl (pH 7.8) tamponuyla homojenize edilmiştir. APX ekstraksiyonu için 5 mM askorbat içeren homojenizasyon tamponu kullanılmıştır (pH 7.8). Homojenant $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 10.000 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiş ve oluşan süpernatant, protein içeriğinin belirlenmesinde ve enzim aktivitelerinin tayin edilmesinde kullanılmıştır. Tüm spektrofotometrik ölçümler Shimadzu UV-1800 ve Thermo Multiskan GO ile yapılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Enzim ekstraktlarının hazırlanması

3.5.4. Antioksidan enzimlerin aktivite değişimlerinin belirlenmesi

3.5.4.1. Süperoksit dismutaz aktivite/izozimlerinin elektroforetik ayrımı

Eşit miktarda protein içeren yaprak ekstraktlarındaki SOD izozimleri Laemmli (1970)'e göre native PAGE ile ayrılmıştır. İzozimler +4 C'de sabit akımla (120 mA) %12'lik separating jel ve %5'lik stacking jel (stacking jel için 60 mA, separating jel için 120 mA) ile Biorad mini-protean elektroforezinde ayrılmıştır. SOD aktivitesi, Beauchamp ve Fridovich (1971)'e göre riboflavin ve nitrobluetetrazolium (NBT) boyası ile belirlenmiştir. Jeller 30 dakika kadar boya solüsyonunda bekletildikten sonra, SOD izozim bantları jel görüntüleme cihazında görüntülenmiş ve densiyometik analizi Bio-1D software programıyla tayin edilmiştir. Elektroforezden sonra farklı SOD izozimleri, boya çözeltisine inhibitörler eklenerek belirlenmiştir. Potasyum siyanür (KCN), Cu/Zn-SOD inhibisyonu için, H₂O₂ ise Fe-SOD ve Cu/Zn-SOD inhibisyonu için boya çözeltisine eklenmiştir. Mn-SOD aktivitesi ise her iki inhibitöre de direnç göstermesine göre belirlenmiştir.

3.5.4.2. Katalaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Yaprakların katalaz (CAT) enzim aktivitelerinde gözlenen değişimler, Bergmeyer ve Gawehn (1970)'in metoduna göre gerçekleştirilmiştir. H₂O₂'in miktarında oluşan azalma, 240 nm'de maksimum absorbanstaki düşüşle belirlenmiştir. 250 µl'lik son hacme sahip küvetlerdeki reaksiyon karışımı; 0.1 mM EDTA, 50 mM Na-fosfat tamponu (pH 7), deiyonize su ve %0,3 H₂O₂'den oluşmaktadır. 180 sn boyunca absorbansta oluşan düşüş takip edilmiştir. CAT aktivitesi, dakikada harcanan µmol H₂O₂ olarak ifade edilmiştir. CAT izozimleri Woodbury ve ark. (1971) tarafından belirtilen yöntem ile tespit edilmiştir.

3.5.4.3. Peroksidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Peroksidaz (POX) enzim aktivitesi, Herzog ve Fahimi (1973) tanımladığı metoda göre yapılmıştır. Köre karşı 465 nm'de H₂O₂ varlığında okside olan DAB (3'-3'-diaminobenzidin tetrahidroklorit) oluşum miktarına bağlı olarak 3 dakika boyunca absorban değişimleri okunmuştur. Polistren küvetteki reaksiyon karışımı, DAB solüsyonu, %0.6'lık H₂O₂, de-iyonize su ve enzim ekstraktından oluşmaktadır.

Reaksiyon H_2O_2 'nin katılmasıyla başlatılmış ve absorbans artışı takip edilmiştir. Spesifik enzim aktivitesi dakikada tüketilen $\mu\text{mol/ml}$ H_2O_2 olarak ifade edilmiştir. POX izozimleri Seevers ve ark. (1971) tarafından oluşturulan yöntem izlenerek native PAGE ile ayrılmıştır.

3.5.4.4. Askorbat peroksidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

APX aktivitesinin tayini Nakano ve Asada (1981)'ya göre yapılmıştır. Askorbat okside oldukça, spektrofotometreden 290 nm'deki absorbansla oluşan azalma okunmuş ve hesaplamalar askorbatın ekstinsiyon katsayısı kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyon karışımı 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7), 0.5 mM askorbat, 0.1 mM EDTA- Na_2 ve 1.2 mM H_2O_2 içermektedir. Askorbatın oksidasyonu, enzim ekstraktının katılmasıyla başlatılmış ve absorbansdaki azalma 180 sn boyunca takip edilmiştir. Bir birim APX aktivitesi dakikada okside olan 1 mmol/ml askorbat olarak ifade edilmiştir. APX izozimlerinin ayırımı Mittler ve Zilinskas (1993)'ın protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

3.5.4.5. Glutasyon redüktaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Glutasyon redüktaz aktivitesi, 340 nm'deki absorbans azalmasından yola çıkılarak hesaplanmıştır (Foyer ve Halliwell, 1976). Reaksiyon karışımı 0.2 M Na_2HPO_4 ve 0.2M NaH_2PO_4 içeren Na-fosfat tamponu, 0.005 M okside glutasyon (GSSG), 5 ml tampon ile tamamlanmış olan 0.0012 M $NADPNa_4$ içermektedir. Körde enzim ekstraktı konulmadan sadece reaksiyon karışımı kullanılmıştır. NADPH varlığında, okside glutasyon miktarındaki azalma, kuvartz küvette köre karşı 180 sn boyunca takip edilmiştir. Hesaplamalar glutasyon redüktaz enziminin ekstinsiyon katsayısı kullanılarak yapılmıştır. Spesifik enzim aktivitesi, dakikada indirgenen 1 mmol/ml GSSG miktarı olarak ifade edilmiştir. GR izozimleri Hou ve ark. (2004) tarafından bildirilen yöntemle ayrılmıştır.

3.5.4.6. Glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

GPX aktivitesi, Elia ve ark. (2003) tarafından tarif edildiği gibi H₂O₂ substratı kullanılarak belirlenmiştir. GPX izozimleri Hou ve ark. (2003) tarafından oluşturulan yöntem izlenerek native PAGE üzerinde ayrılmıştır.

3.5.4.7. Glutatyon S-transferaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

GST aktivitesi, Hossain ve ark. (2006)'nın yöntemi izlenerek 340 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. 100 mM K-P (pH 6.5), GSH ve CDNB içeren reaksiyon karışımı 340 nm'de 3 dakika boyunca spektrofotometrede izlenmiştir. GST izozimleri Ricci ve ark. (1984)'nin belirttiği şekilde ayrılmıştır.

3.5.4.8. NADPH Oksidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

NOX aktivite değişimleri ve izozimleri, Jiang ve Zhang (2002) ve Sagi ve Fluhr (2001)'a göre tespit edilmiştir. İzole edilen süpernatantlara 50 mM Tris HCl (pH: 7.5), XTT ve NADPH içeren reaksiyon karışımına eklenmiş ve absorbanstaki değişim 470 nm'de 3 dakika boyunca izlenmiştir.

3.5.4.9. Monodehidroaskorbat redüktaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

MDHAR (EC: 1.6.5.4) aktivitesi Hossain ve ark. (1984)'nin metoduna göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı; 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 7.5), 0.2 mM NADPH, 2.5 mM AsA, 0.5 ünite askorbat oksidaz (AO) içermektedir. Reaksiyon AO'nun eklenmesiyle başlatılmış, aktivite 340 nm'de 1 dakika absorbansta meydana gelecek değişime göre 6.2 mM⁻¹ cm⁻¹ ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.5.4.10. Dehidroaskorbat redüktaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

DHAR (EC: 1.8.5.1) aktivitesi Nakano ve Asada (1981)'nin protokolüne göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı; 50 mM K-P tamponu (pH 7.0), 2.5 mM GSH ve 0.1 mM DHA içermektedir. Aktivite örnek solüsyonuna reaksiyon karışımının eklenmesiyle başlatılmıştır. Aktivite 265 nm'de 1 dakika absorbansta meydana gelecek değişime göre 14 mM⁻¹ cm⁻¹ ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.5.5. Enzimatik olmayan antioksidanların içeriklerinde meydana gelen değişimlerinin belirlenmesi

Total ve indirgenmiş askorbat (AsA) içerikleri Dutilleul ve ark. (2003) tarif ettiği şekilde kolorimetrik olarak ölçülmüştür. DHA içeriği ise total ve indirgenmiş AsA konsantrasyonların farkı olarak hesaplanmıştır. Glutasyon (GSH) ve oksitlenmiş glutasyon (GSSG) içerikleri Hasanuzzaman ve ark. (2018b)'nın protokolüne göre belirlenmiştir. 1 mM EDTA ve 5% metafosforik asit içeren ekstraksiyon buffer içerisinde örnekler homojenize edilmiştir. 0.5 M K-P buffer (pH: 7) ile inkübasyon sürelerine dikkat ederek GR varlığında 412 nm'de okuma gerçekleştirilmiştir.

3.6. İstatistiksel Analizler

Her bir deneme en az 3 kez tekrar edilmiştir ve her bir bulgu, büyüme parametreleri dışında (n=10) 2 tekrardan oluşmaktadır (n=6). Elde edilen veriler tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ile analiz edilmiş ve ortalamalar arasındaki farklılıklar Lowest Standard Deviations (LSD) testi ile karşılaştırılmıştır.

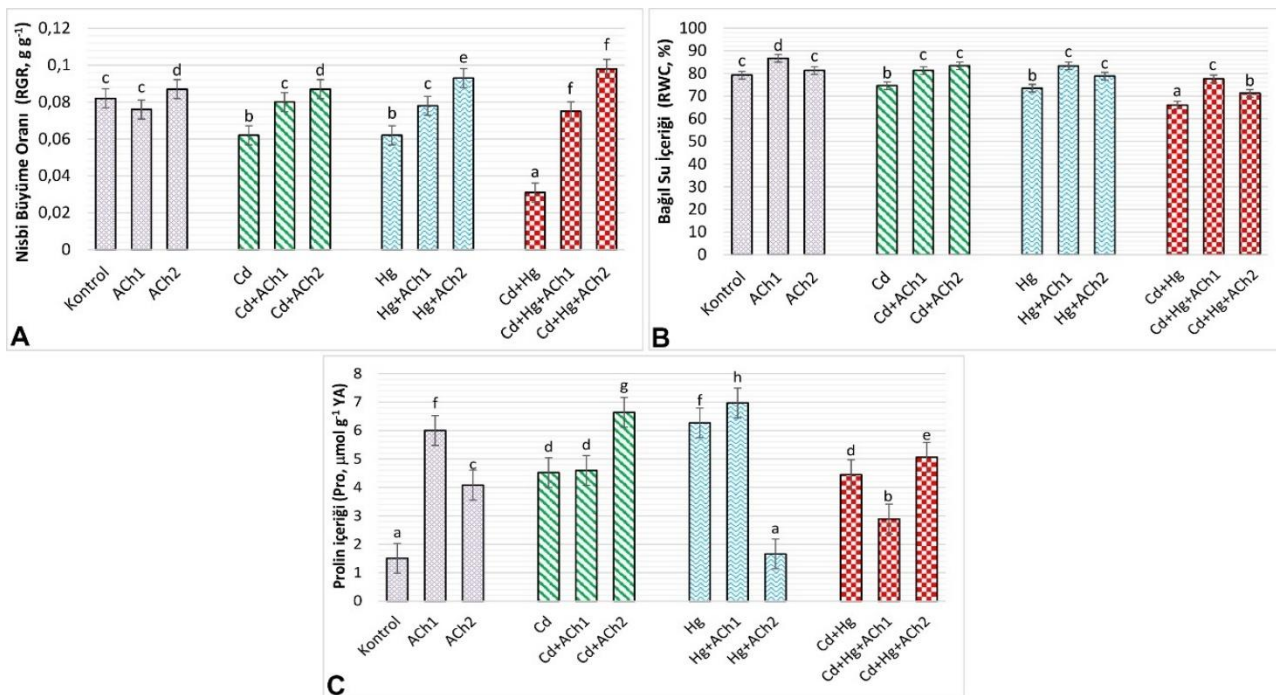
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Cıva ve /veya Kadmiyum Stresi Altındaki Buğday Bitkilerine Asetilkolin Uygulamalarının Büyüme Parametreleri ve Prolin İçeriği Üzerine Etkisi

Cd ve /veya Hg stresi ile Ach uygulamalarının buğday bitkisinde etkilerinin incelenmesi öncelikle bağıl büyüme oranları (RGR) karşılaştırılarak başlanmıştır. Şekil 4.1A'a da görüldüğü üzere ACh1 ile muamele edilen buğday bitkilerinin RGR'sinde herhangi bir değişiklik gözlemlenmezken, ACh2 grubunda hafif bir artış tespit edilmiştir. Cd stresi, RGR'de %24'lük bir azalmaya neden olmuştur. Cd stresine göre, Cd+ACh1 grubunda yaklaşık %30'luk bir artış, Cd+ACh2 grubunda ise %40'lık bir artış gözlemlenmiştir. Hg stresi, kontrol bitkilerine kıyasla RGR'yi %24 oranında azaltmıştır. Hg+ACh1 ve Hg+ACh2 gruplarında sırasıyla %25 ve %50 oranında RGR artışı tespit edilmiştir. Kombine stres grubunda ise (Cd+Hg) RGR'de %62'lik bir azalma gözlemlenmiştir. Cd+Hg+ACh1 ve Cd+Hg+ACh2 uygulamaları, sırasıyla Cd + Hg'ye kıyasla 2.4 kat ve 3.1 kat RGR artışı sağlamıştır. ACh1 uygulamaları, kontrol grubuna kıyasla %9'luk bir bağıl su içeriği (RWC) artışı sağlamıştır (Şekil 4.1B). Cd stresi altında, RWC kontrol grubuna kıyasla %5 azalmıştır. Aynı zamanda, Cd+ACh1 ve Cd+ACh2 ile uygulanan bitkilerde sırasıyla %8 ve %11 oranında artış göstermiştir. Hg stresi altında RWC %7 azalmıştır. Hg+ACh1 ve Hg+ACh2 grupları, stres grubuna kıyasla sırasıyla %13 ve %7 oranında iyileşme göstermiştir. Kombine stres (Cd+Hg) altında RWC'de %16'lık bir azalma gözlemlenmiştir. Cd+Hg+ACh1 ve Cd+Hg+ACh2 gruplarında RWC'de sırasıyla %17 ve %7'lik bir artış gözlemlenmiştir. ACh1 ve ACh2 uygulamaları, kontrol koşullarında prolin içeriğini sırasıyla yaklaşık 4 kat ve 3 kat artırmıştır (Şekil 4.1C). Benzer şekilde, tüm stres uygulamalarında prolin içeriğinde bir artışa yol açmıştır. Stresli yapraklarda, Cd+ACh2, Hg+ACh1 ve Cd+Hg+ACh2 uygulamalarıyla prolin içeriği daha da artmıştır.

Ağır metal kirliliği toprakta morfolojik hasara, metabolik dengesizliklere, büyümede azalmaya ve bitkilerde verim düşüşüne neden olabilir (Alsafran ve ark., 2023). Aynı zamanda, yüksek ağır metal alımı başlangıçta hücrel organelleri etkiler ve doğrudan DNA ve protein sentezini engelleyebilir (Gupta ve ark., 2023). Su genellikle bitkilerin taze ağırlığının yarısından fazlasını oluşturur. Su eksikliği, bitkinin ihtiyaçlarının, büyüme, fotosentez hızı ve stoma iletkenliği gibi faktörlerin tam olarak karşılanmaması durumunda ortaya çıkar. Farklı bir bakış açısıyla, su eksikliği, transpirasyon hızının kökler tarafından su

alımını aşması durumunda ortaya çıkar (dos Santos ve ark., 2022). Bu çalışmada, Cd, Hg ve Cd+Hg stresi altında buğday bitkilerinde RWC’de bir azalma gözlemlenmiştir. RGR’nin de Cd ve/veya Hg koşullarında azaldığı görülmüştür. Bitkilerde Cd ve Hg’nin aşırı birikimi, büyüme inhibisyonuna ve metabolik bozukluklara neden olmaktadır (Yuan ve ark., 2021). Sonuçlarımız, Cd ve Hg kirliliği altında *Zea mays*’in büyüme parametrelerinde ve su ilişkilerinde bozulmalar tespit eden Rellán-Álvarez ve ark. (2006) çalışmasıyla tutarlıdır. Ancak, ACh1 ve ACh2 uygulamalarının ağır metal stresinin neden olduğu azalmayı hafiflettiği ve Cd ve/veya Hg stres koşullarında RWC ve RGR’de artış sağladığı bulunmuştur. Benzer olumlu sonuçlar, Cd stresine maruz kalan ve ACh ile muamele edilen tütün bitkilerinde de gözlenmiştir. Bu, ACh’nin su alımını ve besin verimliliğini artırma kapasitesinin ağır metal alımının azaltılmasına katkıda bulunabileceğini göstermektedir (Su et al., 2020b). Ayrıca, Saleh (2024) nikel (Ni) uygulamasının buğday bitkilerinde büyüme parametrelerinde azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Ancak, ACh uygulaması, stresin neden olduğu zararlı etkileri önemli ölçüde hafifletmiştir. Stres koşullarında, prolin, oksidatif stres hasarını hafifletmedeki rolünün bir göstergesi olarak hizmet eder. Prolin, serbest radikalleri temizleyerek, ozmotik dengeyi koruyarak ve PSII’yi destekleyerek işlev görür (Hayat ve ark., 2021). Bu çalışmada, Cd, Hg ve bunların kombinasyonu (Cd+Hg) tarafından indüklenen stres koşullarında prolin içeriğinde bir artış gözlemlenmiştir. Dolayısıyla, artmış prolin seviyeleri, buğday bitkilerinde antioksidan potansiyelini işaret eder, çünkü bu, reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikiminin detoksifikasyonuna katkıda bulunur (Pandian ve ark., 2020). Bulgularımız, Cu stresinin domates yapraklarındaki prolin içeriğini kontrol grubuna kıyasla artırdığını öne süren Nazir ve ark. (2019) çalışmasıyla uyumludur. Benzer şekilde, Cd+ACh2, Hg+ACh1 ve Cd+Hg+ACh2 koşulları prolin içeriğinde bir artış göstermiştir. Bu artış, RWC’yi koruyarak, protein yapısını ve işlevini stabilize ederek, tolerans mekanizmalarını artırarak ve ROS’u uzaklaştırarak hücreleri zararlı etkilerden korumada önemli bir rol oynar. Saleh (2024) ayrıca ACh takviyesinin nikel toksisitesi altında buğday yapraklarındaki Pro ve diğer çözümler şeker içeriğini artırdığını ve bunun nedeninin biyosentez yollarının indüksiyonu olabileceğini öne sürmüştür.



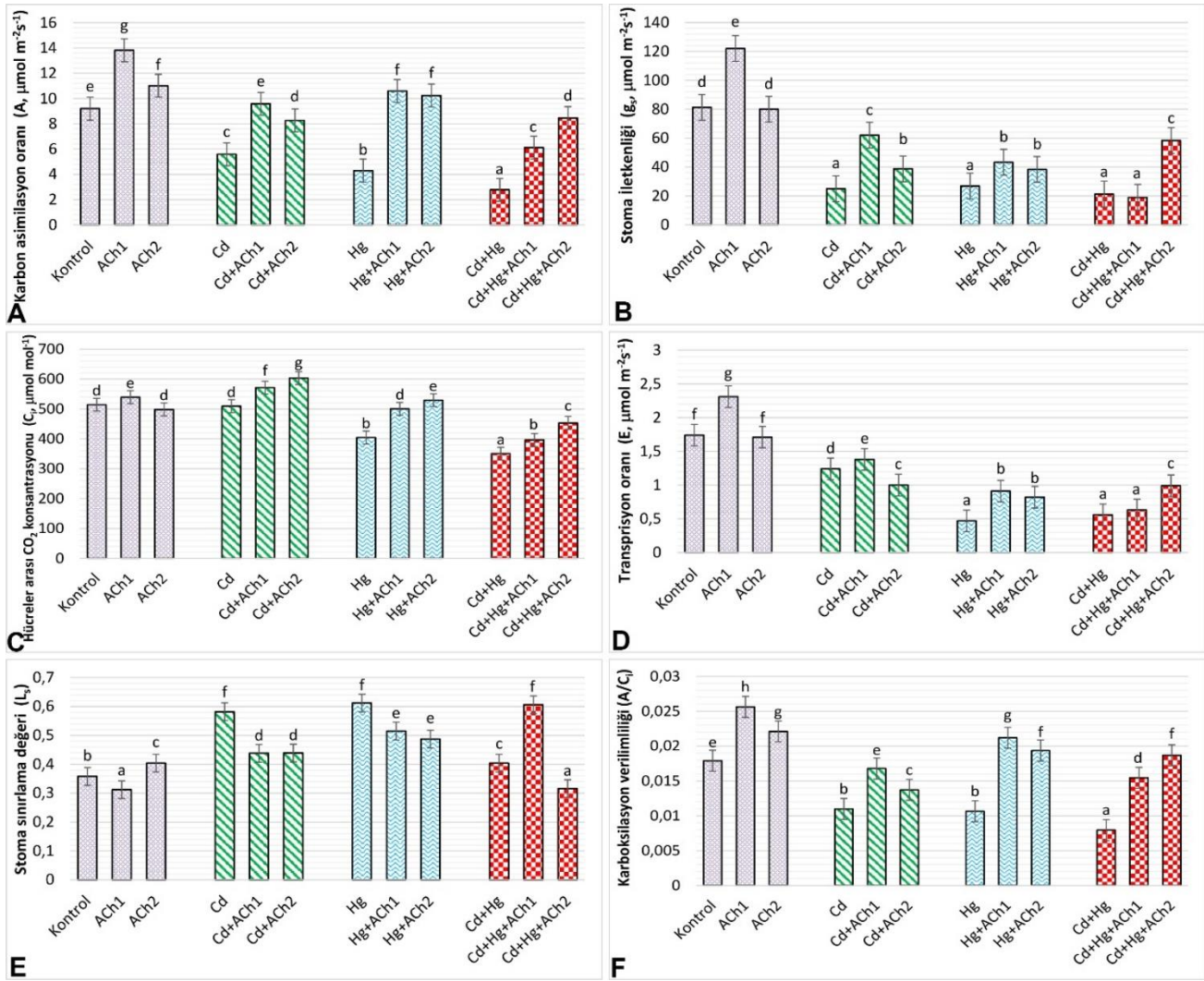
Şekil 4.1. Kadmiyum ve/veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin (ACh) uygulamalarının nisbi büyüme oranı (RGR, A), bağıl su içeriği (RWC, B) ve prolin içeriği (Pro, C) üzerine etkileri

4.2. Cd ve /veya Hg Stresi Altındaki Buğday Bitkilerine Asetilkolin Uygulamalarının Gaz Değişim Parametrelerine Etkileri

Buğday bitkilerinde ACh1 uygulaması, karbon asimilasyon oranında (A) %50 artışa neden olmuştur (Şekil 4.2A). Stres koşulları altında (Cd, Hg, Cd+Hg) bu oran sırasıyla yaklaşık %40, %50 ve %70 azalmıştır. Cd+ACh1 ve Cd+ACh2 gruplarında sırasıyla %71 ve yaklaşık %50 artış gözlemlenmiştir. Hg+ACh1 ve Hg+ACh2 uygulamalarında, A buğday yapraklarında sırasıyla 2.4 kat ve 2.3 kat artmıştır. Kombine gruplarda (Cd+Hg+ACh1, Cd+Hg+ACh2) bu oran sırasıyla 2.2 ve 3 kat artmıştır. Stoma iletkenliği (g_s) ACh1 grubunda %50 artarken, ACh2 grubunda anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Şekil 4.2B). Stres gruplarında (Cd, Hg, Cd+Hg) g_s yaklaşık %70 azalmıştır. Cd+ACh1 ve Cd+ACh2 gruplarında, Cd stres grubuna kıyasla sırasıyla 2.4 kat ve %55 artış gözlemlenmiştir. Ancak, Cd+Hg+ACh2 grubunda, kombine stres grubuna (Cd+Hg) kıyasla g_s 'de 2.7 kat daha yüksek bir etki gözlemlenmiştir. ACh1 uygulanan grupta, hücreler arası CO₂ konsantrasyonu (C_i) kontrol koşullarına kıyasla %4 artmıştır (Şekil 4.2C). Ancak, ACh2 veya Cd stres gruplarında anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Cd grubuna kıyasla, Cd+ACh1'de %12 ve Cd+ACh2'de %18 artış gözlemlenmiştir. C_i , Hg ve Cd+Hg gruplarında %21 ve %31 azalmıştır. Hg grubuna kıyasla, Hg+ACh1 ve Hg+ACh2 gruplarında sırasıyla %23 ve %30 artış rapor edilmiştir. C_i , Cd+Hg+ACh1 ve Cd+Hg+ACh2 ile muamele edilen bitki

yapraklarında sırasıyla %13 ve %29 artmıştır. Transpirasyon oranında (E) kontrol koşullarına kıyasla ACh2 grubunda bir fark gözlemlenmemiştir. Ancak, ACh1 grubunda %32 artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.2D). E'deki en önemli artış, %93 ile Hg+ACh1 grubunda bulunmuştur. Bitki yapraklarında E'deki en önemli azalma, %72 ile Hg grubunda gözlemlenmiştir. Kontrol koşullarına kıyasla, Cd'de E %28 ve Cd+Hg uygulanan yapraklarda %67 azalmıştır. Cd+ACh1 grubu, Cd stres koşullarına kıyasla %11 artış gösterirken, Cd+ACh2 grubu %19 azalmıştır. Cd+Hg+ACh2 grubunda, stres koşullarında ACh uygulamaları E'yi artırmıştır. Kontrol koşullarına kıyasla, stoma sınırlama değeri (L_s) ACh1 altında %12 azalırken, ACh2'de %12 artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.2E). Stres maruziyeti sonrası (Cd ve Hg) bu değer sırasıyla %62 ve %70 artmıştır. Cd+Hg+ACh1 grubu hariç stres altındaki tüm ACh uygulamaları L_s 'yi azaltmıştır. ACh1 ve ACh2 uygulanan buğday yapraklarının karboksilasyon verimliliği (A/C_i) kontrol koşullarına kıyasla sırasıyla %43 ve %23 artmıştır (Şekil 4.2F). Kontrole kıyasla stres gruplarında (Cd, Hg, Cd+Hg) önemli oranlarda azalmalar olmuştur. Çalışma, ACh'nin iyileştirici etkisinin stres gruplarında A/C_i 'yi artırdığını bulmuştur.

Fotosentetik verim, bol miktarda su, ışık ve karbondioksit (CO_2) ihtiyacı gerektirir. Stomalar, yaprakların içi ile çevresindeki atmosfer arasındaki CO_2 ve su buharı alışverişini düzenler (Dusenge ve ark., 2019). Bu tez çalışmasında, Cd, Hg ve Cd+Hg gruplarında karbon asimilasyon (A) oranında bir azalma gözlemlenmiştir. Ağır metaller, klorofil içeriğinde azalmaya ve CO_2 bağlanmasından sorumlu enzimlerin aktivitesini bozma potansiyeline sahiptir (Anjum ve ark., 2017). A değerindeki azalma, stoma anormalliklerine ve E, g_s ve C_i 'deki paralel bir azalmaya bağlıdır. Stres koşullarında (Cd, Hg, Cd+Hg) L_s artmış olup, bu durum diğer gaz değişim parametreleri ile tutarlı olarak bu olguyu desteklemiştir. Benzer şekilde, Šimonová ve ark. (2007), Cd stresi altında *Brassica juncea* ve *Vigna radiata* yapraklarında stoma direncinin artmasıyla birlikte bitki biyokütlesinde belirgin bir azalma gözlemlenmiş, bu durum sonucunda fotosentez ve transpirasyonda azalma meydana gelmiştir. Buna karşın, ACh1 ve ACh2 uygulamaları, stres koşullarında bu etkileri tersine çevirerek fotosentez, transpirasyon, hücreler arası CO_2 konsantrasyonu ve stoma iletkenliğini artırmıştır. Su et al. (2020b), bulgularımızla uyumlu olarak, ACh ile muamele edilmenin klorofil içeriğindeki azalmayı etkili bir şekilde karşılayarak Cd'nin neden olduğu fotosentetik özelliklerdeki olumsuz etkileri hafiflettiğini bildirmiştir.



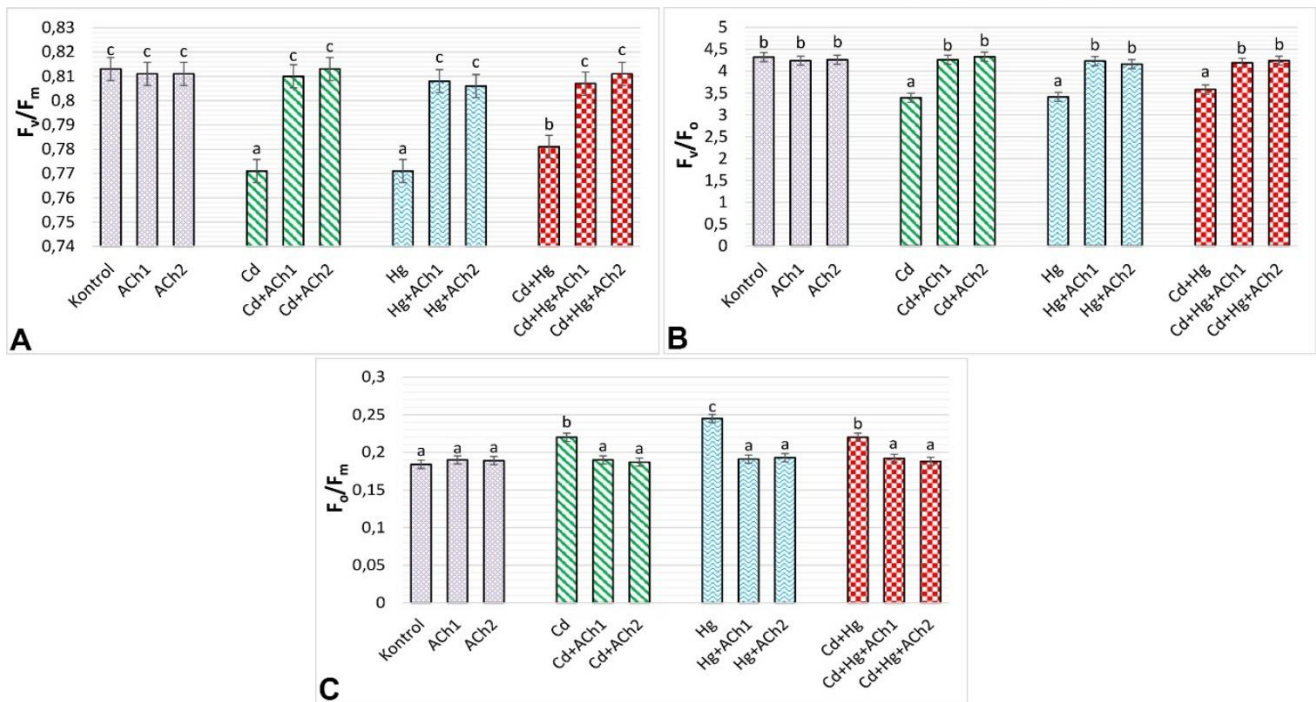
Şekil 4.2. Kadmiyum ve/veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin uygulamalarının karbon asimilasyon oranı (A), stoma iletkenliği (g_s), Hücreler arası CO_2 konsantrasyonu (C_i), transpirasyon oranı (E, D), stoma sınırlama değeri (L_s , E) ve karboksilasyon verimliliği (A/C_i , F) üzerine etkileri

4.3. Cd ve/veya Hg Stresi Altındaki Buğday Bitkilerine Asetilkolin Uygulamalarının Klorofil Flüoresans Parametrelerinde Meydana Getirdiği Değişimler

Buğday fidelerine 2 farklı dozda uygulanan ACh1 ve ACh2 gruplarında F_v/F_m , F_v/F_0 ve F_0/F_m değerlerinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Şekil 4.3A-C). F_v/F_m , yalnız stres gruplarında (Cd, Hg) %5, kombine stres gruplarında (Cd + Hg) ise %3 azalmıştır. Cd ve Hg uygulamaları F_v/F_0 'yu %21 azaltmıştır. F_0/F_m , Cd ve Cd+Hg gruplarında %19, Hg grubunda ise %33 artmıştır. Sonuçlar, her iki dozda ACh uygulamalarının klorofil floresans parametrelerini kontrol seviyelerine düzenlemede başarılı olduğunu göstermiştir.

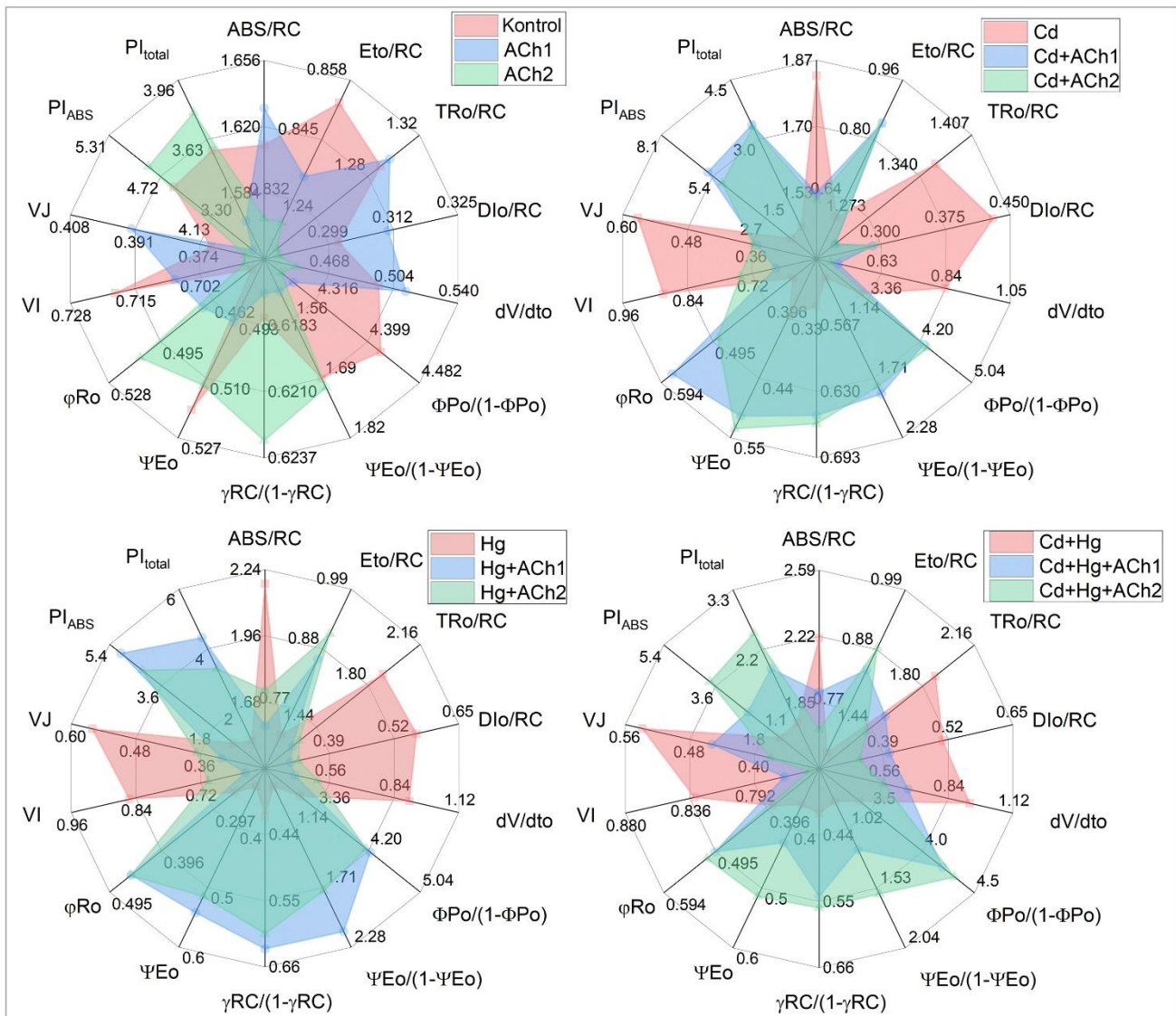
Ağır metaller, fotosentezin hem aydınlık hem de karanlık reaksiyonlarını bozabilir. Ayrıca, stoma dışı faktörler arasında, karbon asimilasyonuna katılan enzimlerin

inaktivasyonu, mezofil hücreleri tarafından CO₂ kullanımının azalmasına yol açan önemli bir sınırlamadır. Dahası, ağır metaller, fotosistem II (PSII) ve fotosistem I'in (PSI) fotokinetik aktivitelerinde azalmaya katkıda bulunur. PSII ve PSI, fotosentetik ışık reaksiyonlarında abiyotik strese duyarlı temel bileşenlerdir (Huihui et al., 2020). Stres genellikle hem PSI hem de PSII reaksiyon merkezlerinin azaltılmasına ve bazen de hafif deaktivasyonuna neden olur (Zhang ve ark., 2018). Ağır metal stresi, genellikle hem PSI hem de PSII aktivitesinde bir azalmaya yol açar (Bayçu ve ark., 2017). Buğday yapraklarındaki Cd ve Hg stresinin PSII ve PSI fonksiyonlarına etkileri, F_v/F_m ve F_v/F_o gibi parametrelerle gösterilmektedir (İsrar ve ark., 2006). Bu çalışmada, Cd, Hg ve Cd+Hg tarafından indüklenen stres koşullarında F_v/F_o ve F_v/F_m parametrelerinde bir azalma gözlemledik. F_v/F_m 'deki bu azalma, Chen ve ark. (2022)'nin bulgularıyla tutarlıdır. F_v/F_o değerindeki azalma, PSII'den birincil elektron alıcılarına elektron taşıma hızındaki değişiklikleri ve reaksiyon merkezlerinin sayısı ve boyutundaki azalmayı gösterir (Singh ve ark., 2022). Ağır metalin neden olduğu PSII verimliliği veya F_v/F_m 'deki azalma, ışık enerjisinin kullanımında bir azalmaya yol açar. Bu da Cd ve Hg stresi altında fotokimyasal olmayan söndürmenin (F_o/F_m) artmasına neden olur. Bu sonuçlara göre; ACh, Cd ve Hg'nin neden olduğu fotosentetik inhibisyonu, fotosentetik kapasiteyi düzenleyerek ve PSII aktivitesini iyileştirerek hafifletebilir (Xu ve Zhou, 2008).



Şekil 4.3. Kadmiyum ve/veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin (ACh) uygulamalarının klorofil flüoresans parametreleri üzerine etkileri: F_v/F_m (A), F_v/F_o (B) ve F_o/F_m (C)

Klorofil floresans parametreleri ile oluşturulan radar grafikleri Şekil 4.4'te sunulmuştur. Tüm stres uygulamalarında artan VI ve VJ parametreleri, düşük fotokimyasal aktiviteye sahip reaksiyon merkezlerini işaret etmektedir. Bu durum, aktif reaksiyon merkezi başına absorpsiyon değerini gösteren ABS/RC oranındaki artışı açıklamaktadır. Genel performans indeksleri PI_{ABS} ve PI_{total} 'ı en yüksek başarıyla artıran gruplar, tek stres uygulamalarında (Cd ve Hg) ACh1 uygulaması ve kombine stres uygulamalarında (Cd+Hg) ACh2 verilen gruplardır.



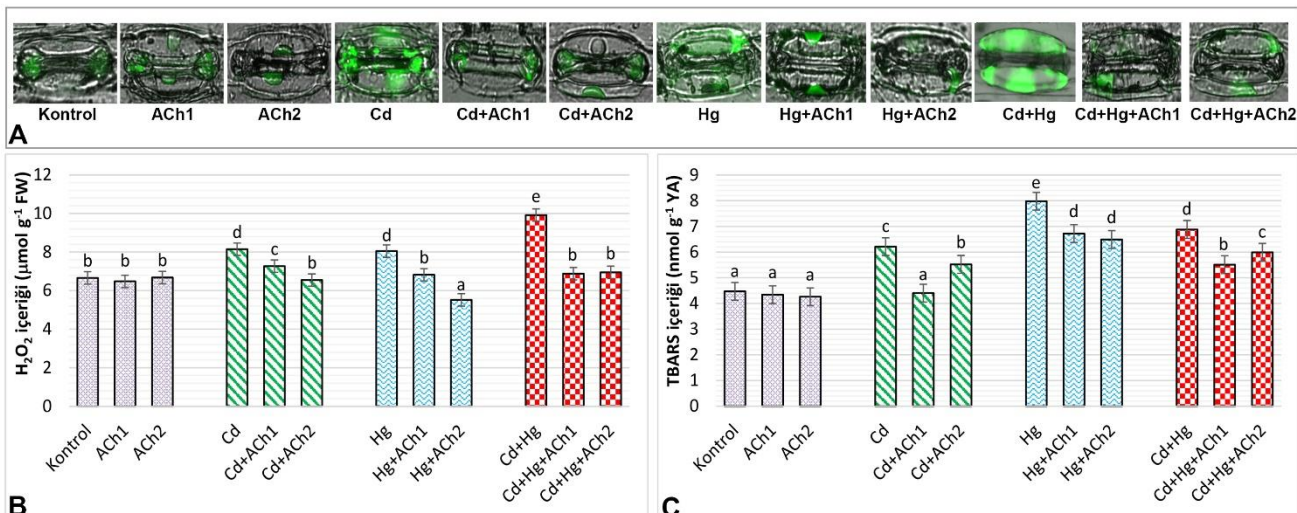
Şekil 4.4. Kadmiyum ve /veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin (ACh) uygulamalarının JIP test parametreleri üzerine etkileri

Bu çalışmada, JIP testini kullanarak buğday bitkilerinde Cd ve Hg stresinin PSII fotokimyasına etkisini araştırdık. Bu test, fotosentetik sistemin stres koşullarına nasıl adapte olduğunu anlamada yardımcı olur (Mathur ve ark., 2013). Cd ve Hg stresi altında TRo/RC,

ABS/RC ve DIO/RC değerleri artarak, PSII'nin reaksiyon merkezine enerji akışını engellemiştir. Bu sonuçlar Zhuo ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmayla tutarlıdır. Buğday bitkilerine uygulanan iki doz ACh uygulaması, Cd ve Hg stresinin fotosentez üzerindeki etkilerini azaltmıştır. Bu azalma, reaksiyon merkezine enerji akışında bir artışa yol açmıştır. DIO/RC değeri Cd ve Hg stresine maruz kalan gruplarda artarken, ACh ile muamele edilen gruplarda bir azalma gözlenmiştir. Bu azalma, aktif reaksiyon merkezlerinin uyarılmış ve artan foton yakalama kapasitesini gösterir. PI_{total} ve PI_{ABS} performans indeksleri, stres koşulları altında bitkilerin fotosentetik reaksiyonlarını analiz etmek için yenilikçi parametrelerdir. Bu çalışmada, ACh uygulamalarının Cd ve Hg stresi altında PI_{total} 'ı artırdığını ve bu durumun buğday yapraklarında PSII'nin fotokinetik aktivitelerinin genel performansını iyileştirdiğini göstermektedir.

4.4. Cd ve/veya Hg Stresi Altındaki Buğday Bitkilerine Asetilkolin Uygulamalarının Oksidatif Stres Belirteçleri Üzerindeki Etkileri

Şekil 4.5A, buğday yapraklarındaki bekçi hücrelerde ROS birikimini tüm uygulama grupları için göstermektedir. Cd ve/veya Hg'ye maruz kalan bitki yapraklarında H_2O_2 birikimi önemli derecede artmıştır. H_2O_2 içeriği sonuçlarıyla tutarlı olarak, ACh uygulamaları stres altındaki bitkilerde H_2O_2 birikimini sınırlamıştır. Kontrole kıyasla ACh uygulamaları arasında buğday yapraklarındaki H_2O_2 ve TBARS içeriklerinde bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.5B-C). Ancak, H_2O_2 birikimi Cd, Hg ve Cd+Hg gruplarında sırasıyla %22, %20 ve %48 artmıştır. ACh uygulamaları, stres koşulları altında radikal birikimini önlemede başarılı olmuştur. Tüm stres+ACh uygulama gruplarında H_2O_2 ve TBARS içeriklerinde azalma ve oksidatif stresin hafifletilmesi gözlemlenmiştir.



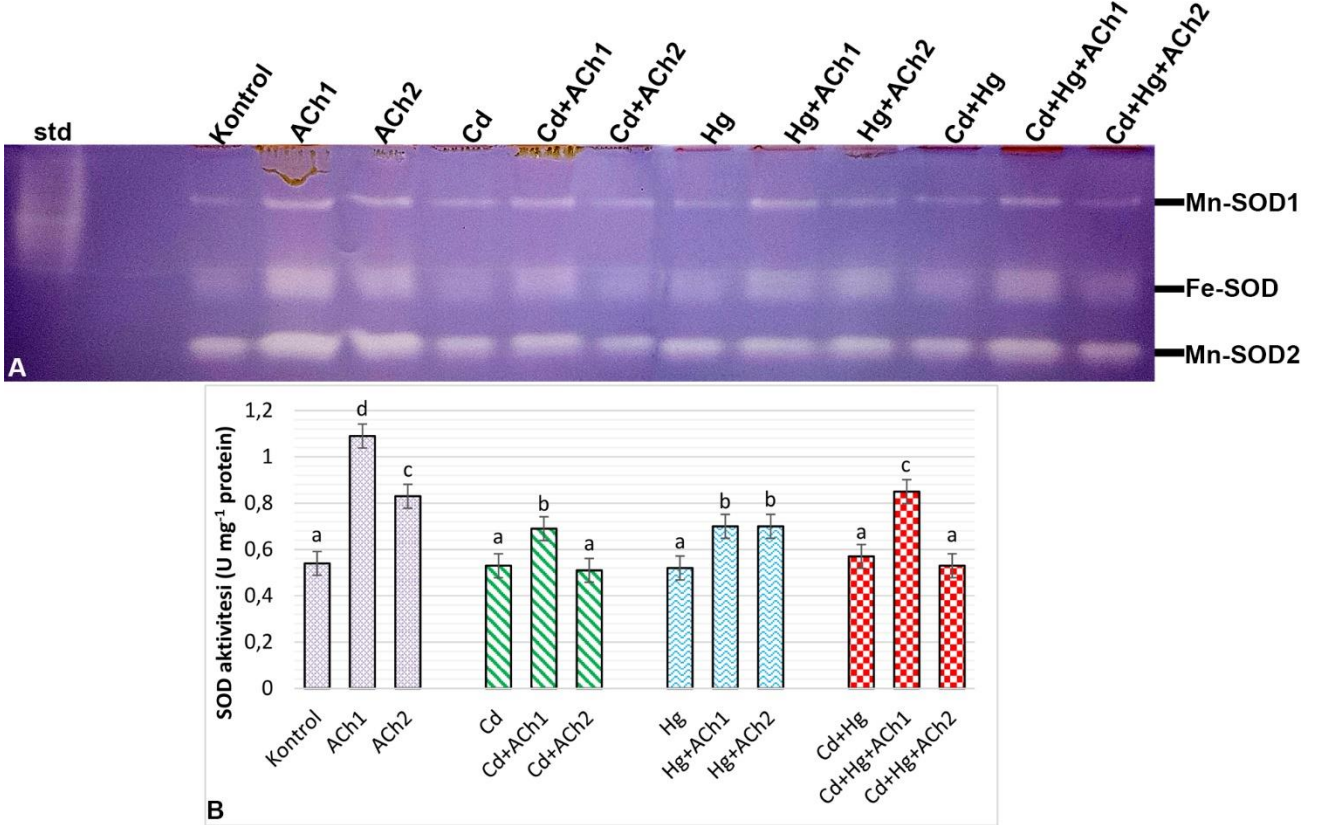
Şekil 4.5. Kadmiyum ve/veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin (ACh) uygulamalarının stomalarda ROS birikimi (A), H₂O₂ içeriği (B) ve TBARS içeriği (C) üzerine etkileri

Ağır metaller fotosentetik süreçleri bozar ve bu durum bitkilerde ROS seviyelerinde artışa yol açar, bu da doğrudan veya dolaylı olarak oksidatif hasara neden olmaktadır (Sharma ve ark., 2020). Fotosentez ve solunum sırasında elektron transferinde yan ürün olarak •OH, O₂^{•-} ve H₂O₂ gibi ROS'lar üretilir (Kadukova ve Kavuličova, 2011). ROS, bitkiler ve diğer organizmalarda birçok sinyal rolü oynamaktadır (Mittler, 2017). Stres koşulları altında ROS'un başlıca kaynakları arasında yağ asitlerinin β-oksidasyonu, mitokondri ve kloroplastların elektron taşıma zincirlerindeki bozulmalar, artan fotorespirasyon ve NOX aktivitesi bulunur (Abdelgawad ve ark., 2015; Cassia ve ark., 2018). Anjum ve ark. (2015), mısır bitkilerinde Cd maruziyeti ile H₂O₂ ve MDA içeriğinde bir artış gözlemlenmiştir. Bu çalışmada, Cd, Hg ve Cd+Hg koşulları altında TBARS içeriğinde bir artış gözlemlenmiştir, ACh1 ve ACh2 uygulamalarının ise ağır metal stresi yanıtında ozmotik ayar yoluna katıldığı ve böylece hücre zarı stabilitesini koruduğu düşünülmektedir (Su ve ark., 2020a).

4.5. Cd ve/veya Hg Stresi Altındaki Buğday Bitkilerine Asetilkolin Uygulamalarının Antioksidan Enzim Profillerine Etkileri

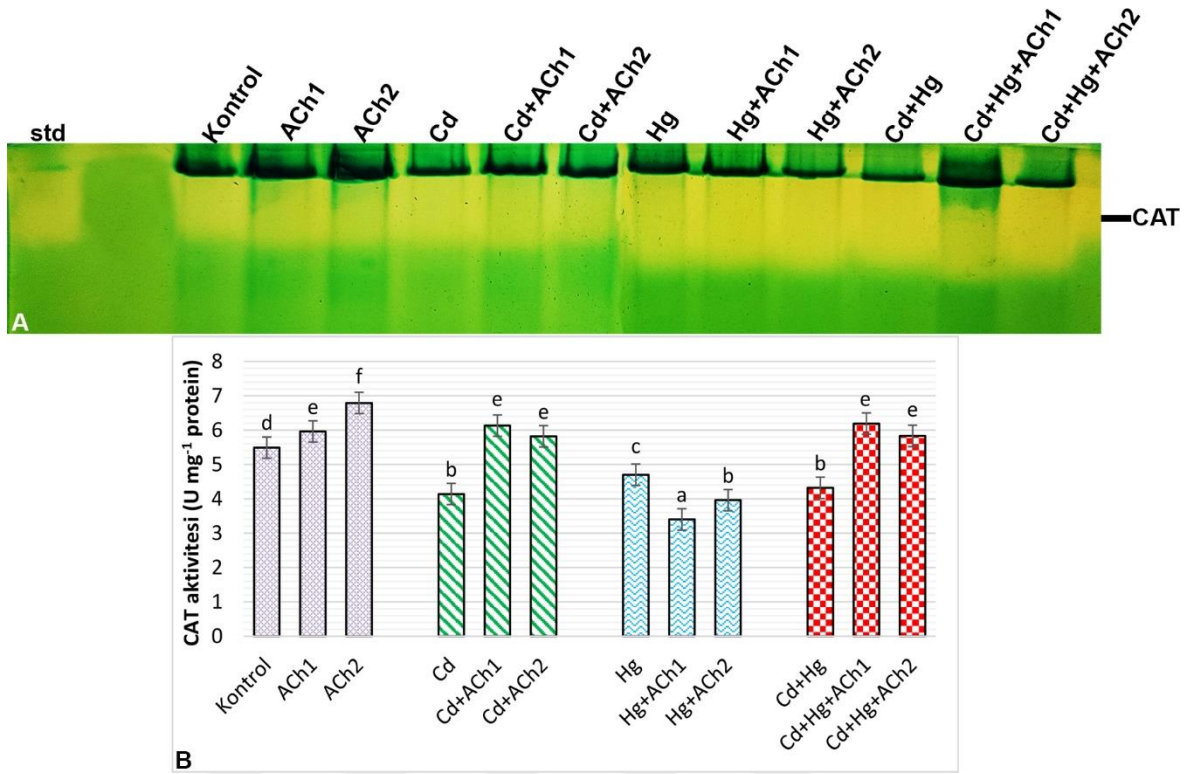
Buğday yapraklarında SOD enzimi için yapılan native PAGE analizinde 3 izoenzim tanımlanmıştır (Mn-SOD1-2 ve Fe-SOD) (Şekil 4.6A). Yalnız ACh1 ve ACh2 uygulanan gruplarda, kontrol koşullarına kıyasla SOD aktivitesinde bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.6B). Cd+ACh1 uygulaması, Cd koşullarına kıyasla toplam SOD aktivitesini %30 artırmıştır. ACh1 uygulaması, Cd ve Cd+Hg stres koşullarında SOD aktivitesini tetiklemekte başarılı

olmuş ve her iki ACh uygulaması da Hg maruziyeti altında SOD aktivitesini artırmıştır. SOD aktivitesi, iki Haber-Weiss tepkimesinin substratları olan $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 'nin relatif miktarlarını modüle eder ve hidroksil radikali oluşumu tehdidini azaltır; bu radikal büyük ölçüde reaktif olup zararlıdır ve membranlara, proteinlere ve DNA'ya ciddi hasar verebilir (Zhang ve ark., 2007). Bu çalışmada, kontrol grubuna kıyasla Cd ve Hg stresi altında SOD aktivitesinde bir fark gözlenmemiştir. Benzer şekilde, Zhang ve ark. (2015) abiyotik stres altında çeltik bitkilerinde SOD aktivitesinde bir değişiklik gözlememiştir.



Şekil 4.6. Kadmiyum ve/veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin (ACh) uygulamalarının süperoksit dismutaz (SOD) izoenzimlerinin bant yoğunluğu (A) ve toplam SOD aktivitesi (B) üzerine etkileri

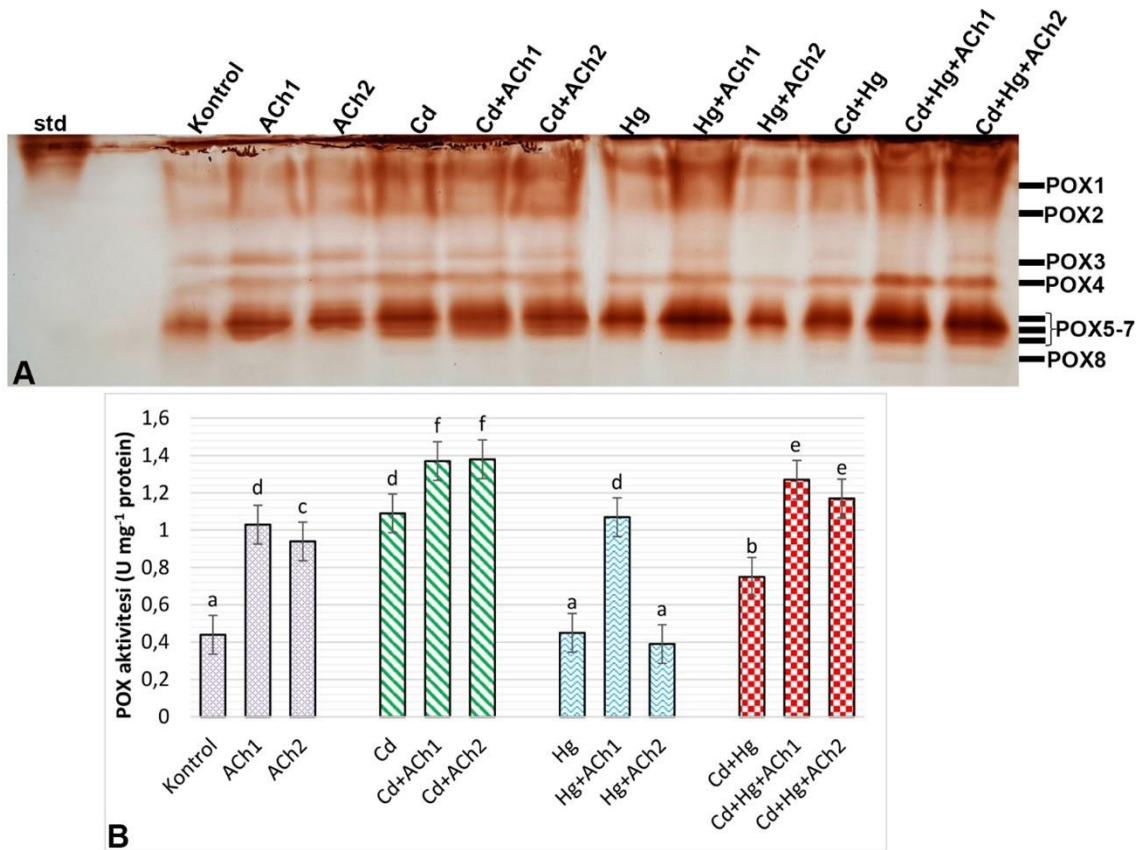
CAT izozimlerini tespit etmek için gerçekleştirilen elektroforetik ayırım sonucunda yalnızca 1 izoenzim bandı tespit edilmiştir (Şekil 4.7A). ACh1 uygulanan bitkilerde hafif bir artış gözlenmişken, ACh2 ile muamele edilen yapraklarda yaklaşık %24'lük bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.7B). Cd, Hg ve Cd+Hg uygulamaları, kontrol koşullarına kıyasla CAT aktivitesinde sırasıyla %24, %14 ve %21'lik bir azalmaya neden olmuştur. Hg+ACh1 ve Hg+ACh2 gruplarında da CAT aktivitesi azalmıştır. Cd ve kombine stres gruplarında ACh1 ve ACh2 uygulamalarıyla yüksek CAT aktivitesi belirlenmiştir.



Şekil 4.7. Kadmiyum ve/veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin (ACh) uygulamalarının katalaz (CAT) izoenzimlerinin bant yoğunluğu (A) ve toplam CAT aktivitesi (B) üzerine etkileri

H₂O₂ gibi reaktif oksijen türlerinin birikimi ve toksisitesine karşı ana savunma mekanizmasıyla ilişkili olan CAT, bitki hücrelerindeki H₂O₂ içeriğini azaltmada rol oynar. CAT enzimi H₂O₂'yi doğrudan su ve oksijene dönüştürür. CAT aktivitesinin ağır metal stresi tarafından uyarılan aşırı ROS üretimini nötralize ettiği düşünülmektedir (Malar ve ark., 2016). Ancak, bu çalışmada Cd, Hg ve Cd+Hg koşulları altında CAT aktivitesinde bir azalma gözlemlenmiştir. Bu azalmanın, H₂O₂ giderici antioksidan enzimlerin (APX ve POX) artan aktivitesi ile telafi edildiği düşünülmektedir.

Buğday yapraklarında 8 POX izozimi tespit edilmiştir (POX1-8) (Şekil 4.8A). ACh1 ve ACh2 uygulamasının, kontrol koşullarına kıyasla POX aktivitesini 2 katından fazla artırdığı belirlenmiştir (Şekil 4.8B). POX aktivitesi Cd koşullarında 2.4 kat artarken, ACh uygulamaları bu aktiviteyi %25 daha artırmıştır. Hg ile maruz kalan buğday yapraklarının POX aktivitesinde kontrolle kıyaslandığında bir değişiklik gözlenmemiştir, ancak Hg + ACh1 uygulaması POX aktivitesini 2.3 kat artırmıştır. Kombine stres (Cd+Hg) grupları, POX aktivitesinde %70 artışa neden olmuş ve ACh1 uygulaması yaklaşık %70 daha fazla artış sağladığı gözlemlenmiştir.

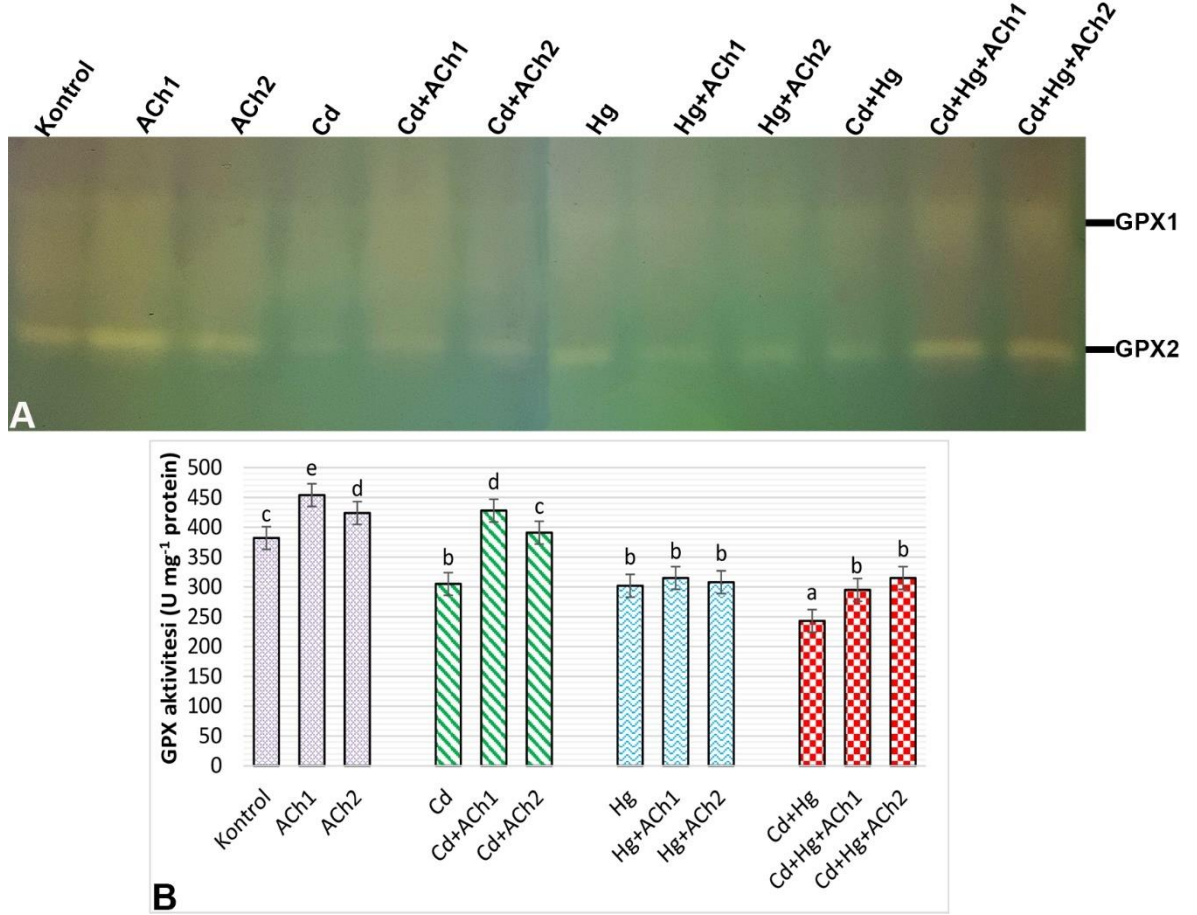


Şekil 4.8. Kadmiyum ve/veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin (ACh) uygulamalarının peroksidad (POX) izoenzimlerinin bant yoğunluğu (A) ve toplam POX aktivitesi (B) üzerine etkileri

Cd ve Cd+Hg koşullarında POX aktivitesi artarken, GPX aktivitesi azalmıştır. Bu POX aktivitesindeki artış, hücrel bileşenleri oksidasyondan koruyan bir savunma mekanizması olarak işlev görebilir (Kumar ve ark., 2023). Stres+ACh uygulamaları genel olarak POX aktivitesinde artışa yol açmıştır. Bu bulgu, brassinosteroid uygulaması sonrasında artmış POX aktivitesini bildiren Soares ve ark. (2020) ile uyumludur. Ancak, Hg+ACh2 grubunda POX aktivitesinde önemli bir azalma gözlenmiştir ve bu birkaç faktörden kaynaklanabilir. Ağır metaller ve ACh arasındaki etkileşim, POX aktivitesini etkileyebilir. Hg, POX sistemini aşan bir stres yanıtı tetikleyebilir veya ACh'ın POX'u tipik olarak aktive etmesini engelleyebilir. Dey ve ark. (2007)'da farklı ağır metallerin buğday yaprakları ve köklerinde POX aktivitesini çeşitli şekillerde etkilediğini belirtmiştir. Ayrıca, yüksek ACh konsantrasyonları (örneğin, ACh2) antioksidan savunma sisteminde olumsuzluk yaratabilir ve bu da POX aktivitesinin azalmasına yol açabilir.

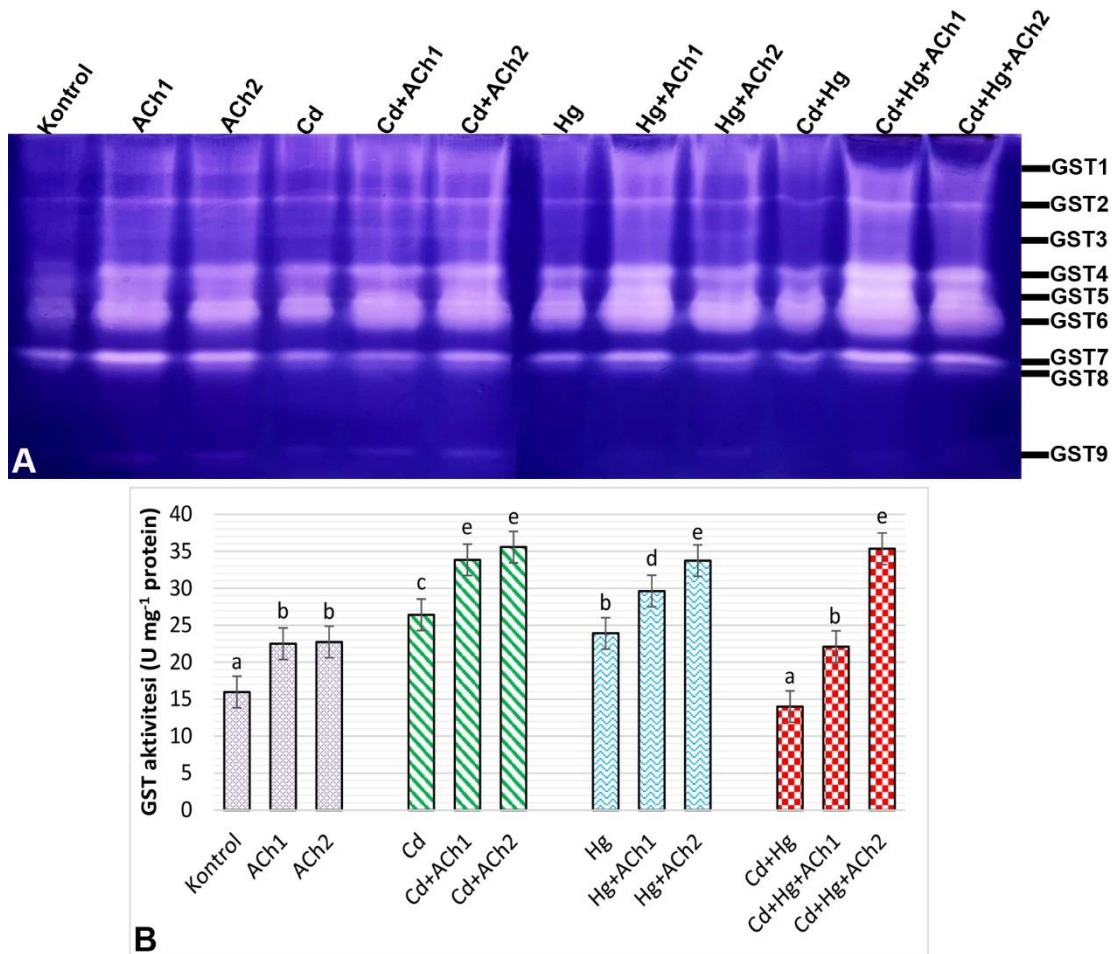
GPX enzimi için native PAGE analizinde 2 izoenzim tespit edilmiştir (Şekil 4.9A). Kontrol koşullarına kıyasla, ACh1 ve ACh2 uygulamaları tek başına daha yüksek GPX aktivitesi göstermiştir (Şekil 4.9B). Cd, Hg ve Cd+Hg koşullarında GPX aktivitesi sırasıyla %20, %20 ve %36 oranında azalmıştır. Cd stresine kıyasla, Cd+ACh1 GPX aktivitesini %40

ve Cd+ACh2 GPX aktivitesini %28 artırmıştır. Hg koşulunda ise ACh uygulama grupları arasında istatistiksel bir değişiklik gözlenmemiştir. Cd+Hg grubuna kıyasla, ACh'nin etkisi GST aktivitesinde Cd+Hg+ACh1 grubunda %21 ve Cd+Hg+ACh2 grubunda yaklaşık %30 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.9. Kadmiyum ve/veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin (ACh) uygulamalarının glutasyon peroksidaz (GPX) izoenzimlerinin bant yoğunluğu (A) ve toplam GPX aktivitesi (B) üzerine etkileri

Deneysel süreçte buğday yapraklarında GST enzimine ait 9 izoenzim bandı belirlenmiştir (Şekil 4.10A). Kontrol koşullarıyla karşılaştırıldığında, ACh1 ve ACh2 uygulamaları toplam GST aktivitesini %40 artırmıştır (Şekil 4.10B). Cd ve Hg stres gruplarının GST aktiviteleri sırasıyla %65 ve %49 yükselmiştir. Stres altında tüm ACh uygulamaları GST aktivitelerini yükseltmiştir.

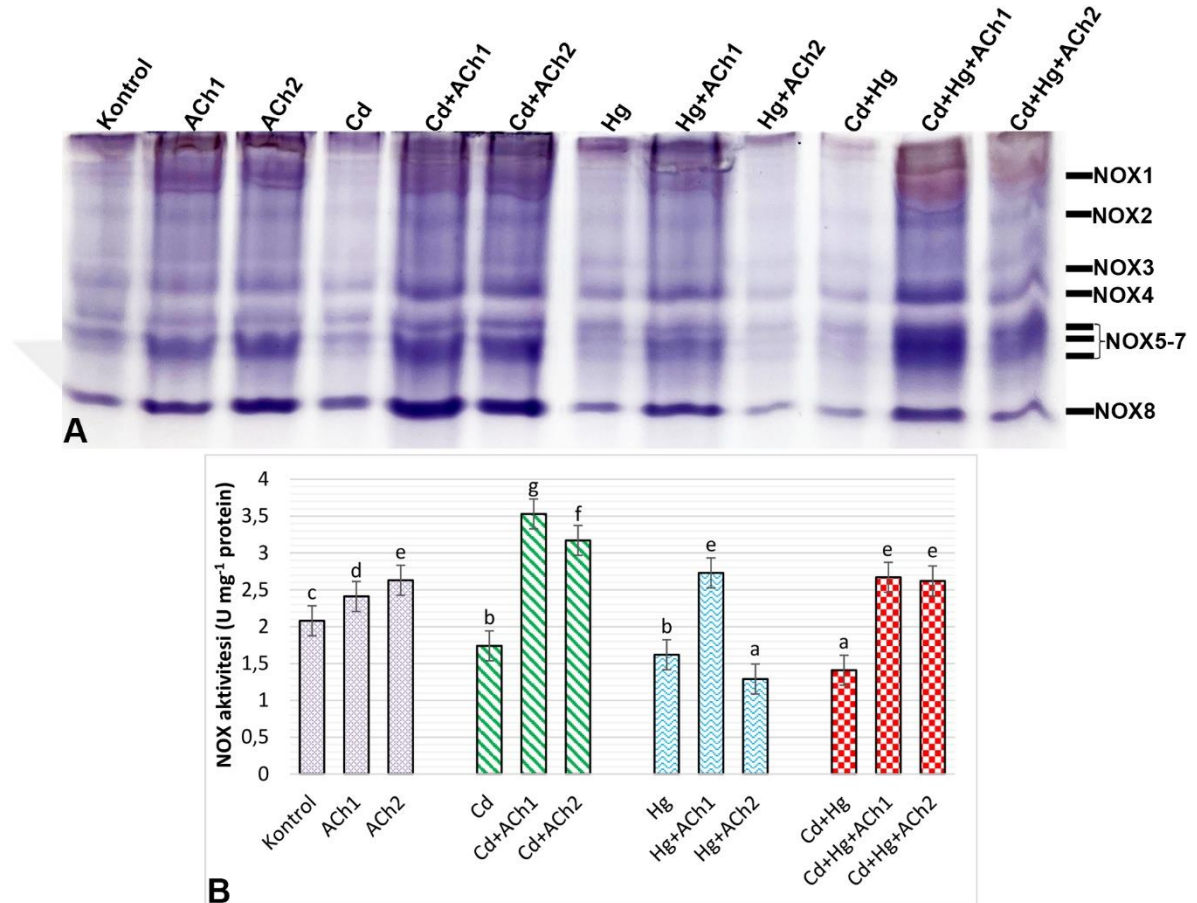


Şekil 4.10. Kadmiyum ve/veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin (ACh) uygulamalarının glutatyon S-transferaz (GST) izoenzimlerinin bant yoğunluğu (A) ve toplam GST aktivitesi (B) üzerine etkileri

İncelenen jel görüntüleri ile buğday yapraklarında NOX enzimi için 8 izoenzim bandı gözlenmiştir (Şekil 4.11A). Kontrol koşullarıyla karşılaştırıldığında, ACh1 ve ACh2 uygulamaları sırasıyla NOX aktivitesini %15 ve %26 artırmıştır (Şekil 4.11B). NOX aktivitesi, Cd, Hg ve Cd+Hg gruplarında sırasıyla %16, %22 ve %32 azalmıştır. ACh1 uygulanan gruplar NOX aktivitesinde artış göstermiştir. Bu gruplardan biri olan Cd+ACh1, NOX aktivitesini 2 kat artırarak en yüksek değeri göstermiştir. Ancak, Hg+ACh2 koşulunda NOX aktivitesinde %20 azalış meydana gelmiştir.

NOX, sitoplazmada NADPH'den oksijene elektron transferini katalize eder, bu da bitkilerde stres koşullarında $O_2^{\bullet-}$ üreterek savunma yanıtını tetikler ve ayrıca H_2O_2 kaynağı olarak hizmet etmektedir (Dumanović ve ark., 2021). Cd+Hg koşulları altında NOX aktivitesindeki azalma, Cd ve Hg tarafından uyarılan $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 birikimi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Maksymiec ve Krupa, 2006). ACh uygulamaları hem normal hem de stres koşullarında NOX aktivitesini başarıyla artırmış, ancak bu etki Hg+ACh2 grubunda gözlenmemiştir. Hg stresine göre karşılaştırıldığında Hg+ACh2 grubunda daha düşük NOX

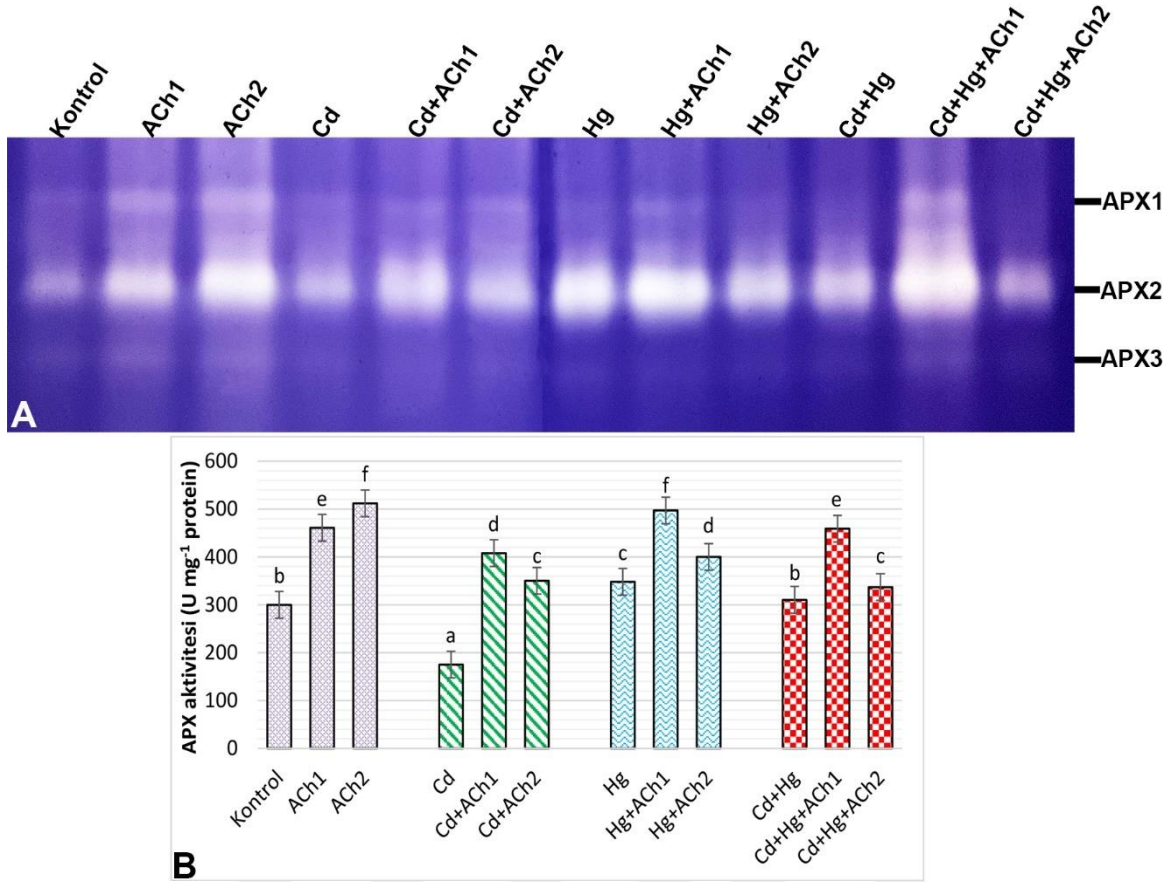
aktivitesi, yüksek ACh konsantrasyonunun NOX enziminin düzenlenmesini etkilemiş olabileceğini düşündürebilir. ACh, Hg varlığında oksidatif stres yollarını farklı şekilde etkileyebilir ve bu da NOX aktivitesinin azalmasına yol açabilir. Ayrıca, bu grupta H₂O₂ seviyelerinin en düşük olması, NOX aktivitesine olan talebin azalmış olabileceğini öne sürmektedir (Wei ve ark., 2020).



Şekil 4.11. Kadmiyum ve/veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin (ACh) uygulamalarının NADPH oksidaz (NOX) izoenzimlerinin bant yoğunluğu (A) ve toplam NOX aktivitesi (B) üzerine etkileri

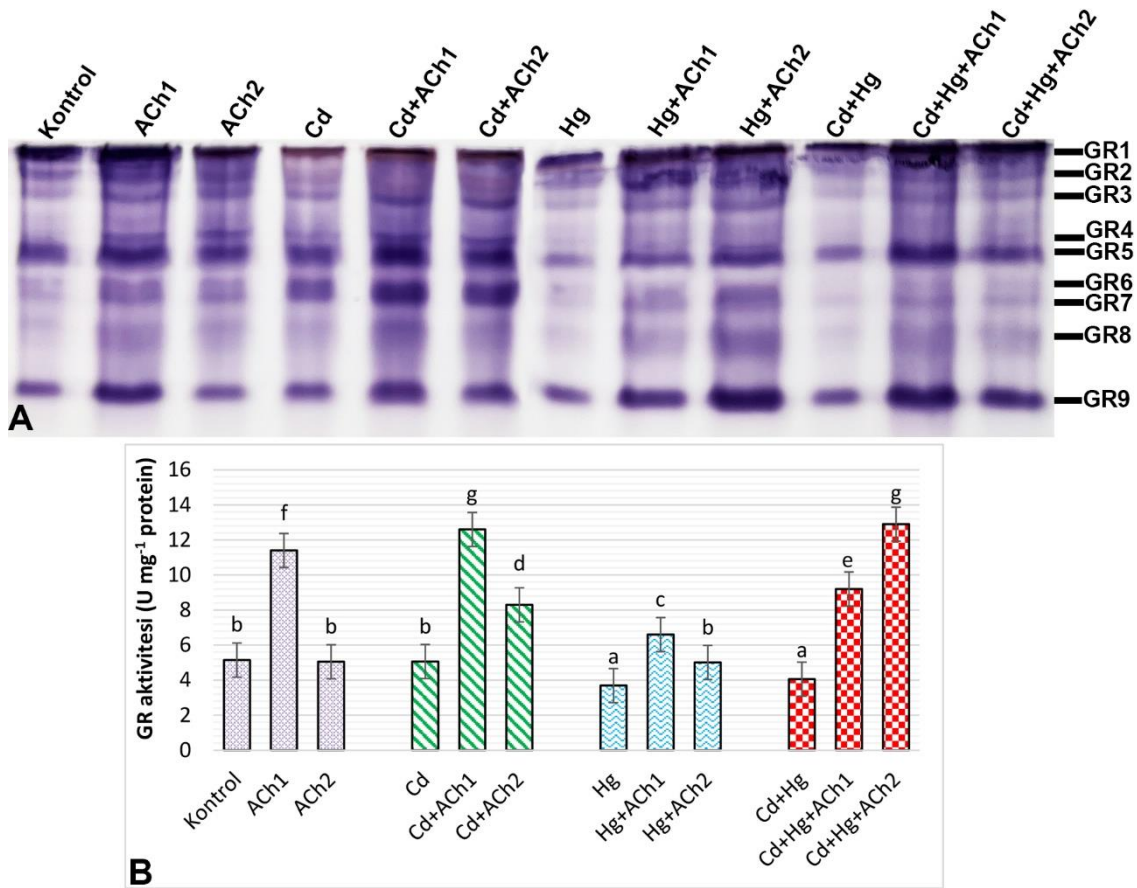
4.6. Cd ve/veya Hg Stresi Altındaki Buğday Bitkilerine Asetilkolin Uygulamalarının AsA-GSH Döngüsü Üzerindeki Etkileri

APX jeli ile 3 izoenzim tanımlanmıştır (Şekil 4.12A). Kontrol koşullarına kıyasla, ACh1 ve ACh2 uygulamaları buğday yapraklarında toplam APX aktivitesini sırasıyla %53 ve %70 artırmıştır (Şekil 4.12B). Cd stresi APX aktivitesini %41 azaltırken, Hg stresi %16 artırmıştır. Stres koşullarına tek başına uygulamalara kıyasla, tüm ACh uygulamaları APX aktivitesini artırmıştır ve en yüksek aktivite artışı ile Cd+ACh1 grubunda belirlenmiştir.



Şekil 4.12. Kadmiyum ve/veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin (ACh) uygulamalarının askorbat peroksidaz (APX) izoenzimlerinin bant yoğunluğu (A) ve toplam APX aktivitesi (B) üzerine etkileri

Buğday yapraklarında GR enzimine ait 9 izoenzim tespit edilmiştir (Şekil 4.13A). Cd stresi GR aktivitesinde bir değişikliğe neden olmazken, Hg ve Cd+Hg uygulamalarında kontrol koşullarına kıyasla %20'den fazla azalma görülmüştür (Şekil 4.13B). Stres koşullarında tüm ACh uygulamaları GR aktivitesini artırmıştır. Ancak, Cd+Hg kombine uygulamasında, tek stres gruplarının aksine, ACh2 uygulama dozu GR aktivitesini 3 kat artırarak daha başarılı olmuştur.

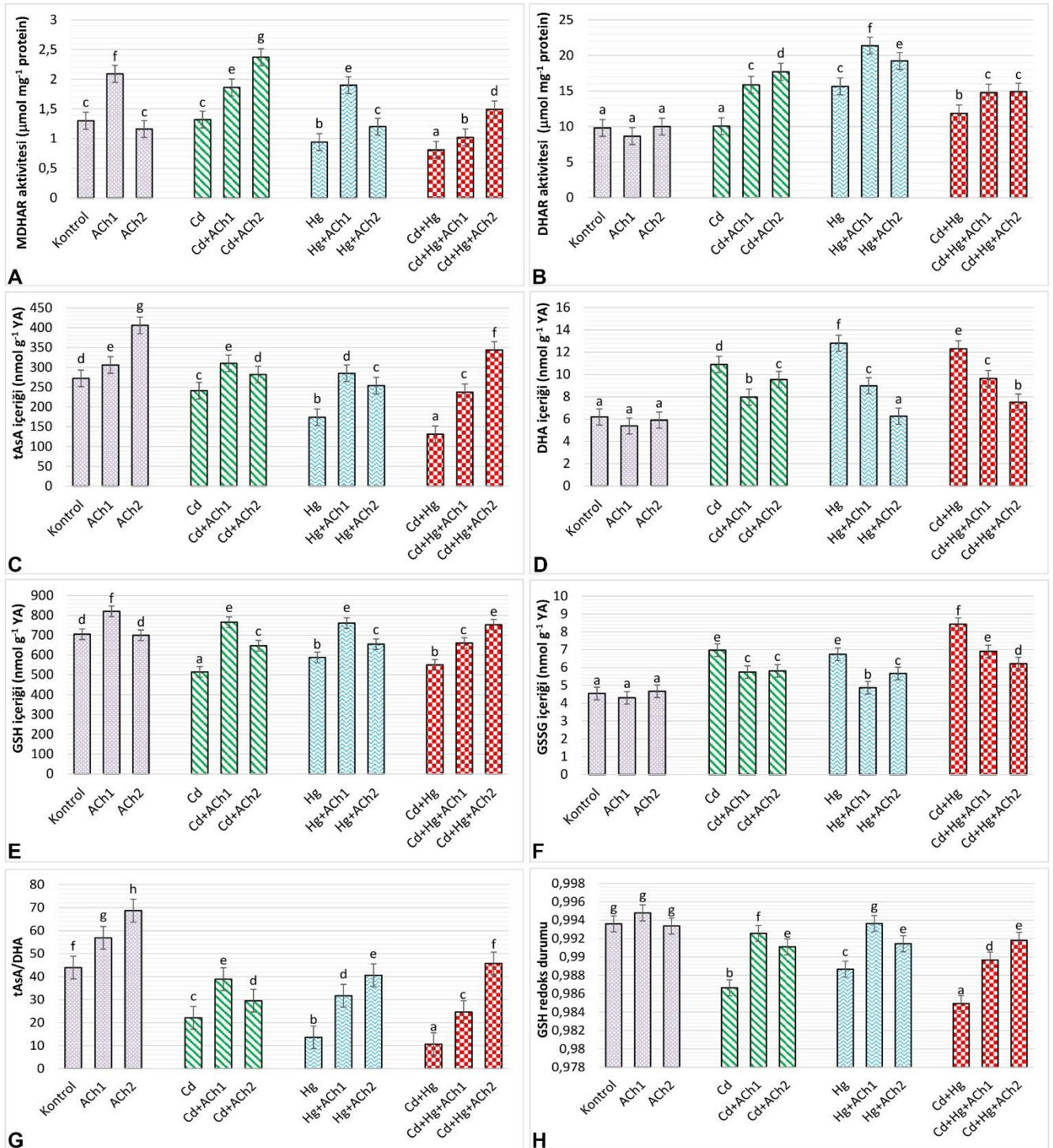


Şekil 4.13. Kadmiyum ve/veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin (ACh) uygulamalarının glutatyon redüktaz (GR) izoenzimlerinin bant yoğunluğu (A) ve toplam GR aktivitesi (B) üzerine etkileri

Kontrol koşullarına göre buğday fidelerine uygulanan ACh1 uygulamasında MDHAR aktivitesinde %60 artış gözlenmiştir (Şekil 4.14A). Hg ve Cd+Hg koşulları MDHAR aktivitesini sırasıyla %27 ve %37 azaltmıştır. Cd'ye kıyasla, Cd+ACh1 uygulamasında %40 ve Cd+ACh2 grubunda yaklaşık %80 artış tespit edilmiştir. Stres gruplarına göre, Hg+ACh1 uygulaması MDHAR aktivitesini 2 kat artırmış ve Cd+Hg+ACh2 grubundaki fidelerde %84 artış sağlamıştır. Kontrol koşullarına kıyasla, uygulanan ACh uygulamaları DHAR aktivitesinde bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 4.14B). Benzer şekilde, Cd stresi DHAR aktivitesinde kontrolle kıyaslandığında bir fark yaratmamıştır. Ancak, Cd+ACh1 ve Cd+ACh2 gruplarında sırasıyla %57 ve %76 artış görülmüştür. Hg+ACh1 ve Hg+ACh2 uygulamaları DHAR aktivitesini sırasıyla %36 ve %22 artırmıştır. Kombine stres gruplarında (Cd+Hg+ACh1 ve Cd+Hg+ACh2), DHAR aktivitesinde Cd+Hg'ye kıyasla %25 artış gözlenmiştir. Kontrolle kıyasla, ACh1 uygulaması tAsA içeriğini %12 ve ACh2 uygulaması yaklaşık %50 artırmıştır (Şekil 4.14C). Cd, Hg ve Cd+Hg koşulları tAsA içeriğini sırasıyla %11, %36 ve %51 azaltmıştır. Stres gruplarında ACh uygulamaları tAsA içeriğini artırmıştır. Stres maruziyeti (Cd, Hg, Cd+Hg) buğday

yapraklarında DHA içeriğini artırmıştır (Şekil 4.14D). Ancak, ACh uygulanan gruplarda (Cd+ACh1, Cd+ACh2, Hg+ACh1, Hg+ACh2) stres gruplarına kıyasla bir azalma gözlenmiştir. Benzer şekilde, kombine stres (Cd+Hg) koşuluna kıyasla, Cd+Hg+ACh1 ve Cd+Hg+ACh2 gruplarında DHA içeriği sırasıyla %21 ve yaklaşık %40 azalmıştır.

ACh1 uygulamasıyla GSH içeriği kontrolle kıyaslandığında %16 artış göstermiştir (Şekil 4.14E). Tüm stres koşulları GSH içeriğinde azalmaya neden olmuştur. Ancak, Cd+ACh1 ve Hg+ACh1 uygulamaları sırasıyla %48 ve %29 artış sağlamıştır. Kombine stres uygulamasına göre, Cd+Hg+ACh2 grubu %36 artış sağlamıştır. Tüm stres+ACh uygulamaları buğday yapraklarında GSSG birikimini azaltmıştır (Şekil 4.14F). ACh1 ve ACh2 uygulamaları tAsA/DHA oranını sırasıyla yaklaşık %30 ve %56 artırmıştır, ancak stres gruplarında (Cd, Hg, Cd+Hg) bir azalma gözlenmiştir (Şekil 4.14G). Cd+ACh1 ve Cd+ACh2 grupları Cd koşuluna kıyasla sırasıyla %76 ve %33 artış sağlamıştır. Hg+ACh1 ve Hg+ACh2 uygulamaları tAsA/DHA oranını sırasıyla 2.3 kat ve yaklaşık 3 kat artırmıştır. Cd+Hg+ACh1 ve Cd+Hg+ACh2 gruplarında sırasıyla 2.3 kat ve 4.2 kat artış sağlamıştır. ACh1 ve ACh2 uygulamalarının GSH redoks durumunda kontrolle kıyaslandığında istatistiksel bir fark yaratmadığı görülmüştür (Şekil 4.14H). Tüm stres maruziyetleri GSH redoks durumunu azaltırken, ACh uygulamaları stresin GSH üzerindeki etkilerini azaltmada başarılı olmuştur.



Şekil 4.14. Kadmiyum ve/veya cıva stresi altındaki buğday yapraklarında asetilkolin (ACh) uygulamalarının monodehidroaskorbat redüktaz aktivitesi (MDHAR, A), dehidroaskorbat redüktaz aktivitesi (DHAR, B), toplam askorbat içeriği (tAsA, C), dehidroaskorbat içeriği (DHA, D), glutasyon içeriği (GSH, E), oksitlenmiş glutasyon içeriği (GSSG, F), AsA/DHA oranı (G) ve GSH redoks durumu (H) üzerine etkiler

Bitkilerde, AsA ve GSH gibi antioksidanlar, metal kirliliği tarafından tetiklenen oksidatif stresi hafifletmede temel roller oynamaktadır. Her iki antioksidanın içeriği de ROS'un uzaklaştırılmasında ve hücrel redoks tamponlamanın korunmasında rol oynadığı öne sürülmüştür (Kaya ve ark., 2020). AsA, bitki hücrelerinde aşırı H_2O_2 birikimini

önerirken, GSH, bitkilerde bir ROS temizleyicisi olarak önemli bir rol oynamaktadır (Yan ve ark., 2018). Sonuçlarımıza göre, Cd ve Hg stresi koşullarında AsA ve GSH içerikleri azalmıştır; bu, Nahar ve ark. (2016) tarafından mercimeklerde ve Ahmad et al. (2018) tarafından domates bitkilerinde elde edilen sonuçlarla desteklenmektedir. Bitkiler, antioksidan ve/veya redoks enzimler ile antioksidan metabolitleri elektron alıcıları olarak kullanarak ağır metal kaynaklı oksidatif stresi hafifletebilirler (Hu ve ark., 2019; Jung ve ark., 2020). Sonuçlarımıza göre, stres koşullarında askorbat içeriği ve AsA/DHA oranı azalmış, bu da ağır metal alımına bağlı oksidatif hasara yol açmıştır; bu durum, birçok çalışmada gözlemlenen ROS oluşumunun ve lipid peroksidasyonunun artışı ile tutarlıdır (Foyer ve Noctor, 2011; Hasanuzzaman ve ark., 2017). MDHAR ve DHAR, AsA'nın oksidatif formu olan DHA'nın yenilenmesinde rol oynamaktadır (Hasanuzzaman ve ark., 2012). Ancak, Cd, Hg ve Cd+Hg uygulamaları altında, MDHAR, GR, tAsA/DHA ve GSH içeriğindeki azalma ve GSH redoks durumundaki bozulma, AsA-GSH döngüsü aracılığıyla temizleyici antioksidanların üretimine yol açmamıştır. Ayrıca, DHAR enzim aktivitesinin arttığı gözlemlenmiş ve bu artış, DHAR tarafından üretilen AsA'nın diğer metabolik fonksiyonlar tarafından kullanıldığını göstermektedir (Fotopoulos ve ark., 2010). ACh uygulaması, belirli antioksidan enzimlerin etkinliğini artırmış ve AsA ve GSH seviyelerini yükseltmiştir.

Bu sonuçlar, aşırı ROS'u nötralize etme potansiyelinin arttığını göstermiştir. Bulgularımızla tutarlı olarak, Qin ve ark. (2021), Cd ve tuzluluk stresleri altında ACh uygulamasının antioksidan sistemin fonksiyonelliğini artırdığını belirtmiştir. Eksternal olarak uygulanan ACh, bitkilerde antioksidan sistemin artmış fonksiyonelliği ve ROS birikiminin azalması gibi belirgin özellikler sergilemektedir. ACh dahil olmak üzere nörotransmitterlerin, bitkilerde antioksidan fonksiyonelliği artırarak oksidatif hasarı hafifletmedeki rolünün oldukça çok olduğunu göstermektedir (Saleh, 2024).

Tez çalışmamızda, ACh uygulamasının buğday yapraklarında ağır metal stresine karşı tolerans geliştirdiği gözlemlenmiştir. Bu durum, ACh'nin hücre duvarının daha fazla ağır metal tutma kapasitesini artırdığı, ağır metallerin vakuollerde toplanmasına ve sonrasında sitozol ile birlikte ko-presipitat oluşumuna yardımcı olduğuna dair önceki gözlemlerle açıklanabilmektedir (Su ve ark., 2020a).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Ağır metal stresi, buğday fidelerinin RGR ve RWC'sinde bir azalmaya neden olmuştur. Cd ve/veya Hg koşulları, A, gs, E, Ci'nin azalması ve stoma sınırlamalarının artmasıyla kanıtlandığı gibi, stoma inhibisyonuna yol açmıştır. ACh1 ve ACh2, stres gruplarında gözlemlenen RGR ve RWC üzerindeki olumsuz etkileri olumlu şekilde azaltmıştır. ACh uygulaması, stres koşullarının gaz değişim parametreleri üzerindeki etkilerini ortadan kaldırmıştır. Dahası, bulgularımız Cd ve/veya Hg stresi altında buğday yapraklarında ROS birikimini ve lipid peroksidasyonunu vurgulamıştır. Bununla birlikte, ACh uygulaması antioksidan enzimlerin aktivitelerini etkili bir şekilde desteklemiş ve böylece ağır metallerin neden olduğu oksidatif hasarı azaltmıştır. Özetle, çalışmamız ACh uygulamasının bitkilerde stres toleransı sağlama ve ağır metal toksisitesinin olumsuz etkilerini azaltma potansiyelini vurgulamaktadır. Bulgular, çevresel stres faktörleri karşısında bitki toleransını artırmak, sürdürülebilir tarım uygulamalarına ve gıda güvenliğine katkıda bulunmak için yeni stratejilere ilişkin değerli bilgiler sunmaktadır.

5.2. Öneriler

Bitkiler, yeryüzündeki temel besin kaynağıdır. Ağır metal toksisitesi ise sadece bitki fizyolojisini olumsuz yönde etkilemekle kalmayıp aynı zamanda tarımsal verim kaybının büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Bitkilerin ağır metal stresine tolerans ve direncini artırmak adına gerçekleştirdiği moleküler ve hücrel adaptasyonlar besin zincirinde daha az ağır metal birikimine neden olmaktadır. Bu da araştırılması gereken önemli bir olgudur. Bitkilerin ağır metal toksisitesine karşı tolerans stratejilerini gösteren birçok literatür çalışması bulunmaktadır. Fakat artan nüfus yoğunluğu ile giderek azalan temel besin kaynakları için tarımsal üretimin iyileştirilmesi, olumsuz çevre şartlarının bitki gelişimini engelleyen biyolojik süreçlerin iyileştirilmesi ve verimin artırılması için çalışmaların artırılması gerekmektedir. Bu tez çalışmasında asetilkolinin ağır metal stresine maruz kalan bitkilerin büyüme parametreleri ve enzimatik süreçlerini açıklayıcı niteliktedir.

Tez çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular asetilkolinin bitkilerin ağır metal stresine karşı etkilerini açığa çıkarabilir ve gelecekteki çalışmalara ışık tutabilecek niteliktedir. Bu tez kapsamında asetilkolinin bitkilerde ağır metal toksisitesine karşı toleransı arttırdığını ve iyileştirici etkileri olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda asetilkolin uygulamalarının etkilerini içeren bu tez çalışmasının ileriki çalışmalara yol gösterici bir kaynak olacağı ön görülmektedir. Ayrıca bu tez çalışmasının literatür için yeni bilgiler içermesi ve daha önce benzer bir çalışma bulunmamasının, Türkiye ve dünyadaki bu alanda yapılan çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbas, T., Rizwan, M., Ali, S., Adrees, M., Zia-ur-Rehman, M., Qayyum, M. F., Ok, Y. S. ve Murtaza, G., 2018, Effect of biochar on alleviation of cadmium toxicity in wheat (*Triticum aestivum* L.) grown on Cd-contaminated saline soil, *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 25668-25680.
- AbdElgawad, H., Farfan-Vignolo, E. R., De Vos, D. ve Asard, H., 2015, Elevated CO₂ mitigates drought and temperature-induced oxidative stress differently in grasses and legumes, *Plant Science*, 231, 1-10.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S. ve Tattini, M., 2012, Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance, *Plant Science*, 196, 67-76.
- Alsafran, M., Saleem, M. H., Al Jabri, H., Rizwan, M. ve Usman, K., 2023, Principles and applicability of integrated remediation strategies for heavy metal Removal/Recovery from contaminated environments, *Journal of Plant Growth Regulation*, 42 (6), 3419-3440.
- Alscher, R. G., Donahue, J. L. ve Cramer, C. L., 1997, Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells, *Physiologia Plantarum*, 100 (2), 224-233.
- Amari, T., Ghnaya, T. ve Abdelly, C., 2017, Nickel, cadmium and lead phytotoxicity and potential of halophytic plants in heavy metal extraction, *South African Journal of Botany*, 111, 99-110.
- Anjum, S. A., Tanveer, M., Hussain, S., Bao, M., Wang, L., Khan, I., Ullah, E., Tung, S. A., Samad, R. A. ve Shahzad, B., 2015, Cadmium toxicity in maize (*Zea mays* L.): consequences on antioxidative systems, reactive oxygen species and cadmium accumulation, *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 17022-17030.
- Anjum, S. A., Tanveer, M., Hussain, S., Ashraf, U., Khan, I. ve Wang, L., 2017, Alteration in growth, leaf gas exchange, and photosynthetic pigments of maize plants under combined cadmium and arsenic stress, *Water, Air, & Soil Pollution*, 228, 1-12.
- Aysin, F., Karaman, A., Yilmaz, A., Aksakal, Ö., Gezginçioğlu, E. ve Kohnehshahri, S. M., 2020, Exogenous cysteine alleviates mercury stress by promoting antioxidant defence in maize (*Zea mays* L.) seedlings, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 44 (5), 506-516.
- Bayçu, G., Gevrek-Kürüm, N., Moustaka, J., Csátári, I., Rognes, S. E. ve Moustakas, M., 2017, Cadmium-zinc accumulation and photosystem II responses of *Nocca caerulea* to Cd and Zn exposure, *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 2840-2850.
- Beauchamp, C. ve Fridovich, I., 1971, Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Analytical Biochemistry*, 44 (1), 276-287.
- Bela, K., Horváth, E., Gallé, Á., Szabados, L., Tari, I. ve Csiszár, J., 2015, Plant glutathione peroxidases: emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses, *Journal of Plant Physiology*, 176, 192-201.
- Bergmeyer, H. ve Gawehn, K., 1970, Methoden der enzymatischen Analyse, vol 432. Verlag Chemie, Weinheim.
- Bojórquez, C., Frías Espericueta, M. G. ve Voltolina, D., 2016, Removal of cadmium and lead by adapted strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae*, *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 32 (4), 407-412.
- Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.

- Braga, I., Pissolato, M. D. ve Souza, G. M., 2017, Mitigating effects of acetylcholine supply on soybean seed germination under osmotic stress, *Brazilian Journal of Botany*, 40, 617-624.
- Bridges, C. C. ve Zalups, R. K., 2004, Homocysteine, system b₀,+ and the renal epithelial transport and toxicity of inorganic mercury, *The American Journal of Pathology*, 165 (4), 1385-1394.
- Caregnato, F. F., Koller, C. E., MacFarlane, G. R. ve Moreira, J. C., 2008, The glutathione antioxidant system as a biomarker suite for the assessment of heavy metal exposure and effect in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh, *Marine Pollution Bulletin*, 56 (6), 1119-1127.
- Cargnelutti, D., Tabaldi, L. A., Spanevello, R. M., de Oliveira Jucoski, G., Battisti, V., Redin, M., Linares, C. E. B., Dressler, V. L., de Moraes Flores, E. M. ve Nicoloso, F. T., 2006, Mercury toxicity induces oxidative stress in growing cucumber seedlings, *Chemosphere*, 65 (6), 999-1006.
- Carocho, M. ve Ferreira, I. C., 2013, A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives, *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.
- Cassia, R., Nocioni, M., Correa-Aragunde, N. ve Lamattina, L., 2018, Climate change and the impact of greenhouse gases: CO₂ and NO, friends and foes of plant oxidative stress, *Frontiers in Plant Science*, 9, 273.
- Chellaiah, E. R., 2018, Cadmium (heavy metals) bioremediation by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview, *Applied Water Science*, 8 (6), 154.
- Chen, J. ve Yang, Z. M., 2012, Mercury toxicity, molecular response and tolerance in higher plants, *Biometals*, 25, 847-857.
- Chen, X., Tao, H., Wu, Y. ve Xu, X., 2022, Effects of cadmium on metabolism of photosynthetic pigment and photosynthetic system in *Lactuca sativa* L. revealed by physiological and proteomics analysis, *Scientia Horticulturae*, 305, 111371.
- Chen, Y.A., Chi, W.C., Huang, T.L., Lin, C.Y., Nguyeh, T. T. Q., Hsiung, Y.C., Chia, L.C. ve Huang, H.J., 2012, Mercury-induced biochemical and proteomic changes in rice roots, *Plant Physiology and Biochemistry*, 55, 23-32.
- Christou, A., Antoniou, C., Christodoulou, C., Hapeshi, E., Stavrou, I., Michael, C., Fatta-Kassinos, D. ve Fotopoulos, V., 2016, Stress-related phenomena and detoxification mechanisms induced by common pharmaceuticals in alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants, *Science of the Total Environment*, 557, 652-664.
- Couto, N., Wood, J. ve Barber, J., 2016, The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network, *Free Radical Biology and Medicine*, 95, 27-42.
- Das, P., Samantaray, S. ve Rout, G., 1997, Studies on cadmium toxicity in plants: a review, *Environmental Pollution*, 98 (1), 29-36.
- Dash, H. R. ve Das, S., 2012, Bioremediation of mercury and the importance of bacterial mer genes, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 75, 207-213.
- Dey, S. K., Dey, J., Patra, S. ve Pothal, D., 2007, Changes in the antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in wheat seedlings exposed to cadmium and lead stress, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19, 53-60.
- Dhalaria, R., Kumar, D., Kumar, H., Nepovimova, E., Kuča, K., Torequl Islam, M. ve Verma, R., 2020, Arbuscular mycorrhizal fungi as potential agents in ameliorating heavy metal stress in plants, *Agronomy*, 10 (6), 815.
- Di Sansebastiano, G.-P., Fornaciari, S., Barozzi, F., Piro, G. ve Arru, L., 2014, New insights on plant cell elongation: a role for acetylcholine, *International Journal of Molecular Sciences*, 15 (3), 4565-4582.

- Ding, W., Zhang, J., Wu, S.C., Zhang, S., Christie, P. ve Liang, P., 2019, Responses of the grass *Paspalum distichum* L. to Hg stress: a proteomic study, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 183, 109549.
- dos Santos, T. B., Ribas, A. F., de Souza, S. G. H., Budzinski, I. G. F. ve Domingues, D. S., 2022, Physiological responses to drought, salinity, and heat stress in plants: a review, *Stresses*, 2 (1), 113-135.
- Dumanović, J., Nepovimova, E., Natić, M., Kuča, K. ve Jačević, V., 2021, The significance of reactive oxygen species and antioxidant defense system in plants: A concise overview, *Frontiers in Plant Science*, 11, 552969.
- Dusenge, M. E., Duarte, A. G. ve Way, D. A., 2019, Plant carbon metabolism and climate change: elevated CO₂ and temperature impacts on photosynthesis, photorespiration and respiration, *New Phytologist*, 221 (1), 32-49.
- Dutilleul, C., Driscoll, S., Cornic, G., De Paepe, R., Foyer, C. H. ve Noctor, G., 2003, Functional mitochondrial complex I is required by tobacco leaves for optimal photosynthetic performance in photorespiratory conditions and during transients, *Plant Physiology*, 131 (1), 264-275.
- El Rasafi, T., Oukarroum, A., Haddioui, A., Song, H., Kwon, E. E., Bolan, N., Tack, F. M., Sebastian, A., Prasad, M. ve Rinklebe, J., 2022, Cadmium stress in plants: A critical review of the effects, mechanisms, and tolerance strategies, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 52 (5), 675-726.
- Elia, A. C., Galarini, R., Taticchi, M. I., Dörr, A. J. M. ve Mantilacci, L., 2003, Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55 (2), 162-167.
- Evans, M. L., 1972, Promotion of cell elongation in *Avena* coleoptiles by acetylcholine, *Plant Physiology*, 50 (3), 414.
- Ewins, A. J., 1914, Acetylcholine, a new active principle of ergot, *Biochemical Journal*, 8 (1), 44.
- Feng, Z., Ji, S., Ping, J. ve Cui, D., 2021, Recent advances in metabolomics for studying heavy metal stress in plants, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 143, 116402.
- Fotopoulos, V., Ziogas, V., Tanou, G. ve Molassiotis, A., 2010, Involvement of AsA/DHA and GSH/GSSG ratios in gene and protein expression and in the activation of defence mechanisms under abiotic stress conditions, *Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants*, 265-302.
- Foyer, C. H. ve Halliwell, B., 1976, The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism, *Planta*, 133, 21-25.
- Foyer, C. H. ve Noctor, G., 2009, Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications, *Antioxidants & Redox Signaling*, 11 (4), 861-905.
- Foyer, C. H. ve Noctor, G., 2011, Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub, *Plant Physiology*, 155 (1), 2-18.
- Gallego, S. M., Pena, L. B., Barcia, R. A., Azpilicueta, C. E., Iannone, M. F., Rosales, E. P., Zawoznik, M. S., Groppa, M. D. ve Benavides, M. P., 2012, Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms, *Environmental and Experimental Botany*, 83, 33-46.
- García-Caparrós, P., Hasanuzzaman, M. ve Lao, M. T., 2019, Oxidative stress and antioxidant defense in plants under salinity, *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants: Production, Metabolism, Signaling and Defense Mechanisms*, 291-309.

- Ghori, N.-H., Ghori, T., Hayat, M., Imadi, S., Gul, A., Altay, V. ve Ozturk, M., 2019, Heavy metal stress and responses in plants, *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16, 1807-1828.
- Gill, M., 2014, Heavy metal stress in plants: a review, *Int J Adv Res*, 2 (6), 1043-1055.
- Gill, S. S. ve Tuteja, N., 2010, Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 48 (12), 909-930.
- Gill, S. S., Anjum, N. A., Gill, R., Yadav, S., Hasanuzzaman, M., Fujita, M., Mishra, P., Sabat, S. C. ve Tuteja, N., 2015, Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants, *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 10375-10394.
- Gontia-Mishra, I., Sapre, S., Sharma, A. ve Tiwari, S., 2016, Alleviation of mercury toxicity in wheat by the interaction of mercury-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria, *Journal of Plant Growth Regulation*, 35, 1000-1012.
- Guedes, F. R. C. M., Maia, C. F., da Silva, B. R. S., Batista, B. L., Alyemeni, M. N., Ahmad, P. ve da Silva Lobato, A. K., 2021, Exogenous 24-Epibrassinolide stimulates root protection, and leaf antioxidant enzymes in lead stressed rice plants: central roles to minimize Pb content and oxidative stress, *Environmental Pollution*, 280, 116992.
- Gupta, R., Khan, F., Alqahtani, F. M., Hashem, M. ve Ahmad, F., 2023, Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) assisted bioremediation of heavy metal toxicity, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-29.
- Hall, J. á., 2002, Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance, *Journal of experimental Botany*, 53 (366), 1-11.
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A., da Silva, J. A. T. ve Fujita, M., 2012, Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor, *Crop Stress and its Management: Perspectives and Strategies*, 261-315.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Anee, T. I. ve Fujita, M., 2017, Exogenous silicon attenuates cadmium-induced oxidative stress in *Brassica napus* L. by modulating AsA-GSH pathway and glyoxalase system, *Frontiers in Plant Science*, 8, 1061.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M., Mahmud, J., Nahar, K., Mohsin, S., Parvin, K. ve Fujita, M., 2018a, Interaction of sulfur with phytohormones and signaling molecules in conferring abiotic stress tolerance to plants, *Plant signaling & Behavior*, 13 (5), e1477905.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Rohman, M., Anee, T., Huang, Y. ve Fujita, M., 2018b, Exogenous silicon protects *Brassica napus* plants from salinity-induced oxidative stress through the modulation of AsA-GSH pathway, thiol-dependent antioxidant enzymes and glyoxalase systems, *Gesunde Pflanzen*, 70 (4).
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. B., Anee, T. I., Parvin, K., Nahar, K., Mahmud, J. A. ve Fujita, M., 2019, Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress, *Antioxidants*, 8 (9), 384.
- Hawkes, S. J., 1997, What is a "heavy metal"?, *Journal of Chemical Education*, 74 (11), 1374.
- Hayat, K., Khan, J., Khan, A., Ullah, S., Ali, S., Salahuddin ve Fu, Y., 2021, Ameliorative effects of exogenous proline on photosynthetic attributes, nutrients uptake, and oxidative stresses under cadmium in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.), *Plants*, 10 (4), 796.
- Hermans, C., Chen, J., Coppens, F., Inzé, D. ve Verbruggen, N., 2011, Low magnesium status in plants enhances tolerance to cadmium exposure, *New Phytologist*, 192 (2), 428-436.

- Hernández-Jiménez, M. J., Lucas, M. M. ve de Felipe, M. R., 2002, Antioxidant defence and damage in senescing lupin nodules, *Plant Physiology and Biochemistry*, 40 (6-8), 645-657.
- Herzog, V. ve Fahimi, H. D., 1973, A new sensitive colorimetric assay for peroxidase using 3, 3'-diaminobenzidine as hydrogen donor, *Analytical Biochemistry*, 55 (2), 554-562.
- Hossain, M., Hossain, M. ve Fujita, M., 2006, Induction of pumpkin glutathione S-transferases by different stresses and its possible mechanisms, *Biologia Plantarum*, 50, 210-218.
- Hossain, M. A., Nakano, Y. ve Asada, K., 1984, Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide, *Plant and Cell Physiology*, 25 (3), 385-395.
- Hou, W.C., Lu, Y.L., Liu, S.Y. ve Lin, Y.H., 2003, Activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in leaves of different cultivars of *Liriope spicata* L. on 10% SDS-PAGE gels, *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 44.
- Hou, W. C., Liang, H. J., Wang, C. C. ve Liu, D. Z., 2004, Detection of glutathione reductase after electrophoresis on native or sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels, *Electrophoresis*, 25 (17), 2926-2931.
- Hsu, Y. T. ve Kao, C. H., 2007, Toxicity in leaves of rice exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation, *Plant and Soil*, 298, 231-241.
- Hu, L., Li, Y., Wu, Y., Lv, J., Dawuda, M. M., Tang, Z., Liao, W., Calderón-Urrea, A., Xie, J. ve Yu, J., 2019, Nitric oxide is involved in the regulation of the ascorbate–glutathione cycle induced by the appropriate ammonium: nitrate to mitigate low light stress in *Brassica pekinensis*, *Plants*, 8 (11), 489.
- Hunt, R., Causton, D. R., Shipley, B. ve Askew, A. P., 2002, A modern tool for classical plant growth analysis, *Annals of Botany*, 90 (4), 485-488.
- Hussain, H. A., Men, S., Hussain, S., Chen, Y., Ali, S., Zhang, S., Zhang, K., Li, Y., Xu, Q. ve Liao, C., 2019, Interactive effects of drought and heat stresses on morpho-physiological attributes, yield, nutrient uptake and oxidative status in maize hybrids, *Scientific Reports*, 9 (1), 3890.
- Ibrahim, M., Nawaz, S., Iqbal, K., Rehman, S., Ullah, R., Nawaz, G., Almeer, R., Sayed, A. A. ve Peluso, I., 2022, Plant-derived smoke solution alleviates cellular oxidative stress caused by arsenic and mercury by modulating the cellular antioxidative defense system in wheat, *Plants*, 11 (10), 1379.
- Ilyas, N., Akhtar, N., Yasmin, H., Sahreen, S., Hasnain, Z., Kaushik, P., Ahmad, A. ve Ahmad, P., 2022, Efficacy of citric acid chelate and *Bacillus sp.* in amelioration of cadmium and chromium toxicity in wheat, *Chemosphere*, 290, 133342.
- Israr, M., Sahi, S., Datta, R. ve Sarkar, D., 2006, Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sesbania drummondii*, *Chemosphere*, 65 (4), 591-598.
- Jali, P., Das, A. B. ve Pradhan, C., 2014, A comparative analysis of physiological and biochemical responses to low doses of cadmium in two important varieties of *Oryza sativa* L. of Odisha, India, *Internatl J Sci Res*, 3 (12), 1920-1927.
- Jawad Hassan, M., Ali Raza, M., Ur Rehman, S., Ansar, M., Gitari, H., Khan, I., Wajid, M., Ahmed, M., Abbas Shah, G. ve Peng, Y., 2020, Effect of cadmium toxicity on growth, oxidative damage, antioxidant defense system and cadmium accumulation in two *Sorghum* cultivars, *Plants*, 9 (11), 1575.
- Jiang, M. ve Zhang, J., 2002, Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in abscisic acid-and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings, *Planta*, 215, 1022-1030.

- Jung, H.-i., Lee, B.R., Chae, M.J., Lee, E.J., Lee, T.G., Jung, G.B., Kim, M.S. ve Lee, J., 2020, Ascorbate-mediated modulation of cadmium stress responses: reactive oxygen species and redox status in *Brassica napus*, *Frontiers in Plant Science*, 11, 586547.
- Kadukova, J. ve Kavuličova, J., 2011, Phytoremediation of heavy metal contaminated soils—Plant Stress Assessment, *Handbook of Phytoremediation*, 185-222.
- Kapoor, D., Singh, S., Kumar, V., Romero, R., Prasad, R. ve Singh, J., 2019, Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), *Plant Gene*, 19, 100182.
- Kaya, C., Ashraf, M., Alyemeni, M. N. ve Ahmad, P., 2020, The role of nitrate reductase in brassinosteroid-induced endogenous nitric oxide generation to improve cadmium stress tolerance of pepper plants by upregulating the ascorbate-glutathione cycle, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 196, 110483.
- Kosolsaksakul, P., Farmer, J. G., Oliver, I. W. ve Graham, M. C., 2014, Geochemical associations and availability of cadmium (Cd) in a paddy field system, northwestern Thailand, *Environmental Pollution*, 187, 153-161.
- Kumar, N., Sharma, V., Kaur, G., Lata, C., Dasila, H., Perveen, K., Khan, F., Gupta, V. K. ve Khanam, M. N., 2023, Brassinosteroids as promoters of seedling growth and antioxidant activity under heavy metal zinc stress in mung bean (*Vigna radiata* L.), *Frontiers in Microbiology*, 14.
- Kumar, S., Thakur, P., Kaushal, N., Malik, J. A., Gaur, P. ve Nayyar, H., 2013, Effect of varying high temperatures during reproductive growth on reproductive function, oxidative stress and seed yield in chickpea genotypes differing in heat sensitivity, *Archives of Agronomy and Soil Science*, 59 (6), 823-843.
- Laemmli, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227 (5259), 680-685.
- Laxa, M., Liebthal, M., Telman, W., Chibani, K. ve Dietz, K.-J., 2019, The role of the plant antioxidant system in drought tolerance, *Antioxidants*, 8 (4), 94.
- Lester, H. A., 1977, The response to acetylcholine, *Scientific American*, 236 (2), 106-120.
- Li, H., Ding, S., Song, W., Wang, X., Ding, J. ve Lu, J., 2022, The degradation of dissolved organic matter in black and odorous water by humic substance-mediated Fe (II)/Fe (III) cycle under redox fluctuation, *Journal of Environmental Management*, 321, 115942.
- Lin, R., Wang, X., Luo, Y., Du, W., Guo, H. ve Yin, D., 2007, Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.), *Chemosphere*, 69 (1), 89-98.
- Lindberg, S., Bullock, R., Ebinghaus, R., Engstrom, D., Feng, X., Fitzgerald, W., Pirrone, N., Prestbo, E. ve Seigneur, C., 2007, A synthesis of progress and uncertainties in attributing the sources of mercury in deposition, *AMBIO: a Journal of the Human Environment*, 36 (1), 19-33.
- Liu, S., Ju, J. ve Xia, G., 2014, Identification of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3', 5'-hydroxylase genes from Antarctic moss and their regulation during abiotic stress, *Gene*, 543 (1), 145-152.
- Ma, L., Zhang, H., Sun, L., Jiao, Y., Zhang, G., Miao, C. ve Hao, F., 2012, NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF function in ROS-dependent regulation of Na⁺/K⁺ homeostasis in *Arabidopsis* under salt stress, *Journal of Experimental Botany*, 63 (1), 305-317.
- Mahajan, P. ve Kaushal, J., 2018, Role of phytoremediation in reducing cadmium toxicity in soil and water, *Journal of toxicology*, 2018 (1), 4864365.
- Maksymiec, W. ve Krupa, Z., 2006, The effects of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana*, *Environmental and Experimental Botany*, 57 (1-2), 187-194.

- Malar, S., Shivendra Vikram, S., JC Favas, P. ve Perumal, V., 2016, Lead heavy metal toxicity induced changes on growth and antioxidative enzymes level in water hyacinths [*Eichhornia crassipes* (Mart.)], *Botanical Studies*, 55 (1), 1-11.
- Mansoor, S., Ali Wani, O., Lone, J. K., Manhas, S., Kour, N., Alam, P., Ahmad, A. ve Ahmad, P., 2022, Reactive oxygen species in plants: from source to sink, *Antioxidants*, 11 (2), 225.
- Mathur, S., Mehta, P. ve Jajoo, A., 2013, Effects of dual stress (high salt and high temperature) on the photochemical efficiency of wheat leaves (*Triticum aestivum*), *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19, 179-188.
- Mehla, N., Sindhi, V., Josula, D., Bisht, P. ve Wani, S. H., 2017, An introduction to antioxidants and their roles in plant stress tolerance, *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress*, 1-23.
- Meng, Y., Jing, H., Huang, J., Shen, R. ve Zhu, X., 2022, The role of nitric oxide signaling in plant responses to cadmium stress, *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (13), 6901.
- Mhamdi, A. ve Van Breusegem, F., 2018, Reactive oxygen species in plant development, *Development*, 145 (15), dev164376.
- Mittler, R. ve Zilinskas, B. A., 1993, Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium, *Analytical Biochemistry*, 212 (2), 540-546.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. ve Van Breusegem, F., 2004, Reactive oxygen gene network of plants, *Trends in Plant Science*, 9 (10), 490-498.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V. ve Van Breusegem, F., 2011, ROS signaling: the new wave?, *Trends in Plant Science*, 16 (6), 300-309.
- Mittler, R., 2017, ROS are good, *Trends in Plant Science*, 22 (1), 11-19.
- Momonoki, Y. S. ve Momonoki, T., 1993, Histochemical localization of acetylcholinesterase in leguminous plant, Siratro (*Macroptilium atropureum*), *Japanese Journal of Crop Science*, 62 (4), 571-576.
- Moreno, F. N., Anderson, C. W., Stewart, R. B. ve Robinson, B. H., 2008, Phytofiltration of mercury-contaminated water: volatilisation and plant-accumulation aspects, *Environmental and Experimental Botany*, 62 (1), 78-85.
- Mousavi, S. M., 2022, Silicon and nano-silicon mediated heavy metal stress tolerance in plants, In: Silicon and nano-silicon in environmental stress management and crop quality improvement, Eds: Elsevier, p. 181-191.
- Nahar, K., Rahman, M., Hasanuzzaman, M., Alam, M. M., Rahman, A., Suzuki, T. ve Fujita, M., 2016, Physiological and biochemical mechanisms of spermine-induced cadmium stress tolerance in mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings, *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 21206-21218.
- Nakano, Y. ve Asada, K., 1981, Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant and Cell Physiology*, 22 (5), 867-880.
- Nath, M., Bhatt, D., Bhatt, M. D., Prasad, R. ve Tuteja, N., 2018, Microbe-mediated enhancement of nitrogen and phosphorus content for crop improvement, In: Crop improvement through microbial biotechnology, Eds: Elsevier, p. 293-304.
- Naz, H., Akram, N. A. ve Ashraf, M., 2016, Impact of ascorbic acid on growth and some physiological attributes of cucumber (*Cucumis sativus*) plants under water-deficit conditions, *Pak. J. Bot*, 48 (3), 877-883.
- Nazir, F., Hussain, A. ve Fariduddin, Q., 2019, Hydrogen peroxide modulate photosynthesis and antioxidant systems in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants under copper stress, *Chemosphere*, 230, 544-558.

- Nianiou-Obeidat, I., Madesis, P., Kissoudis, C., Voulgari, G., Chronopoulou, E., Tsaftaris, A. ve Labrou, N. E., 2017, Plant glutathione transferase-mediated stress tolerance: functions and biotechnological applications, *Plant Cell Reports*, 36, 791-805.
- Nowicka, B., 2022, Heavy metal-induced stress in eukaryotic algae—mechanisms of heavy metal toxicity and tolerance with particular emphasis on oxidative stress in exposed cells and the role of antioxidant response, *Environmental Science and Pollution Research*, 29 (12), 16860-16911.
- Pandey, B., Suthar, S. ve Chand, N., 2022, Effect of biochar amendment on metal mobility, phytotoxicity, soil enzymes, and metal-uptakes by wheat (*Triticum aestivum*) in contaminated soils, *Chemosphere*, 307, 135889.
- Pandey, S., Fartyal, D., Agarwal, A., Shukla, T., James, D., Kaul, T., Negi, Y. K., Arora, S. ve Reddy, M. K., 2017, Abiotic stress tolerance in plants: myriad roles of ascorbate peroxidase, *Frontiers in Plant Science*, 8, 581.
- Pandian, S., Rakkammal, K., Rathinapriya, P., Rency, A. S., Satish, L. ve Ramesh, M., 2020, Physiological and biochemical changes in sorghum under combined heavy metal stress: An adaptive defence against oxidative stress, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101830.
- Panuccio, M. R., Sorgonà, A., Rizzo, M. ve Cacco, G., 2009, Cadmium adsorption on vermiculite, zeolite and pumice: Batch experimental studies, *Journal of Environmental Management*, 90 (1), 364-374.
- Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, B. ve Sharma, A., 2004, Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance, *Environmental and Experimental Botany*, 52 (3), 199-223.
- Pirzadah, T. B., Malik, B., Tahir, I., Irfan, Q. M. ve Rehman, R. U., 2018, Characterization of mercury-induced stress biomarkers in *Fagopyrum tataricum* plants, *International Journal of Phytoremediation*, 20 (3), 225-236.
- Pourrut, B., Jean, S., Silvestre, J. ve Pinelli, E., 2011, Lead-induced DNA damage in *Vicia faba* root cells: potential involvement of oxidative stress, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 726 (2), 123-128.
- Qi, M., Zheng, X., Niu, G., Ye, A., Rather, S. A., Ahmed, N., Mustafad, N. S., Wang, P., Siddiqui, M. H. ve Kimar, R., 2023, Supplementation of acetylcholine mediates physiological and biochemical changes in tobacco lead to alleviation of damaging effects of drought stress on growth and photosynthesis, *Journal of Plant Growth Regulation*, 42 (8), 4616-4628.
- Qin, C., Su, Y., Li, B., Cheng, Y., Wei, C., Yuan, S., Ahmed, N., Ashraf, M. ve Zhang, L., 2019, Acetylcholine mechanism of action to enhance tolerance to salt stress in *Nicotiana benthamiana*, *Photosynthetica*, 57 (2).
- Qin, C., Ahanger, M., Zhou, J., Ahmed, N., Wei, C., Yuan, S., Ashraf, M. ve Zhang, L., 2020, Beneficial role of acetylcholine in chlorophyll metabolism and photosynthetic gas exchange in *Nicotiana benthamiana* seedlings under salinity stress, *Plant Biology*, 22 (3), 357-365.
- Qin, C., Ahanger, M. A., Lin, B., Huang, Z., Zhou, J., Ahmed, N., Ai, S., Mustafa, N. S., Ashraf, M. ve Zhang, L., 2021, Comparative transcriptome analysis reveals the regulatory effects of acetylcholine on salt tolerance of *Nicotiana benthamiana*, *Phytochemistry*, 181, 112582.
- Rao, K. M. ve Sresty, T., 2000, Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses, *Plant Science*, 157 (1), 113-128.

- Rellán-Álvarez, R., Ortega-Villasante, C., Alvarez-Fernandez, A., Campo, F. F. d. ve Hernandez, L. E., 2006, Stress responses of *Zea mays* to cadmium and mercury, *Plant and Soil*, 279, 41-50.
- Ricci, G., Bello, M. L., Caccuri, A. M., Galiazzo, F. ve Federici, G., 1984, Detection of glutathione transferase activity on polyacrylamide gels, *Analytical Biochemistry*, 143 (2), 226-230.
- Rizwan, M., Ali, S., Abbas, T., Zia-ur-Rehman, M., Hannan, F., Keller, C., Al-Wabel, M. I. ve Ok, Y. S., 2016, Cadmium minimization in wheat: a critical review, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 130, 43-53.
- Robas Mora, M., Jiménez Gómez, P. A., González Reguero, D. ve Probanza Lobo, A., 2022, Effect of plant growth-promoting bacteria on biometrical parameters and antioxidant enzymatic activities of *Lupinus albus* var. orden dorado under mercury stress, *Frontiers in Microbiology*, 13, 891882.
- Ronzan, M., Piacentini, D., Fattorini, L., Della Rovere, F., Eiche, E., Riemann, M., Altamura, M. ve Falasca, G., 2018, Cadmium and arsenic affect root development in *Oryza sativa* L. negatively interacting with auxin, *Environmental and Experimental Botany*, 151, 64-75.
- Roshchina, V. V. ve Mukhin, E. N., 1985, Acetylcholine action on the photochemical reactions of pea chloroplasts, *Plant Science*, 42 (2), 95-98.
- Roychoudhury, A., 2020, Neurotransmitter acetylcholine comes to the plant rescue, *J Mol Cell Biol Forecast. 2020; 3 (1)*, 1019.
- Sachdev, S., Ansari, S. A. ve Ansari, M. I., 2023, Reactive oxygen species (ROS): An Introduction, In: *Reactive Oxygen Species in Plants: The Right Balance*, Eds: Springer, p. 1-22.
- Sagi, M. ve Fluhr, R., 2001, Superoxide production by plant homologues of the gp91phox NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection, *Plant Physiology*, 126 (3), 1281-1290.
- Saleh, M. A., 2024, Nickel toxicity mitigation by supplementation of acetylcholine in wheat: growth, photosynthetic and antioxidant activities, *South African Journal of Botany*, 164, 231-241.
- Salla, V., Hardaway, C. J. ve Sneddon, J., 2011, Preliminary investigation of *Spartina alterniflora* for phytoextraction of selected heavy metals in soils from Southwest Louisiana, *Microchemical Journal*, 97 (2), 207-212.
- Seevers, P., Daly, J. ve Cathedral, F., 1971, The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust disease, *Plant physiology*, 48 (3), 353-360.
- Seminario, A., Song, L., Zulet, A., Nguyen, H. T., González, E. M. ve Larrainzar, E., 2017, Drought stress causes a reduction in the biosynthesis of ascorbic acid in soybean plants, *Frontiers in Plant Science*, 8, 1042.
- Shahid, M., Khalid, S., Abbas, G., Shahid, N., Nadeem, M., Sabir, M., Aslam, M. ve Dumat, C., 2015, Heavy metal stress and crop productivity, *Crop Production and Global Environmental Issues*, 1-25.
- Sharma, A., Sidhu, G. P. S., Araniti, F., Bali, A. S., Shahzad, B., Tripathi, D. K., Brestic, M., Skalicky, M. ve Landi, M., 2020, The role of salicylic acid in plants exposed to heavy metals, *Molecules*, 25 (3), 540.
- Sharma, A., Kapoor, D., Gautam, S., Landi, M., Kandhol, N., Araniti, F., Ramakrishnan, M., Satish, L., Singh, V. P. ve Sharma, P., 2022, Heavy metal induced regulation of plant biology: Recent insights, *Physiologia Plantarum*, 174 (3), e13688.
- Šimonová, E., Henselová, M., Masarovičová, E. ve Kohanová, J., 2007, Comparison of tolerance of *Brassica juncea* and *Vigna radiata* to cadmium, *Biologia Plantarum*, 51, 488-492.

- Singh, H., Kumar, D. ve Soni, V., 2022, Performance of chlorophyll a fluorescence parameters in *Lemna minor* under heavy metal stress induced by various concentration of copper, *Scientific Reports*, 12 (1), 10620.
- Smart, R. E. ve Bingham, G. E., 1974, Rapid estimates of relative water content, *Plant Physiology*, 53 (2), 258-260.
- Soares, T. F. S. N., dos Santos Dias, D. C. F., Oliveira, A. M. S., Ribeiro, D. M. ve dos Santos Dias, L. A., 2020, Exogenous brassinosteroids increase lead stress tolerance in seed germination and seedling growth of *Brassica juncea* L, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 193, 110296.
- Su, Y., Cheng, Y., Qin, C., Ahmed, N., Mu, Y., Mustafad, N., Ashraf, M. ve Zhang, L., 2020a, Exogenous acetylcholine alleviates cadmium-induced phytotoxicity by modulating photosynthetic metabolism and antioxidant potential in tobacco (*Nicotiana benthamiana*), *Photosynthetica*, 58 (4).
- Su, Y., Qin, C., Begum, N., Ashraf, M. ve Zhang, L., 2020b, Acetylcholine ameliorates the adverse effects of cadmium stress through mediating growth, photosynthetic activity and subcellular distribution of cadmium in tobacco (*Nicotiana benthamiana*), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 198, 110671.
- Tiong, S. H., Looi, C. Y., Hazni, H., Arya, A., Paydar, M., Wong, W. F., Cheah, S.C., Mustafa, M. R. ve Awang, K., 2013, Antidiabetic and antioxidant properties of alkaloids from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, *Molecules*, 18 (8), 9770-9784.
- Tretyn, A., Kendrick, R. E., Bossen, M. E. ve Vredenberg, W. J., 1990, Influence of acetylcholine agonists and antagonists on the swelling of etiolated wheat (*Triticum aestivum* L.) mesophyll protoplasts, *Planta*, 182, 473-479.
- Velikova, V., Yordanov, I. ve Edreva, A., 2000, Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines, *Plant Science*, 151 (1), 59-66.
- Veljović Jovanović, S., Kukavica, B., Vidović, M., Morina, F. ve Menckhoff, L., 2018, Class III peroxidases: functions, localization and redox regulation of isoenzymes, *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*, 269-300.
- Vranova, V., Rejsek, K., Skene, K. R. ve Formanek, P., 2011, Non-protein amino acids: plant, soil and ecosystem interactions, *Plant and Soil*, 342, 31-48.
- Wang, Y., Tan, P., Chang, L., Yue, Z., Zeng, C., Li, M., Liu, Z., Dong, X. ve Yan, M., 2022, Exogenous proline mitigates toxic effects of cadmium via the decrease of cadmium accumulation and reestablishment of redox homeostasis in *Brassica juncea*, *BMC Plant Biology*, 22 (1), 1-19.
- Waszczak, C., Carmody, M. ve Kangasjärvi, J., 2018, Reactive oxygen species in plant signaling, *Annual Review of Plant Biology*, 69 (1), 209-236.
- Wei, C., Jiao, Q., Agathokleous, E., Liu, H., Li, G., Zhang, J., Fahad, S. ve Jiang, Y., 2022, Hormetic effects of zinc on growth and antioxidant defense system of wheat plants, *Science of the Total Environment*, 807, 150992.
- Wei, L., Zhang, J., Wang, C. ve Liao, W., 2020, Recent progress in the knowledge on the alleviating effect of nitric oxide on heavy metal stress in plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 147, 161-171.
- Woodbury, W., Spencer, A. ve Stahmann, M., 1971, An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes, *Analytical Biochemistry*, 44 (1), 301-305.
- Xiong, T., Leveque, T., Shahid, M., Foucault, Y., Mombo, S. ve Dumat, C., 2014, Lead and cadmium phytoavailability and human bioaccessibility for vegetables exposed to soil

- or atmospheric pollution by process ultrafine particles, *Journal of Environmental Quality*, 43 (5), 1593-1600.
- Xiong, T., Zhang, S., Kang, Z., Zhang, T. ve Li, S., 2021, Dose-dependent physiological and transcriptomic responses of lettuce (*Lactuca sativa* L.) to copper oxide nanoparticles—insights into the phytotoxicity mechanisms, *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (7), 3688.
- Xu, Z.M., Li, Q.S., Yang, P., Ye, H.J., Chen, Z.S., Guo, S.H., Wang, L.L., He, B.Y. ve Zeng, E. Y., 2017, Impact of osmoregulation on the differences in Cd accumulation between two contrasting edible amaranth cultivars grown on Cd-polluted saline soils, *Environmental Pollution*, 224, 89-97.
- Xu, Z. ve Zhou, G., 2008, Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass, *Journal of Experimental Botany*, 59 (12), 3317-3325.
- Yan, Z., Ming, D., Cui, J.X., Chen, X.J., Wen, Z.L., Zhang, J.W. ve Liu, H.Y., 2018, Exogenous GSH protects tomatoes against salt stress by modulating photosystem II efficiency, absorbed light allocation and H₂O₂-scavenging system in chloroplasts, *Journal of Integrative Agriculture*, 17 (10), 2257-2272.
- Yang, L., Ma, X., Guo, Y., He, Y., Yang, Y., Wang, W., Xu, Z., Zuo, Z., Xue, Y. ve Yang, R., 2023, Acetylcholine (ACh) enhances Cd tolerance through transporting ACh in vesicles and modifying Cd absorption in duckweed (*Lemna turionifera* 5511), *Environmental Pollution*, 335, 122305.
- Yuan, H., Liu, Q., Guo, Z., Fu, J., Sun, Y., Gu, C., Xing, B. ve Dhankher, O. P., 2021, Sulfur nanoparticles improved plant growth and reduced mercury toxicity via mitigating the oxidative stress in *Brassica napus* L, *Journal of Cleaner Production*, 318, 128589.
- Zhang, F.-Q., Wang, Y.S., Lou, Z.P. ve Dong, J.D., 2007, Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*), *Chemosphere*, 67 (1), 44-50.
- Zhang, H., Xu, N., Wu, X., Wang, J., Ma, S., Li, X. ve Sun, G., 2018, Effects of 4 kinds of sodium salt stress on plant growth, PS II and PS I function in leaves of *Sorghum*, *J Plant Interact*, 13 (1), 506-513.
- Zhang, Y., ZG, E., Jiang, H., Wang, L., Zhou, J. ve Zhu, D., 2015, A comparative study of stress-related gene expression under single stress and intercross stress in rice, *Genetics and Molecular Research: GMR*, 14 (2), 3702-3717.
- Zhao, H., Guan, J., Liang, Q., Zhang, X., Hu, H. ve Zhang, J., 2021, Effects of cadmium stress on growth and physiological characteristics of sassafras seedlings, *Scientific Reports*, 11 (1), 9913.
- Zhuo, Y., Qiu, S., Amombo, E., Zhu, Q., Tang, D., Huang, M., Han, X., Chen, L., Wang, S. ve Chen, K., 2017, Nitric oxide alleviates cadmium toxicity in tall fescue photosystem II on the electron donor side, *Environmental and Experimental Botany*, 137, 110-118.