



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**ARSENİK VE KADMIYUM STRESLERİNE
MARUZ BIRAKILAN MARUL BİTKİSİNDE
K3 VİTAMİNİNİN (MENADİONE) SU
DÜZENLEMESİ VE ANTİOKSİDAN ENZİM
SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Rümeysa Zeynep ŞAHİN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Haziran-2023
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Rümeysa Zeynep ŞAHİN tarafından hazırlanan “Arsenik Ve Kadmiyum Streslerine Maruz Bırakılan Marul Bitkisinde K3 Vitamininin (Menadione) Su Düzenlemesi Ve Antioksidan Enzim Sistemi Üzerine Etkileri” adlı tez çalışması 23/06/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Prof. Dr. Evren YILDIZTUGAY

Danışman

Prof. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI

Üye

Doç. Dr. Ali Tefvık UNCU

İmza

.....

.....

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Şerife Yurdagül KUMCU
FBE Müdürü

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.

Rümeysa Zeynep ŞAHİN
17/07/2023

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ARSENİK VE KADMIYUM STRESLERİNE MARUZ BIRAKILAN MARUL BİTKİSİNDE K3 VİTAMİNİNİN (MENADİONE) SU DÜZENLEMESİ VE ANTİOKSİDAN ENZİM SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Rümeysa Zeynep ŞAHİN

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI

2023, 86 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI

Prof. Dr. Evren YILDIZTUGAY

Doç. Dr. Ali Tefvik UNCU

Çalışmada arsenik ve/veya kadmiyum stresleri uygulanan marul yapraklarında dışarıdan uygulanan vitaminin olası olumlu rolleri araştırılmıştır. Marul tohumları çimlendirildikten sonra hidroponik ortama alınmıştır. Marul fidelerine kadmiyum (Cd, 100 µM) ve arsenik (As, 100 µM) stresleri uygulanmıştır. Strese eş zamanlı olarak dışarıdan menadione (K3 vitamini, V1:5 µM ve V2:25 µM) uygulaması 96 saat süresince yapılmıştır. Stres uygulanan marul yapraklarında su içeriği (RWC) değerleri azalırken, protein miktarı değişmemiştir. Arsenik stresi uygulanan gruplarda prolin miktarı artmıştır. As ve Cd uygulanan marul yaprakları yüksek süperoksit dizmutaz (SOD) aktivitesi göstermiştir (As+V2 dışında). SOD aktivitesiyle oluşan H₂O₂ miktarında, katalaz (CAT) ve peroksidaz (POX) yetersiz aktiviteleri nedeniyle stres altında artış izlenmiştir. Dışarıdan menadione uygulaması, ağır metal streslerine karşı RWC ve protein miktarını artırmıştır. Özellikle As ve As+Cd gruplarında prolin miktarı artmıştır. Her iki stres faktörü altında yetişen marul yapraklarında menadione uygulamasıyla SOD, CAT ve POX aktivitelerinde artışlar gözlenmiştir. Böylece artan enzim aktiviteleriyle H₂O₂ ve TBARS miktarlarında azalmalar izlenmiştir. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde menadione uygulaması, kadmiyum ve arsenik streslerine karşı su içeriğini, prolin miktarını ve antioksidan sistemi iyileştirmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Arsenik, Kadmiyum, *Lactuca sativa*, Menadione

ABSTRACT

MS THESIS

EFFECTS OF VITAMIN K3 (MENADIONE) ON WATER REGULATION AND ANTIOXIDANT ENZYME SYSTEM IN LETTUCE PLANT EXPOSED TO ARSENIC AND CADMIUM STRESSES

Rumeysa Zeynep SAHIN

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY**

**THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE / DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN MECHANICAL ENGINEERING**

Advisor: Prof. Dr. Ceyda OZFIDAN KONAKCI

2023, 86 Pages

Jury

Prof. Dr. Ceyda OZFIDAN KONAKCI

Prof. Dr. Evren YILDIZTUGAY

Doc. Dr. Ali Tevfik UNCU

In the study, the possible positive roles of externally applied vitamin in lettuce leaves that were subjected to arsenic and/or cadmium stresses were investigated. Lettuce seeds were taken into hydroponic environment after germination. Cadmium (Cd, 100 mM) and arsenic (As, 100 mM) stresses were applied to lettuce seedlings. Simultaneously with stress, external menadione (vitamin K3, V1:5 mM and V2:25 mM) was applied for 96 hours. While the water content (RWC) values decreased in lettuce leaves under stress, the protein content did not change. The amount of proline increased in the arsenic stressed groups. Lettuce leaves treated with As and Cd showed high superoxide dismutase (SOD) activity (except As+V2). The amount of H₂O₂ formed by SOD activity increased under stress due to insufficient activities of catalase (CAT) and peroxidase (POX). External application of menadione increased the amount of RWC and protein against heavy metal stresses. In particular, the amount of proline increased in the As and As+Cd groups. Increases in SOD, CAT and POX activities were observed with menadione application in lettuce leaves grown under both stress factors. Thus, decreases were observed in the amounts of H₂O₂ and TBARS with increasing enzyme activities. When all the results were evaluated, menadione application improved the water content, proline amount and antioxidant system against cadmium and arsenic stresses.

Keywords: Antioxidant, Arsenic, Cadmium, *Lactuca sativa*, Menadione

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi, birikim ve tecrübelerinden faydalandığım, ne zaman kendisine danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp itinayla yardımcı olan, gösterdiği sabırlı, azimli ve özverili yaklaşımından dolayı birlikte çalışmaktan, öğrencisi olmaktan onur duyduğum, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana katmış olduğu değerli bilgilerinden yararlanacağımı düşündüğüm çok kıymetli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez denemelerinin kurulmasında ve analizlerin yürütülmesinde engin bilgilerinden yararlandığım, Sayın Prof. Dr. Evren YILDIZTUGAY'a, laboratuvar çalışmalarında desteklerini gördüğüm ve Arş. Gör. Dr. Büşra ARIKAN'a ve Arş. Gör. Fatmanur ALPTEKİN'e Rumeysa EKİM'e, Buket KOYUKAN'a, Çağrı GÜLENTÜRK'e, Melike BALCI'ya teşekkürlerimi sunuyorum.

Öğrenim hayatımın başlangıcından bugüne kadar maddi ve manevi destek ve sevgilerini hiçbir zaman eksik etmeyen, her koşulda her anda yanımda duran, beni yalnız bırakmayan sevgili annem Ayşe ŞAHİN'e, babam Mehmet ŞAHİN'e, abilerim Ali Enes ŞAHİN ve Yakup Talha ŞAHİN'e, kardeşim Elif Sude ŞAHİN'e sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunuyorum.

Rümeysa Zeynep ŞAHİN
KONYA-2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Bitki Materyali: Marul	5
2.2. Bitkinin Büyümesini Etkileyen Stres Faktörleri	7
2.2.1. Biyotik Stres	7
2.2.2. Abiyotik Stres	7
2.2.2.1. Ağır Metal Stresi	8
2.2.2.2. Bitkilerde Ağır Metal Stresi	9
2.3. Ağır Metale Maruz Kalan Bitkilerde Görülen Değişiklikler	11
2.3.1. Morfolojik Değişiklikler	11
2.3.2. Biyokimyasal Değişiklikler	11
2.3.2.1. Enzim İnaktivasyonu	11
2.3.3. Metallerin Zarlar Üzerine Etkisi	12
2.3.4. Fotosentez İnhibisyonu	12
2.4. Kadmiyum Stresi	13
2.5. Arsenik Stresi	15
2.6. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	17
2.6.1. Singlet Oksijen	19
2.6.2. Süperoksit anyon radikali (O_2^-)	19
2.6.3. Hidrojen peroksit (H_2O_2)	19
2.6.4. Hidroksil radikali (OH^-)	20
2.7. Antioksidan Mekanizması	21
2.7.1. Antioksidan Enzimler	21
2.7.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	21

2.7.1.2. Katalaz (CAT).....	22
2.7.1.3. Peroksidaz (POX)	25
2.7.1.4. Askorbat Peroksidaz (APX).....	25
2.7.1.5. Glutasyon Redüktaz (GR)	25
2.7.1.6. Glutasyon S-Transferaz (GST).....	26
2.7.1.7. Glutasyon Peroksidaz (GPX)	26
2.7.2. Enzimatik Olmayan Antioksidan Sistemler.....	26
2.7.2.1. Karotenoidler	26
2.7.2.2. Askorbik Asit.....	27
2.7.2.3. Glutasyon (GSH).....	28
2.7.2.4. Tokoferoller (E Vitamini).....	28
2.7.2.5. Flavonoidler	29
2.7.2.6. Prolin.....	30
2.8. K3 Vitamini	31
3.1. Sterilizasyon aşaması.....	35
3.2. Çalışmada yer alan Uygulama Grupları.....	35
3.3. Bağlı Su içeriğinin (RWC) belirlenmesi.....	37
3.4. Enzim ve İzozim aktivitelerinin saptanması için ekstraksiyon aşaması	37
3.4.1. Süperoksit dismutaz (SOD) izozim/enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	37
3.4.2. Katalaz (CAT) izozim/enzim aktivitesinin belirlenmesi	38
3.4.3. Peroksidaz (POX) izozim/enzim aktivitesinin belirlenmesi	38
3.5. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarının belirlenmesi	38
3.5.1. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarının belirlenmesi.....	38
3.6. Lipit peroksidasyonun belirlenmesi	39
3.7. Prolin miktarının belirlenmesi	39
3.8. Total protein miktarının belirlenmesi	39
3.9. İstatistiksel Analizler	40
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	41
4.1. Arsenik ve kadmiyum stresleri altındaki marul yapraklarında menadione uygulamasının kısmi su miktarı üzerine etkisi	41
4.3. Arsenik ve kadmiyum stresleri altındaki marul yapraklarında menadione uygulamalarında antioksidan enzim/izozim profillemesinde oluşan değişimler.....	43
4.3.3. Arsenik ve kadmiyum stresleri altındaki marul yapraklarında menadione uygulamalarının total POX enzim/izozim aktivitesi üzerine etkisi	46
4.4. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarının belirlenmesi	49
4.4.1. Arsenik ve kadmiyum stresleri altındaki marul yapraklarında menadione uygulamalarının hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarı üzerine etkisi.....	49
4.5. Lipit Peroksidasyonun Belirlenmesi	50
4.5.1. Arsenik ve kadmiyum stresleri altındaki marul yapraklarında menadione uygulamalarının TBARS miktarı üzerine etkisi	50
4.6. Arsenik ve kadmiyum stresleri altındaki marul yapraklarında menadione uygulamalarının prolin miktarı üzerine etkisi.....	52
4.7. Arsenik ve kadmiyum stresleri altındaki marul yapraklarında menadione uygulamalarının protein miktarı üzerine etkisi	53
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	55

5.1 Sonuçlar	55
5.2 neriler	58
6. KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŐ	Hata! Yer iőareti tanımlanmamıő.



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1. Vitamin K Formları	3
Şekil 2. 1. Ağır metallerin bitki kökleri tarafından alınımı ve verimlilik üzerindeki doğrudan veya dolaylı etkileri	10
Şekil 2. 2. Kadmiyum toksisitesinin bitkilerde su ilişkileri ve fotosentez üzerindeki etkileri.	15
Şekil 2. 3. Antioksidan enzim sistemi tarafından katalize edilen temel reaksiyonlar	18
Şekil 2. 4. MSB'nin biyotik ve abiyotik streslere karşı bitki savunma mekanizmaları üzerindeki etkilerine ilişkin model	33
Şekil 4. 1. 100 µM arsenik ve 100 µM kadmiyum toksisitesine maruz kalan marul yapraklarında menadione uygulamalarının (5 ve 25 µM) kısmi su içeriği (RWC) üzerine etkisi.....	41
Şekil 4. 2. 100 µM arsenik ve 100 µM kadmiyum toksisitesine maruz kalan marul yapraklarında menadione uygulamalarının (5 ve 25 µM) total SOD aktivitesi ve SOD izozimlerinin band yoğunluğu üzerine etkisi.....	43
Şekil 4. 3. 100 µM arsenik ve 100 µM kadmiyum toksisitesine maruz kalan marul yapraklarında menadione uygulamalarının (5 ve 25 µM) total CAT aktivitesi ve CAT izozimlerinin band yoğunluğu üzerine etkisi.....	45
Şekil 4. 4. 100 µM arsenik ve 100 µM kadmiyum toksisitesine maruz kalan marul yapraklarında menadione uygulamalarının (5 ve 25 µM) total POX aktivitesi ve POX izozimlerinin band yoğunluğu üzerine etkisi.....	47
Şekil 4. 5. 100 µM arsenik ve 100 µM kadmiyum toksisitesine maruz kalan marul yapraklarında menadione uygulamalarının (5 ve 25 µM) hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarı üzerine etkisi	49
Şekil 4. 6. 100 µM arsenik ve 100 µM kadmiyum toksisitesine maruz kalan marul yapraklarında menadione uygulamalarının (5 ve 25 µM) TBARS miktarı üzerine etkisi	51
Şekil 4. 7. 100 µM arsenik ve 100 µM kadmiyum toksisitesine maruz kalan marul yapraklarında menadione uygulamalarının (5 ve 25 µM) prolin miktarı üzerine etkisi.	52
Şekil 4. 8. 100 µM arsenik ve 100 µM kadmiyum toksisitesine maruz kalan marul yapraklarında menadione uygulamalarının (5 ve 25 µM) protein miktarı üzerine etkisi.....	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. ROS'un detoksifikasyonunda yer alan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar, önemli fonksiyonları ve hücre içindeki konumları (Mushtaq ve ark., 2020). 24

Çizelge 3. 1. Yüksek lisans tezinde kullanılan uygulama grupları ve açıklamaları 36



SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

Cu	Bakır
As	Arsenik
Cd	Kadmiyum
Al	Aliminyum
Zn	Çinko
Hg	Civa
Fe	Demir
Cr	Krom
Pb	Kurşun
Ni	Nikel
Mn	Mangan
Mg	Magnezyum
K	Potasyum
SOD	Süperoksit Dismutaz
CAT	Katalaz
GPX	Glutasyon Peroksidaz
APX	Askorbat Peroksidaz
POD	Peroksidaz
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
MSB	Menadion Sodyum Bisülfat
UV	Ultra viole
PS1	Fotosistem 1
PS2	Fotosistem 2
CO ₂	Karbon dioksit
ATP	Adenozin trifosfat
DNA	Deoksiribo nükleik asit
RNA	Ribo nükleik asit
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
OH ⁻	Hidroksil
O ₂ ⁻	Oksijen
ETS	Elektron Taşıma Sistemi
ER	Endoplazmik Retikulum
AA	Askorbik asit
GST	Glutasyon S-transferaz
MDHAR	Monodehidroaskorbat redüktaz
DHAR	Dehidroaskorbat redüktaz
PRX	Peroksiredoksin
GSH	Glutasyon
AsA	Askorbik Asit
Glu	Glutamat
Cys	Sistein
Gly	Glisin
TBARS	Tiyobarbütirik asitle reaktif maddeler
RWC	Bağlı su içeriği
PVPP	Polivinilpoliprolidon

EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
TCA	Trikloroasetik asit
TBA	2-Tiyobarbitürik asit
BSA	Bovin serum albumin
DAB	3-3- diaminobenzidin tetrahidroklorit
Mn-SOD	Mangan süperoksit dismutaz
Fe-SOD	Demir süperoksit dismutaz
Cu/Zn-SOD	Bakır/Çinko süperoksit dismutaz
YA	Yaş Ağırlık
KA	Kuru Ağırlık
TA	Turgorlu Ağırlık



1. GİRİŞ

Türkiye iklim özelliklerinin elverişli olması ve konum açısından Dünya tarımında önemli yere sahiptir. Türkiye’de iklim çeşitliliği nedeniyle tarımsal faaliyetler, çok çeşitli alanlarda yaygın ve yoğun bir şekilde yapılmıştır. Türkiye, dünyada ekolojik zenginliğe sahip ülkelerin başında gelmektedir. Bundan dolayı Türkiye tarımda olduğu gibi, sebzecilik açısından da şanslı bir konumdadır (Engindeniz, n.d.)

Marul (*Lactuca sativa L.*), papatyagillerden *Asteraceae* (*Compositae*) familyasından büyük yapraklı, kendine döllen, tek yıllık yerli bir türdür. Marul bitkisinin yetiştirilmesi kolaydır ve hem ilkbahar hem de sonbaharda ekilebilir. Marul Dünya’da üretilen ve tüketilen ekonomik açıdan da önemli olan sebzelerden biridir (Chen ve ark., 2018). Marul ülkemizde üretilen sebzeler içerisinde önemli bir yere sahiptir ve yaklaşık üretimi 262.000 ton olarak belirlenmiştir. Bu sebeple üzerinde yapılan stresle alakalı çalışmalar önem arz etmektedir. Marul TÜİK verilerine göre Türkiye’de toplam tarım alanlarının %3,41’ini oluşturan sebze üretim alanları içerisinde %1,19’luk bir paya sahiptir. Dünyadaki toplam marul üretim alanının yaklaşık 1 milyon hektarı Asya’da bulunmaktadır. Türkiye 490,423 ton ile dünya üretiminde 8. Sıradadır.

Canlılar etkileşim halinde oldukları ve yaşadıkları çevrede uygunsuz koşullar olduğu zaman adaptasyon eksikliğinden kaynaklı çeşitli (biyotik, abiyotik) stres koşullarına maruz kalırlar. Abiyotik stres sınıfından kuraklık, tuzluluk, ekstrem sıcaklıklar, ağır metaller, UV bitki verimliliğini sınırlayan önemli çevresel problemlerdir. Günümüzde ekosistemlerde yaygın bir şekilde birikmeye başlayan ağır metaller, tüm organizmaların yaşamını tehdit eden, tarım ve insan sağlığı üzerinde olumsuz potansiyel etkisi olan önemli bir çevre sorunu haline almıştır. Ağır metallerin insan sağlığı üzerinde oldukça zararlı etkileri mevcuttur, bu metallere maruziyet artan sanayileşme faaliyetleri ile daha da artmaktadır.

Bitkilerin yetiştiği topraklar git gide çeşitli endüstriyel faaliyetler sonucu veya aşırı gübreleme veya egzoz dumanları gibi çevresel antropojenik faaliyetlerin etken olması sonucunda ağır metallerle (Cu, As, Cd, Al, Zn, Hg, Fe, Cr, Pb, Ni, Mn) kirlenmektedir. Bu kirlenme bitkiler için oldukça toksiktir. Ağır metal kirliliğine maruz kalan bitkilerde birçok fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal süreçler etkilenmiştir.

Örneğin Kadmium metali, suda çözünme oranının yüksek olması ve yüksek toksisitesi nedeniyle son derece önemli bir kirletici olarak kabul edilmektedir (Pinto ve

ark., 2004). Kadmiyum metalinin toprakta kalma süresi fazla olduğu için tarımda oldukça önemlidir (Benavides ve ark., 2005). Kadmiyum bitkinin gelişimini ve büyümesini olumsuz yönde etkiler. Bitkilerde başlıca belirtileri klorozis, büyüme yetersizliği ve yaprak büzüşmesidir. Bitkilerde kadmiyumun miktarı kök, gövde, yaprak meyve, tohum sıralaması ile giderek azalır, kısaca miktarının en fazla olduğu yer köklerdir. Kadmiyum kaynaklı etkiler arasında oksidatif stres, kök metabolizmasının inhibisyonu ve fotosentetik aparatın inhibisyonu da yer almaktadır. Oksidatif stres kadmiyum toksisitesinin en çok çalışılan konularından biridir. Kadmiyum toksisitesi reaktif oksijen türlerinin üretimine neden olur ve bitkilerde hasara sebebiyet verir. Daha yüksek dozları ise bitki nekrozuna sebep olmaktadır (Abbas ve ark., 2018).

Arsenik, düşük konsantrasyonlarda her yerde bulunan doğal olayların ve antropojenik faaliyetlerin sonucunda meydana çıkan metalloid özellik gösteren bir elementtir. Arsenik yarı metal özelliğinden dolayı doğada organik ve inorganik formlarda bulunur. Arsenik toksisitesi bitki büyümesini, gelişimini ve üretkenliğini etkileyen çeşitli fizyolojik ve morfolojik bozukluklara neden olmaktadır. Ek olarak As oksidatif stresin oluşumuna neden olur ve dolaylı olarak ROS üretimi meydana gelir. ROS bitkilerin metabolik aşamalarını kısıtlar ve hücrelere çeşitli hasarlar verir.

As ve Cd toksisitesi, bitki yaşamı ve insan sağlığı açısından oldukça önemli iki temel ağır metal olup, As birçok metabolik sürece etki eder ve bu sebeple bitki büyümesinde, gelişiminde azalmalar meydana gelmektedir (Srivastava ve ark., 2014). Cd stresi ise büyümede azalmaya, biyolojik membranların oksidasyonuna, verimde azalmaya yol açan bir etkisi mevcuttur. Bu iki temel ağır metal toksisitesi yapraktaki klorofil içeriğini azaltarak fotosentezi etkilemektedir (Bankaji ve ark., 2014). Yapılan bir çalışmada, *Arachis hypogaea* bitkilerinde, Cd stresi altında fotosentezin azaldığı bildirilmiştir (Shi & Cai, 2008). Aynı şekilde buğdayda da artan As ağır metali ile birlikte buğdayda toplam klorofil içeriğinde bir azalma gözlenmiştir (L1 ve ark., 2007).

As ve Cd uygulanan mısır bitkisinde hidrojen-kükürt bağının bozularak protein denatürasyonunun gerçekleştiği ve bitkinin büyüme ve gelişmesini olumsuz etkilediği gözlenmiştir (S. A. Anjum ve ark., 2015). Ayrıca bitkiler As ve Cd gibi ağır metal stresleri ile başa çıkabilmek için, ROS üretimini azaltmak veya kontrol altında tutmak için, çeşitli enzimler (SOD, CAT, GPX, APX) ve enzimatik olmayan bileşiklerden (Askorbik Asit, tokoferoller, karetonoidler, glutatyon, bitki polifenoller, prolin) oluşan antioksidan savunma sistemleri mevcuttur. Antioksidan savunma sistemleri hücre zarı

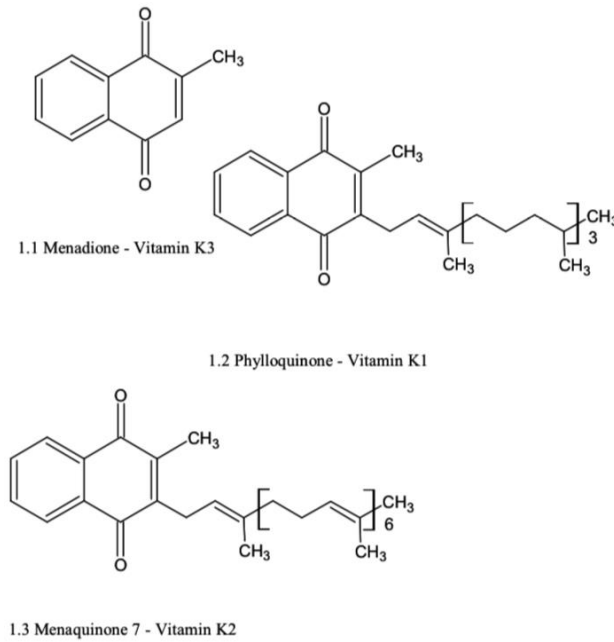
ve organellerini ROS'un zararlı etkilerinden korumak için çok önemlidir (Martínez-Castillo ve ark., 2022).

Çevresel streslerle maruz kalan bitkilerde savunma mekanizmaları aktifleşerek salisilik asit, prolin, glisin betain ve şeker gibi farklı organik bileşikler çok sayıda üretilmektedir. Bu bileşikler bitki bünyesinde olumsuzluklara karşı koruyucu rol oynamaktadırlar (Korkmaz, 2005).

Vitaminler çeşitli gıdalarda bulunan karmaşık organik bileşik grupları olup 2 sınıfa ayrılmaktadır:

- 1) Suda çözünen vitaminler; B ve C vitamini
- 2) Yağda çözünen vitaminler; A,D,E,K vitaminleri

Kan pıhtılaşma faktörleri olarak bilinen K vitaminleri; K1 (Filokinon), K2 (Menakinon) ve K3 (Menadione) olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır (Şekil 1.1). Yapraklı bitkilerde flokinon üretimi mevcuttur ve fotosentezde işlevi bulunmaktadır (Olubukola Sinbad ve ark., 2019a).



Şekil 1. 1. Vitamin K Formları

Koagülasyon kelimesinden gelen yani pıhtılaşmada görevli Vitamin K bitkilerde herhangi bir süreci yönetmez diye bilinirken son on yılda yapılan araştırmalarda bitki metabolizmasındaki vitamin K'nın fiziksel özelliğine olan ilgi ise artmıştır (Manzotti ve ark., 2008).

K vitamini yağda çözünen bir vitamin olmasından dolayı özellikle, K3 (Menadion) vitamininin suda çözünür bir türevi olan (menadion sodyum bisülfid, MSB), oksidatif stresleri ortaya çıkararak hareket edip antioksidan kapasiteyi artırarak oksidatif stresi hafifletir (García-Machado ve ark., 2022). MSB biyotik ve abiyotik streslere karşı savunmayı indükleyen vitamin K3'ten türetilen suda çözünür bir bileşiktir (Jiménez-Arias ve ark., 2015).

Bitkiler üzerinde As ve Cd toksisitesi aktif olarak incelenmektedir. Marul kendine döllen, büyük yapraklı tek yıllık bir bitkidir, önemli bir besin kaynağıdır ve dünya üretiminde 8. Sırada olması sebebiyle stres üzerinde yapılan çalışmalar literatür açısından önemlidir. Literatürde ağır metal stresinin marul bitkisi üzerindeki etkisi özellikle -Arsenik ve kadmiyum stresleri- ve Vitamin K3 uygulaması ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Projede As ve Cd stresine maruz bırakılan marul bitkisinin vitamin K3 su düzenlemesi ve antioksidan enzim (SOD, CAT, POX, APX, GPX gibi) üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Bağlı su içeriği, prolin ve lipid peroksidasyonu gibi fizyolojik ve biyokimyasal parametreler ölçülmüştür.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Bitki Materyali: Marul

Marul, *Lactuca Sativa L. Compositae* familyasının *Cicoreae* toplumuna ait olan popüler yapraklı bir sebze türüdür (Pink & Keane, 1993). Yapılan araştırmalar gösteriyor ki marul ilk olarak Kafkasya yakınlarında *L. Serriola*'dan evcilleştirilmiştir (Wei ve ark., 2021). Kendi kendine tozlaşabilen marul, dünyada önemli sebze türlerinden biri olmakla beraber insanlar için doğrudan besin ve enerji kaynağını sağlamaktadır ve dünyanın her yerinde yaygın olarak üretilir. En büyük üretici ise Çin'dir (W. Zhang ve ark., 2020) ve (Mou, 2005). Ekonomik değer ve üretim açısından ABD'de önemli yere sahiptir. Özellikle Çin ve Güneydoğu Asya'da yaygın olarak bulunan yenilebilir bir sebzedir.

Karotenoidler, antioksidanlar, vitaminler ve diğer fitobesinler açısından oldukça önemli bir sebze türü ve iyi bir flavonoid kaynağı olan marul, su ve besin alımını en üst düzeye çıkarmak için derin ve yaygın bir kök sistemine sahip yıllık bir bitkidir. Farklı marul çeşitleri mevcuttur. Bu farklılık yaprakların şekli, rengi, yüzeyi ve dokusundan kaynaklanmaktadır (Gan & Azrina, 2016).

Marul bitkisi büyük ekonomik değere sahiptir. Türkiye, ekolojik açıdan zengin olduğu için tarımda olduğu gibi sebzecilik açısından da şanslı bir konumdadır. Dünya'da marul üretimi FAO'nun 2014 verilerine göre yaklaşık 24,900,000 tondur (Şen ve ark., 2016). Ülkemizde marul, sebze üretiminde önemli yere sahip olup üretim miktarı 262.000 tona yakındır. Salata ve marul, besleyici değeri düşük, az kalorili fakat iştah açıcı özelliği sebebiyle, sofraların vazgeçilmeyen bir salata sebzesidir. Özellikle Doğu Akdeniz bölgesi tarım açısından iklim koşulları bakımından önemli bir bölgedir. Başta marul olmak üzere çeşitli sebzelerin bu bölgede dört mevsim yetiştiğini söyleyebiliriz. Bu bölgede yetişen marul, toplam üretimin %34'ünü oluşturmaktadır (Sangün & Satar, 2012).

Marul, hızlı büyümesi ve olgunlaşması için serin havada ve bol güneşte üretilen bir sebze türüdür ve iyi verim için sık sulamaya ihtiyaç duyar. Yaprak özelliklerine göre 3 ana gruptan oluşmaktadır: Baş ya da göbekli marul (*L. sativa var. Capitata*), kıvrıkcık

yapraklı marul (*L. sativa var. crispa*), cos marul (*L. sativa var. longifolia*) (Kandemir ve ark., 2021).

Protein ve yağ oranları çok çok azdır ve nişasta ihtiva etmezler, ancak iyi bir A ve C vitamini kaynağıdır, antioksidan özelliği yüksek sebze türüdür (Yağmur & Aydın, 2021). Marulda bulunan yüksek Cd konsantrasyonu, marulun tüketimiyle birlikte insanların ağır metal toksisitesine maruz kalmasının temel sebebidir ve sağlık açısından tehlikelidir (Zhao ve ark., 2021).

Düşük sodyumlu, az kalorili ve az yağlı olan marul, C vitamini, demir lif gibi mineraller bakımından oldukça zengin bir salata sebzesidir. Ayrıca marul, karotenoidler, flavonoidler, askorbik asit, B grubu vitaminler, tokoferoller gibi sağlık açısından yararlı olan doğal fitokimyasal ve vitaminlerin bol bir kaynağıdır (M. J. Kim ve ark., 2016).

Marulda en fazla miktarda bulunan fitokimyasallar polifenollerdir. Yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalarda taze marul tüketiminin antioksidan aktiviteye olumlu etki ettiği, diyabeti önlediği ve bazı kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği bildirilmiştir (D. E. Kim ve ark., 2018). Marul insan sağlığına yararlı, en çok tüketilen bol miktarda bulunan doğal bir antioksidan kaynağı olmakla birlikte anti-diyabetik, anti-inflamatuar ve anti-kanser etkileri mevcuttur (Yang ve ark., 2022).

Çevresel biyotik ve abiyotik streslerin marulda gen ekspresyonu başta olmak üzere klorofil içeriği, fotosentez hızı, protein düzeyi gibi parametreler üzerinde oldukça önemli etkisi mevcuttur (Du ve ark., 2020).

Yapılan çok sayıda çalışma, marul ve marul özlerinin reaktif oksijen türlerini süpürmede ve üretimini engellemede ve dolayısıyla da o serbest radikallerin azalmasında etkili olduklarını bildirmiştir. Diğer sebze türlerine kıyasla marulun nispeten daha düşük bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca marul çeşitlerine göre de antioksidan kapasitede değişiklikler meydana gelmiştir. Örneğin, kırmızı marulun antioksidan kapasitesi yeşil yapraklı marula göre daha yüksektir. Maruldaki antioksidan kapasite polifenol içeriği ile doğru orantılıdır. Ayrıca marulun toplam antioksidan aktivitesi marulun çeşidi, hasat zamanı ve yaprak sayısına göre değişmektedir. Örneğin gevşek yapraklı marulun en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olup doğal olarak en yüksek radikal süpürme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Yang ve ark., 2022).

Önceki araştırmalarda yeşil yapraklı sebze türlerinin diğer sebzelere göre ağır metal alınımına ve birikimine daha yatkın oldukları bildirilmiştir. Örneğin yapılan bir

çalışmada marul bitkisinin domates ve lahana gibi diğer bitki türlerine göre arsenik alınımı önemli seviyelerdedir (Cooper ve ark., 2020).

2.2. Bitkinin Büyümesini Etkileyen Stres Faktörleri

Canlılar doğaları gereği çevreleriyle sürekli etkileşim halindedir ve birçok stres unsuruna maruz kalırlar (Büyük ve ark., 2012). Stres kavramı bitkilerde büyüme ve gelişmeyi azaltan veya durduran, bitkinin verimlilik ve kalitesini etkileyen hatta bitkinin ölümüne gitmesine sebep olan olumsuz faktörler olarak tanımlanır (Fujita ve ark., 2006). Bitkiler sesil yaşamları gereği içinde oldukları çevredeki olumsuz koşullardan kendini koruyamaz ve bu olumsuz koşullardan oldukça etkilenir. Bu durum sürekli veya akut olabilir (Madlung & Comai, 2004). Stres faktörleri genellikle biyotik ve abiyotik stres olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır (Levitt, 1985).

2.2.1. Biyotik Stres

Bitkilerdeki biyotik stresin kaynağı böcekler, virüsler, nematodlar, mantarlar, bakteriler ve yabancı otlardır (Singla & Krattinger, 2016). Biyotik stres hasat edilen meyvelerde zararlı mikroorganizmaların neden olduğu bulaşıcı hastalıktan kaynaklanır ve genellikle çürüme olarak isimlendirilir (Atkinson & Urwin, 2012). Biyotik stres etmenleri aşırı durumlarda bitkinin ölümüne yol açan besin maddelerinden doğrudan mahrum kalır. Biyotik stresin tarımda da önemi büyüktür (Wrigley ve ark., 2015). Tarımda yaygın ve ciddi bir sorun olan biyotik ve abiyotik stresler bitkinin gelişimini ve verimini derinden etkiler, ağır kayıplara neden olur (Shameer & Prasad, 2018). Abiyotik stres başlıca mahsul bitkilerinin kaybına neden olmaktadır.

2.2.2. Abiyotik Stres

Abiyotik stres tuzluluk, sıcaklık, kuraklık, ağır metaller, UV, donma, ışık, hipoksi gibi stresleri içerir (Hirayama & Shinozaki, 2010). Abiyotik streslerden biri olan ağır metal stresinin bitkiler üzerinde ciddi anlamda toksik etkileri mevcuttur. Günümüzde, ekosistemlerin toprak, su ve hava gibi ortamlarında yaygın bir şekilde birikmeye başlayan ağır metaller, Dünya yüzeyindeki tüm organizmaların yaşamını tehdit eden önemli bir çevre sorunu halini almıştır. Ağır metal kirliliği biyosferi etkiler ve çevre kirliliğine yol açmaktadır (Berti & Cunningham, 2000).

Çevre kirliliği toprağın, suyun ve havanın kirlenmesidir. Bu kirleticiler de bitkinin büyüme ve gelişmesi olumsuz yönde etkilemektedir (“Kadmiyum, Krom ve Kurşunun *Ceratophyllum Demersum* L. ve *Pogostemon Erectus* (Dalzell) Kuntze Üzerine Fitotoksitesinin Değerlendirilmesi,” 2018).

2.2.2.1. Ağır Metal Stresi

Mangan, Demir, Nikel, Kadmiyum, Civa, Bakır, Kobalt, Çinko, Arsenik gibi metallerin normal düzeyleri bitkiler için temel mikro besinler olsa da fazla seviyeleri toksiktir ve bitki büyümesi başta olmak üzere yaşlanmasını, metabolizmasını ve fizyolojisini ciddi oranda etkiler (Ghori ve ark., 2019).

Son zamanlarda artan sanayileşme, nüfus, kentleşme, uzun süreli fosfat gübre kullanımı, ilaç ve fosil yakıtların aşırı kullanımı, evsel atıklar vb. antropojenik koşullara bağlı olarak ekosistemlerin su, hava ve toprak gibi ortamlarında yaygınlaşan ağır metal birikimi dünyada canlı yaşamını tehdit eden ve çevre güvenliğini olumsuz yönde etkileyen önemli bir sorun haline gelmiştir (Yerli ve ark., 2020).

Ağır metaller insan vücuduna hava ve su yolu ile girerek sağlık açısından ciddi tehlikeler arz ederek insanlarda akut veya kronik olmak üzere kanserle birlikte böbrek disfonksiyonu, sinir sistemi bozuklukları, cilt lezyonları gibi çeşitli hastalıklar meydana gelmiştir, en toksik ağır metallerin başında kurşun, civa, kadmiyum, bakır yer alır (Turna & Yavuz, 2016; Chunhabundit, 2016; Gazwi ve ark., 2020; Lisiewicz ve ark., 2012).

Ağır metale maruz kalan bitkilerin gelişimi, temel besin maddelerinin eksikliğinden dolayı sağlıklı bitkiye göre daha geridedir. Dolayısıyla ağır metallerin bitkilerde birikimi, verim ve kaliteyi azaltır (Mengoni ve ark., 2000). Ağır metalleri diğer kimyasal kirleticilerden ayıran özellikler; çevre şartlarına dayanıklı yapıları, biyolojik sistemi tehdit edici özellikleri ve besin zincirine kolaylıkla alınıp canlı organizmalarda birikme göstermeleridir (Sharma & Dietz, 2009).

Ekosfere ulaşan ağır metallere mangan, kobalt, çinko, bakır, nikel ve molibden bitki gelişimi için gerekli iken (Asri & Sönmez, 2006), Arsenik (As), civa (Hg), Cd ve Pb gibi bazı ağır metaller ise bitki ve hayvan gelişimi için gerekli olmayan elementlerdir.

Ağır metal kirliliğine maruz kalan bitkilerde özellikle, kök hücre duvarları ve plazma membranı çok etkilenir. Çünkü metalle ilk karşılaşan organ bitki köküdür ve çoğu metalin %70-90'ı köklerde birikir (Piršelová ve ark., 2011).

Ağır metallere maruz kalan As ve Cd bitki yaşamı için tehlikeli olan iki ana ağır kirleticidir (White & Brown, 2010). Bu toksik metaller bitkilerin hem yer altı hem de yer üstü yüzeyleri tarafından (Patra ve ark., 2004) kolaylıkla alınır ve bitkilerin fizyolojik, morfolojik, biyokimyasal özelliklerini ciddi anlamda etkiler (Gupta ve ark., 2013). Yüksek konsantrasyondaki ağır metal birikimi bitkilerde birçok fizyolojik süreci olumsuz etkiler, bunlar:

- 1) Aktif bulunan enzimleri inhibe eder
- 2) Fotosistemleri etkisiz hale getirir
- 3) Mineral metabolizmasını bozar

Toksik ağır metalleri diğer kirleticilerden ayıran özellikleri biyolojik olarak parçalanmamaları ve canlı organizmalarda birikim göstermeleridir. Dolayısıyla nispeten daha düşük konsantrasyonlarda dahi birçok hastalığa sebep olmaktadır. Ağır metaller parçalanamadıkları için toksik olmayan bileşiklere dönüştürülürler veya fiziksel olarak uzaklaştırılırlar (Tangahu ve ark., 2011).

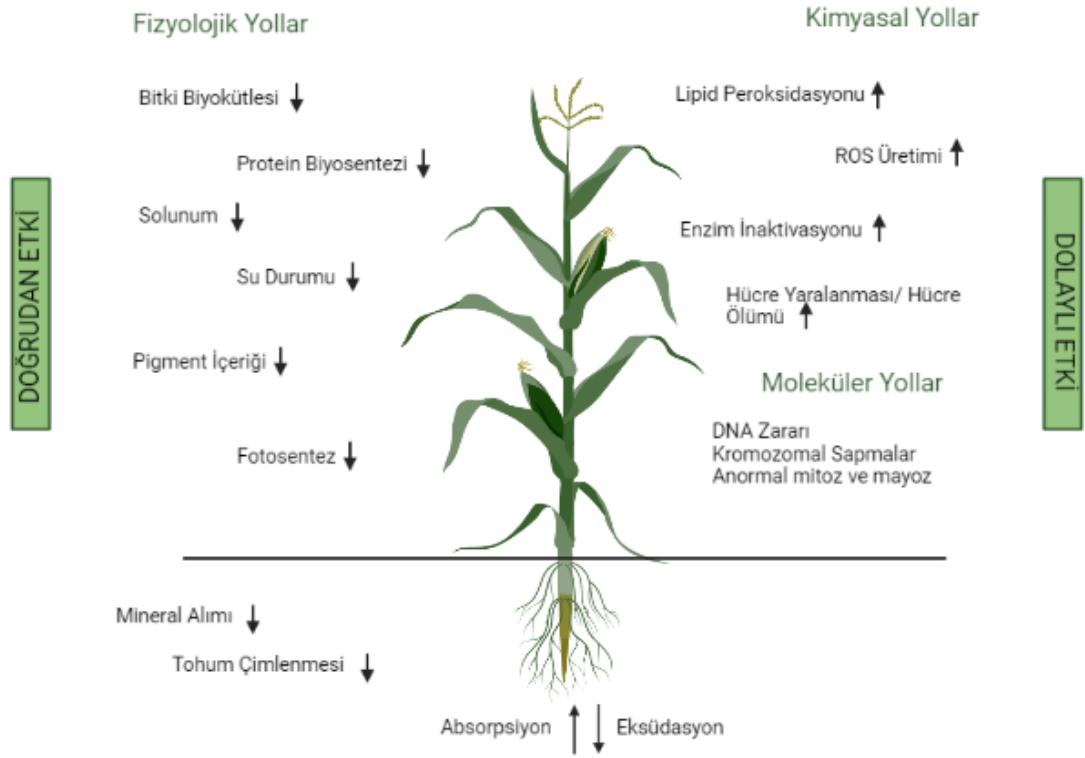
2.2.2.2. Bitkilerde Ağır Metal Stresi

Ağır metallerin yüksek konsantrasyonları bitkiler için toksik etkilere sahiptir ve çevreyi kirletici olarak kabul edilirler, ağır metal ile kirlenmiş toprakta yetişen bitkiler fitotoksisite, kloroz, zayıf bitki büyümesi, verim düşüşü ile sonuçlanır (Chibuike & Obiora, 2014).

Bitkilerin üretimi için kullanılan toprakların çoğu dünyanın birçok yerinde Cd, Zn, Cu gibi ağır metallerle kirlenmiştir, bitkiler ise topraktan ihtiyacı olan suyu alırken toprakta birikmiş olan ağır metallerin su ile beraber bitki bünyesine geçerek birikimi söz konusudur. Havada bulunan ağır metaller ise toz partikülleri aracılığı ile bitki bünyesine geçmektedir ve bitkide ağır metaller birçok fizyolojik süreci ve aktivitelerini engellemekte ya da olumsuz etkide bulunmaktadır, dolaylı olarak ağır metallerin bitkide birikim göstermeleri bitkinin verim ve kalitesini, büyüme ve gelişmesini olumsuz etkilemektedir (Jayakumar ve ark., 2007).

Ağır metal stresi yaşayan bitkiler topraktan ihtiyacı olan gerekli besinleri alamadığı için normal bitkilere göre büyüme ve gelişimlerinde aksaklıklar meydana

gelmektedir. Bitkinin kökleri tarafından alınan ağır metallerin bitkinin gelişimi ve verimi üzerindeki iki yönlü etkileri Şekil 2.1’de ifade edilmiştir (Bhat ve ark., 2019).



Şekil 2. 1. Ağır metallerin bitki kökleri tarafından alınımı ve verimlilik üzerindeki doğrudan veya dolaylı etkileri

Toprakta herhangi bir ağır metal birikimi söz konusu olduğu zaman bitki ihtiyacı olan besin elementlerini topraktan karşılamadığından dolayı bitki büyümesinde bodur büyüme, yaprak sayısında azalma ve küçük yüzey alanına sahip yaprakların oluşması gibi verim ve kaliteyi önemli derecede etkileyen çeşitli olumsuzluklar söz konusudur (Mengoni ve ark., 2000).

Ağır metal stresine maruz kalmış bir bitkide, köklerde suberin adı verilen bileşiğin artmasından dolayı kökler kahverengileşerek bitki ve su arasındaki denge bozularak bitkinin gelişiminde olumsuzluklar bildirilmiştir (Soudek ve ark., 2010).

2.3. Ağır Metale Maruz Kalan Bitkilerde Görülen Değişiklikler

Aşırı ağır metal, bitkilerde birden fazla değişikliğe sebep olmaktadır ve bu değişikliklerin yol açtığı zararların bir kısmı gözle görülebilir (morfolojik değişiklikler) düzeyde iken, birçoğunun belirlenmesi ise karmaşık biyokimyasal analizler gerektirmektedir ve bir bitki ağır metal toksisitesine maruz kaldığı an ilk savunma yolu olarak metal alınımını azaltmak, ayrıca hücreye metal girişini sınırlayan çeşitli kök ve hücresel salgıları sunmayı benimsemiştir, ikinci savunma yolu ise ağır metallerin oluşturduğu toksisiteyi temizlemek için çeşitli mekanizmaların devreye sokulmasıdır (Hall, 2002).

2.3.1. Morfolojik Değişiklikler

Ağır metalin zararlı etkisi ilk ve en çok **köklerde** görülür.

- Kökler normal bitki kökleriyle kıyaslandığında daha kısa, yan köklerde artma ya da azalma, saçak kök sayısında azalma görülür
- Köklerde lignifikasyon ile birlikte hipodermis ve epidermiste bazı yapısal değişiklikler meydana gelir (Aydinalp & Marinova, 2009).
- Gövde ve kökün yaş-kuru ağırlığı azalır, bitki büyümesi yavaşlar (Lombardi & Sebastiani, 2005).
- Yapraklarda sararma, yaprak sayısının ve yüzey alanının küçülmesi (Lanaras ve ark., 1993) ve nekrotik leke oluşumu gibi çeşitli değişiklikler meydana gelir (Köleli ve ark., 2004).

2.3.2. Biyokimyasal Değişiklikler

2.3.2.1. Enzim İnaktivasyonu

Metaller, çoğunlukla enzimlerde sülfidril gruplarına bağlanarak inaktivasyona sebebiyet verirken (ROS ve ark., 1990) bazı metaller ise enzimlerin aktivitelerini arttırmaktadır (Drazkiewicz, 1994), örneğin pirinçte yapılan bir çalışmada çinko ve bakır gibi metallerin yapraklarda klorofilaz enziminin aktivitesini arttırdığı tespit

edilmiştir kısacası belirli metal derişimlerine göre aktivasyon ya da inaktivasyon gerçekleşmiştir.

İlaveten Antioksidan enzimlerde de metal derişimine bağlı olarak aktivasyon ya da inaktivasyon meydana gelmektedir.

Tarım yapılacak topraklarda çeşitli antropojenik etkenler sonucunda toksik düzeyde ağır metaller bulunmaktadır ve bunun sonucunda bitkilerde toksik metal birikimi söz konusu olup sonucunda metabolizma ve beslenmede bozulma meydana gelmekte, bitki büyüme ve gelişiminin azalmasına neden olmaktadır (Rahman ve ark., 2022).

Metal toksisitesinin bitki hücrelerindeki etkileri:

- Oksidatif strese sebebiyet vermekte
- Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) oluşumunu arttırmakta
- ROS'nin oluşması ile nükleik asitlerin, proteinlerin, lipidlerin zarar görmesine yol açmakta
- Antioksidatif enzimlerin aktivitelerini artırmakta veya azaltmaktadır.

Oksidatif zarara karşı bitki hücreleri kendilerini antioksidatif enzimler ya da enzimatik olmayan antioksidantlar gibi çok çeşitli antioksidatif savunma mekanizmaları ile korumaktadır (Karanlık ve ark., 2013).

2.3.3. Metallerin Zarlar Üzerine Etkisi

Metallerin yapısal moleküller üzerinde ve moleküler üstü düzeyde olumsuz etkileri mevcuttur. Metal stresi altında birçok foksiyondan sorumlu olan hücre zarı lipidlerinin yapısında oluşacak değişiklikler, hücre zarını da etkiler. Birçok metal yüksek derişimlerde fosfatın bulunduğu elektron verici bölgeye yani fosfolipitlerin baş kısmına bağlanarak bu lipidlerin kompozisyonunun değişmesine neden olmaktadır ve böylece hücre zarının yapısı ve fonksiyonlarının değişmesine de sebebiyet vermektedir (Lindberg & Griffiths, 1993).

2.3.4. Fotosentez İnhibisyonu

Birçok metal toksik etki düzeylerinde, fotosentez hızının azalmasına neden olur. Fotosentez hızının azalmasının nedenleri şuanlardır:

-Ağır metaller, özellikle başta Cd olmak üzere, kloroplast yapısının değişmesine neden olur ve bitkide klorofil miktarı azalmaktadır.

-Metallerin tillakoid zarlarla ilişkiye girmesi sonucu kloroplastta çeşitli fonksiyonel ve yapısal hasarlar ortaya çıkmaktadır.

-Metallerin yüksek seviyeleri, fotosistem II (PS II)'de ve fotosistem I'de birçok bölgeye zarar verdiği, bazı metallerin belirli derişimlerinin inhibisyona sebebiyet verdiği belirlenmiştir (Ayhan ve ark., 2006). Bunların dışında Cu, Hg, Ni, Cd metallerinin belirli derişimlerinin Plastosiyanin ve Ferrodoksin basamaklarında inhibisyona neden olarak fotosentezi etkiledikleri gösterilmiştir (Nowicka, 2022).

-Rubisco enzimi başta olmak üzere Calvin döngüsünde yer alan enzimlerin bazıları çeşitli metallerin belirli derişimlerinde inhibe olmaktadır (Myśliwa-Kurdiel ve ark., 2004).

-Ağır metaller bitkinin stoma iletkenliğini etkilemektedir. Bitkilerin gaz alışverişinin yapıldığı yerler stomalar olduğu için açılıp kapanmasındaki değişiklikler fotosentez hızını etkilemektedir (Yerli ve ark., 2020).

2.4. Kadmiyum Stresi

Kadmiyum toprakta hareketli yumuşak bir elementtir ve suda yüksek çözünürlüğünden (Andosch ve ark., 2012) dolayı bitkilerin kökleri tarafından kolaylıkla ve hızla alınır.

Kadmiyum ekosistemde yer alan, her yerde bulunan en tehlikeli ağır metal kirleticilerinden biri olup tüm canlılar için oldukça toksik, esansiyel olmayan bir geçiş metalidir (Genchi ve ark., 2020). Çeşitli antropojenik faaliyetler çevrede bulunan kadmiyum konsantrasyonunu önemli derecede arttırmaktadır. Toprağın kadmiyum ile kirlenmesi bitkilerde kadmiyum birikimine sebep olmaktadır, bu da hayvan ve insan sağlığında ciddi sorunlara neden olmaktadır (F. U. Haider ve ark., 2021).

Uluslararası Kanseri Araştırmaları Örgütü verilerine göre Kadmiyum ve bileşenleri insanda kanserojen olarak tanımlanmıştır, uzun süreli kadmiyum maruziyetinde prostat, böbrek, akciğer ve testis kanserleri görülmektedir (Yaklaşım ve ark., 2018). Kadmiyumun topraktan bitkiye aktarım oranının yüksek olması nedeniyle ağırlıklı olarak sebze ve meyvelerde bulunur (Satarug ve ark., 2010).

Cd toksisitesinin bitkide belirgin özellikleri, kloroz, su alımı dengesizliği ve stoma kapanmasıdır (Clemens, 2006). Daha yüksek Cd toksisitesi bitki ölümüne yol

açmaktadır. Cd fotosentetik aparata zarar verir, karbon fiksasyonunu engeller, klorofil ve karotenoid içeriğinde azalmaya neden olur (Sanità Di Toppi & Gabbrielli, 1999). Toprakta kadmiyum, terlemeyi, total su içeriğini ve stomaların aktivitesini azaltarak bitki bünyesinde ozmotik stres meydana gelir ve fizyolojik hasar gerçekleşir (M. S. Haider ve ark., 2021).

Kadmiyum toksisitesi hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve apoptozu etkiler. Bu aktiviteler, DNA onarım mekanizması, reaksiyon oksijen türlerinin (ROS) üretimi ve apoptoz indüksiyonu ile etkileşime girer. Kadmiyum bitki bünyesinde birçok fizyolojik değişikliğe sebep olmaktadır, karbonhidrat ve azot metabolizmalarını değiştirmesi bunun başlıca nedenidir. Kadmiyum stomaların kapanmasına, transpirasyona, klorofil biyosentezinin bozulmasına ve proteinlerin –SH gruplarındaki enzimleri inaktive etmesine sebep olmaktadır (Cole & Volpe, 1983).

Kadmiyum CO₂ asimilasyonunu azalttığından dolayı fotosentez üzerinde olumsuz etkisi mevcuttur. Yapılan bir çalışmada Cd miktarı arttıkça bitki ağırlığı, SOD, CAT ve POD genlerinin ekspresyonunun bastırıldığı, melondialdehit içeriğinin arttığı gözlemlenmiştir (Hassan ve ark., 2005).

Kadmiyum stresi bitkide fotosentezi de ciddi oranda etkilemektedir. Şekil 2.2.'de gösterildiği gibi kadmiyum toksisitesi, mitokondri ve kloroplast aktivitesini inhibe ederek ATP sentezinin azalmasına neden olur, ayrıca membran lipid değişimi ve protein değişimini gerçekleştirir. Makro ve mikro besin alımının azalmasına ve kalvin döngüsünün enzimatik aktivitelerinde azalmaya sebep olur. Kadmiyum stresi hücrede su potansiyeli dengesizliğine neden olur. Bu stres stomaların açılıp kapanması, CO₂ miktarında azalma ve fotosentez gibi birçok süreci etkilemektedir (F. U. Haider ve ark., 2021).

Arsenik çevrede hareketli olarak her yerde bulunur ve nikel, sülfür, bakır, kobalt ve kurşun ağırlıklı olmak üzere yaklaşık 245'ten fazla mineralin biraraya gelerek oluşturduğu bir bileşiktir. İnsan ve diğer canlı organizmalar için zehirli bir metaloiddir (Mandal & Suzuki, 2002). Oksitlenme durumunda arsenat (+V), arsenit (+III), arsenik (0) ve arsin (-III) olmak üzere 4 formda bulunur. Gaz formu olan yani Arsin en toksik formdur. Doğada en çok bulunan formu ise inorganik olan arsenik trioksittir. Toprakta en çok bulunan formu ise + değerlikli olan arsenattır. Suda en yaygın olarak bulunan iki formu ise inorganik olan arsenit ve arsenattır (Nicomel ve ark., 2015).

Arsenik bitki büyümesi için gerekli bir element değildir. Bitkiler, buna rağmen, aldıkları Arseniği organlarında biriktirmektedirler ve genellikle bitki kökleri metaloidin kök uzamasını ve çoğalmasını engellediği As'a maruz kalan ilk dokudur. Bitkide toksisite belirtileri şunlardır: Kök büyümesi inhibisyonu, fotosentezin olumsuz yönde etkilenmesi ve bitki ölümü ile sonuçlanmasıdır (Kumar ve ark., 2014). Ayrıca As, biyokütle birikimini yavaşlatarak veya durdurarak, doğurganlık, verim ve meyve üretimindeki kayıplar yoluyla bitki üreme kapasitesinden ödün vererek bitki büyümesini ciddi şekilde engelleyebilir (Garg & Singla, 2011). Arsenik'in toksik düzeyde birikimi söz konusudur. Arsenik toksisitesi çok sayıda fizyolojik süreci etkiler. As metaline maruz kalan bitkilerde hücre zarları ciddi hasar görür ve elektrolit sızıntısı yaşanır (N. Singh ve ark., 2006). Bu elementin en toksik formları ise arsenit ve arsenattır, çevre için öldürücüdür. Arsenik hücrelerin sülfidril grubunu etkilediği için zehir kabul edilir (Farooq ve ark., 2016) ve (Jaishankar ve ark., 2014). Arseniğin toksisitesi türüne göre değişiklik gösterebilir. Genel olarak Arseniğin inorganik formu organik formundan daha toksik olduğu bilinir. İndirgenmiş olan arsenit formu, enzimatik fonksiyonları bozarken oksitlenmiş olan arsenat formu ise bir fosfat analogu gibi davranarak fosfat alınımını ve taşınmasını engeller. Arsenit formu daha toksiktir (Kaur ve ark., 2011).

Arseniğin düşük dozu bile oksidatif DNA hasarına ve ROS türlerinin oluşumuna sebeptir (Özolat & Tuli, 2016). As'a maruz kalan bitkilerin büyümesinde (bitki boyu, bitki başına yaprak sayısı, yaprak alanı, gövde çapı, yaş ve kuru ağırlığı) ciddi hasarlar mevcuttur. Mahsul verimi, kök ve sürgün biyokütlesi önemli ölçüde düşüktür (Vezza ve ark., 2018).

Bitkilerin As ile kirlenmiş topraktan ve yeraltı sularından arsenik alma eğilimi mevcuttur. Dolaylı olarak toprak ve yeraltı sularındaki Arsenik miktarının artması bitkilerde As içeriğinin de yükseldiği bulunmuştur. Bu da insan sağlığı ve mahsul üretimini tehdit eden bir unsurdur. Bitkilerde As birikimi, çeşitli fizyolojik ve

morfolojik süreçleri etkilemektedir. Mevcut klorofil içeriği azalır bundan dolayı fotosentez süreçleri ciddi anlamda etkilenmektedir. Fotosentez hızında azalma meydana gelerek bitkisi verimi ve büyümesi azalmaktadır (Kalita ve ark., 2018).

As toksisitesi buğday, domates gibi birçok bitkide büyüme, gelişme ve verimin azalmasına sebep olmuştur. Bitkiler üzerinde yapılan bazı araştırmalarda ise klorofilin ve beraberinde fotosentezin bozulması, çeşitli metabolik aktivitelerin bozulması ve ilaveten su durumlarında da çeşitli değişikliklerin olduğu bildirilmiştir.

Ağır metal stresi, As ve Cd gibi stresler bitki dokularına ciddi zararlar veren ve bitkilerde oksidatif hasara neden olan serbest radikal oluşumunu indükler. Ağır metal stresi, oksidatif hasara sebebiyet veren, kararsız ve hücreler için zararlı olan aşırı reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesine yol açar (Yıldırım ve ark., 2019).

Stres koşulları altında ROS üretimi artarak maksimum seviyeyi aşar ve oksidatif strese yol açar, oksidatif stresin sonucunda bitkilerde elektrolit sızıntısı, lipid peroksidasyonu, hücre zarı ve DNA moleküllerinin hasarı yaşanır (Aprile ve ark., 2019).

2.6. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Çeşitli cansız faktörler canlının metabolik olaylarını bozmaktadır ve bu hücrelerde başlıca stres faktörleri redoks tepkimesi temel olarak tüm hücrel olayları elimine etmektedir veya olumsuz yönde etkilemektedir, bu streslerin sonucunda da hücrelerde ROS adı verilen radikal bir molekül oluşmaktadır. Bitkilerde ROS üretimi hücrel metabolizmanın bir parçası olarak var oluşuna rağmen çevresel stresler sonucu DNA'ya, proteinlere, lipitlere ciddi anlamda zarar veren oldukça reaktif aşırı ROS üretimi ve birikimi gerçekleşir (Raja ve ark., 2017).

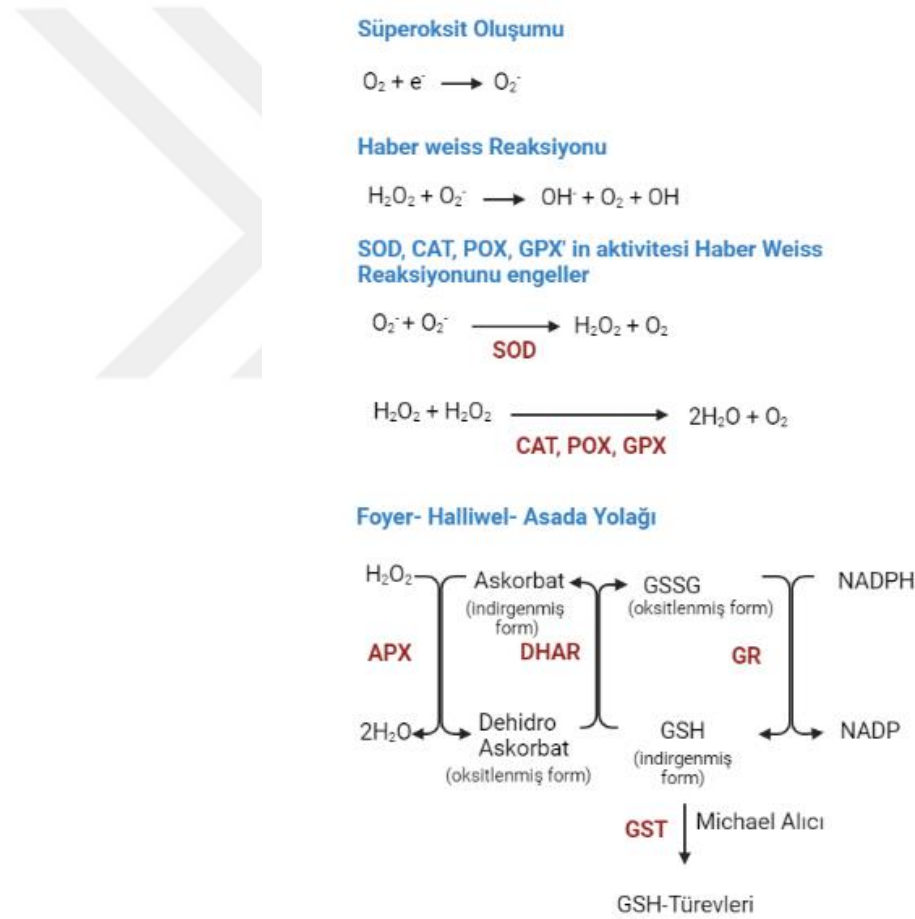
Son yapılan araştırmalar bitkilerde ROS'un ikili rollerini ortaya koydu, geçmişte ROS'nin yüksek konsantrasyonlarda olduğu zaman DNA ve RNA'nın yıkımı, lipid ve amino asitlerin oksidasyonu gibi yıkıcı etkiye sahip tehlikeli rolleri bilinmekteydi şu an ise sinyallemedeki önemli rolleri de bilinmektedir (Meitha ve ark., 2020).

Reaktif oksijen türleri oksijen temelli oluşan, başlıca kloroplast, mitokondri ve peroksizomlarda üretimi gerçekleşen, farklı hücre bölmelerinin metabolizması ve enerji durumu hakkında bilgi sağlayan, oksijen ile ilgili olan tüm metabolik süreçleri (fotosentez, mitokondri) etkileyen ve oksijen içeren eşleşmemiş serbest elektronları bulunan türlerdir. ROS türleri, hidroksil radikali ($\text{OH}^\cdot$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve

süperoksit anyonu (O_2^-) olmak üzere DNA, RNA, lipidler ve proteinlerle etkileşime girerek onları oksitleyen ve sonucunda ciddi hasarlara sebebiyet veren güçlü oksidan bileşiklerdir (Gusman ve ark., 2013).

Her ROS çeşidi kendine has belirgin kimyasal özelliklere sahiptir; örneğin singlet oksijen DNA'nın protein ve lipidlerini oksitleyebilir, hidroksil radikalleri son derece reaktif ve kararsızdır, hidrojen peroksit ise oldukça kararlı bir türüdür ve hücrel sinyallemede baskın role sahip bir ROS türüdür (Waszczak ve ark., 2018).

SOD,CAT,POX,GPX gibi antioksidan enzimler tarafından katalize edilen çeşitli reaksiyonlar Şekil 2.3'de gösterilmiştir (Rajput ve ark., 2021).



Şekil 2. 3. Antioksidan enzim sistemi tarafından katalize edilen temel reaksiyonlar

2.6.1. Singlet Oksijen

Bitkilerde fotosentez sırasında özellikle fotosistem 2'nin reaksiyon merkezinde çoğunlukla ışııkta oluşumu gözlenen başlıca oksidatif stresin oluşumunu tetikleyen reaktif oksijen türüdür (Kruk & Szymańska, 2021).

Yüksek konsantrasyonlarda hücre zarını, proteinleri ve DNA'yı yok eder ve protein sentezini inhibe ederek fotoinhibisyona yol açar ayrıca singlet oksijen sinyallemede kloroplasttan çekirdeğe bilgi aktarımında görev alarak nükleer genlerin ekspresyonunu düzenler (Dmitrieva ve ark., 2020).

2.6.2. Süperoksit anyon radikali (O_2^-)

Süperoksit anyon özellikle kloroplastlarda sürekli üretilen bir radikaldır, mitokondride de oluşumu gözlenir ve ilk oluşan ROS türlerinden bir tanesidir. Mitokondride kompleks 1 ve 3'ten, kloroplastta ise PS1 ve PS2 sistemlerinden oluşmaktadır. Kısa yaşam ömrü ve düşük hareketliliğe sahip olduğundan dolayı orta derecede reaktif bir radikaldır, kimyasal yapısı gereği de negatif yüklü olduğu için biyolojik membranlardan geçiş özelliğine sahip değildir ayrıca süperoksit anyon radikali diğer ROS türlerini oluşturmak için başka reaksiyonlarla (fenton) etkileşime geçebilir (Halliwell, 2006).

2.6.3. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Bitki hücresinde H_2O_2 'in başlıca oluşum yerleri mitokondri, ER, kloroplast, hücre zarı gibi bölümlerde ETS sistemi üzerinde e^- taşınımı ile birlikte O_2^- 'nin SOD tarafından dismutasyonundan sonra oluşumları gözlenir (Sofu ve ark., 2015). 1 milisaniye süre hücrede varlığını sürdüren, suda çözünen, en uzun ömürlü moleküldür ve miktarına bağlı olarak radikal özellik kazanmaktadır. Bitkilerde iki ucu keskin kılıca benzetilir yani düşük konsantrasyonlarda hücrelerde biyolojik süreçlerin ilerlemesinde olumlu özellik gösterir, faydalıdır fakat yüksek konsantrasyonları oksidatif strese sebep vererek hücrelerde zararı söz konusudur (Das & Roychoudhury, 2014). Düşük konsantrasyonlarda fotorespirasyon ve fotosentez, stoma hareketi, büyüme ve gelişme, hücre döngüsünün sağlanmasında etkisi vardır (Quan ve ark., 2008).

2.6.4. Hidroksil radikali (OH⁻)

Reaktif oksijen türleri arasında en kısa ömürlü fakat en güçlü ve en son oluşan radikal olması sebebi ile en reaktif olan hidroksil radikalidir, özellikle DNA/RNA bağlarının kırılmasında görevlidir (Richards ve ark., 2015).

Hidroksil radikali biyoloji moleküllerin hepsi ile etkileşime geçerek zarlar, lipitler ve proteinlerde hücre hasarına neden olmaktadır ayrıca hücrede hidroksil radikalini ortadan kaldıracak bir enzim mevcut olmadığından dolayı aşırı üretimi hücre ölümüne sebebiyet vermektedir (Meitha ve ark., 2020).

ROS uzun süredir abiyotik (kuraklık, sıcaklık, UV, ağır metal stresi) ve biyotik çevresel stres koşullarına verilen cevapta rol oynaması ile tanınmaktadır (Gill & Tuteja, 2010). Reaktif oksijen türleri, bitkilerde iki rolü vardır:

- 1) Yüksek konsantrasyonlarda oksidatif hasara sebep olması
- 2) Düşük konsantrasyonlarda sinyal verici

ROS üretiminin ortak olduğu organeller ise kloroplast, mitokondri ve peroksizomlardır. Normal bitki koşullarında ROS, minimum düzeyde bulunur ve üretimi kloroplastlar, mitokondriler ve peroksizomların metabolizması için gereklidir ancak ağır metal gibi abiyotik stresle karşı karşıya kalındığında önemli miktarlarda üretilir. Daha yüksek ROS seviyeleri bitkilerde oksidatif hasara sebebiyet vermektedir (M. A. Ashraf, Riaz, ve ark., 2019; Ishikawa ve ark., 2010). Ağır metaller protein grupları ile etkileşime geçerek bağlanma eğilimi gösterir ve enzimlerin inaktivasyonuna sebebiyet vererek ROS türlerinin üretilmesine neden olur (Maleki ve ark., 2017).

Bitkilerin streslere karşı fizyolojik ve kimyasal savunmaları enzimatik olmayan ve enzimatik antioksidan bileşenlerden oluşur bu farklı antioksidan sistemler proteinler, nükleik asitler, zarlar, lipitleri oksidatif stresin hasarlarından korumak için gelişmiştir (Demidchik, 2015).

Bitkilerde en yaygın olarak üretilen ROS türleri metal-metaloid stresler altında geliştirilmiş olandır (N. A. Anjum ve ark., 2014). ROS ağır metaller aracılığı ile üretildiği zaman bitkiler, oksidatif stresle mücadele etmek için katalaz, süperoksit dismutaz, peroksidaz, askorbat peroksidaz, glutatyon redüktaz gibi bazı antioksidan enzimleri de dolaylı olarak üreterek savunma sistemi olan antioksidan mekanizmayı aktive eder (Dixit ve ark., 2001).

2.7. Antioksidan Mekanizması

Ağır metaller gibi çeşitli abiyotik stresler, bitkilerde oldukça reaktif ve toksik olan, oksidatif strese neden olan reaktif oksijen türlerinin aşırı birikimine yol açar. Antioksidanlar ise bu strese cevap olarak bitkilerde birikip çeşitli karmaşık bir antioksidan savunma sistemi üreterek biriken ROS moleküllerini temizler ya da üretimini kontrol eder (Gill & Tuteja, 2010) ve (Blokhina ve ark., 2003). Antioksidan savunma sistemi hem enzimatik (SOD, CAT, GPX, APX) hem de enzimatik olmayan [askorbik asit (AA), tokoferoller (vitamin E), karotenoidler, glutatyon ve fenolik bileşikler] ikili bir hücrel savunma sistemidir (Berni ve ark., 2019; Jiang & Huang, 2001). Bitkilerin ROS süpürücü antioksidan enzimleri arasında katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon S-transferaz (GST), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) ve peroksiredoksin (PRX) ler yer alır. Enzimatik olmayan ROS süpürücü antioksidanlar ise GSH, askorbik asit (AsA), karotenoidler, tokoferoller (Vitamin E), flavonoidler gibi fenolik bileşiklerden oluşmaktadır (Gill & Tuteja, 2010).

Marul bitkisindeki antioksidan aktivitenin büyük bir kısmı ise fenolik bileşikten kaynaklanır. Fenolik bileşiklerin dışında bazı vitaminler de (C vitamini, E vitamini) marulda bulunan antioksidan aktiviteye katkı sağlamaktadır (Nicolle ve ark., 2004).

Antioksidanların rolleri, hücrede fazla bulunan serbest radikalleri etkisizleştirmek, toksik etkiye karşı hücreyi korumak ve hastalıkları engellemektir (Young & Woodside, 2001).

Antioksidanlar toksik olan radikaller ile hızlı bir şekilde reaksiyona girerek peroksidasyon ve otooksidasyonun ilerlemesini engeller (Karabulut & Gülay, 2016).

2.7.1. Antioksidan Enzimler

2.7.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD, hücrelerin oksidatif stresten korunmasında rol oynayan, organizmaların sitoplazmasında eksprese edilen yüksek oranda korunmuş bir enzimdir (Wang ve ark., 2018).

SOD enzimi, mitokondride yer alan O₂ radikallerini temizlemede görev alan antioksidan enzim ailesidir. Süperoksit dismutaz enzimleri, reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu hasarlara karşı ön savunma sistemini oluşturmaktadır (Younus, 2018). Süperoksit radikallerini daha az reaktif olan hidrojen peroksit'e dönüştürür.



SOD enzimleri SOD 1 (sitoplazmik Cu-Zn SOD), SOD 2 (Mangan SOD), SOD 3 (hücre dışı Cu-Zn SOD) olmak üzere 3 izoforma sahip enzimlerdir.

SOD 1 ökaryotlarda karakterize edilen, sitozolde yüksek oranda bulunmakla beraber mitokondriyal matriste, çekirdekte ve sitoplazmada bulunur (Fukai & Ushio-Fukai, 2011; Miao & St. Clair, 2009).

SOD 2 enzimi içerisinde Mn bulunan mitokondri matrisinde ve iç zarlarda yer alan bir Süperoksit dismutaz enzim izoformudur ("Comp. Biol. Norm. Lung," 2015). Mangan SOD'lar mitokondri ve peroksizomlarda meydana gelir ve bu enzimler Mn atomu olmadan işlev göremezler (Alscher, 2002).

SOD 3, hücre dışı matris içinde ve hücre yüzeylerinde bulunan bir Cu ve bir Zn içeren bir tetramerik glikoproteindir. SOD 1 ve SOD 2 izoformların aksine ifadesi yüksek oranda hücre ve dokuya özgüdür (van der Vliet, 2015).

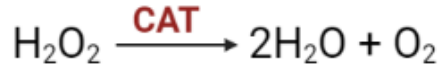
2.7.1.2. Katalaz (CAT)

Katalaz, keşfedilen ilk enzim olmakla birlikte heme içeren tetramerik güçlü bir katalizör enzimdir (Suman ve ark., 2021). Yaygın olarak aerobik canlılarda bulunur. Hayvanlarda bitkilerin tersine yalnızca bir tane katalaz izoformu vardır. Bitkilerde çoklu izoformlar halinde bulunur (McClung, 1997). Katalaz glioksizomlar, peroksizomlar, kloroplast, sitozol ve mitokondride lokalizedir (Boguszevska & Zagdask, 2012).

Genellikle peroksizomlarda bulunan katalaz en önemli antioksidan enzimlerden biridir, H₂O₂ 'yi parçalar ve organelden uzaklaştırır. Reaksiyonu, hidrojen peroksidin suya ve oksijene dönüşümünü katalize eder (X. Liu & Kokare, 2017).

Katalaz iki H₂O₂ molekülünü herhangi bir etkene ihtiyaç duymadan su ve moleküler oksijene dönüştürme yeteneğine sahip, hidrojen peroksidin

uzaklaştırılmasında da oldukça önemlidir ayrıca peroksidazla karşılaştırıldığında CAT hidrojen peroksit için daha yüksek Km değerine sahiptir (Dumanović ve ark., 2021).



Hücre organellerinin birikmesini önler ve hücrelerin oksidatif hasar görmesini önlemek için görevlidir (Nandi ve ark., 2019). Diğer bir ROS süpürücü enzim olan askorbat peroksidaz (APX) hem kloroplastta hem de sitozolde bulunur ve özellikle katalazın olmadığı durumlarda devreye girer.

CAT aktivitesi genellikle yüksek Cd konsantrasyonlarına maruz kalmanın ardından azalmıştır.

Çizelge 2. 1. ROS'un detoksifikasyonunda yer alan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar, önemli fonksiyonları ve hücre içindeki konumları (Mushtaq ve ark., 2020).

Enzimatik Antioksidanlar	Hücredeki Lokasyonu	Fonksiyon
Katalaz (CAT)	Mitokondri ve Peroksizomlar	H ₂ O ₂ 'nin H ₂ O ve O ₂ 'ye katalizlenmesi
SOD	Mitokondri, Peroksizomlar, Sitozol ve Kloroplast	O [•] -'nin H ₂ O ve O ₂ 'ye dönüştürülerek uzaklaştırılması
APX	Mitokondri, Peroksizomlar, Sitozol ve Kloroplast	İndirgeyici madde olarak (AA) kullanarak H ₂ O ₂ 'yi H ₂ O ve DHA'ya indirger.
GR	Mitokondri, Sitoplazma ve Kloroplast	GR, ASC-GSH döngüsünün anahtar bir enzimidir, yüksek hücresel GSH/GSSG oranını korumak için glutatyon disülfürde bir disülfid bağının oluşumunu katalize eder ve kloroplastta Mehler reaksiyonu tarafından üretilen H ₂ O ₂ 'yi detoksifiye eder
DHAR	Mitokondri, Sitoplazma ve Kloroplast	İndirgeyici substrat olarak GSH kullanarak DHA'nın AsA'ya indirgenmesini katalize eder ve bitki hücresinin redoks durumunu korur.
MDHAR	Mitokondri, Sitoplazma ve Kloroplast	İndirgeyici ajan olarak NADPH kullanarak MDHA'dan AA'yı yeniden üretir.
GPX	Mitokondri, Sitoplazma ve Kloroplast ve Endoplazmik Retikulum	O ₂ ve peroksi radikallerinin ara formlarının etkili söndürücüsü olarak işlev görür
Prolin	Mitokondri, Sitozol ve Kloroplast	OH [•] ve 1O ₂ 'yi temizler ve LPO nedeniyle ortaya çıkan zararlı etkileri önler
Flavonoidler	Hücre vakuelleri	OH [•] , 1O ₂ ve H ₂ O ₂ 'yi süpürür
AA	Sitozol, Mitokondri, Peroksizom, Kloroplast, Vakuol ve Apoplast	Membranları oksidatif hasardan korur ve metal bağlayıcı enzimlerin işlevini korur
GSH	Sitozol, ER, Mitokondri, Kloroplast, Vakuoller, Peroksizomlar ve Apoplast	OH [•] , 1O ₂ , H ₂ O ₂ ve O [•] -'yu yakalar, ayrıca askorbik asidin GSSG üretmek için yenilenmesinde rol oynar, bitkilerde ağır metal iyonlarının şelatlanmasına yardımcı olur
Karotenoidler	Bitkilerin hem fotosentetik hem de fotosentetik olmayan dokularında bulunur.	PSI ve PSII'den gelen fazla enerjinin söndürülmesi, lipid peroksidasyonunu inhibe eder, 1O ₂ ve üçlü Klorofil (3Chl*)

2.7.1.3. Peroksidaz (POX)

Peroksidaz, aktif bölgesinin kimyasına göre heme içeren ya da içermeyen bir oksidaz enzimi sınıfıdır. Aktivitesi 1855 yılında bitkilerle keşfedilmiştir. Peroksidaz enzimi, katalaz gibi serbest radikal mekanizmasını kullanarak (de Albuquerque ve ark., 2019) oksidasyon-redüksiyon reaksiyonunu katalize eder (Bindoli & Rigobello, 2013) ancak katalize edilen bu reaksiyon çok çeşitli substratların H_2O_2 ile oksidasyonudur.

Peroksidazlar canlı sistemler için gerekli olmakla birlikte tüm bitki ve hayvanlarda bulunmaktadır. Klasik bitki peroksidazları ise heme grubu içeren birden fazla farklı işlev gören enzimlerin iyi çalışılmış bir grubudur, bitkilerin çoğunda farklı izoenzimler olarak ortaya çıkar (Veitch, 2004). Cd, Cr, Cu gibi ağır metallerle karşılaşıldığında peroksidaz seviyesi ya aktive ya da inhibe olur (Woo ve ark., 2009).

2.7.1.4. Askorbat Peroksidaz (APX)

Askorbat peroksidaz, sitozol ve kloroplastta üretilen askorbat-glutasyon döngüsünde hidrojen peroksiti yok etmekle birincil görevli ROS seviyelerini düzenleyen antioksidan savunma sisteminin anahtar bir bileşenidir (M. S. Haider ve ark., 2021). APX, mitokondri, kloroplast ve peroksizomlar gibi farklı hücre altı bölmelerde ROS fazlalığının ortadan kaldırılmasında görevli antioksidan enzimdir. Yapılan çalışmada APX izoformlarının olumsuz çevre koşullarında stres altındaki bitkilerde koruyucu olarak doğrudan rol oynadığı bildirilmiştir (Caverzan ve ark., 2012). Reaksiyon sırasında APX, askorbatı indirgeyici eleman olarak kullanır.

2.7.1.5. Glutasyon Redüktaz (GR)

Glutasyon redüktaz enzimi strese cevapta yer alan molekülleri geri kazandıran enzimlerdir örneğin GSSG'yi askorbat glutasyon döngüsü yoluyla GSH'a dönüştürerek GSH dengesinin korunmasında görevli olan ve enzimler tarafından kullanılan askorbatın geri kazanılmasına yardımcı olan bir antioksidandır (Moreno-Galván ve ark., 2020; ve (Madhu ve ark., 2022).

2.7.1.6. Glutasyon S-Transferaz (GST)

Bitki GST'leri herbisitleri ortadan kaldırma rolüyle detaylıca incelenmiştir. GST'ler sitotoksik bileşikleri detoksifiye eden enzimlerdir ve oksidatif stres, ağır metal stresi, patojen saldırıları gibi streslere karşı yanıtın oluşmasında görevli enzimdir (Carvalho ve ark., 2015).

2.7.1.7. Glutasyon Peroksidaz (GPX)

Glutasyon peroksidaz, indirgenmiş formda olan glutasyonu (GSH), disülfid forma (GSSG) oksitleyerek hidrojen peroksit radikalini ortadan kaldırmak veya birikimini azaltmak için glutasyon-askorbat döngüsünde önemli bir bileşendir. Bitki GPX antioksidanlarının temel işlevi ise strese bağlı gelişen oksidatif hasarın sebebiyet vereceği programlanmış hücre ölümünü önlemektir. Ayrıca glutasyon peroksidazlar abiyotik stres tarafından indüklenebilir (L. Zhang ve ark., 2019).

2.7.2. Enzimatik Olmayan Antioksidan Sistemler

Askorbik Asit (C vitamini), tokoferoller (E vitamini), karotenoidler, glutasyon, bitki polifenoller, prolin gibi enzimatik olmayan antioksidanlar, serbest radikal reaksiyonunu kesintiye uğratarak çalışırlar (Shahidi & Zhong, 2010).

Bitkilerde abiyotik stres altında savunma gösteren, enzimatik olmayan antioksidan bileşenler glutasyon, karotenoidler, askorbik asit, fenolikler ve flavonoidlerden oluşmaktadır (M. A. Ashraf, Riaz, ve ark., 2019). Özellikle glutasyon, askorbat ve tokoferoller gibi antioksidanlar redoks tamponu gibi hareket ederek, yüksek ROS üretiminin zararlı etkilerinden bitkileri korumaktadır (Foyer & Noctor, 2005).

2.7.2.1. Karotenoidler

Tetraterpenoidler olarak da bilinen karotenoidler, en yaygın yağda çözünen ve bitki büyümesi ve savunmasında görevli rol oynayan fitobesinlerdir (Stahl & Sies, 2003). Karotenoidlerin antiinflamatuvar, antikanser, nöroprotektif ve antioksidan özellikleri mevcuttur. Karotenoidler, fotosentezde yardımcı pigmentler olarak görev

olarak bitkileri fotooksidatif strese karşı korur. Karotenoidler sınıfında en yaygın bilinen A vitamini öncüsü olan β -karoteninin birincil kaynağıdır. Marulda bulunan karotenoidler β -karoten, lutein ve β -kriptoksantindir ve β -karoten güçlü bir antioksidan olup iyi bir O₂ temizleyicidir (Pham-Huy ve ark., 2008).

ROS ile karşılaştığında singlet oksijeni ve peroksil radikallerini ortadan kaldırmadan sorumlu önemli bir antioksidan savunma sistemi elemanıdır (Moussa ve ark., 2020). Karotenoidlerin, diğer ROS türlerine kıyasla peroksil radikallerini daha iyi ve verimli bir şekilde temizlediği bilinmektedir. Bu aktivitelerinden dolayı lipoproteinlerin ve hücrel membranların ROS türlerine karşı korunmasında önemli rollerinin olduğu bilinmektedir (Nimse & Pal, 2015).

2.7.2.2. Askorbik Asit

Bitki büyümesinde ve savunmasında ve hayatta kalmasında bir antioksidan olarak görev alan askorbik asit asıl olarak de novo yollar ile sentezlenmektedir. L - Askorbik asit (AsA) bitkilerde oldukça bol bulunan bir metabolittir ve hücre büyümesi, bölünmesi ve gelişiminin yanı sıra bitki stres fizyolojisinde önemli rollere sahiptir (Conklin, 2001; Smirnoff, 1996). Askorbik asit bitkilerde abiyotik ve biyotik streslere cevap olarak ortaya çıkan oksidatif strese karşı savunmada ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) detoksifikasyonunda önemli rolü olan en bol bulunan enzimatik olmayan, suda çözünen bir antioksidandır (Gest ve ark., 2013; Hossain ve ark., 2018). Askorbik asit, hormonların biyosentezinde, fotosentezde ve diğer antioksidanları yenilemede görevli olan enzimlerin kofaktörü olarak işlev görmektedir (Gallie, 2013). Askorbat rejeneratif olduğu için en güçlü antioksidanlardan sayılır (Akram ve ark., 2017).

Askorbatın, ROS'u temizlemesinin yanı sıra çeşitli reaksiyonlarda da elektron donörü olarak görevi vardır. Bu görevleri sırasında monodehidroaskorbata ve dehidroaskorbata dönüşür. Dehidroaskorbat kararsız bir bileşik olduğu için tekrar askorbata indirgenmelidir aksi takdirde ortadan kaybolur ve sadece antioksidan ve serbest radikal süpürücü olmak üzere iki işlevi bulunmaktadır. Askorbatın belirli seviyelerde ve konsantrasyonlarda yükselmesi, tokoferol geri dönüşümün kapasitesini ve dolaylı olarak metal kaynaklı oksidatif stres sırasında tokoferollerin antioksidan kapasitesini artırabilir (Kanwischer ve ark., 2005).

Askorbik asit meyve ve sebzelerde önemli ölçüde bulunmaktadır. Öncelikle marulda yer alan C vitamininin içeriği marul çeşitlerine göre farklılık göstermektedir,

mesela kıvırcık maruldaki C vitamini en düşük seviyededir. En fazla tüketilen sebzeler arasında yer alan marul askorbik asit açısından da önemli bir kaynaktır.

2.7.2.3. Glutasyon (GSH)

Glutasyon (GSH), hücre içinde en çok bulunan suda çözünür bir tiyol bileşiği olup glutamat-sistein-glisin (Glu-Cys-Gly) aminoasitlerinden oluşan bir tripeptittir (Galano & Alvarez-Idaboy, 2011). Glutasyon çevresel streslerin neden olduğu oksidatif strese karşı hücre savunmasında görevli enzimatik olmayan güçlü bir antioksidandır (Hasanuzzaman ve ark., 2017). Glutasyonun hücre içi sinyal iletiminde de önemli rolleri mevcuttur (Kennedy ve ark., 2020).

Yapılan birkaç çalışma, çeşitli çevresel zorluklara karşı glutasyonun bitki savunma genlerinin uyarılmasında görev aldığını ve GSH ve/veya GSH ile ilişkili enzimlerdeki yükselişin, çeşitli biyotik strese karşı (bakteri, mantarlar ve bitki virüsü) savunma direnci ile ilişkili olduğunu bildirdi (Hernández ve ark., 2017). Glutasyon birçok bitkide yaygın olarak bulunur ve ROS'un süpürülmesinde doğrudan veya dolaylı olarak rol alır. Hücre çoğalması, büyüme ve gelişmesini modüle eder (El-Beltagi ve ark., 2020).

Abiyotik stres altındaki bitkiye eksojen GSH uygulaması bitkinin strese karşı toleransını artırır. Yapılan bir çalışma, çevresel abiyotik streslerden olan kuraklık stresine karşı eksojen glutasyon uygulamasında, glutasyonun prolin içeriğini düzenleyerek ozmotik dengeyi sağladığını ve bitki hücrelerinin su durumunu iyileştirdiğini bildirmiştir (Nahar ve ark., 2015).

Ayrıca ağır metal stresine karşı glutasyon hücrede fitoşelatinlerin oluşumu ile birlikte vakuollerde ağır metallerin tutulmasına yardımcı olur (Sharma & Dietz, 2006).

2.7.2.4. Tokoferoller (E Vitamini)

E vitamini olarak bilinen tokoferoller, insan beslenmesi için gerekli olan lipidde çözünen, kuvvetli antioksidan özellikleri olan moleküllerdir. Hücre membranını ve zarını serbest radikal aracılı olan lipid peroksidasyonu hasarından korumaktadır (Ecz, 2003). E vitamini fotosentetik organizmalar aracılığı ile bitkiler tarafından üretilir. Tokoferoller α tokoferol, β tokoferol, γ tokoferol ve δ tokoferol olmak üzere 4 forma sahiptir. En yaygın biyolojik aktif formu α tokoferoldür (Engin, 2009).

E vitamininin görevi çeşitli enzimlerle etkileşime geçerek hücre zarı, duvarı ve lipid alanları gibi hücresel yapıları korumanın yanı sıra bir antioksidan molekül olarak reaktif oksijen türlerini (ROS) ve nitrikoksiti temizlemektir. Örneğin α - tokoferolün antioksidan etkisi hücre membranındaki yağ asitlerini korumaktır. Tokoferolün lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkisinden başka, humoral ve hücresel bağışıklık üzerinde de düzenleyici etkileri mevcuttur. α - tokoferol, peroksil radikalleri ile reaksiyona girerek oksidasyonu durdurur

Tokoferol diğer adıyla E vitamininin, kuvvetli antioksidan özelliklere sahip olma özelliği onun sinyal iletimi, gen anlatımının düzenlenmesi ve oksidatif stres cevabı gibi birçok sürece etki etmesini sağlamaktadır (Sezer, 2017).

E ve C vitamini gibi antioksidan vitaminler singlet oksijeni ortadan kaldırarak serbest radikal oluşumunu engeller ve hücreleri lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadırlar.

Yapılan bir çalışmada arabidopsis bitkisinin Cd veya Cu metalleri tarafından indüklenen oksidatif strese toleransında tokoferollerin çok önemli rol oynadığı gösterilmiştir. E vitamini eksikliğinde Cd veya Cu metalinin sebep olduğu oksidatif hasar çoğaldı ancak dışarıdan E vitamini takviyesinde ise oluşan oksidatif hasara karşı koruyucu bir rolünün olduğu ispatlanmıştır (Dos Santos ve ark., 2005).

Doğal antioksidan olan tokoferollerin α ve γ formları, maruldaki ana izomerlerdir (Nicolle ve ark., 2004).

2.7.2.5. Flavonoidler

Flavonoidler, bilinen 8000'den fazla farklı bileşik ile bir araya gelerek çeşitli bitkilerden izole edilen doğal değişken fenolik maddeler olup, bitkilerin tohum ve meyve kısmında bol miktarda bulunan koku, tat ve renkten sorumlu (Rodríguez De Luna ve ark., 2020), sekonder metabolit grubudur. Strese karşı duyarlı olan flavonoidler, abiyotik ve biyotik stresler sonucunda üretilen reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engellemekte veya oluşan ROS seviyelerini düşürmekte görevli olan önemli ve güçlü bir antioksidan bileşiktir (D'Amelia ve ark., 2018). Flavonoidler, çevresel strese karşı diğer antioksidan enzimlerin aktivitelerinde herhangi bir azalma olduğu durumda devreye giren ikincil bir antioksidan sistem olarak yer almaktadır ve strese maruz kaldığında biyosentezi indüklenmektedir (Baskar ve ark., 2018). Flavonoidler doğal kaynaklı oldukları için diğer antioksidanlara kıyasla daha düşük toksisiteye

sahiptir. Flavonoidler temel olarak 6 sınıfa ayrılmaktadır: Flavonlar, Flavononlar, Flavonoller, İzoflavonoidler, Flavanlar, Antosiyaninler'dir.

Flavonoidlerin birçok biyolojik fonksiyon için kayda değer önemi vardır. Özellikle Quercetin, serbest radikal türlerini temizleyerek lipoprotein oksidasyonunun oluşumunu engeller (Khanam ve ark., 2012).

2.7.2.6. Prolin

Prolin bir osmoprotektan olup abiyotik stres altındaki bitkilerde belirli miktarlarda üretilmektedir ve stres koşullarına maruz kalan bitkilerde 3 ana rol üstlenerek ozmotik düzenlemeye aracılık ettiği, farklı enzimlerin aktivitelerini artıran bir moleküler şaperon görevinin olduğu (Verbruggen & Hermans, 2008) ve membran bütünlüğünün sağlanmasında pozitif etkiye sahip olduğu bilinmektedir (M. Ashraf & Foolad, 2007). Bitkilerde besin deposu olarak görev alır ve sinyal verme, ROS'ni temizleme, protein stabilize etme ve stres toleransında işlevleri vardır (Hayat ve ark., 2012).

Son birkaç on yılda yapılan çalışmalarda, bitkilerin çeşitli abiyotik streslere karşı toleransı ile prolin birkimi arasında pozitif bir ilişki olduğu gözlenmiştir (Ghosh ve ark., 2022). Ağır metal stresinde prolin birikimi, diğer abiyotik streslerle kıyaslandığında büyüklük ve diğer özellikler açısından genellikle daha fazladır, özellikle Cu ve Cd metallerinin güçlü prolin indükleyicileri oldukları bilinmektedir (Sharma & Dietz, 2006). Yapılan çalışmada ise ağır metal stresi altındaki *Lactuca sativa* bitkisinde prolin birikimi Cd konsantrasyonu ile orantılı olarak arttığı belirlenmiştir (Costa & Morel, 1994). Yapılan bir çalışmada, kadmiyum ağır metalinin prolin birikiminde en güçlü indükleyici olduğu, çinko metalinin ise en zayıf indükleyici olduğu kanıtlandı ayrıca prolin birikiminin ağır metal kirliliği seviyesinin tespitinde kullanılabileceği sonucuna ulaşıldı (Alia & Saradhi, 1991).

Stres koşulları altında bitkilerde prolin birikimi metabolik uyumun sağlanmasında, abiyotik strese maruz kalan bitkilerin hayatta kalmasında önemli bir yöntem olarak kabul edilmiştir ayrıca stresli koşullar altında üretimi gerçekleşen prolin ROS süpürücü, metal şelatör, hücre redoks dengeleyici ve sinyal molekülü olarak işlev görür (Anwar Hossain ve ark., 2014). L-prolinin, ROS temizliği, ozmolit ve metal şelatör işlevlerinin yanı sıra antioksidan görevi de önemli bir yere sahiptir (Hosseini et al., 2022).

Prolin antioksidan sisteme aktif katılım göstererek reaktif oksijen türlerini temizler aynı zamanda osmoregülasyona katılımı ile de hücrelerin ozmolaritesini korumaktadır ve prolin birikimi stres sebebi ile kloroplast organelinde üretilen ROS'u temizleyerek PS2'nin işleyişini korumaktadır (Elkelish ve ark., 2020).

2.8. K3 Vitamini

Vitaminler, çevresel streslere karşı toleransın artırılması ve bitki hastalık direncinin güçlendirilmesinde etkilidir. Bitkilerin abiyotik stres toleransı eksojen vitamin uygulamaları ile arttırılmaktadır (Hong ve ark., 2016).

K vitamini yağda çözünen, 2-metil-1,4-naftokinon türevlerinden oluşan (Wicaksana, 2016) ve güçlü bir antioksidan özelliğe sahip olduğu söylenen bileşiktir. 'K vitamini' terimi almanca koagülasyon kelimesinden türetildiğinden dolayı genellikle pıhtılaşmayı teşvik eden yani kanamayı azaltan ya da kesen özelliklere sahip oldukça geniş bir naftokinonik bileşik grubu olarak bilinir lakin bitkilerde K vitamini herhangi bir pıhtılaşma kanama sürecini yönetmez (Manzotti ve ark., 2008). Bitkilerde K vitamini yaygın olarak bulunmasına rağmen rolleri ve işlevleri tam olarak bilinmemektedir. Bitkilerde K vitamininin fizyolojik işlevi redoks özellikleri ile doğrudan ilişkilidir. Menadion gibi naftokinonlar, oksidan ajan veya indirgeyici ajan veya nükleofil olarak hareket edebilir. Bu özellik K3 vitamininin ROS üretimini arttırabilir (Borges ve ark., 2014).

K3 vitamini, lipitte çözünen vitamin türlerinden biridir. Filokinon (K1 Vitamini) ve menakinon (K2 Vitamini) doğal formlarıdır. Menadion (K3 Vitamini) ise insan yapımıdır. Bitkilere ve mantarlara genellikle suda çözünebilen bir formu olan ve menadion sodyum bisülfid (MSB) formu uygulanır (Borges ve ark., 2014).

K3 vitamininin suda çözünür bir formu olan Menadion Sodyum Bisülfid (MBS), bitkide savunma mekanizmasına aracılık eden, oksidatif stresleri ortaya çıkaran güçlü antimikrobiyal özelliklere sahip önemli bir bitki büyüme düzenleyicisidir (García-Machado ve ark., 2022). MSB, antioksidan kapasiteyi artırarak oksidatif stresi hafifletir (Askari et al., 2021). MSB abiyotik ve biyotik strese karşı savunma mekanizmasını indükleyen suda çözünebilen ve K3 vitamininden türetilen bir bileşiktir. Yapılan çalışmalarda K3 vitamini veya suda çözünebilen menadion türevi olan Menadion sodyum bisülfid (MSB), çeşitli türlerde çeşitli çevresel streslere karşı bitki savunma indükleyicisi olarak gösterilmiştir (Jiménez-Arias ve ark., 2015).

Bitki savunma aktivatörleri bitki savunmasında umut verici bir alternatiftir; özellikle MSB'nin birçok bitki türünde çeşitli patojenlere ve abiyotik streslere karşı savunmada etkin dirençli rolleri vardır (García-Machado ve ark., 2022). MSB uygulamasının abiyotik stres altında bitkilerin gelişimini ve büyümesini iyileştirdiği bilinmekle beraber bitkiler üzerindeki kadmiyumun olumsuz etkisini önemli derecede azalttığı bilinir (Rasheed ve ark., 2018). MSB ile muamele edilen bitkilerde daha düşük seviyelerde hidrojen peroksit oluşumu ve minimum oksidatif hasar gözlenmektedir (M. A. Ashraf, Asma, ve ark., 2019).

K Vitamini, 3 türden oluşmaktadır: K1 (flokinon), K2 (menakinon), K3 (menadion). K1 (flokinon) ve K2 (menakinon) iki doğal biyoaktif formunu oluşturur. Vitamin K3 (menadion) ise K vitamininin yan zinciri olmayan katabolik bir üründür (Kishore ve ark., 2019). K1 yani filokinon bitkilerde fotosentez için gerekli olup vitamin K türleri arasında en yaygın bulunan formudur. Menakinon formu flokinondan sentezlenmiştir. K1 vitamini fotosentezde doğrudan bulunduğu için yeşil yapraklı sebzelerde yaygın olarak bulunur. Ayrıca hayvanlarda K1 vitamini aktif olarak bulunur ve pıhtılaşma faktörlerinin üretiminden sorumlu vitamin olarak literatürde yer almaktadır. Hayvanlarda K1 vitamini menakinon olarak bilinen K2 vitaminine de dönüştürülebilir (Gross ve ark., 2006).

Bakteriler ve diğer mikroorganizmalar ise Menadion formunu oluşturur (Olubukola Sinbad ve ark., 2019b). Menadion'un bitkilerdeki rolü karmaşıktır. ROS üretme, bitkilerde streslere karşı direnci artırma, hipoksinin olumsuz etkilerini dengeleme gibi rolleri bulunmaktadır. K3 vitamini redoks döngüsü aracı olarak da bilinmektedir (Rajashekar ve ark., 2014).

Lactuca sativa (marul) bitkisi A vitamini, C vitamini ve Potasyum açısından zengindir (Ain ve ark., 2018). Menadion sodyum bisülfid, çeşitli biyotik ve abiyotik streslere karşı savunma molekülü olarak rol aldığı bildirilmiştir.

MSB olumsuz çevresel koşullar altında işlevi oldukça önemlidir, iyon taşıyıcı birkaç geni yukarı regüle ederek iyon homeostazı ve antioksidan aktiviteyi artırır ayrıca hızlı bir şekilde prolin oluşumunu sağlamaktadır (Jiménez-Arias ve ark., 2019).

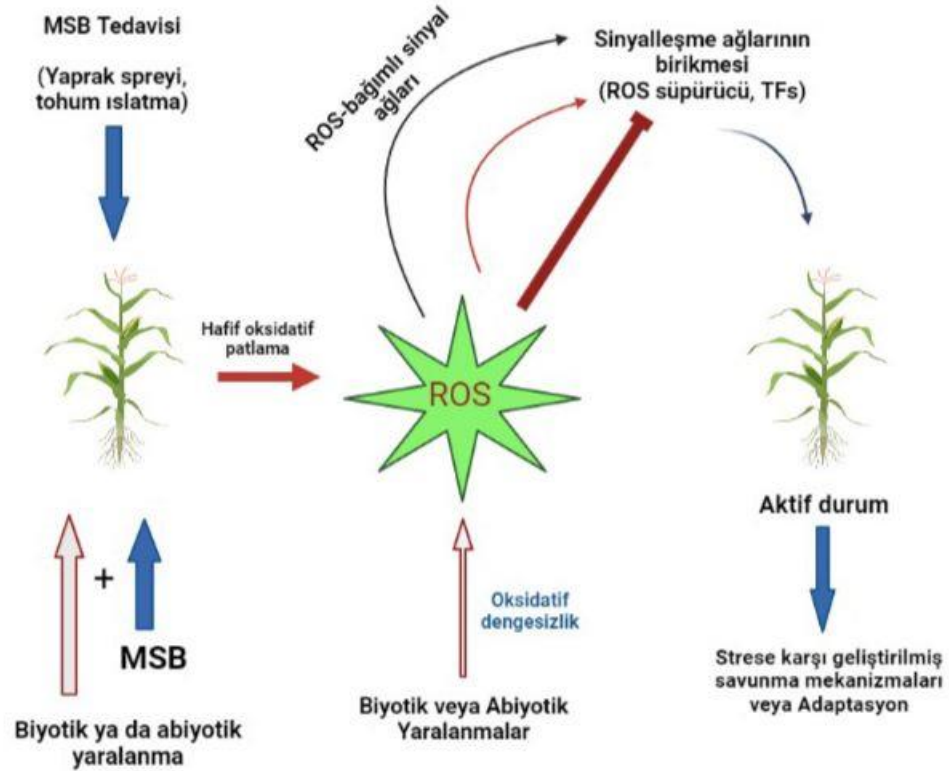
Yapılan bir çalışmada, K3 vitamininin suda çözünür bileşiği olan menadione sodyum bisülfid (MSB), bitkinin tohumlarına ıslatma yöntemiyle uygulanmıştır, MSB uygulaması yapılan bitkide prolin miktarı diğerlerine oranla iki kat daha fazla olmuştur ve yetişkin bitkilerde tuz stresi toleransını indüklediği bulunmuştur. Kısaca MSB, prolin ile ilişkili genleri kontrol ederek bitkilerde tuzluluk gibi çevresel streslere tolerans

geliştirmiştir (Jiménez-Arias ve ark., 2015). Bir başka çalışmada eksojen menadion uygulamasının abiyotik stresler üzerindeki etkisi, soğuk stresi altındaki mısır fidelerinde tolerans oluşturmaktadır (Prasad ve ark., 1994).

MSB uygulaması yapılan bitkilerde antioksidan sistem daha yüksek aktivite göstermiştir ayrıca Cd stresinin temel besin alınımı ve taşınımı üzerindeki negatif etkisini büyük ölçüde azaltmıştır (Rasheed ve ark., 2018).

Diğer bir çalışmada MSB, bitki büyümesinde pozitif etki gösterir, fotosentezi iyileştirerek ve su dengesini koruyarak tuz stresi koşulunda domates bitkisinde tuz toleransını başlatan bir aktivatör olarak işlev görür. Ayrıca MSB prolin birikimini hızlandırır ve bazı iyon taşıyıcı genleri up regüle ederek iyon homeostazını birikimi ve antioksidan aktiviteyi artırır (Jiménez-Arias ve ark., 2019).

Yapılan çalışmalar Şekil 2.4'de de verildiği üzere menadion sodyum bisülfat bileşiğinin, reaktif oksijen türüne bağlı olan ve bir sinyal ağı geliştiren oksidatif patlamayı ürettiğini göstermektedir (Jiménez-Arias ve ark., 2019).



Şekil 2. 4. MSB'nin biyotik ve abiyotik streslere karşı bitki savunma mekanizmaları üzerindeki etkilerine ilişkin model

Bu olay reaktif oksijen türlerinin temizlenmesi ve bazı gizli savunma proteinlerinin birikmesine sebep olur. Bu durum ise çeşitli çevresel stres koşullarında gelişmiş bir stres toleransı sağlamaktadır. Günümüzde de MSB'nin bu etkilerinden ötürü mahsul koruma için pazarlanması yaygındır (Jiménez-Arias ve ark., 2019).

Bir diğer çalışmada, bir mantar türü olan *Phanerochaete chrysosporium*'a dışarıdan uygulanan menadion koşullarında süperoksit anyon radikal seviyesi uygulama boyunca düzenli olarak azalmıştır. H_2O_2 seviyesi, katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve NADPH oksidaz aktiviteleri uygulama boyunca diğer kontrol bitkilerine göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. CAT aktivitesi önemli bir artış gösterirken H_2O_2 seviyesinin önceki çalışmalarda ulaşılan verilerden düşük olsa da yine de kontrol bitkilerinden yüksek olduğu vurgulanmıştır. Sonuç olarak *P. Chrysosporium*'un antioksidan tepki mekanizması, menadionun neden olduğu oksidatif stresi etkisiz hale getirmiştir (Tongul & Tarhan, 2014).

Bir diğer çalışmada ise, Cd stresi altındaki yaz kabağı bitkisinde tohumlara dışarıdan MSB uygulaması, hücrede kadmiyum metalinin hücre zarı ve kloroplastlar yerine vakuoller ve hücre duvarında birikimine aracılık ederek bitkinin büyümesi, gelişimi ve verimini arttırmada diğerlerine göre çok daha etkili olduğu saptanmıştır (Yaseen ve ark., 2021).

Cr toksisitesi altındaki buğday bitkisine önemli büyüme düzenleyicisi olarak bilinen dışarıdan MSB uygulaması lipid peroksidasyonunu, aşırı ROS üretimini, toplam toprak üstü Cr içeriğini, oksidatif hasarı önemli ölçüde azaltmıştır (Askari ve ark., 2021).

Yapılan çalışmalardan da anlaşılacağı üzere Vitamin K3, çeşitli abiyotik ve biyotik stres altındaki bitkilere dışarıdan uygulandığı zaman savunma tepkilerini arttırma, stresi hafifletme, antioksidan aktiviteyi artırma gibi çeşitli etkileri gözlenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Sterilizasyon aşaması

Bu tez çalışmasında bitki materyali olarak insan beslenmesinde önemli bir değere sahip ve çeşitli mineral ve vitamin içeriği nedeniyle ekonomik öneme sahip olan marul (*Lactuca sativa L.*) kullanılmıştır. Sterilizasyon aşaması tohumların normal büyüme süreçlerini gerçekleştirebilmeleri için yapılmıştır. Sterilizasyon aşaması çalışmada uygulama grupları içinde kontaminasyon olmaması açısından önemli bir basamaktır. Marul tohumları 60 saniye süresince etanolde bekletilip sonrasında beş kere yıkanmış ve etanol uzaklaştırılmaya çalışılmıştır. Yıkama sonrasında %4'lük sodyum hipoklorid solüsyonunda 10 dakika boyunca tutulmuş ve tekrarda beş kere deiyonize su ile yıkanmıştır. Marul tohumları çimlendikten sonra ¼ oranında seyreltilmiş Hoagland solüsyonuna alınarak hidroponik ortamda yetiştirilmiştir. Bu yetiştirme ortamında beş gün tutulduktan sonra uygulama basamağına geçilmiştir.

3.2. Çalışmada yer alan Uygulama Grupları

Yüksek lisans tezinde stres faktörlerinden iki tanesi seçilmiştir. Stres faktörleri tek başına bitkileri etkilemekten ziyade farklı stres unsurları bir arada bulunarak olumsuz etkiler oluşturabilmektedir. Bu amaçla kadmiyum ve arsenik stresleri tek başına uygulandığı gibi birlikte kombinasyonlu olarak uygulama da yapılmıştır. Kadmiyum ve arsenik stresleri uygulamaları sonucunda oluşan oksidatif hasarın iyileştirilmesinde dışarıdan uygulanan menadione (K3 vitamini) etkisi incelenmeye çalışılmıştır. Strese ait uygulama miktarlarının belirleyebilmek için ön denemelerle 100 µM kadmiyum ve 100 µM arsenik uygulaması marul bitkilerinde denenmiştir. Diğer yandan, K3 vitamini (Menadione) ön deneme uygulamaları için yine aynı süreçler sonucunda 5, 10, 25 ve 50 µM doz uygulamalarına karar verilmiştir. Ön denemelerden elde edilen sonuçlar (TBARS miktarı ve bitki canlılık durumu) 5 µM ve 25 µM menadione uygulamalarının marul bitkilerinde daha uygun olacağı sonucuna varılmıştır. Uygulama süresi olarak bilimsel makaleler de göz önüne alındığında 96 saat seçilmiştir. Uygulama süresi sonunda hasat edilen yaprak örneklerinde fizyolojik ve biyokimyasal

analizler yapılmıştır. Analiz süresine kadar bekletilen örnekler -80°C ortamında tutulmuştur. Tezde yer alan uygulama grupları çizelgede verildiği şekliyle alt örneklemelere tabi tutulmuştur: (Çizelge 3.1).

Çizelge 3. 1. Yüksek lisans tezinde kullanılan uygulama grupları ve açıklamaları

Grup	Grup tanımlaması
K	Kontrol grubu, herhangi bir uygulama yapılmamış grup
V1	Kontrol koşulları altında sadece 5 μM menadione uygulaması yapılan grup
V2	Kontrol koşulları altında sadece 25 μM menadione uygulaması yapılan grup
As	Kontrol koşulları altında sadece 100 μM arsenik stresi uygulaması yapılan grup
As+V1	100 μM arsenik stresi ve 5 μM menadione uygulamaları yapılan grup
As+V2	100 μM arsenik stresi ve 25 μM menadione uygulamaları yapılan grup
Cd	Kontrol koşulları altında sadece 100 μM kadmiyum stresi uygulaması yapılan grup
Cd+V1	100 μM kadmiyum stresi ve 5 μM menadione uygulamaları yapılan grup
Cd+V2	100 μM kadmiyum stresi ve 25 μM menadione uygulamaları yapılan grup
As+Cd	Kontrol koşulları altında 100 μM arsenik stresi ve 100 μM kadmiyum stresi uygulaması yapılan grup
As+Cd+V1	100 μM arsenik stresi+100 μM kadmiyum stresi ve 5 μM menadione uygulamaları yapılan grup
As+Cd+V2	100 μM arsenik stresi+100 μM kadmiyum stresi ve 25 μM menadione uygulamaları yapılan grup

Tezimizin amacı olan kadmiyum ve arsenik stresleri altında menadione muhtemel koruyuculuk rollerini saptayabilmek için fizyolojik ve biyokimyasal analizler yapılmıştır. Fizyolojik analizler içerisinde;

- Bağıl su içeriği (RWC)

biyokimyasal parametreler içerisinde,

- Antioksidan enzim/izozim aktivite tayinleri (SOD, CAT, POX)
- ROS miktarı (H_2O_2 miktarı)
- Lipid peroksidasyonu (TBARS miktarı)
- Prolin analizi

- Protein miktarı

3.3. Bağlı Su içeriğinin (RWC) belirlenmesi

Uygulama sonrasında hasat aşamasında örneklemeler yapılmıştır. Yaprak örneklerinin yaş ağırlıkları belirlenmiş ve değer YA olarak kaydedilmiştir. Örneklemeler arasındaki değişim oranlarını belirleyebilmek için tekrarlı çalışılmış her bir gruptan 5 tekrar örnek kaydedilmiştir. Formülde kullanılmak üzere yaş ağırlıklarının yanı sıra turgorlu ağırlıkları da ölçülmüştür. Bu amaçla 50 ml de-iyonize su içerisinde yaklaşık 20 dakika bekletilmiş ve ağırlıkları tartılarak değer TA olarak kaydedilmiştir. Bu tartım sonrasında örnekler 70°C etüvde 3 gün süresince tutulmuş ve tartılmıştır. Değer KA olarak kaydedilmiştir. (Smart & Bingham, 1974) kısmi su içeriği (RWC) hesaplamasında aşağıda da gösterilen formülü kullanmıştır ve birimini de % olarak hesaplanmıştır. $RWC (\%) = [(YA - KA) / (TA - KA)] \times 100$

3.4. Enzim ve İzozim aktivitelerinin saptanması için ekstraksiyon aşaması

Örnekleme sonrasında yapraklar tartılarak derin dondurucuda kısa süre bekletilmiş ve antioksidan enzim/izozim aktivite tayin analizlerinde kullanılmıştır. Yaprak örneklerinde analiz yapabilmek için (0.5 gr) soğutulmuş havan içerisine konulan yaprak örneklerinin üzerine 50 mM Na-fosfat tamponu (pH 7.8), 1 mM EDTA ve polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) içeren homojenizasyon tamponu eklenmiştir. Solüsyon içerisindeki yaprak örnekleri parça kalmayacak şekilde ezilmiştir. Soğutmalı santrifüj ile 30 dakika süresince 14000 g'de santrifüj edilmiştir. Ependorfun üst kısmında kalan süpernatant temiz bir ependorf içerisine alınmış ve enzim analizlerinde kullanılmak üzere ayrılmıştır.

3.4.1. Süperoksit dismutaz (SOD) izozim/enzim aktivitesinin belirlenmesi

SOD izozim analizleri densiyometrik olarak yapılmış ve Laemmli, (1970) tarafından verilen metotla tamamlanmıştır. SOD izozim tayininde yaprak örnekleri, 9 mM Tris HCl (pH 6.8) ve %13.6 gliserol ile homojenizasyon yapılmış ve 14.000 g'de 5 dakika süresince santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantların protein miktarı belirlenmiştir. Protein miktarının belirlenmesi, bovin serum albüminin standart olarak

kullanılmasıyla Bradford, (1976) tarafından verilen metot temel alınarak yapılmıştır. Protein miktarına bağlı olarak her bir gruptan eşit miktarda protein (40 µg) yüklemesi yapılarak SOD izozim tayini belirlenmiştir. İzozimlerin bant yoğunlukları Bio-1D yazılım programı kullanılarak densiyometrik olarak yapılmıştır. Ayrıca total SOD aktivite tayini, daha önce verilen ekstrakt üzerinden tamamlanmıştır. Bu tayin için Beauchamp & Fridovich, (1971) ile gösterilen yöntem izlenmiştir.

3.4.2. Katalaz (CAT) izozim/enzim aktivitesinin belirlenmesi

Woodbury ve ark. (1971) ile tanımlanan metota göre CAT izozimlerin analizleri yapılmıştır. Her bir gruptan 40 µg protein olacak şekilde yükleme yapılmıştır. Total CAT enzim aktivitesi için Bergmeyer (1970) tarafından tanımlanan yöntem kullanılmış ve 50 mM Na-fosfat tamponu (pH 7.0), %0.3 H₂O₂, EDTA ve enzim örneği kuvartz küvetlere eklenmiştir. Örneklerin aktivite analizleri, 240 nm dalga boyundaki H₂O₂'nin üç dakika süresince tüketilmesi temel alınarak tamamlanmıştır.

3.4.3. Peroksidaz (POX) izozim/enzim aktivitesinin belirlenmesi

Peroksidaz (POX) izozim bant yoğunluklarının belirlenmesi amacıyla elektroforetik olarak Seevers ve ark. (1971) tarafından verilen metot kullanılmıştır. Total POX aktivitesinde Herzog & Fahimi, (1973) tarafından tanımlanan metottan yararlanılmıştır. 3'-3'-diaminobenzidin tetrahidroklorit (DAB), H₂O₂ varlığında okside olmaktadır ve bunun 465 nm'de absorbans artışı temel alınarak total POX aktivite hesaplanmıştır.

3.5. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarının belirlenmesi

3.5.1. Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarının belirlenmesi

Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarının belirlenmesi amacıyla Liu ve ark., (2010) tarafından verilen yöntem kullanılmıştır. Bu yöntem 0.5 gr yaprak örnekleri sıvı azotta parçalanmış ve aseton ile homojeniz edilmiştir. Süzüntü, 3.000 g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant ayrılmış ve titantum tetraklorid içeren solüsyon ilave edilmiştir. Amonyum hidroksit eklenerek 16.000 g'de santrifüj edilmiştir. Pellet kısmı

aseton ile yıkanarak elde edilen pellet H_2SO_4 solüsyonuyla çözülmüştür. Oluşan solüsyonun 410 nm’de absorbanı izlenmiştir. Bilinen H_2O_2 miktarına bağı standart eğri temel alınarak H_2O_2 miktarı hesaplanmıştır.

3.6. Lipit peroksidasyonun belirlenmesi

Malondialdehit (TBARS miktarı) birikimi lipid peroksidasyonun bir göstergesidir. Stres koşulunda yaprakların hasar düzeyini veya K3 vitaminin bu hasar üzerine olumlu rollerini belirleyebilmek için TBARS miktarı tayin edilmiştir. Bu nedenle (Madhava Rao ve ark 2000) tarafından gösterilen yöntemle göre 0.1 gr yaprak örnekleri tiokloroasetik asit (TCA) ile homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sonrasında karışım 10.000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında, süpernatant ayrılmış ve 2-Tiobarbitürik asit (TBA) ve trikloroasetik asit (TCA) karışımı eklenmiştir. Karışım tüplere alınmış ve sıcak su banyosunda yarım saat tutulmuştur. Miktar tayini için 532 nm ve 600 nm iki farklı aralıktaki absorban değişimleri değerlendirilmiştir.

3.7. Prolin miktarının belirlenmesi

Örnekleme yapılan yapraklardaki prolin miktarının izlenmesi Bates ve ark., (1973) tarafından yöntem temel alınmıştır. Her bir bir gruptan 0.1 gr yaprak örnekleri alınmış ve sülfosalisilik asit eklenerek homojenize edilmiştir. Elde edilen karışım filtre kağıdından süzülüp asit ninhidrin ve glasiyal asetik asit eklenmiştir. Oluşan solüsyon sıcak su banyosunda bir saat bekletilmiş ve sonrasında buz banyosuna alınmıştır. Soğutmadan sonra karışıma toluen eklenmiş ve üst kısım alınarak 520 nm’de absorbanı kaydedilmiştir.

3.8. Total protein miktarının belirlenmesi

Elektroforetik olarak yapılan izozim belirlenmesi ve enzim aktivitelerinin saptanması amacıyla protein miktarı izlenmiştir. Bu nedenle (Bradford, 1976) ile gösterilen protein tayin yöntemi kullanılmıştır. Bovin serum albumin (BSA) içeren ve belirlenen miktar aralığında standartlara göre örneklerin protein miktarı hesaplanmıştır. Hazırlanan örnekler ve kör, spektrofotometrik olarak 595 nm’de absorbanı ölçülmüştür.

3.9. İstatistiksel Analizler

Fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerdeki elde edilen veriler her bir gruptan beş tekrar yapılarak değerlendirilmiştir. Bulgular one-way ANOVA analiziyle (tek yönlü varyans analizi) yorumlanmıştır. Uygulama grupları arasındaki karşılaştırma TUKEY post-test (SPSS yazılımı, versiyon 23.0) uygulanmıştır. Karşılaştırma sonunda değer $P < 0.05$ bulunuyorsa gruplar arasındaki değişimde istatistiksel olarak farklı olarak yorumu yapılmıştır. Çalışmamızdaki grafik olarak verilen tüm sonuçlarımızdaki hata çubukları standart hata temel alınarak yapılmıştır.

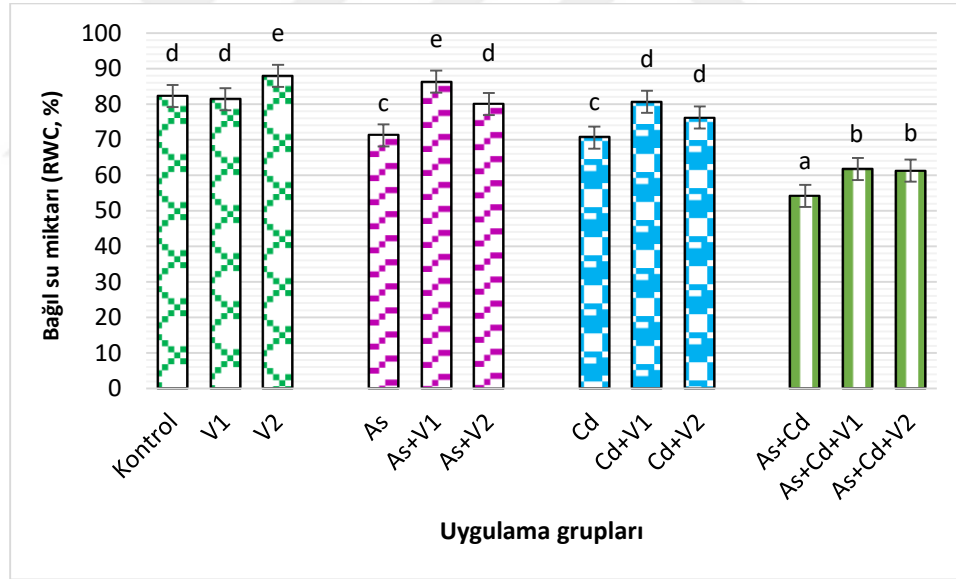


4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Tez çalışmasında kadmiyum ve arsenik stresleri uygulanan marul yapraklarında menadione uygulamalarının, su içeriği, antioksidan savunma sistemi ve lipid peroksidasyonu üzerine etkileri fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerle desteklenerek gösterilmeye çalışılmıştır. Tezde elde edilen verilerin sonuçları ve yorumlanması aşağıda verilmiştir.

4.1. Arsenik ve kadmiyum stresleri altındaki marul yapraklarında menadione uygulamasının kısmi su miktarı üzerine etkisi

Arsenik ve kadmiyum stresleri altındaki marulda menadione uygulamasının su ilişkileri üzerine etkisini belirleyebilmek için uygulama gruplarında kısmi su miktarı (RWC) (Şekil 4.1) analiz edilmiştir.



Şekil 4. 1. 100 μ M arsenik ve 100 μ M kadmiyum toksisitesine maruz kalan marul yapraklarında menadione uygulamalarının (5 ve 25 μ M) kısmi su içeriği (RWC) üzerine etkisi

Arsenik stresi marul yapraklarının RWC değerlerinde azalmaya neden olmuştur. Aynı şekilde kadmiyum stresi uygulaması da marul bitkilerinin içsel su içeriklerinde azalmaya sonuçlanmıştır. Bu iki stresin oluşturduğu azalma oranı açısından, arsenik veya kadmiyum stresleri arasında önemli bir farklılık yoktur. Bu iki stres uygulamasının

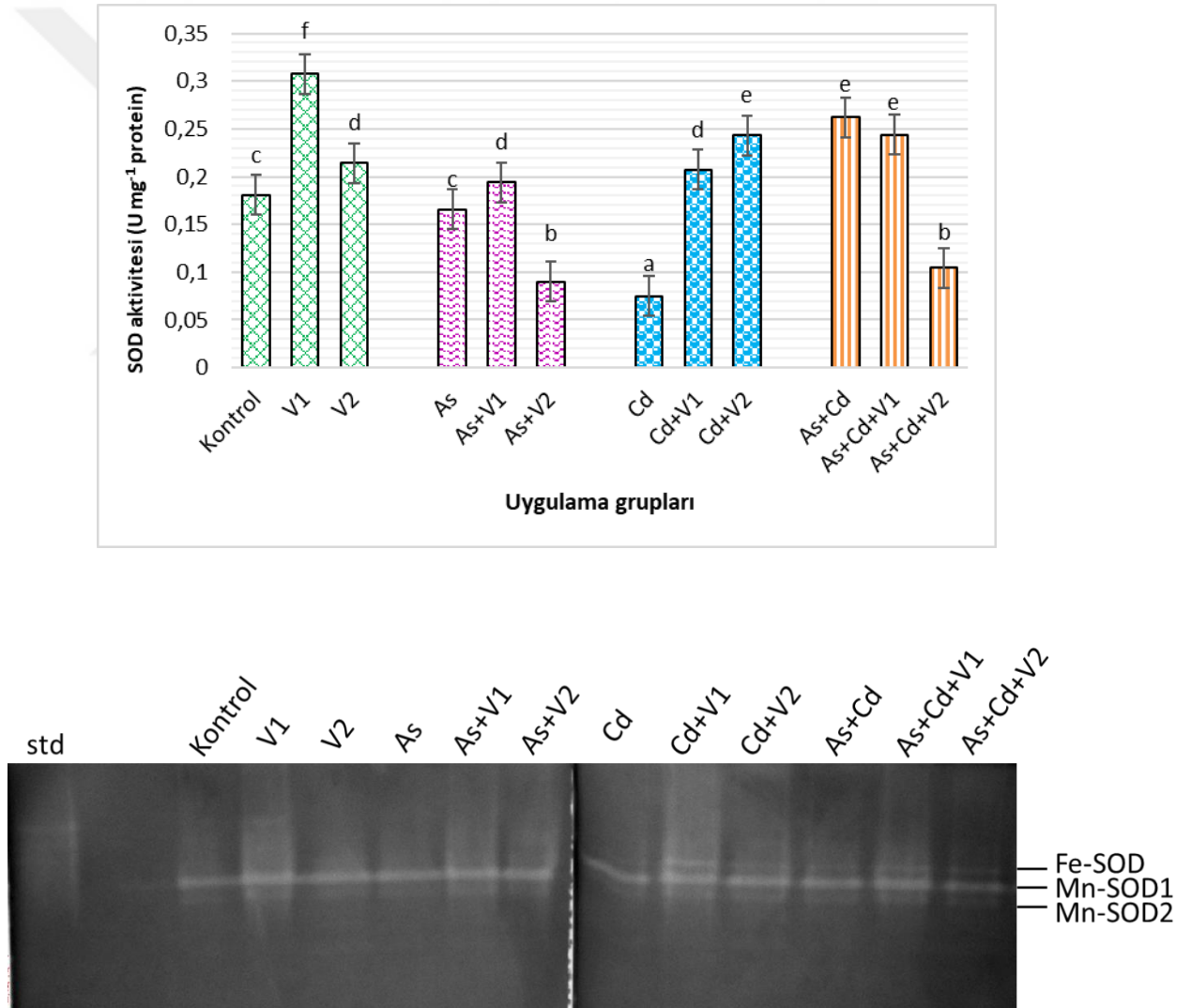
aynı anda yapıldığı grupta ise (As+Cd) beklendiği gibi en düşük RWC değerlerine neden olmuştur. Diğer yandan, arsenik stresi uygulanan bitkilere eş zamanlı olarak dışarıdan menadione uygulanması RWC düzeylerinde önemli bir iyileşme sağlamış ve sadece stres grubuyla karşılaştırdığımızda daha yüksek RWC değerlerine ulaşılmıştır. Bu değişim kadmiyum stresiyle eş zamanlı olarak uygulanan menadione gruplarında da yüksek RWC değerleri izlenmiştir. Stresin kombinasyonlu olarak uygulandığı gruplara vitamin eklenmesi de RWC değerlerini sadece stres grubuna göre (As+Cd) artırmıştır. Kontrol koşulları altında uygulanan düşük dozdaki K3 vitamini uygulanan marul bitkilerinde RWC değerleri değişim göstermemiştir. Ancak yüksek dozdaki menadione uygulanması (25 μ M) artan bir RWC değerleri oluşturmuştur.

Metal iyonları bitki yaşama ortamlarına eklendiği takdirde toprakta su alınması ve devamında kökte su içeriği azalmaktadır (Małacka ve ark., 2008). Çalışmamızda ağır metal stresinin toksik etkileri arasında sayılan muhtemel kök büyümesi ve sınırlı su alınımları nedeniyle RWC değerleri azalma eğilimindedir. Su miktarında gözlenen sınırlamalar nedeniyle kök hücrelerinde oksidatif hasar tetiklenmektedir. Metal iyonu uygulanmasıyla birlikte bitkilerde akuaporin iletkenliğini değiştirmekte ve bunun devamında zarlardaki su geçirgenliği azalmaktadır. Kurşun uygulaması yapılan *Allium cepa* bitkisinde yapısı bozulan akuaporinler nedeniyle su akışı sınırlanmaktadır (Przedpelska-Wasowicz & Wierzbička, 2011). Bu sonuç tezimizde gözlediğimiz ağır metal stresindeki düşük RWC değerlerinin nedeni olabilir. Stres marul yapraklarında bulunan su kanallarının geçirgenliğini bozmuş olabilir. Ayrıca Rucińska-Sobkowiak ve ark. 'nın belirttiği gibi toksik düzeydeki metal maruz kalan bitkilerde hücre çeperlerinin iletkenliğinde de azalmalarla birlikte su alınımları azalmaktadır. B. Piršelová & Matušíková, (2013) tarafından kobalt toksisitesinin, bitkilerin karakteristik kalloz depolarının oluşumunu tetiklediğini bildirmişlerdir. Stresin bu olumsuz etkileri dışarıdan vitamin uygulayarak bitkide iyileşme sağlanabilir. Su kıtlığı stresi altında mısır bitkisine dışarıdan C vitaminin (askorbat) bağlı su içeriğini (RWC) artırdığı saptanmıştır (Darvishan ve ark., 2013).

4.3. Arsenik ve kadmiyum stresleri altındaki marul yapraklarında menadione uygulamalarında antioksidan enzim/izozim profillemesinde oluşan değişimler

4.3.1. Arsenik ve kadmiyum stresleri altındaki marul yapraklarında menadione uygulamalarının total SOD enzim/izozim aktivitesi üzerine etkisi

Arsenik ve kadmiyum stresleri altındaki marulda menadione uygulamalarının antioksidan savunma sistemi üzerine etkisini belirleyebilmek için uygulama gruplarında total süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi analiz edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4. 2. 100 μ M arsenik ve 100 μ M kadmiyum toksisitesine maruz kalan marul yapraklarında menadione uygulamalarının (5 ve 25 μ M) total SOD aktivitesi ve SOD izozimlerinin band yoğunluğu üzerine etkisi

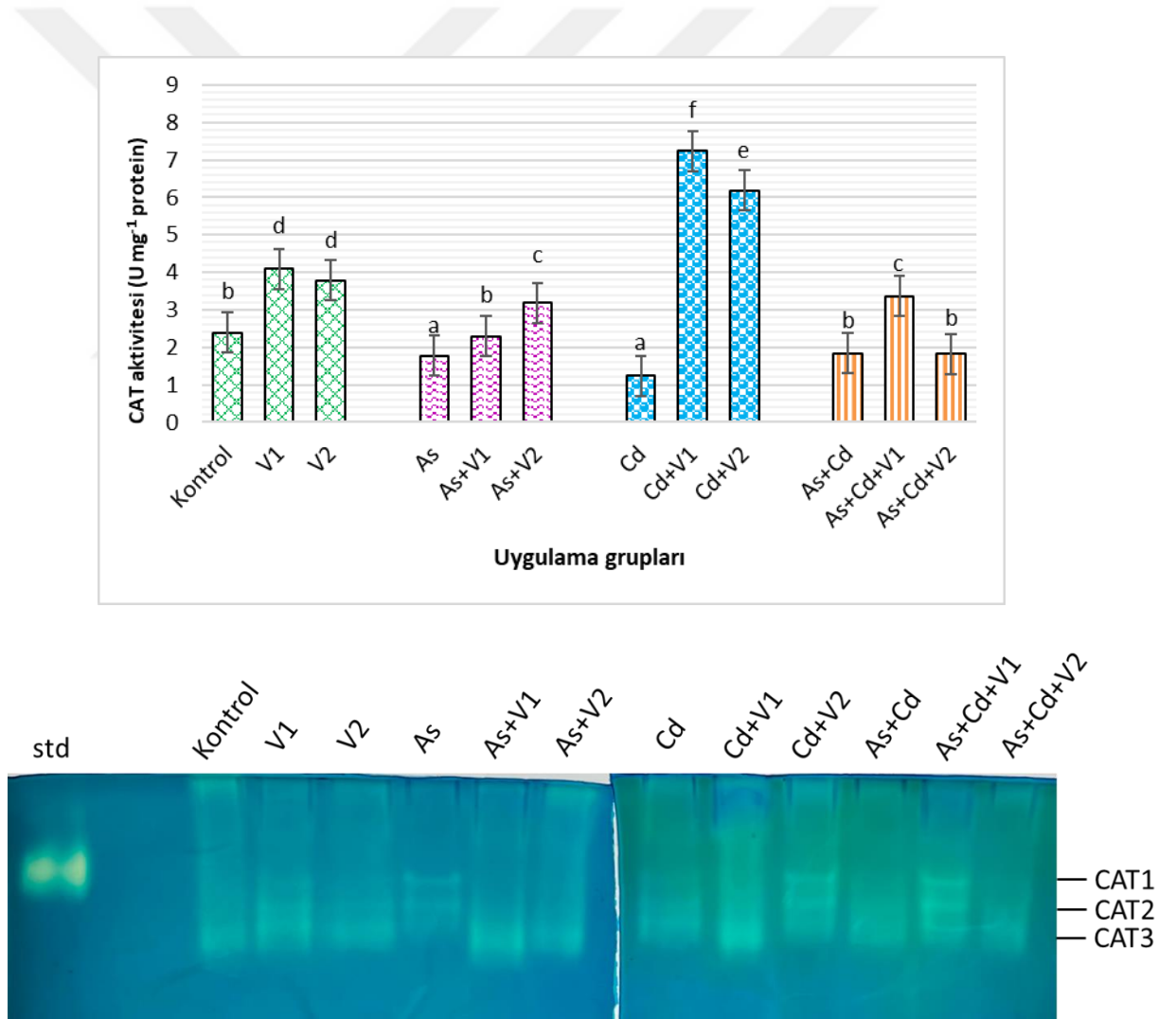
SOD izoformlarını tespit edebilmek için elektroforezde yükleme yapılmıştır ve üç SOD izozimi tespit edilmiştir. Bu üç izozimden bir tanesi Fe-SOD ve iki tanesi de Mn-SOD olarak tanımlanmıştır. Uygulama gruplarında deneme süresince Cu/Zn-SOD izozimine ait bir bant izlenmemiştir. Total SOD aktivitesi arsenik stresi altında kontrol düzeylerinde kalmıştır. Ancak kadmiyum stresi uygulanan marul bitkilerinde ise SOD aktivitesini azaltmıştır. Bu azalma Fe-SOD ve Mn-SOD2 izoformlarının azalan bant yoğunluklarıyla paraleldir. Her iki stresin birlikte uygulandığı grupta ise (As+Cd) total SOD aktivitesi tüm SOD izozimlerine bağlı olarak artmıştır. Stres (As ve As+Cd) ve V uygulamasında SOD aktivitesi açısından benzer sonuçlar izlenmiştir. As ya da As+Cd uygulamasıyla birlikte yapılan menadione uygulamasında yüksek dozlarda SOD aktivitesinde bir azalma gözlenirken, As+V1 grubuna düşük dozda vitamin eklenmesiyle aktivite artmıştır. Ayrıca Cd toksisitesi altındaki marul yapraklarında tüm dozlarda menadione SOD aktivitesini artırmıştır. Cd+V1 ve Cd+V2 gruplarında artan SOD aktivitesinden özellikle Fe-SOD ve Mn-SOD2 izoformları sorumludur. Kontrol şartlarında uygulanan menadione ise SOD aktivitesinde bir artışa neden olmuştur.

Biyolojik zarın (özellikle hücre zarının) bozulması ve enzimlerin ve proteinlerin denatürasyonu, ağır metal stresin bitki üzerindeki etkilerindendir. Hidroksil radikali, hidrojen peroksitler ve süperoksit anyonunun oluşumunun membran hasarına, elektrolit sızıntısına ve membranöz proteinlerin ve lipidlerin spesifik olmayan oksidasyonuna neden olarak sonuçta hücre ölümüne yol açtığı kanıtlanmıştır. Her iki ağır metal stresinin hücresel enzim aktivitelerini bozarak temel biyolojik reaksiyonlarda bozulmalar oluşturduğu rapor edilmiştir (Tripathi ve ark., 2007). Kadmiyum ve arsenik streslerinin enzimlerin aktivitesinde yer alan kofaktörlerin yerine geçerek enzim aktivitelerini azalttığı gösterilmiştir. Fotosentez ve solunumda yer alan ETS elemanlarının veya kompleks sistemin bozulmasıyla radikal birikimi artmakta ve membranlarda, protein ya da DNA'da radikal kaynaklı oksidasyon gözlenmektedir. Çalışmamızda da SOD aktivitesi stres uygulamalarında ya değişmemiş ya da azalmıştır. Bu durumda stres temelli süperoksit anyon radikalinin (SOD'un substratı) ortamda biriktiği ve süpürülemediği söylenebilir. Ayrıca SOD kombinasyon stres uygulamasında ise artmış buna karşılık bu grupta artan SOD aktivitesinin H_2O_2 miktarında artışlara neden olduğunu söyleyebiliriz. Pan ve ark., (2019) tarafından kadmiyum stresine maruz kalan *Kandelia obovata* bitkilerinde yüksek SOD aktivitesi rapor edilmiştir. Strese karşı koruyuculuk sağlamada dışarıdan vitamin uygulanmasıyla olumlu sonuçlar alınmıştır. A. Farooq ve ark., (2020) yaptıkları çalışmada su stresi uygulanan *Carthamus*

tinctorious bitkilerine dışarıdan eklenen askorbik asitin (C vitamini) SOD aktivitesini artırdığını göstermişlerdir. Artan antioksidan enzim aktiviteleri bir tolerans cevabı olarak değerlendirilmekte ve süperoksit anyon radikalının uzaklaştırılmasında etkili olduğu düşünülmektedir.

4.3.2. Arsenik ve kadmiyum stresleri altındaki marul yapraklarında menadione uygulamalarının total CAT enzim/izozim aktivitesi üzerine etkisi

Arsenik ve kadmiyum stresleri altındaki marulda menadione uygulamalarının antioksidan savunma sistemi üzerine etkisini belirleyebilmek için uygulama gruplarında total katalaz (CAT) aktivitesi analiz edilmiştir (Şekil 4.3).



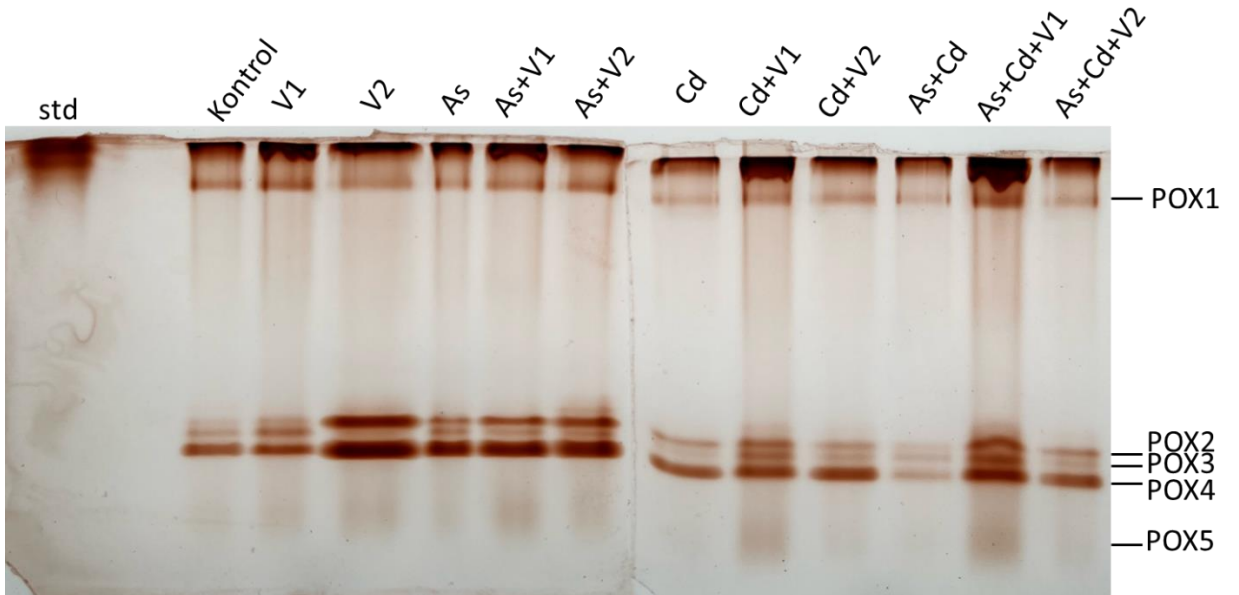
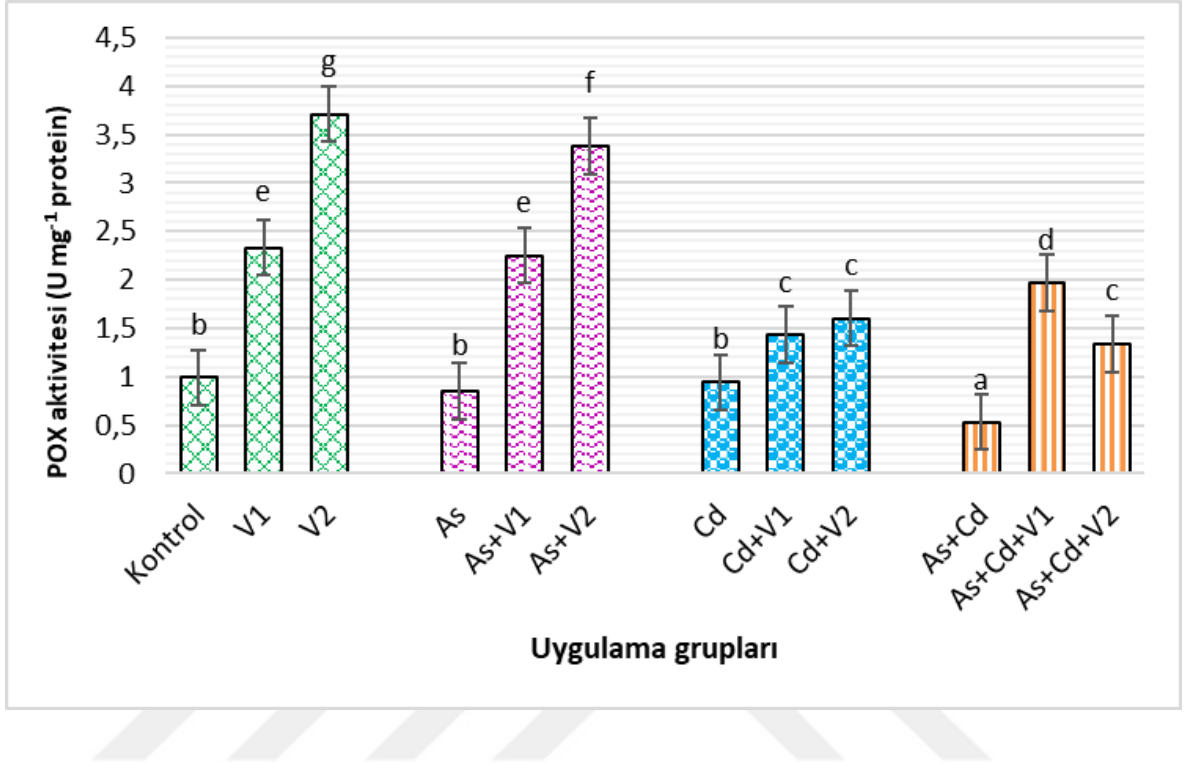
Şekil 4. 3. 100 μ M arsenik ve 100 μ M kadmiyum toksisitesine maruz kalan marul yapraklarında menadione uygulamalarının (5 ve 25 μ M) total CAT aktivitesi ve CAT izozimlerinin band yoğunluğu üzerine etkisi

CAT aktivitesine ait izoformların uygulama grupları içinde değişimini izleyebilmek için native page elektroforezinde yükleme yapıldığında üç CAT izozimi (CAT1-2-3) gözlenmiştir. Kadmiyum ve arsenik toksisitesi altında yetişen marul yapraklarında total CAT aktivitesi azalmıştır. Kombinasyonlu olarak uygulanan stres grubunda (As+Cd) üç CAT izoformunun bant yoğunluğu kontrol ile benzer görünmektedir. Stresler tek başına uygulandığında (sadece As ya da Cd), yetiştirme ortamına stresle birlikte menadione eklemesi yapıldığında total CAT aktivitesi artış göstermiştir. Bu değişimde özellikle CAT3 izoformunun değişimi daha baskındır. Ancak, As+Cd grubunda dışarıdan vitamin uygulandığında ise CAT aktivitesi üzerine etkisi daha farklı olmuştur. Düşük dozdaki menadione (5 μ M) As+Cd streslerine karşı CAT aktivitesini tüm CAT izoformlarına bağlı olarak uyarabilirken, yüksek dozdaki menadione (25 μ M) ise sadece stres grubuyla (As+Cd) aynı düzeyde total CAT aktivitesine neden olmuştur. Stresiz koşullarda menadione uygulaması yapılan marul yapraklarında total CAT aktivitesi indüklenmiştir.

Cd ya da As stresleri uygulanan bitkilerde H_2O_2 oluşturan sistemlerden biri de glikolat oksidaz, NADPH oksidaz (NOX) ya da hidroksipiruvat redüktazdır. Diğer bir yolak ise SOD aktivitesiyle birlikte süperoksit anyon radikalinin H_2O_2 'ye katalizlenmesidir (Ronzan ve ark., 2019). Artan H_2O_2 miktarını ortadan kaldırmak amacıyla katalaz (CAT) iş görmektedir ve en çok bulunduğu hücresel bölgede peroksizomlardır (Su ve ark., 2018). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuca paralel olarak Arabidopsis bitkilerine uygulanan Cd ve As streslerinin CAT aktivitesini azalttığı rapor edilmiştir (Piacentini ve ark., 2020). Buna karşılık, stres koşullarında yetiştirilen marul bitkilerine menadione eklenmesi CAT aktivitesini artırmıştır. Bu durumu, artan CAT aktivitesiyle savunma cevaplarının menadione tarafından uyarıldığı yönünde yorumlayabiliriz. Aynı şekilde düşük sıcaklık stresi altında mısır bitkilerine uygulanan B2 veya B12 vitamin uygulamalarında CAT aktivitesini artırdığı bildirilmiştir (Xin Chi ve ark., 2021).

4.3.3. Arsenik ve kadmiyum stresleri altındaki marul yapraklarında menadione uygulamalarının total POX enzim/izozim aktivitesi üzerine etkisi

Arsenik ve kadmiyum stresleri altındaki marulda menadione uygulamalarının antioksidan savunma sistemi üzerine etkisini belirleyebilmek için uygulama gruplarında total peroksidaz (POX) aktivitesi analiz edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4. 4. 100 µM arsenik ve 100 µM kadmiyum toksisitesine maruz kalan marul yapraklarında menadione uygulamalarının (5 ve 25 µM) total POX aktivitesi ve POX izozimlerinin band yoğunluğu üzerine etkisi

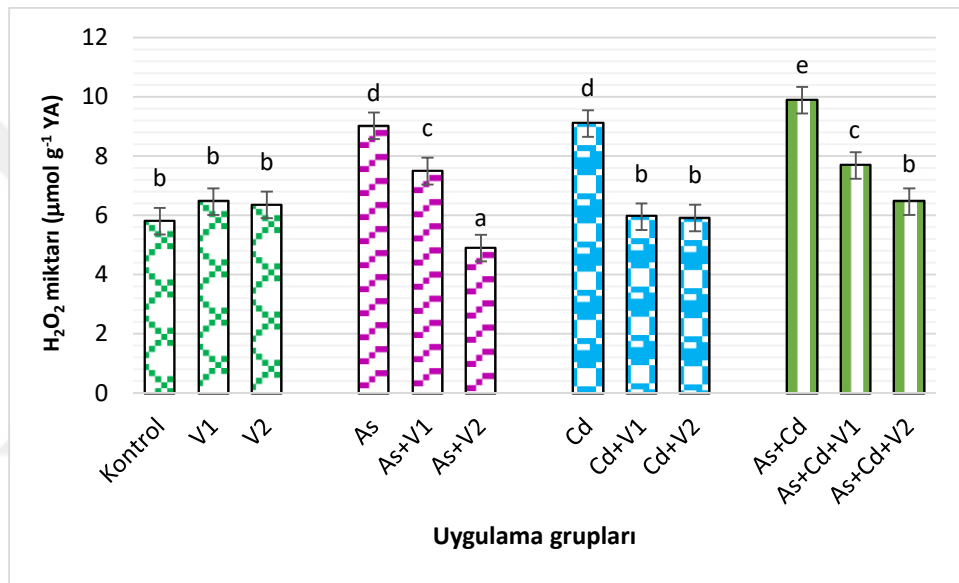
Total POX aktivitesindeki değişimi enzimin izoformlarıyla da desteklemek amacıyla marul yapraklarında uygulama sonrasında native pagede elektroforetik analizleri değerlendirildiğinde beş POX izozim bantları (POX1-2-3-4-5) saptanmıştır. Total POX aktivitesinde ayrı olarak uygulanan stresle birlikte kontrol grubuna göre herhangi bir değişim izlenmemiştir. Ayrıca bu stresleri birlikte uyguladığımızda ise marul yapraklarının POX aktivitesinde azalma gözlenmiştir. Bu grupta (As+Cd) izlenen POX aktivitesindeki değişim tüm POX izoformlarının bant yoğunluklarıyla da desteklenmiştir. Stres uygulanan marul yapraklarına eş zamanlı olarak menadione eklenmesi POX aktivitesini artırmıştır. Bu etki her iki vitamin dozlarıyla da sağlanmıştır. Bu değişimden özellikle POX2-3-4 izoformlarının değişimi sorumludur. Kontrol koşulları altında dışarıdan menadione uygulamaları total POX aktivitesini ciddi oranda artırmıştır. Bu artışın oranı özellikle en yüksek dozdaki (V2) menadione uygulamasında dikkat çekicidir. Söz ettiğimiz grupta artan POX aktivitesine POX2 ve POX4 daha fazla katkı sağlamıştır.

As ya da Cd stresleri klorofil yapısı ve fonksiyonlarını bozarak yüksek enerjili elektronların oksijeni indirgemesi sonucunda radikal oluşmasına neden olmaktadır (Farmer & Mueller, 2013). Çalışmalarda stresin şiddeti ile artan antioksidan enzim aktivitesi arasında olumlu bir etkileşim olduğu bildirilmiştir. Strese karşı koyabilmek için bitkiler POX aktivitesini artırmaktadır. Priyanka ve ark. (2021) kadmiyum ya da kurşun uygulamalarının pamuk bitkilerinin POX aktivitesini artırdığını raporlamışlardır. Ancak buna zıt olarak çalışmamızda stres koşullarında marul yapraklarında artan POX aktivitesi izlenmemiştir. Diğer yandan menadione uygulamasına (tüm konsantrasyonlarda, V1 ve V2) bağlı olarak stres gruplarında POX aktivitesinde artışların izlenmesi, analizini yaptığımız antioksidanlar için en etkili şekilde H₂O₂ süpürülmesinde POX'un katkısını ortaya koymaktadır. Chi ve ark. (2021), düşük sıcaklık stresine karşı B vitaminlerinin uygulanmasında artan POX aktivitesini göstermişlerdir.

4.4. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarının belirlenmesi

4.4.1. Arsenik ve kadmiyum stresleri altındaki marul yapraklarında menadione uygulamalarının hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarı üzerine etkisi

Arsenik ve kadmiyum stresleri altındaki marulda menadione uygulamalarının ROS birikimi üzerine etkisini belirleyebilmek için uygulama gruplarında hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarı analiz edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4. 5. 100 μM arsenik ve 100 μM kadmiyum toksisitesine maruz kalan marul yapraklarında menadione uygulamalarının (5 ve 25 μM) hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarı üzerine etkisi

Arsenik toksisitesine maruz kalan marul yapraklarında H_2O_2 miktarı artış göstermiştir. Bu artışa benzer olarak kadmiyum stresi uygulanan gruplarda da artış izlenmiştir. Kombinasyonlu stres gruplarında H_2O_2 miktarının daha fazla olması beklediğimiz bir sonuçtu. Arsenik stresine karşı dışarıdan vitamin uygulaması H_2O_2 miktarını azaltmıştır. Bu azalma ilginç bir şekilde en dozdaki vitamin uygulamasında daha belirgindir. Aynı şekilde kadmiyum stresi altında yetiştirilen marul yapraklarında menadione uygulamaları sadece Cd uygulanan gruba göre H_2O_2 miktarında azalmaya neden olmuştur. As+V2 gruplarında gözlenen sonuca benzer olarak, her iki stresin de birlikte uygulandığı gruplara vitamin eklenmesi H_2O_2 miktarında ciddi düşüşler

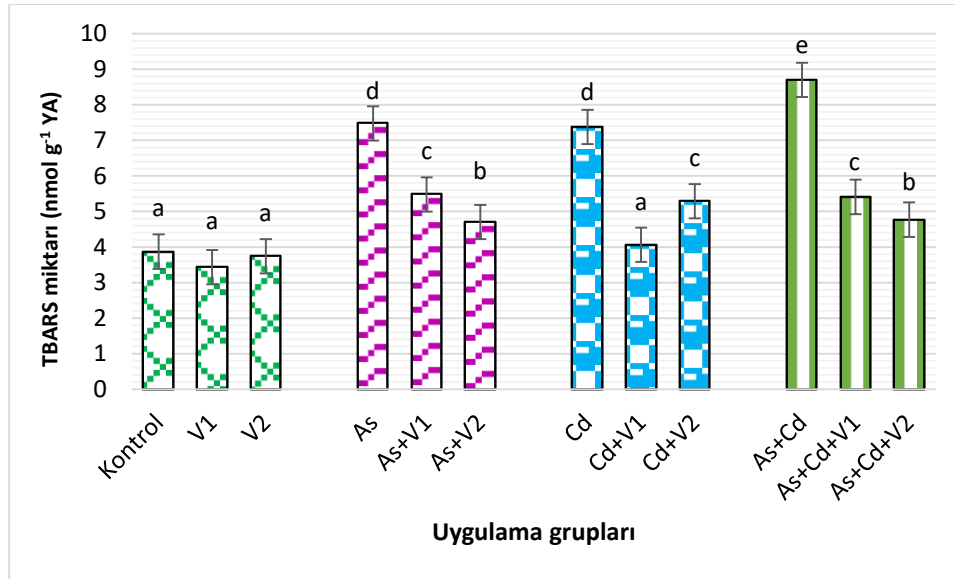
oluşturmuştur. Diğer yandan kontrol koşulları altında dışarıdan uyguladığımız vitamin H_2O_2 miktarında değişime neden olmamıştır.

Stres koşullarının bitkilerde enzimatik reaksiyonlara ya da oksijen indirgenmesine bağlı olarak oluştuğuna dair birçok çalışma mevcuttur. Oluşan H_2O_2 radikal olarak adlandırılmamaktadır, çünkü miktara bağlı olarak iki yönlü etkileri vardır. Az miktarda normal biyolojik süreçlerde oluşturulmakta ve sinyalleme etkisiyle strese karşı savunma cevaplarını tetikleyebilmektedir. Ancak yüksek oranda birikme gösterdiğinde önemli hücresel bileşenlere zarar vermekte ve antioksidan sistemce ortadan kaldırılmaktadır. Boubakri ve ark., (2013) tarafından bildirilen raporda stres ile birlikte artan H_2O_2 birikimi hücrede hasara neden olduğu sunulmuş ve bu etki hücreyi ölüme kadar götürebilmiştir. Paralel olarak çalışmamızda As ya da Cd streslerinde ya da birlikte uygulandığı gruplarda (As+Cd) H_2O_2 miktarında ciddi artışlar izlenmiştir. Bu artışlarda bu uygulama gruplarında gözlediğimiz yetersiz H_2O_2 süpüren enzimlerin de katkısı olmuştur. Vitamin uygulamalarının antioksidan enzim aktivitelerini uyararak ROS birikimini ve membran hasarını ortadan kaldırıldığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Çalışmamızda As+V ya da Cd+V gruplarında artan CAT ve POX aktiviteleriyle ve As+Cd+V gruplarında ise özellikle artan POX aktivitesiyle H_2O_2 ortadan kaldırılmıştır. Bu etki her iki vitamin konsantrasyonuyla (V1 ve V2) sağlanmıştır.

4.5. Lipit Peroksidasyonun Belirlenmesi

4.5.1. Arsenik ve kadmiyum stresleri altındaki marul yapraklarında menadione uygulamalarının TBARS miktarı üzerine etkisi

Arsenik ve kadmiyum stresleri altındaki marulda menadione uygulamalarının lipid peroksidasyonu üzerine etkisini belirleyebilmek için uygulama gruplarında TBARS miktarı analiz edilmiştir (Şekil 4.6).



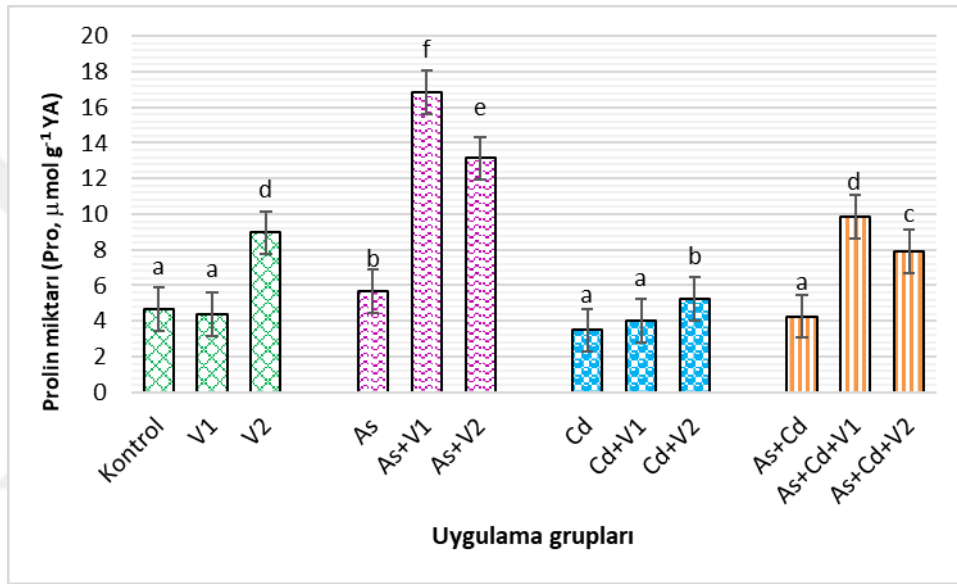
Şekil 4. 6. 100 μ M arsenik ve 100 μ M kadmiyum toksisitesine maruz kalan marul yapraklarında menadione uygulamalarının (5 ve 25 μ M) TBARS miktarı üzerine etkisi

Lipid peroksidasyon durumunu gösteren bir analiz de TBARS analizidir ve stresin bitkiler üzerindeki hasar seviyesini anlamamıza yardımcı olmaktadır. Arsenik ya da kadmiyum stresleri marul yapraklarına uygulandığı takdirde membranlarda peroksidasyon düzeyi artmıştır. Bu indüklenme As+Cd uygulama gruplarında 2.2 kat artış ile en yüksek düzeydedir. Dışarıdan vitamin uygulaması, zarlardaki bu hasarı azaltmada başarılı olmuştur. Tüm vitamin dozlarında stres gruplarına göre karşılaştırıldığında TBARS miktarı azalmıştır. Stres uygulanmadan dışarıdan K3 vitamini uyguladığımızda ise TBARS düzeyleri kontrol ile aynı seviyede kalmıştır.

Canlı organizmaların hücrelerinde peroksidasyon, nihai metabolitleri (örn., malondialdehit) ve diğer tiyobarbitürik asitle reaktif maddeleri (TBARS) verir. TBARS'ların belirlenmesi, oksidatif bozunma hızının bir ölçüsü olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Asgher ve ark., 2014). Kadmiyum stresine maruz kalan *Phoenix dactylifera*'da TBARS düzeyleri artmıştır (Zouari ve ark., 2016). Bu sonuç bizim tezimizde izlediğimiz TBARS değişimini desteklemektedir. Ancak dışarıdan uyguladığımız menadione, stresin artırdığı TBARS düzeylerini azaltabilmiştir. Bu durum menadionun membran bütünlüğü ve fonksiyonu bakımından olumlu etkileri olduğunu göstermektedir. Benzer olumlu etki tuz stresi altında yetiştirilen domates fidelerinde C vitamini eklenmesiyle Shalata & Neumann, (2001) tarafından da raporlanmıştır.

4.6. Arsenik ve kadmiyum stresleri altındaki marul yapraklarında menadione uygulamalarının prolin miktarı üzerine etkisi

Arsenik ve kadmiyum stresleri altındaki marulda menadione uygulamalarının osmoregülasyon üzerine etkisini belirleyebilmek için uygulama gruplarında prolin miktarı analiz edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4. 7. 100 μM arsenik ve 100 μM kadmiyum toksisitesine maruz kalan marul yapraklarında menadione uygulamalarının (5 ve 25 μM) prolin miktarı üzerine etkisi

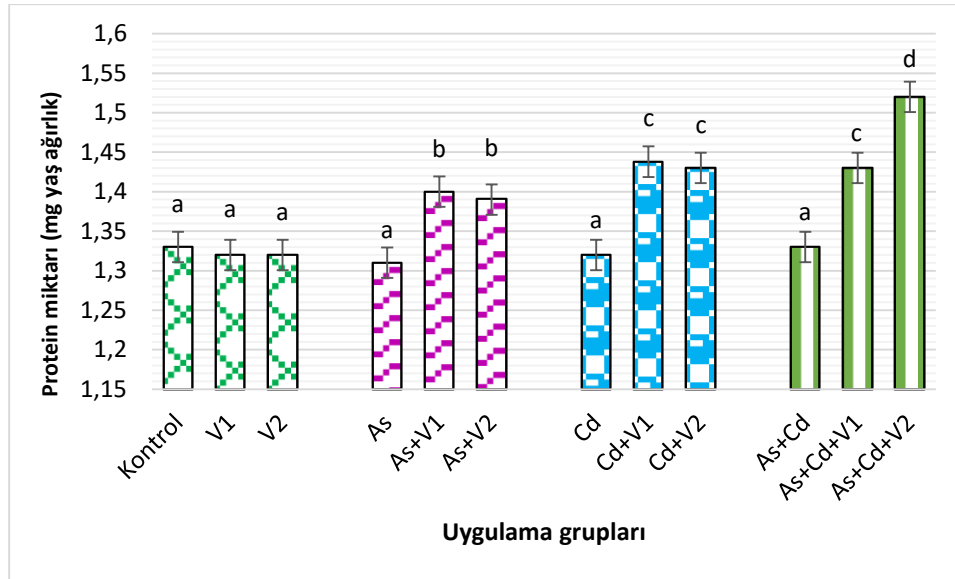
Prolin miktarındaki artış sadece arsenik stresi uygulanan marul yapraklarında izlenmiştir. Osmotik düzenlemede rol alan prolin, arsenik stresine karşı dışarıdan vitamin uygulaması yoluyla artmıştır. Bu artışın oranı As+V1 grubunda en yüksek düzeye ulaşmıştır (yaklaşık 3 kat artışla). Farklı olarak, kadmiyum ile eş zamanlı olarak uygulanan 5 μM menadione, prolin miktarında sadece Cd grubuna göre herhangi bir değişime neden olmazken, 25 μM menadione, arsenik stresi altında prolin miktarını artırmıştır. Kombinasyonlu olarak uygulanan kadmiyum ve arsenik toksisitesine karşı menadione uygulaması ise (her iki dozda da) prolin miktarını artırmıştır. Kontrol koşullarında menadione uygulanan marul yapraklarında sadece 25 μM menadione

uygulama dozunda prolin miktarı artarken, düşük dozdaki menadione prolinde herhangi bir değişim oluşturmamıştır.

Cd ve prolinin etkileşimli etkileri altında daha iyi bitki su statüsünün oluşturulmasının, stresli koşullar altında büyümeyi artıran uyumlu osmolitlerin birikmesi yoluyla daha iyi bir ozmotik düzenleme kapasitesinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir (M. Singh ve ark., 2015). Stres altında prolin ile birlikte artan fotosentetik aktiviteler, stomatal iletkenlik ve transpirasyon oranı saptanmıştır (Oukarroum ve ark., 2012). Su ilişkileri üzerine parametrelerdeki düzenlemeler stres altında antioksidan enzim aktivitesindeki artışlarla ilgilidir. Çalışmamızda ise prolin miktarının uyarılması ağır metal toksisitesi altında sağlanamamıştır. Prolinde herhangi bir artışın izlenmemesi RWC değerlerindeki azalmalarla da bağlantılıdır. Diğer yandan B vitamin grupları (B1, B2 ve B6) ve C vitamini belirli genlerin ekspresyonunun indüklenmesi veya baskılanmasında rol oynar ve potansiyel olarak stres sırasında aktive olan pentoz fosfat yoluna bağlı prolin biyosentezinin dolaylı bir uyarıcısı olarak hizmet edebilir (Pitzschke ve ark., 2015). Keshavarz ve Moghadam (2017) tarafından yayınlanan makalede B12 (kobalamin) uygulaması tuzluluk stresine karşı prolin miktarını fasulye fidelerinde artırmıştır. Bizim çalışmamızda da özellikle As ve As+Cd gruplarında her iki menadione konsantrasyonu prolin miktarını uyarmıştır.

4.7. Arsenik ve kadmiyum stresleri altındaki marul yapraklarında menadione uygulamalarının protein miktarı üzerine etkisi

Arsenik ve kadmiyum stresleri altındaki marulda menadione uygulamalarının total protein miktarı üzerine etkisi incelenmiş ve deneme sonucunda elde edilen verilen Şekil 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4. 8. 100 μ M arsenik ve 100 μ M kadmiyum toksisitesine maruz kalan marul yapraklarında menadione uygulamalarının (5 ve 25 μ M) protein miktarı üzerine etkisi

Kadmiyum ve arsenik streslerini tek başına ya da kombinasyonlu olarak uyguladığımızda marul yapraklarının protein içeriğinde herhangi bir değişim izlenmemiştir. Diğer yandan, menadione uygulaması her iki stres koşulları altında protein miktarını indüklemiştir. Tek başına uygulanan menadione ise yaprakların protein miktarı üzerinde herhangi bir etki oluşturmamıştır.

Protein aktivitesi ve proteinlerin sentez sonrası işlenme basamakları stresle birlikte olumsuz etkilenmektedir. Arsenik bitki tarafından yüksek miktarda alındığında hücresel proteinlerin SH- bağlarını bozmakta ve özellikle fotosentetik proteinlerin işlevlerini azaltmaktadır (Anjum ve ark., 2016). Bu çalışmada kadmiyum ve arsenik streslerinin birlikte uygulandığı mısır bitkilerinin protein düzeylerinde azalmalar saptanmıştır. Tezimizde ise stres koşulları marul yapraklarında protein miktarını değiştirmemiştir. Diğer yandan vitaminin dışarıdan uygulandığı gruplarda protein miktarında ciddi artışlar izlenmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Esansiyel olmayan metaloid arsenik (As), topraklarda ve yeraltı sularında yaygın olarak dağılmıştır. Arsenik kontaminasyonu, ürün verimliliği ve gıda güvenliği açısından gıda güvenliğini tehdit ettiği için endişe verici bir durumdur. As'ye maruz kalan bitkiler, verimlilik kaybına neden olan morfo-fizyolojik, büyüme ve gelişme bozukluğu gösterir. Fizyolojik ve biyokimyasal düzeyde, kloroplast, mitokondri, peroksizom, endoplazmik retikulum, hücre çeperi, plazma zarında As kaynaklı değiştirilmiş lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın yapısını parçalayarak hücreye zarar veren reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimine neden olur. Bu nedenle, ROS kaynaklı oksidatif strese karşı bitki toleransı, bitkilerde As toleransını arttırmak için hayati bir stratejidir. Arsenik stresine maruz kalan bitkiler, bodur bitki büyümesiyle sonuçlanan kök hücrelerinde renk değişikliği, lignifikasyon ve plazmoliz göstermiştir. Ek olarak, As kontaminasyonu, farklı bitkilerin çimlenme yüzdesini, sürgün ve kök uzamasını, kök ve yaprak biyokütlesini ve tohum canlılık indeksini ciddi şekilde azaltmıştır. Benzer şekilde, As maruziyetinin yaprak sayılarını, yaprak alanını, bitki boyunu ve bitkilerin taze ve kuru biyokütlesini azalttığı gösterilmiştir. As varlığında azalan biyokütle muhtemelen hücre zarlarının artan geçirgenliğinin bir sonucudur. Toksikite altındaki bitkiler, enerji üretimi ve bitkilerin optimum büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan hücresel bileşenlerin/temel besinlerin artan sızıntısıyla karşı karşıya kalırlar. Arseniğin kökler üzerinde neden olduğu zararlı etkiler, su ve iyonların alımını etkileyebilir, bu da sonuç olarak fotosentetik ve terleme oranını azaltır ve stoma düzenlemesini engeller. Bu durum As stresi altında marul yapraklarında gözlediğimiz RWC azalmaları ile paralellik göstermektedir. Diğer yandan birkaç çalışma, arsenik uygulamasının süperoksit anyon radikali, hidroksil radikali ve H_2O_2 gibi ROS oluşumlarının indüklediğini göstermiştir. Bu toksik düzeydeki radikallerin ortadan kaldırılmasında sorumlu enzimatik ya da enzimatik olmayan antioksidanlar uyarılır. Çalışmamızda arsenik stresine maruz kalan marul yapraklarında SOD ve POX aktivitesi uyarılamamış ve CAT aktivitesi ise azalmıştır. Radikallerin enzim aktivitesiyle süpürülmesindeki yetersizlikler sonucunda çalışmamızda H_2O_2 miktarı artmış ve devamında zarlarda lipid peroksidasyon düzeyleri (TBARS miktarının gösterdiği üzere) tetiklenmiştir.

Çalışmamızda uyguladığımız bir diğer stres faktörü de kadmiyum (Cd) stresidir. Cd, çoğu canlı organizma için tehlikeli olan uzun bir biyolojik yarı ömre sahip ve oldukça toksik ağır metallerden biridir. Cd esas olarak yer kabuğunda çinko ile birlikte bulunur. Cd, çinko, kurşun ve bakır endüstrileri tarafından bir yan ürün olarak çevreye salınır, fosfat bazlı gübrelerin, kentsel kompostların, atık su sulamanın, metal işleme endüstrilerinin ve metal bazlı pestisitlerin uygulanmasında kullanılır ve birçok kısımda birikir. Arsenik toksisitesinde olduğu gibi, bitkilerde Cd birikimi klorofil içeriğini azaltabilir, su kanallarının yapısını bozabilir, fotosentezi engelleyebilir ve bitki büyümesini baskılayabilir. Bu negatif etkiler çalışmamızda kadmiyum stresi altında azalan RWC değerleriyle de uyumludur. Cd, bitki türlerinde Ca, Mg, P, K, S, Fe, Mo, Zn, Mn, B ve Cu gibi besin elementlerinin alımını, taşınmasını ve ardından dağılımını engelleyerek olumsuz etkiler gösterir. Bu etki Cd stresinde bitkilerde izlenen büyümedeki azalmalarla gösterilir. Kadmiyum, artan ROS oluşumunu indükleyerek hücrenin redoks potansiyelini değiştirerek hücre zarlarında ve diğer biyomoleküllerde oksidatif hasara neden olur. Bitkiler bu hasara karşı koyabilmek için antioksidan savunma sistemini aktifler, ancak çalışmamızda kadmiyum stresi altında SOD ve CAT aktiviteleri azalmış POX aktivitesi ise değişmemiştir. Bu sonuç marul yapraklarında strese bağlı radikal birikimini artırmış (özellikle H_2O_2 miktarını) ve TBARS içeriğinde de artışlara neden olmuştur. Kombinasyonlu stres uygulamalarımızda ise sözü edilen SOD, CAT ve POX aktivitelerinde yalnızca SOD aktivitesini artırabilmiştir. Yine bu uygulama grubunda (As+Cd) yetersiz enzim kapasitesinden dolayı H_2O_2 ve TBARS düzeylerinde artışlar izlenmiştir.

Çeşitli vitaminler, farklı streslere karşı bitki direncini artırabilecek hazırlayıcı ajanlar olarak test edilmiştir. Bir bitki büyüme olarak tanımlanan suda çözünür bir menadion (K3 vitamini) türevi olan menadiyon sodyum bisülfitin görevleri arasında Arabidopsis'te biyotik ve abiyotik streslere karşı koruma ve iyileştirme söylenmektedir. Bu önceki çalışmalar, menadionun ROS'a bağlı bir sinyal ağı geliştiren hafif bir oksidatif patlama ürettiğini göstermektedir. Bu etki, bitkilerde ROS-süpürme ve transkripsiyon faktörleri gibi gizli savunma proteinlerinin birikmesine neden olur, bu da gelişen bir stres tepkisini oluşturur. Çalışmamızda savunma sisteminin ilk adımı olan artan SOD aktivitesi, menadione uygulamasına bağlı olarak kadmiyum stresinde tüm menadione uygulama gruplarında ve arsenik stresinde ise sadece düşük dozdaki menadione uygulamalarında izlenmiştir. As+V1 grubu ile kombine uygulanan stres ve tüm menadione dozları (As+Cd+V1/V2) SOD aktivitesini artırmamıştır. Bu gruplarda

SOD aktivitesinde artışın olmamasının nedeni, gruplarda radikal birikimlerin fazla olmaması olabilir. SOD aktivitesiyle birlikte onun katalizlediği reaksiyon gereğince H_2O_2 birikimi görülmektedir. Artan H_2O_2 miktarı da CAT, POX ya da askorbat-glutasyon döngüsünde yer alan antioksidanlarca ortadan kaldırılır. Çalışmamızda menadione stres uygulanan gruplarda hem CAT hem de POX aktivitesini dikkat çekici şekilde uyarmıştır. Bu aktiviteler sonucunda H_2O_2 etkin olarak süpürülmüş ve stres ile birlikte dışarıdan vitamin uygulamalarında hasar ortadan kaldırılmıştır. Bu gruplarda stresin hasarının iyileştirilmesi TBARS miktarında gözlediğimiz azalmalarla da ilişkilidir. Radikallerin ortadan kaldırılmasıyla menadione teşvikli koruma, bazı makalelerde menadionun klorofil içeriğinde yaptığı artışlarla ya da yapısında oluşturduğu iyileştirmelerle ilgili olduğu raporlanmıştır.

Bitkiler, antioksidanların yanı sıra aynı zamanda prolin gibi daha düşük moleküler ağırlıklı ozmolitleri de radikal süpürücüsü olarak kullanabilir. Stres altında artan prolin ve çözünebilir proteinlerin artışı bir tolerans özelliği olarak düşünülmektedir. Prolinin stres sırasında hücreleri nasıl koruduğuna dair moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır ancak kimyasal özelliklerini ve glutasyon (GSH) havuzu gibi redoks sistemleri üzerindeki etkilerini içeriyor gibi görünmektedir. Prolinin stres adaptasyonundaki işlevi genellikle bir ozmolit özelliği ve su stresini dengeleme yeteneği ile açıklanır. Bununla birlikte, olumsuz çevre koşulları genellikle hücre içi redoks homeostazını bozarak, oksidatif stresi dengelemek için de çalışan mekanizmalar gerektirir. Bu nedenle, prolin birikimi, proteinlerin ve antioksidan enzimlerin stabilizasyonunda, ROS'un doğrudan temizlenmesinde, $NADP^+/NADPH$ ve GSH/GSSG oranı gibi hücre içi redoks dengesinin korunmasında rol oynar. Tezimizde arsenik stresi dışındaki diğer stres uygulamalarında (Cd ve As+Cd) prolin miktarında herhangi bir değişime neden olmamıştır. Bu durum stres altında olumsuz etkilenen RWC değerleriyle de uyumludur. Diğer yandan vitamin uygulaması yapılan gruplarda strese karşı prolin miktarında ciddi artışlar sağlanmıştır. Menadione uygulamasının stres altında klorofil içeriğinde iyileşmeler sağlayarak prolin birikiminde artışlara neden olduğu şeklinde yorumlama da yapılabilir.

5.2 Öneriler

Hızlı sanayileşme ve mevcut tarımsal uygulamalar nedeniyle ağır metal kirliliği yaygındır. Bu kirleticiler, toprak mikroorganizmaları tarafından kolayca parçalanmadıkları ve bu nedenle bitkiler tarafından kolayca emilebildikleri için çevrede daha uzun süre kalırlar. Ağır metalleri absorbe eden bitkiler, büyüme ve gelişmeyi engelleyerek yaşlanmayı artırır ve bu da ürün veriminin düşmesine neden olur. Ayrıca tüketildiğinde insan sağlığını etkileyen ürünlerde birikebilmektedir. Toprakta yüksek seviyelerde arsenik (As) ve kadmiyum (Cd) varlığı, tarımsal verimliliği de tehdit etmektedir. As bitkilerinde güçlü bir birikme ve biyo-zenginleştirme kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir. Bitkiler büyümeleri sırasında dış ortamdan belirli bir miktarda As'ı aktif veya pasif olarak alabilirler. Kadmiyum (Cd), yüksek birikim nedeniyle insanlığa zararlı olan en zehirli ağır metallerden biri olarak kabul edilmektedir. Cd, bitki kökünün büyümesini, su ve besin maddelerinin alımını ve solunum gücünü engeller, karbonhidrat metabolizmasını ve diğer fizyolojik yönleri etkiler ve böylece verimi azaltır. Bu etkiler artan Cd konsantrasyonu ile daha da kötüleşebilir. Her iki stres faktörüyle başa çıkabilme yolları önem kazanmaktadır. Savunma mekanizmalarını tetikleyebilmek amacıyla bitkilere ve çevreye uyumlu ve zararlı birikimleri olmayan bileşenlerin kullanımı dikkat çeken bir konudur.

Dışarıdan vitamin uygulamaları, redoks aktif doğası nedeniyle bitkilerde oksidatif stresi incelemek için kullanılır. K vitamininin redoks özellikleri, bu bileşiğin fizyolojik işlevleri yerine getirmesini sağlar. Naftokinonlar (menadion), kinonlar ve benzokinonlar elektron verebilir veya çekebilir ve bu özellikleri onları biyolojik sistemlerde aktif hale getirir. Ancak bu özellikler K vitamini konsantrasyonuna bağlıdır. Bu çalışmanın sonuçları, konsantrasyona bağlı menadione etkilerini ortaya koymada bilgi sağlayacaktır. K vitamini, ROS'u temizleyen proteinlerin daha fazla birikmesiyle sonuçlanan ROS üretimini indükler. K vitamini, fotosistem I'in önemli bir unsurudur ve temel bir elektron taşıyıcısı olarak işlev görür. K vitamini, mobil elektron taşıyıcısı olarak işlevleri ve membran proteinlerinin redoks durumunu sürdürmesi yoluyla bitkileri çevresel kısıtlamalardan korur. Bu durum stres altındaki bitkilerde verimlilik açısından değerli sonuçlar sağlamaktadır. Tezimizde menadione uygulamasına bağlı olarak savunma mekanizmalarında bir uyarılma görmekteyiz, bu sonuçlar menadione hakkında daha bilgi sahibi olmamızı sağlayacaktır. Çalışmada menadione uygulamalarının sinyallemede moleküler basamaklarının daha fazla aydınlatılması araştırılmayı beklemektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abbas, T., Rizwan, M., Ali, S., Adrees, M., Zia-ur-Rehman, M., Qayyum, M. F., Ok, Y. S., & 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(26).
- Ain, N., Ahmad, E., & Hussain, I. (2018). *Impact of different effluents on the performance and heavy metal accumulation of Lettuce (Lactuca sativa L.)*. 8(3), 44–52.
- Akram, N. A., Shafiq, F., & Ashraf, M. (2017). Ascorbic acid-a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 8).
- Alia, & Saradhi, P. P. (1991). Proline Accumulation Under Heavy Metal Stress. *Journal of Plant Physiology*, 138(5).
- Alscher, R. G. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(372).
- Andosch, A., Affenzeller, M. J., Lütz, C., & Lütz-Meindl, U. (2012). A freshwater green alga under cadmium stress: Ameliorating calcium effects on ultrastructure and photosynthesis in the unicellular model *Micrasterias*. *Journal of Plant Physiology*, 169(15).
- Anjum, N. A., Gill, S. S., Gill, R., Hasanuzzaman, M., Duarte, A. C., Pereira, E., Ahmad, I., Tuteja, R., & Tuteja, N. (2014). Metal/metalloid stress tolerance in plants: role of ascorbate, its redox couple, and associated enzymes. In *Protoplasma* (Vol. 251, Issue 6).
- Anjum, S. A., Tanveer, M., Hussain, S., Bao, M., Wang, L., Khan, I., Ullah, E., Tung, S. A., Samad, R. A., & 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(21).
- Anwar Hossain, M., Hoque, M. A., Burritt, D. J., & Fujita, M. (2014). Proline Protects Plants Against Abiotic Oxidative Stress: Biochemical and Molecular Mechanisms. In *Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling*.
- Aprile, A., Sabella, E., Francia, E., Milc, J., Ronga, D., Pecchioni, N., Ferrari, E., Luvisi, A., Vergine, M., & De Bellis, L. (2019). Combined effect of cadmium and lead on durum wheat. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23).
- Asgher, M., Khan, N. A., Khan, M. I. R., Fatma, M., & Masood, A. (2014). Ethylene production is associated with alleviation of cadmium-induced oxidative stress by sulfur in mustard types differing in ethylene sensitivity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 106.
- Ashraf, M. A., Asma, H. F., & Iqbal, M. (2019). Exogenous menadione sodium bisulfite mitigates specific ion toxicity and oxidative damage in salinity-stressed okra (*Abelmoschus esculentus* Moench). *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(12).
- Ashraf, M. A., Riaz, M., Arif, M. S., Rasheed, R., Iqbal, M., Hussain, I., & Mubarik, M. S. (2019). The Role of Non-Enzymatic Antioxidants in Improving Abiotic Stress Tolerance in Plants. In *Plant Tolerance to Environmental Stress*.
- Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2).
- Askari, S. H., Ashraf, M. A., Ali, S., Rizwan, M., & Rasheed, R. (2021). Menadione sodium bisulfite alleviated chromium effects on wheat by regulating oxidative

- defense, chromium speciation, and ion homeostasis. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(27).
- Asri, F. Ö., & Sönmez, S. (2006). Ağır Metal Toksisitesinin Bitki Metabolizması Üzerine Etkileri. *Derim*, 23(2).
- Atkinson, N. J., & Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: From genes to the field. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 63, Issue 10).
- Aydinalp, C., & Marinova, S. (2009). The effects of heavy metals on seed germination and plant growth on alfalfa plant (*Medicago sativa*). *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 15(4).
- Ayhan, B., Ekmekçi, Y., & Tanyolaç, D. (2006). DERLEME/REVIEW BİTKİLERDE AĞIR METAL ZARARLARI ve KORUNMA MEKANİZMALARI. *JOURNAL OF SCIENCE AND TECHNOLOGY Cilt*, 16(1), 7–1.
- Bankaji, I., Sleimi, N., López-Climent, M. F., Perez-Clemente, R. M., & Gomez-Cadenas, A. (2014). Effects of Combined Abiotic Stresses on Growth, Trace Element Accumulation, and Phytohormone Regulation in Two Halophytic Species. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33(3).
- Baskar, V., Venkatesh, R., & Ramalingam, S. (2018). Flavonoids (antioxidants systems) in higher plants and their response to stresses. In *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1).
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1).
- Benavides, M. P., Gallego, S. M., & Tomaro, M. L. (2005). Cadmium toxicity in plants. In *Brazilian Journal of Plant Physiology* (Vol. 17, Issue 1).
- Berni, R., Luyckx, M., Xu, X., Legay, S., Sergeant, K., Hausman, J. F., Lutts, S., Cai, G., & Guerriero, G. (2019). Reactive oxygen species and heavy metal stress in plants: Impact on the cell wall and secondary metabolism. In *Environmental and Experimental Botany* (Vol. 161).
- Berti, W. R., & Cunningham, S. D. (2000). Metal-accumulating plants. Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment. *Journal of Plant Biotechnology*.
- Bhat, J. A., Shivaraj, S. M., Singh, P., Navadagi, D. B., Tripathi, D. K., Dash, P. K., Solanke, A. U., Sonah, H., & Deshmukh, R. (2019). Role of silicon in mitigation of heavy metal stresses in crop plants. In *Plants* (Vol. 8, Issue 3).
- Bindoli, A., & Rigobello, M. P. (2013). Peroxidase Biochemistry and Redox Signaling. In *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*.
- Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. In *Annals of Botany* (Vol. 91).
- Boguszewska, D., & Zagdask, B. (2012). ROS as Signaling Molecules and Enzymes of Plant Response to Unfavorable Environmental Conditions. In *Oxidative Stress - Molecular Mechanisms and Biological Effects*.
- Borges, A. A., Jiménez-Arias, D., Expósito-Rodríguez, M., Sandalio, L. M., & Pérez, J. A. (2014). Priming crops against biotic and abiotic stresses: MSB as a tool for studying mechanisms. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 5, Issue November).
- Boubakri, H., Poutaraud, A., Wahab, M. A., Clayeux, C., Baltenweck-Guyot, R., Steyer, D., Marcic, C., Mliki, A., & Soustre-Gacougnolle, I. (2013). Thiamine modulates metabolism of the phenylpropanoid pathway leading to enhanced resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine. *BMC Plant Biology*, 13(1).

- 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).
- Büyüç, I., Soydam-Aydin, S., & Aras, S. (2012). Molecular responses of plants to stress conditions. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69(2), 97–110.
- Carvalho, L. C., Vidigal, P., & Amâncio, S. (2015). Oxidative stress homeostasis in grapevine (*Vitis vinifera* L.). In *Frontiers in Environmental Science* (Vol. 3, Issue MAR).
- Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S. B., Ribeiro, C. W., Lazzarotto, F., & Margis-Pinheiro, M. (2012). Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. In *Genetics and Molecular Biology* (Vol. 35, Issue 4 SUPPL.).
- Chen, Z., Han, Y., Ning, K., Ding, Y., Zhao, W., Yan, S., Luo, C., Jiang, X., Ge, D., Liu, R., Wang, Q., & Zhang, X. (2018). Inflorescence development and the role of LsFT in regulating bolting in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Frontiers in Plant Science*, 8.
- Chibuike, G. U., & Obiora, S. C. (2014). Heavy metal polluted soils: Effect on plants and bioremediation methods. In *Applied and Environmental Soil Science* (Vol. 2014).
- Chunhabundit, R. (2016). Cadmium exposure and potential health risk from foods in Contaminated area, Thailand. *Toxicological Research*, 32(1).
- Clemens, S. (2006). Evolution and function of phytochelatin synthases. *Journal of Plant Physiology*, 163(3).
- Cole, J. F., & Volpe, R. (1983). The effect of cadmium on the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 7(1), 151–159.
- Comparative Biology of the Normal Lung. (2015). In *Comparative Biology of the Normal Lung*.
- Conklin, P. L. (2001). Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. In *Plant, Cell and Environment* (Vol. 24, Issue 4).
- Cooper, A. M., Felix, D., Alcantara, F., Zaslavsky, I., Work, A., Watson, P. L., Pezzoli, K., Yu, Q., Zhu, D., Scavo, A. J., Zarabi, Y., & Schroeder, J. I. (2020). Monitoring and mitigation of toxic heavy metals and arsenic accumulation in food crops: A case study of an urban community garden. *Plant Direct*, 4(1).
- Costa, G., & Morel, J. L. (1994). Water relations, gas exchange and amino acid content in Cd-treated lettuce. *Plant Physiology and Biochemistry*, 32(4).
- D'Amelia, V., Aversano, R., Chiaiese, P., & Carputo, D. (2018). The antioxidant properties of plant flavonoids: their exploitation by molecular plant breeding. In *Phytochemistry Reviews* (Vol. 17, Issue 3).
- Darvishan, M., Tohidi-Moghadam, H. R., & Zahedi, H. (2013). The effects of foliar application of ascorbic acid (vitamin C) on physiological and biochemical changes of corn (*Zea mays* L) under irrigation withholding in different growth stages. *Maydica*, 58(2).
- Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. In *Frontiers in Environmental Science* (Vol. 2, Issue DEC).
- de Albuquerque, T. L., Silva, J. de S., de Macedo, A. C., Gonçalves, L. R. B., & Rocha, M. V. P. (2019). Biotechnological Strategies for the Lignin-Based Biorefinery Valorization. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*.
- Demidchik, V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical

- chemistry to cell biology. In *Environmental and Experimental Botany* (Vol. 109).
 Dixit, V., Pandey, V., & Shyam, R. (2001). Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal of Experimental Botany*, 52(358).
- Dmitrieva, V. A., Tyutereva, E. V., & Voitsekhovskaja, O. V. (2020). Singlet oxygen in plants: Generation, detection, and signaling roles. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9).
- Dos Santos, C. V., Cuiné, S., Rouhier, N., & Rey, P. (2005). The Arabidopsis plastidic methionine sulfoxide reductase B proteins. Sequence and activity characteristics, comparison of the expression with plastidic methionine sulfoxide reductase A, and induction by photooxidative stress. In *Plant Physiology* (Vol. 138, Issue 2).
- Drazkiewicz, M. (1994). Chlorophyllase: Occurrence, functions, mechanism of action, effects of external and internal factors. In *Photosynthetica* (Vol. 30, Issue 3).
- Du, J., Lu, X., Fan, J., Qin, Y., Yang, X., & Guo, X. (2020). Image-Based High-Throughput Detection and Phenotype Evaluation Method for Multiple Lettuce Varieties. *Frontiers in Plant Science*, 11.
- Dumanović, J., Nepovimova, E., Natić, M., Kuća, K., & Jačević, V. (2021). The Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense System in Plants: A Concise Overview. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11).
- Ecz, A. (2003). *VITAMIN E AS AN ANTIOXIDANT Bilgehan DOĞRU PEKİNER Ankara University , Faculty of Pharmacy , Department of Biochemistry 06100 Tandoğan , Ankara , TURKEY*. 32(4), 243–267.
- El-Beltagi, H. S., Mohamed, H. I., & Sofy, M. R. (2020). Role of ascorbic acid, glutathione and proline applied as singly or in sequence combination in improving chickpea plant through physiological change and antioxidant defense under different levels of irrigation intervals. *Molecules*, 25(7).
- Elkelish, A., Qari, S. H., Mazrou, Y. S. A., Abdelaal, K. A. A., Hafez, Y. M., Abu-Elsaoud, A. M., Batiha, G. E. S., El-Esawi, M. A., & Nahhas, N. El. (2020). Exogenous ascorbic acid induced chilling tolerance in tomato plants through modulating metabolism, osmolytes, antioxidants, and transcriptional regulation of catalase and heat shock proteins. *Plants*, 9(4).
- Engin, K. N. (2009). Alpha-tocopherol: Looking beyond an antioxidant. *Molecular Vision*, 15.
- Farmer, E. E., & Mueller, M. J. (2013). ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 64).
- Farooq, A., Bukhari, S. A., Akram, N. A., Ashraf, M., Wijaya, L., Alyemeni, M. N., & Ahmad, P. (2020). Exogenously applied ascorbic acid-mediated changes in osmoprotection and oxidative defense system enhanced water stress tolerance in different cultivars of safflower (*Carthamus tinctorious* L.). *Plants*, 9(1).
- Farooq, M. A., Islam, F., Ali, B., Najeel, U., Mao, B., Gill, R. A., Yan, G., Siddique, K. H. M., & Zhou, W. (2016). Arsenic toxicity in plants: Cellular and molecular mechanisms of its transport and metabolism. In *Environmental and Experimental Botany* (Vol. 132).
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. In *Plant Cell* (Vol. 17, Issue 7).
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 9, Issue 4).

- Fukai, T., & Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: Role in redox signaling, vascular function, and diseases. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 15, Issue 6).
- Galano, A., & Alvarez-Idaboy, J. R. (2011). Glutathione: Mechanism and kinetics of its non-enzymatic defense action against free radicals. *RSC Advances*, 1(9).
- Gallie, D. R. (2013). L-Ascorbic Acid: A Multifunctional Molecule Supporting Plant Growth and Development. *Scientifica*, 2013.
- Gan, Y. Z., & Azrina, A. (2016). Antioxidant properties of selected varieties of lettuce (*Lactuca sativa* L.) commercially available in Malaysia. *International Food Research Journal*, 23(6).
- García-Machado, F. J., García-García, A. L., Borges, A. A., & Jiménez-Arias, D. (2022). Root treatment with a vitamin K3 derivative: a promising alternative to synthetic fungicides against *Botrytis cinerea* in tomato plants. *Pest Management Science*, 78(3).
- Garg, N., & Singla, P. (2011). Arsenic toxicity in crop plants: Physiological effects and tolerance mechanisms. In *Environmental Chemistry Letters* (Vol. 9, Issue 3).
- Gazwi, H. S. S., Yassien, E. E., & Hassan, H. M. (2020). Mitigation of lead neurotoxicity by the ethanolic extract of *Laurus* leaf in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 192.
- Genchi, G., Sinicropi, M. S., Lauria, G., Carocci, A., & Catalano, A. (2020). The effects of cadmium toxicity. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 17, Issue 11).
- Gest, N., Gautier, H., & Stevens, R. (2013). Ascorbate as seen through plant evolution: The rise of a successful molecule? In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 64, Issue 1).
- Ghori, N. H., Ghori, T., Hayat, M. Q., Imadi, S. R., Gul, A., Altay, V., & Ozturk, M. (2019). Heavy metal stress and responses in plants. In *International Journal of Environmental Science and Technology* (Vol. 16, Issue 3).
- Ghosh, U. K., Islam, M. N., Siddiqui, M. N., Cao, X., & Khan, M. A. R. (2022). Proline, a multifaceted signalling molecule in plant responses to abiotic stress: understanding the physiological mechanisms. In *Plant Biology* (Vol. 24, Issue 2).
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. In *Plant Physiology and Biochemistry* (Vol. 48, Issue 12).
- Gross, J., Won, K. C., Lezhneva, L., Falk, J., Krupinska, K., Shinozaki, K., Seki, M., Herrmann, R. G., & Meurer, J. (2006). A plant locus essential for phyloquinone (vitamin K1) biosynthesis originated from a fusion of four eubacterial genes. *Journal of Biological Chemistry*, 281(25).
- Gupta, D. K., Huang, H. G., Nicoloso, F. T., Schetinger, M. R., Farias, J. G., Li, T. Q., Razafindrabe, B. H. N., Aryal, N., & Inouhe, M. (2013). Effect of Hg, As and Pb on biomass production, photosynthetic rate, nutrients uptake and phytochelatin induction in *Pfaffia glomerata*. *Ecotoxicology*, 22(9).
- Gusman, G. S., Oliveira, J. A., Farnese, F. S., & Cambraia, J. (2013). Mineral nutrition and enzymatic adaptation induced by arsenate and arsenite exposure in lettuce plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 71.
- Haider, F. U., Liqun, C., Coulter, J. A., Cheema, S. A., Wu, J., Zhang, R., Wenjun, M., & Farooq, M. (2021). Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies. In *Ecotoxicology and Environmental Safety* (Vol. 211).
- Haider, M. S., Jaskani, M. J., & Fang, J. (2021). Overproduction of ROS: underlying molecular mechanism of scavenging and redox signaling. In *Biocontrol Agents and*

Secondary Metabolites.

- Hall, J. L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 53, Issue 366).
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. In *Plant Physiology* (Vol. 141, Issue 2).
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Anee, T. I., & Fujita, M. (2017). Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. In *Physiology and Molecular Biology of Plants* (Vol. 23, Issue 2).
- Hassan, M. J., Shao, G., & Zhang, G. (2005). Influence of cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activity in rice cultivars with different grain cadmium accumulation. *Journal of Plant Nutrition*, 28(7).
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., & Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments: A review. In *Plant Signaling and Behavior* (Vol. 7, Issue 11).
- Hernández, J. A., Barba-Espín, G., & Diaz-Vivancos, P. (2017). Glutathione-mediated biotic stress tolerance in plants. In *Glutathione in Plant Growth, Development, and Stress Tolerance*.
- Herzog, V., & Fahimi, H. D. (1973). Determination of the activity of peroxidase. *Anal. Biochem.*, 55(2).
- Hirayama, T., & Shinozaki, K. (2010). Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: Past, present and future. *Plant Journal*, 61(6), 1041–1052.
- Hong, J. K., Kim, H. J., Jung, H., Yang, H. J., Kim, D. H., Sung, C. H., Park, C. J., & Chang, S. W. (2016). Differential control efficacies of vitamin treatments against bacterial wilt and grey mould diseases in tomato plants. *Plant Pathology Journal*, 32(5).
- Hossain, M. A., Munné-Bosch, S., Burritt, D. J., Diaz-Vivancos, P., Fujita, M., & Lorence, A. (2018). Ascorbic Acid in Plant Growth, Development and Stress Tolerance. In *Ascorbic Acid in Plant Growth, Development and Stress Tolerance*.
- Hosseinifard, M., Stefaniak, S., Javid, M. G., Soltani, E., Wojtyla, Ł., & Garnczarska, M. (2022). Contribution of Exogenous Proline to Abiotic Stresses Tolerance in Plants: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9).
- Ishikawa, T., Takahara, K., Hirabayashi, T., Matsumura, H., Fujisawa, S., Terauchi, R., Uchimiya, H., & Kawai-Yamada, M. (2010). Metabolome analysis of response to oxidative stress in rice suspension cells overexpressing cell death suppressor bax inhibitor-1. *Plant and Cell Physiology*, 51(1).
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., & Beeregowda, K. N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. In *Interdisciplinary Toxicology* (Vol. 7, Issue 2).
- Jayakumar, K., Jaleel, C. A., & Vijayarengan, P. (2007). Changes in growth, biochemical constituents, and antioxidant potentials in radish (*Raphanus sativus* L.) under cobalt stress. *Turkish Journal of Biology*, 31(3).
- Jiang, Y., & Huang, B. (2001). Drought and heat stress injury to two cool-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. *Crop Science*, 41(2).
- Jiménez-Arias, D., García-Machado, F. J., Morales-Sierra, S., Suárez, E., Pérez, J. A., Luis, J. C., Garrido-Orduña, C., Herrera, A. J., Valdés, F., Sandalio, L. M., & Borges, A. A. (2019). Menadione sodium bisulphite (MSB): Beyond seed-soaking. Root pretreatment with MSB primes salt stress tolerance in tomato plants. *Environmental and Experimental Botany*, 157.
- Jiménez-Arias, D., Pérez, J. A., Luis, J. C., Martín-Rodríguez, V., Valdés-González, F.,

- & Borges, A. A. (2015). Treating seeds in menadione sodium bisulphite primes salt tolerance in *Arabidopsis* by inducing an earlier plant adaptation. *Environmental and Experimental Botany*, 109.
- Kadmiyum, Krom ve Kurşunun *Ceratophyllum demersum* L. ve *Pogostemon erectus* (Dalzell) Kuntze Üzerine Fitotoksitesinin Değerlendirilmesi. (2018). *Karaelmas Science and Engineering Journal*.
- Kalita, J., Pradhan, A. K., Shandilya, Z. M., & Tanti, B. (2018). Arsenic Stress Responses and Tolerance in Rice: Physiological, Cellular and Molecular Approaches. In *Rice Science* (Vol. 25, Issue 5).
- KANDEMİR, D., ŞAHİN, G. T., BALKAYA, A., & SARIBAŞ, Ş. (2021). Kıvırcık ve Yedikule Tipi Marul Çeşitlerinin Kök Gelişimi ve Kök Sistemi Mimarisi Yönünden İncelenmesi. *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences*.
- Kanwischer, M., Porfirova, S., Bergmüller, E., & Dörmann, P. (2005). Alterations in tocopherol cyclase activity in transgenic and mutant plants of *Arabidopsis* affect tocopherol content, tocopherol composition, and oxidative stress. *Plant Physiology*, 137(2).
- Karabulut, H., & Gülay, M. Ş. (2016). Antioksidanlar. *MAE Vet. Fak. Dergisi*, 1(1), 65–76.
- Kaur, S., Kamli, M. R., & Ali, A. (2011). Role of arsenic and its resistance in nature. In *Canadian Journal of Microbiology* (Vol. 57, Issue 10).
- Kennedy, L., Sandhu, J. K., Harper, M. E., & Cuperlovic-culf, M. (2020). Role of glutathione in cancer: From mechanisms to therapies. In *Biomolecules* (Vol. 10, Issue 10).
- Khanam, U. K. S., Oba, S., Yanase, E., & Murakami, Y. (2012). Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables. *Journal of Functional Foods*, 4(4).
- Kim, D. E., Shang, X., Assefa, A. D., Keum, Y. S., & Saini, R. K. (2018). Metabolite profiling of green, green/red, and red lettuce cultivars: Variation in health beneficial compounds and antioxidant potential. *Food Research International*, 105.
- Kim, M. J., Moon, Y., Tou, J. C., Mou, B., & Waterland, N. L. (2016). Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). In *Journal of Food Composition and Analysis* (Vol. 49).
- Kishore, C., Sundaram, S., & Karunakaran, D. (2019). Vitamin K3 (menadione) suppresses epithelial-mesenchymal-transition and Wnt signaling pathway in human colorectal cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*, 309.
- Köleli, N., Eker, S., & Cakmak, I. (2004). Effect of zinc fertilization on cadmium toxicity in durum and bread wheat grown in zinc-deficient soil. *Environmental Pollution*, 131(3).
- Korkmaz, A. (2005). Inclusion of acetyl salicylic acid and methyl jasmonate into the priming solution improves low-temperature germination and emergence of sweet pepper. *HortScience*, 40(1).
- Kruk, J., & Szymańska, R. (2021). Singlet oxygen oxidation products of carotenoids, fatty acids and phenolic prenyllipids. In *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (Vol. 216).
- Kumar, A., Singh, R. P., Singh, P. K., Awasthi, S., Chakrabarty, D., Trivedi, P. K., & Tripathi, R. D. (2014). Selenium ameliorates arsenic induced oxidative stress through modulation of antioxidant enzymes and thiols in rice (*Oryza sativa* L.). *Ecotoxicology*, 23(7).
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head

- of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259).
- Lanaras, T., Moustakas, M., Symeonidis, L., Diamantoglou, S., & Karataglis, S. (1993). Plant metal content, growth responses and some photosynthetic measurements on field-cultivated wheat growing on ore bodies enriched in Cu. *Physiologia Plantarum*, 88(2).
- Levitt, J. (1985). Responses of Plants to Environmental Stresses. *Journal of Range Management*, 38(5).
- LI, C. xi, FENG, S. li, SHAO, Y., JIANG, L. na, LU, X. yang, & HOU, X. li. (2007). Effects of arsenic on seed germination and physiological activities of wheat seedlings. *Journal of Environmental Sciences*, 19(6).
- Lindberg, S., & Griffiths, G. (1993). Aluminium effects on ATPase activity and lipid composition of plasma membranes in sugar beet roots. *Journal of Experimental Botany*, 44(10).
- Lisiewicz, M., Heimburger, R., Golimowski, J., Hassan, S. K. M., Darus, F. M., Nasir, R. A., Sumari, S. M., Ismail, Z. S., Omar, N. A., Community, R. S., Chattopadhyay, G., Box, O., Bakar, C., Baba, A., Al-rajhl, M. a, & Madany, W. C. (2012). Metaller Veİnsan SağlığıYİrmİncİ Y¼zyİldan Bug¼ne Ve GeleceğeMiras Kalan Çevre Sağlığı Sorunu Heavy Metals and Human Health : Environmental Health Problem From Twenty Centuries To Future. *Atmospheric Environment*, 38(3).
- Liu, X., & Kokare, C. (2017). Microbial Enzymes of Use in Industry. In *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*.
- Liu, Z. J., Guo, Y. K., & Bai, J. G. (2010). Exogenous hydrogen peroxide changes antioxidant enzyme activity and protects ultrastructure in leaves of two cucumber ecotypes under osmotic stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 29(2).
- Lombardi, L., & Sebastiani, L. (2005). Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. *Plant Science*, 168(3).
- Madhava Rao, K. V., & Sresty, T. V. S. (2000). Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Science*, 157(1).
- Madhu, Kaur, A., Tyagi, S., Shumayla, Singh, K., & Upadhyay, S. K. (2022). Exploration of glutathione reductase for abiotic stress response in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*, 41(3).
- Madlung, A., & Comai, L. (2004). The effect of stress on genome regulation and structure. In *Annals of Botany* (Vol. 94, Issue 4).
- Małecka, A., Piechalak, A., Morkunas, I., & Tomaszewska, B. (2008). Accumulation of lead in root cells of *Pisum sativum*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(5).
- Maleki, M., Ghorbanpour, M., & Kariman, K. (2017). Physiological and antioxidative responses of medicinal plants exposed to heavy metals stress. *Plant Gene*, 11.
- Mandal, B. K., & Suzuki, K. T. (2002). Arsenic round the world: A review. In *Talanta* (Vol. 58, Issue 1).
- Manzotti, P., Nisi, P. De, & Zocchi, G. (2008). Vitamin K in Plants. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 2(1).
- Martínez-Castillo, J. I., Saldaña-Robles, A., & Ozuna, C. (2022). Arsenic stress in plants: A metabolomic perspective. In *Plant Stress* (Vol. 3).
- McClung, C. R. (1997). Regulation of catalases in *Arabidopsis*. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(3).
- Meitha, K., Pramesti, Y., & Suhandono, S. (2020). Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Postharvest Vegetables and Fruits. In *International Journal of Food Science* (Vol. 2020).

- Mengoni, A., Gonnelli, C., Galardi, F., Gabbrielli, R., & Bazzicalupo, M. (2000). Genetic diversity and heavy metal tolerance in populations of *Silene paradoxa* L. (Caryophyllaceae): A random amplified polymorphic DNA analysis. *Molecular Ecology*, 9(9).
- Miao, L., & St. Clair, D. K. (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 47, Issue 4).
- Moreno-Galván, A. E., Cortés-Patiño, S., Romero-Perdomo, F., Uribe-Vélez, D., Bashan, Y., & Bonilla, R. R. (2020). Proline accumulation and glutathione reductase activity induced by drought-tolerant rhizobacteria as potential mechanisms to alleviate drought stress in Guinea grass. *Applied Soil Ecology*, 147.
- Mou, B. (2005). Genetic variation of beta-carotene and lutein contents in lettuce. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(6).
- Moussa, Z., M.A. Judeh, Z., & A. Ahmed, S. (2020). Nonenzymatic Exogenous and Endogenous Antioxidants. In *Free Radical Medicine and Biology*.
- Mushtaq, Z., Faizan, S., & Gulzar, B. (2020). Salt stress, its impacts on plants and the strategies plants are employing against it: A review. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 8(3).
- Myśliwa-Kurdziel, B., Prasad, M. N. V., & Strzałka, K. (2004). Photosynthesis in Heavy Metal Stressed Plants. In *Heavy Metal Stress in Plants*.
- Nahar, K., Hasanuzzaman, M., Alam, M. M., & Fujita, M. (2015). Glutathione-induced drought stress tolerance in mung bean: Coordinated roles of the antioxidant defence and methylglyoxal detoxification systems. *AoB PLANTS*, 7(1).
- Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., & Das, N. (2019). Role of Catalase in Oxidative Stress- And Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.
- Nazar, R., Iqbal, N., Masood, A., Khan, M. I. R., Syeed, S., & Khan, N. A. (2012). Cadmium Toxicity in Plants and Role of Mineral Nutrients in Its Alleviation. *American Journal of Plant Sciences*, 03(10).
- Nicolle, C., Carnat, A., Fraisse, D., Lamaison, J. L., Rock, E., Michel, H., Amoureux, P., & Remesy, C. (2004). Characterisation and variation of antioxidant micronutrients in lettuce (*Lactuca sativa* folium). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(15), 2061–2069.
- Nicomel, N. R., Leus, K., Folens, K., Van Der Voort, P., & Du Laing, G. (2015). Technologies for arsenic removal from water: Current status and future perspectives. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 13, Issue 1).
- Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35).
- 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. In *Environmental Science and Pollution Research* (Vol. 29, Issue 12).
- Olubukola Sinbad, O., Folorunsho, A. A., Olabisi, O. L., Abimbola Ayoola, O., & Johnson Temitope, E. (2019a). Vitamins as Antioxidants. *Journal of Food Science and Nutrition Research*, 02(03), 214–235.
- Olubukola Sinbad, O., Folorunsho, A. A., Olabisi, O. L., Abimbola Ayoola, O., & Johnson Temitope, E. (2019b). Vitamins as Antioxidants. *Journal of Food Science and Nutrition Research*, 02(03).
- Oukarroum, A., El Madidi, S., & Strasser, R. J. (2012). Exogenous glycine betaine and proline play a protective role in heat-stressed barley leaves (*Hordeum vulgare* L.):

- A chlorophyll a fluorescence study. *Plant Biosystems*, 146(4).
- Özbolat, G., & Tuli, A. (2016). Ağır Metal Toksisitesinin İnsan Sağlığına Etkileri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 25(23783).
- Pan, C., Yang, D., Zhao, X., Jiao, C., Yan, Y., Lamin-Samu, A. T., Wang, Q., Xu, X., Fei, Z., & Lu, G. (2019). Tomato stigma exsertion induced by high temperature is associated with the jasmonate signalling pathway. *Plant Cell and Environment*, 42(4).
- Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, B., & Sharma, A. (2004). Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. In *Environmental and Experimental Botany* (Vol. 52, Issue 3).
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. In *International Journal of Biomedical Science* (Vol. 4, Issue 2).
- Piacentini, D., Corpas, F. J., D'Angeli, S., Altamura, M. M., & Falasca, G. (2020). Cadmium and arsenic-induced-stress differentially modulates Arabidopsis root architecture, peroxisome distribution, enzymatic activities and their nitric oxide content. *Plant Physiology and Biochemistry*, 148.
- PINK, D. A. C., & KEANE, E. M. (1993). 40 - Lettuce: *Lactuca sativa* L. In *Genetic Improvement of Vegetable Crops*.
- Pinto, A. P., Mota, A. M., De Varennes, A., & Pinto, F. C. (2004). Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. *Science of the Total Environment*, 326(1–3).
- Piršelová, B., & Matušíková, I. (2013). Callose: The plant cell wall polysaccharide with multiple biological functions. In *Acta Physiologiae Plantarum* (Vol. 35, Issue 3).
- Piršelová, Beáta, Kuna, R., Libantová, J., Moravčíková, J., & Matušíková, I. (2011). Biochemical and physiological comparison of heavy metal-triggered defense responses in the monocot maize and dicot soybean roots. *Molecular Biology Reports*, 38(5).
- Pitzschke, A., Fraundorfer, A., Guggemos, M., & Fuchs, N. (2015). Antioxidative responses during germination in quinoa grown in vitamin B-rich medium. *Food Science and Nutrition*, 3(3).
- Prasad, T. K., Anderson, M. D., Martin, B. A., & Stewart, C. R. (1994). Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell*, 6(1).
- Przedpelska-Wasowicz, E. M., & Wierzbicka, M. (2011). Gating of aquaporins by heavy metals in *Allium cepa* L. epidermal cells. *Protoplasma*, 248(4).
- Quan, L. J., Zhang, B., Shi, W. W., & Li, H. Y. (2008). Hydrogen peroxide in plants: A versatile molecule of the reactive oxygen species network. In *Journal of Integrative Plant Biology* (Vol. 50, Issue 1).
- Rahman, S. U., Nawaz, M. F., Gul, S., Yasin, G., Hussain, B., Li, Y., & Cheng, H. (2022). State-of-the-art OMICS strategies against toxic effects of heavy metals in plants: A review. In *Ecotoxicology and Environmental Safety* (Vol. 242).
- Raja, V., Majeed, U., Kang, H., Andrabi, K. I., & John, R. (2017). Abiotic stress: Interplay between ROS, hormones and MAPKs. In *Environmental and Experimental Botany* (Vol. 137).
- Rajashekar, C. B., Fu, J., & Giri, A. (2014). Exogenous Vitamin K3 and Peroxides Can Alleviate Hypoxia in Bean Seedlings (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.). *American Journal of Plant Sciences*, 05(22).
- Rajput, V. D., Harish, Singh, R. K., Verma, K. K., Sharma, L., Quiroz-Figueroa, F. R.,

- Meena, M., Gour, V. S., Minkina, T., Sushkova, S., & Mandzhieva, S. (2021). Recent developments in enzymatic antioxidant defence mechanism in plants with special reference to abiotic stress. In *Biology* (Vol. 10, Issue 4).
- Rasheed, R., Arslan Ashraf, M., Kamran, S., Iqbal, M., & Hussain, I. (2018). Menadione sodium bisulphite mediated growth, secondary metabolism, nutrient uptake and oxidative defense in okra (*Abelmoschus esculentus* Moench) under cadmium stress. *Journal of Hazardous Materials*, 360.
- Richards, S. L., Wilkins, K. A., Swarbreck, S. M., Anderson, A. A., Habib, N., Smith, A. G., McAinsh, M., & Davies, J. M. (2015). The hydroxyl radical in plants: From seed to seed. *Journal of Experimental Botany*, 66(1).
- Rodriguez De Luna, S. L., Ramírez-Garza, R. E., & Serna Saldívar, S. O. (2020). Environmentally Friendly Methods for Flavonoid Extraction from Plant Material: Impact of Their Operating Conditions on Yield and Antioxidant Properties. In *Scientific World Journal* (Vol. 2020).
- Ronzan, M., Piacentini, D., Fattorini, L., Federica, D. R., Caboni, E., Eiche, E., Ziegler, J., Hause, B., Riemann, M., Betti, C., Altamura, M. M., & Falasca, G. (2019). Auxin-jasmonate crosstalk in *Oryza sativa* L. root system formation after cadmium and/or arsenic exposure. *Environmental and Experimental Botany*, 165.
- ROS, R., COOKE, D. T., BURDEN, R. S., & JAMES, C. S. (1990). Effects of the Herbicide MCPA, and the Heavy Metals, Cadmium and Nickel on the Lipid Composition, Mg²⁺-ATPase Activity and Fluidity of Plasma Membranes from Rice, *Oryza sativa* (cv. Bahia) Shoots. *Journal of Experimental Botany*, 41(4).
- Rucińska-Sobkowiak, R., Nowaczyk, G., Krzesłowska, M., Rabeda, I., & Jurga, S. (2013). Water status and water diffusion transport in lupine roots exposed to lead. *Environmental and Experimental Botany*, 87.
- Sangün, O., & Satar, S. (2012). Aphids (Hemiptera: Aphididae) on lettuce in the Eastern Mediterranean Region of Turkey: Incidence, population fluctuations, and flight activities. *Turkiye Entomoloji Dergisi*, 36(4).
- Sanità Di Toppi, L., & Gabbriellini, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. In *Environmental and Experimental Botany* (Vol. 41, Issue 2).
- Satarug, S., Garrett, S. H., Sens, M. A., & Sens, D. A. (2010). Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. In *Environmental Health Perspectives* (Vol. 118, Issue 2).
- ŞEN, F., KINAY TEKSÜR, P., OKŞAR, R. E., GÜLEŞ, A., & KAYGISIZ AŞÇIOĞUL, T. (2016). YARARLI MİKROORGANİZMA UYGULAMASININ MARUL VERİM ve KALİTE ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 13(1).
- Sezer, F. (2017). Bitkilerde E Vitamini Biyosentezi ve Fonksiyonu. *International Journal of Innovative Approaches in Science Research*, 1(1), 69–77.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2010). Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(9).
- Shalata, A., & Neumann, P. M. (2001). Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increases resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany*, 52(364).
- Shameer, S., & Prasad, T. N. V. K. V. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation*, 84(3).
- Sharma, S. S., & Dietz, K. J. (2006). The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 57, Issue 4).

- Sharma, S. S., & Dietz, K. J. (2009). The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. In *Trends in Plant Science* (Vol. 14, Issue 1).
- Shi, G. R., & Cai, Q. S. (2008). Photosynthetic and anatomic responses of peanut leaves to cadmium stress. *Photosynthetica*, 46(4).
- Singh, A. P., Goel, R. K., & Kaur, T. (2011). Mechanisms pertaining to arsenic toxicity. *Toxicology International*, 18(2).
- Singh, M., Pratap Singh, V., Dubey, G., & Mohan Prasad, S. (2015). Exogenous proline application ameliorates toxic effects of arsenate in *Solanum melongena* L. seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 117.
- Singh, N., Ma, L. Q., Srivastava, M., & Rathinasabapathi, B. (2006). Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L and *Pteris ensiformis* L. *Plant Science*, 170(2).
- Singla, J., & Krattinger, S. G. (2016). Biotic Stress Resistance Genes in Wheat. In *Reference Module in Food Science*.
- Smart, R. E., & Bingham, G. E. (1974). Rapid Estimates of Relative Water Content. *Plant Physiology*, 53(2).
- Smirnoff, N. (1996). The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany*, 78(6).
- Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M., & Vitti, A. (2015). Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 16, Issue 6).
- Soudek, P., Katrušáková, A., Sedláček, L., Petrová, Š., Kočí, V., Maršík, P., Griga, M., & Vaněk, T. (2010). Effect of heavy metals on inhibition of root elongation in 23 cultivars of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 59(2).
- Srivastava, R. K., Pandey, P., Rajpoot, R., Rani, A., & Dubey, R. S. (2014). Cadmium and lead interactive effects on oxidative stress and antioxidative responses in rice seedlings. *Protoplasma*, 251(5).
- Stahl, W., & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 24, Issue 6).
- Suman, S., Bagal, D., Jain, D., Ragini Singh, Singh, I. K., & Singh, A. (2021). Biotic stresses on plants: reactive oxygen species generation and antioxidant mechanism. In *Frontiers in Plant-Soil Interaction*.
- Tangahu, B. V., Sheikh Abdullah, S. R., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., & Mukhlisin, M. (2011). A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. In *International Journal of Chemical Engineering*.
- Tongul, B., & Tarhan, L. (2014). The effect of menadione-induced oxidative stress on the in vivo reactive oxygen species and antioxidant response system of *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry*, 49(2).
- Tripathi, R. D., Srivastava, S., Mishra, S., Singh, N., Tuli, R., Gupta, D. K., & Maathuis, F. J. M. (2007). Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 25, Issue 4).
- TÜRKİYE'DE SEBZE ÜRETİMİ VE GELECEK İÇİN BAZI ÖNERİLER Sait ENGİNDENİZ. (n.d.). 3, 1–17.
- Turna, F., & Yavuz, M. (2016). Ağır Metal Kirliliği Olan Alanlarda Genotoksikite Tayini ve Biyoizlem Çalışmalarında Bazı Kemirgenlerin Kullanılması Use of Common Rodents to Determination of the Genotoxicity and Biomonitoring Studies in Heavy Metal Polluted Areas Ağır Metal Kirliliği ve . 9(1), 56–64.
- van der Vliet, A. (2015). Antioxidant Defenses in the Lung. In *Comparative Biology of the Normal Lung: Second Edition*.

- Veitch, N. C. (2004). Structural determinants of plant peroxidase function. In *Phytochemistry Reviews* (Vol. 3, Issues 1–2).
- Verbruggen, N., & Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: A review. In *Amino Acids* (Vol. 35, Issue 4).
- Vezza, M. E., Llanes, A., Travaglia, C., Agostini, E., & Talano, M. A. (2018). Arsenic stress effects on root water absorption in soybean plants: Physiological and morphological aspects. *Plant Physiology and Biochemistry*, 123.
- Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., & Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 217, Issue 6).
- Waszczak, C., Carmody, M., & Kangasjärvi, J. (2018). Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 69).
- Wei, T., van Treuren, R., Liu, X., Zhang, Z., Chen, J., Liu, Y., Dong, S., Sun, P., Yang, T., Lan, T., Wang, X., Xiong, Z., Liu, Y., Wei, J., Lu, H., Han, S., Chen, J. C., Ni, X., Wang, J., ... Liu, H. (2021). Whole-genome resequencing of 445 *Lactuca* accessions reveals the domestication history of cultivated lettuce. *Nature Genetics*, 53(5).
- White, P. J., & Brown, P. H. (2010). Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany*, 105(7).
- Wójcik, M., & Tukiendorf, A. (2004). Phytochelatin synthesis and cadmium localization in wild type of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, 44(1).
- Woo, S., Yum, S., Park, H. S., Lee, T. K., & Ryu, J. C. (2009). Effects of heavy metals on antioxidants and stress-responsive gene expression in Javanese medaka (*Oryzias javanicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 149(3).
- Wrigley, C. W., Corke, H., Seetharaman, K., & Faubion, J. (2015). Encyclopedia of Food Grains: Second Edition. In *Encyclopedia of Food Grains: Second Edition* (Vols. 1–4).
- Xin Chi, Y., Yang, L., Jiang Zhao, C., Muhammad, I., Bo Zhou, X., & De Zhu, H. (2021). Effects of soaking seeds in exogenous vitamins on active oxygen metabolism and seedling growth under low-temperature stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(6).
- Yaðmur, F., & Hancý, Ý. H. (2002). *Arsenik*. 250–251.
- YAĞMUR, B., & AYDIN, Ş. (2021). Çinko (Zn) uygulamalarının marul (*Lactuca Sativa* L.) bitkisinin bazı yaprak besin element içeriklerine etkisi. *Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Dergisi*, 9(1).
- Yaklaşım, Y., Fen, T., & Edebiyat, T. (2018). *Bilimsel Araştırmalarda Yeni Yaklaşımlar I* (Vol. 1).
- Yang, X., Gil, M. I., Yang, Q., & Tomás-Barberán, F. A. (2022). Bioactive compounds in lettuce: Highlighting the benefits to human health and impacts of preharvest and postharvest practices. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 21, Issue 1).
- Yaseen, W., Iqbal, M., Hussain, I., Khaliq, S., & Ashraf, M. A. (2021). Exogenous Menadione Sodium Bisulphite Increases Pigments, Osmoprotectants and Alters Metabolism to Attenuate Cadmium Toxicity on Growth and Yield in Summer Squash (*Cucurbita pepo*). *International Journal of Agriculture and Biology*, 25(6).
- YERLİ, C., ÇAKMAKCI, T., SAHİN, U., & TÜFENKÇİ, Ş. (2020). Ağır Metallerin Toprak, Bitki, Su ve İnsan Sağlığına Etkileri. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*.
- YILDIRIM, E., Ekinci, M., TURAN, M., AGAR, G., ÖRS, S., DURSUN, A., KUL, R., & BALCI, T. (2019). Impact of Cadmium and Lead Heavy Metal Stress on Plant

- Growth and Physiology of Rocket (*Eruca sativa* L.). *KKSU J. Agric Nat*, 22(6).
- Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. In *Journal of Clinical Pathology* (Vol. 54, Issue 3).
- Younus, H. (2018). Younus, H. (2018). Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *. International Journal of Health Sciences*, 12(3), 88–93.
- Zhang, L., Wu, M., Teng, Y., Jia, S., Yu, D., Wei, T., Chen, C., & Song, W. (2019). Overexpression of the glutathione peroxidase 5 (RcGPX5) gene from *rhodiola crenulata* increases drought tolerance in *salvia miltiorrhiza*. *Frontiers in Plant Science*, 9.
- Zhang, W., Alseekh, S., Zhu, X., Zhang, Q., Fernie, A. R., Kuang, H., & Wen, W. (2020). Dissection of the domestication-shaped genetic architecture of lettuce primary metabolism. *Plant Journal*, 104(3).
- Zhao, H., Huang, X., Liu, F., Hu, X., Zhao, X., Wang, L., Gao, P., Li, J., & Ji, P. (2021). Potential of a novel modified gangue amendment to reduce cadmium uptake in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Hazardous Materials*, 410.
- Zouari, M., Ben Ahmed, C., Zorrig, W., Elloumi, N., Rabhi, M., Delmail, D., Ben Rouina, B., Labrousse, P., & Ben Abdallah, F. (2016). Exogenous proline mediates alleviation of cadmium stress by promoting photosynthetic activity, water status and antioxidative enzymes activities of young date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 128.