



**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN NİKEL VE KROM STRESİ
ALTINDAKİ BİBER BİTKİLERİNİN FİZYOLOJİK GELİŞİMİ, OKSİDATİF
STRES VE AZOT METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİSİ**

FERHAT UĞURLAR

TOPRAK BİLİMİ VE BİTKİ BESLEME

**Şanlıurfa
2024**

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN NİKEL VE KROM STRESİ
ALTINDAKİ BİBER BİTKİLERİNİN FİZYOLOJİK GELİŞİMİ, OKSİDATİF
STRES VE AZOT METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİSİ**

FERHAT UĞURLAR

**TOPRAK BİLİMİ VE BİTKİ BESLEME
Tez Danışmanı: CENGİZ KAYA**

**Şanlıurfa
2024**

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının ortaya çıkmasında bilgeliği, sabrı ve desteği ile başarıya ulaşmamı sağlayan değerli danışmanım Prof. Dr. Cengiz KAYA içten teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca öğütleri, destekleri ve yönlendirmeleri olmasaydı bugüne kadar gelemeyeceğim değerli anneme, babama ve kardeşlerime teşekkür ederim. Doktora eğitimim boyunca beni motive eden, her anımda yanımda olan, hayat arkadaşım Zeynep UĞURLAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu süreçte kimi zaman vakit ayıramadığım değerli kızım Arin Duru UĞURLAR ve oğlum Reşat Ali UĞURLAR'a teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER	vii
KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	7
2.1. Bitkilerde Nikel Stresi	7
2.2. Bitkilerde Krom Stresi	10
2.3. Bitkilerde ağır metal stresi toleransının artırılmasında bitki gelişim düzenleyicilerinin kullanımı	13
2.3.1. Ağır metal stresi toleransının artırılmasında nitrik oksit kullanımı	14
2.3.2. Ağır metal stresi toleransının artırılmasında diüretik kullanımı	16
2.3.3. Ağır metal stresi toleransının artırılmasında hidrojen sülfid kullanımı	18
2.3.4. Ağır metal stresi toleransının artırılmasında tiamin kullanımı	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Materyal	23
3.2. Yöntem	23
3.2.1. Bitki Yaş ve Kuru Ağırlıkları	25
3.2.2. Fotosentez ile ilişkili parametrelerin belirlenmesi	25
3.2.3. Yaprak bağıl su içeriği tayini	26
3.2.4. Prolin içeriği tayini	26
3.2.5. Toplam çözünür şeker içeriği tayini	27
3.2.6. Toplam fenolik madde konsantrasyonu tayini	27
3.2.7. Oksidatif stres ile ilişkili parametrelerin ölçümü	28
3.2.8. Antioksidan enzimlerin aktiviteleri ve toplam çözünür protein tayini	30
3.2.9. Azot metabolizması ile ilişkili enzim aktivitelerinin tayini	31
3.2.10. Toplam serbest amino asitler, nitrat (NO ₃ ⁻) ve amonyum (NH ₄ ⁺) tayini	33
3.2.11. Nikel'in hücrede dağılımının belirlenmesi	36
3.2.12. Ağır metal, azot (N), fosfor (P) ve potasyum tayini (K)	36
3.2.13. İstatistiksel analiz	36
4. BULGULAR	37
4.1. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında nitrik oksit (NO) ve diüretik uygulamalarının bitki toleransına etkisi	37
4.2. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının bitki toleransına etkisi	60
5. TARTIŞMA	83
5.1. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında nitrik oksit (NO) ve diüretik uygulamalarının bitki toleransına etkisi	83
5.2. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının bitki toleransına etkisi	88
6. SONUÇLAR	92
7. ÖNERİLER	93
KAYNAKLAR	94
ÖZGEÇMİŞ	122

ÖZET

DOKTORA TEZİ

BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN NİKEL VE KROM STRESİ ALTINDAKİ BİBER BİTKİLERİNİN FİZYOLOJİK GELİŞİMİ, OKSİDATİF STRES VE AZOT METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİSİ

FERHAT UĞURLAR

HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TOPRAK BİLİMİ VE BİTKİ BESLEME

Yıl: 2024, Sayfa : 122

Yüksek seviyelerde Nikel (Ni) ve Krom (Cr) bitkilerde toksisiteye yol açarak fizyolojik bozulmalara ve büyümesinin gerilemesine neden olur. Bu çalışmada Ni stresi (100 μM) koşullarında biber bitkilerine yapraktan Nitrik Oksit (NO, 0.1 mM) ve diüre (400 mg L⁻¹) uygulamasının bireysel ve kombine etkileri incelendi. Benzer şekilde eksojen Tiamin (TA, 50 mg L⁻¹) ve Hidrojen Sülfid (H₂S, 0.2 mM) uygulamalarının Cr stresi (100 μM) altında bireysel ve kombine etkileri araştırıldı. Sonuçlarımız, Ni stresinin biber bitkilerinin üst aksam ve kök kuru ağırlığını sırasıyla %73 ve %62 oranında düşürdüğünü, ayrıca hidrojen peroksit (H₂O₂, %398), malondialdehit (MDA, %471) ve elektrolit sızıntısı (ES, %204) gibi oksidatif stres belirteçlerinin seviyelerini arttırdığını gösterdi. Ni stresi toplam klorofil içeriğini (%44), maksimum kuantum verimini (*Fv/Fm*, %23), bağlı su içeriğini (BSİ, %21), toplam çözünabilir şekerleri (%47) azalttı, ancak prolin (4,5 kat) ve fenolik içeriklerini (%43) arttırdı. NO ve diürenin ayrı ayrı veya birlikte uygulanması, biber bitkilerinde BSİ, prolin, toplam şekerleri ve fenolik içeriğini artırarak bitki büyümesini iyileştirdi. NO ve diüre uygulaması ile antioksidan enzimlerinin aktivitelerinde meydana gelen artış oksidatif stres parametrelerinde azalmaya neden oldu. Ni stresi nitrat redüktaz (NR, %57), glutamin sentetaz (GS, %32), glutamat sentaz (GOGAT, %36), glutamat dehidrojenaz (GDH, %38), protein içeriğini (%50) ve nitrat içeriğini (%35) azalttı. Ancak amonyum ve amino asit içeriğini sırasıyla %48 ve %73 oranında arttırdı. NO ve diüre uygulaması Ni stresi koşullarında azot asimilasyonunu ve protein içeriğini iyileştirdi. NO+Diüre uygulaması yaprak hücre duvarlarında ve kök vakuollerinde Ni'yi arttırdı, ancak hücre organellerinde Ni konsantrasyonunu azalttı. NO ve diüre kombinasyonu Ni birikimini azaltarak mineral besin alımını (N, P ve K) iyileştirdi. Ni stresi koşullarında NO ve diürenin birlikte uygulanması, tek başına uygulamalarına kıyasla daha belirgin sonuçlar ortaya çıkardı. Cr stresi, toplam klorofil içeriğini (%49), *Fv/Fm* (%29), BSİ (%30), toplam çözünabilir şekerleri (%48) azalttı, ancak prolin (5,7 kat) ve fenolik içeriklerini (%50) arttırdı. Cr stresi H₂O₂ (%488), MDA (%565) ve ES (%244) seviyelerinde artışa neden oldu ve bu durum bitki büyümesinin azalmasına yol açtı. TA ve H₂S'in ayrı ayrı veya birlikte uygulanması, biber bitkilerinde BSİ, prolin, toplam şekerleri ve fenolik içeriğini arttırdı. Antioksidan enzimlerinin aktivitelerini iyileştirerek Cr kaynaklı oksidatif stresi önemli ölçüde hafifletti. Cr stresi NR (%61), GS (%34), GOGAT (%40) ve GDH (43), protein (%33) ve nitrat (%49) içeriğini azalttı, ancak amonyum (%51) ve amino asit içeriğini (%105) arttırdı. TA ve H₂S Cr stresli bitkilerde azot asimilasyonunu ve protein içeriğini iyileştirdi. Yapraktan TA ve H₂S uygulaması Cr toksisitesi nedeniyle azalan mineral besin (N, P ve K) alımını iyileştirdi ve sürgünlerde Cr birikimini azalttı. Genel olarak TA ve H₂S'in Cr stresi altında kombinasyon halinde uygulanması Cr stresinin hafifletilmesinde bireysel uygulamalarına göre daha etkiliydi. Sonuç olarak, mevcut çalışma, bitki büyüme düzenleyicilerinin sinerjistik etki göstererek ağır metal stresine karşı daha etkili bir toleransın geliştirilmesine yönelik bilgiler sağlamaktadır.

ANAHTAR KELİMELELER: Nikel toksisitesi, krom toksisitesi, bitki büyüme düzenleyicileri, azot metabolizması, antioksidan savunma sistemi

ABSTRACT

DOCTORATE THESIS

EFFECT OF PLANT GROWTH REGULATORS ON PHYSIOLOGICAL DEVELOPMENT, OXIDATIVE STRESS AND NITROGEN METABOLISM OF PEPPER PLANTS UNDER NICKEL AND CHROMIUM STRESS

FERHAT UĞURLAR

HARRAN UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF SOIL SCIENCE AND PLANT NUTRITION

Year: 2024, Page : 122

High levels of Nickel (Ni) and Chromium (Cr) cause toxicity in plants, causing physiological disruptions and growth retardation. In this study, the individual and combined effects of foliar application of Nitric Oxide (NO, 0.1 mM) and diurea (400 mg L⁻¹) to pepper plants under Ni stress (100 µM) conditions were examined. Similarly, the individual and combined effects of exogenous Thiamine (TA, 50 mg L⁻¹) and Hydrogen Sulfite (H₂S, 0.2 mM) applications under Cr stress (100 µM) were investigated. Our results showed that Ni stress reduced the upper part and root dry weight of pepper plants by 73% and 62%, respectively, while also increasing the levels of oxidative stress markers such as hydrogen peroxide (H₂O₂, 398%), malondialdehyde (MDA, 471%), and electrolyte leakage (EL, 204%). Furthermore, Ni stress reduced total chlorophyll content (44%), maximum quantum yield (*Fv/Fm*, 23%), relative water content (RWC, 21%), total soluble sugars (47%), but increased proline (4.5-fold) and phenolic content (43%). Application of NO and diurea separately or together improved plant growth by increasing RWC, proline, soil sugars and phenolic content in pepper plants. The increase in the activities of antioxidant enzymes with NO and diurea application caused a decrease in oxidative stress parameters. Ni stress decreased nitrate reductase (NR, 57%), glutamine synthetase (GS, 32%), glutamate synthase (GOGAT, 36%), glutamate dehydrogenase (GDH, 38%), protein content (50%), and nitrate content (35%). However, it increased the ammonium and amino acid contents by 48% and 73%, respectively. NO and diurea application improved nitrogen assimilation and protein content under Ni stress conditions. NO+Diurea application increased Ni in leaf cell walls and root vacuoles, but decreased Ni concentration in cell organelles. The combination of NO and diurea improved mineral nutrient uptake (N, P, and K) by reducing Ni accumulation. Under Ni stress conditions, the combined application of NO and diurea produced more significant results than their sole application. Cr stress reduced total chlorophyll content (49%), *Fv/Fm* (29%), RWC (30%), total soluble sugars (48%), but increased proline (5.7-fold) and phenolic content (50%). Cr stress caused an increase in H₂O₂ (488%), MDA (565%) and EL (244%) levels, which led to reduced plant growth. Application of TA and H₂S separately or together increased RWC, proline, total sugars and phenolic contents in pepper plants. It significantly alleviated Cr-induced oxidative stress by improving the activities of antioxidant enzymes. Cr stress reduced NR (61%), GS (34%), GOGAT (40%) and GDH (43), protein (33%) and nitrate (49%) content. However, it increased the ammonium (51%) and amino acid content (105%). TA and H₂S improved nitrogen assimilation and protein content in Cr-stressed plants. Foliar TA and H₂S application improved mineral nutrient (N, P, and K) uptake, which was reduced due to Cr toxicity, and reduced Cr accumulation in shoots. In general, the combination application of TA and H₂S under Cr stress was more effective in alleviating Cr stress than their individual applications. In conclusion, the current study provides information on the development of a more effective tolerance to heavy metal stress by synergistic effects of plant growth regulators.

KEYWORDS: Nickel toxicity, chromium toxicity, plant growth regulators, nitrogen metabolism, antioxidant defense system

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.	Klorofil ölçümü	25
Şekil 3.2.	Prolin testinde iki faz oluşumu	26
Şekil 3.3.	L-prolin ile hazırlanan standart eğri	27
Şekil 3.4.	Biber yapraklarında fenolik madde tayini	28
Şekil 3.5.	Gallik asit standartından oluşturulan kalibrasyon eğrisi	28
Şekil 3.6.	H ₂ O ₂ standartından oluşturulan kalibrasyon eğrisi	29
Şekil 3.7.	EC metre ile ölçümlerin yapılması	29
Şekil 3.8.	BSA ile hazırlanan standart eğri	31
Şekil 3.9.	NaNO ₂ ile hazırlanan standart grafiği	32
Şekil 3.10.	Glisin ile hazırlanan standart grafiği	34
Şekil 3.11.	KNO ₃ - ile hazırlanan standart grafiği	35
Şekil 3.12.	(NH ₄) ₂ SO ₄ ile hazırlanan standart grafiği	35
Şekil 4.1.	Ni toksisitesine maruz kalan biber fidelerinin fenotipik görünümü	37
Şekil 4.2.	Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının üst aksam yaş ağırlığına etkisi	38
Şekil 4.3.	Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının üst aksam kuru ağırlığına etkisi	39
Şekil 4.4.	Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının üst aksam kuru ağırlığına etkisi	39
Şekil 4.5.	Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının kök kuru ağırlığına etkisi	40
Şekil 4.6.	Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının klorofil a içeriğine etkisi	41
Şekil 4.7.	Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının klorofil b içeriğine etkisi	41
Şekil 4.8.	Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının toplam klorofil içeriğine etkisi	42
Şekil 4.9.	Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının karotenoid içeriğine etkisi	42
Şekil 4.10.	Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının maksimum kuantum verimine (Fv/Fm) etkisi	43
Şekil 4.11.	Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının yaprak bağıl su içeriğine (BSİ) etkisi	44
Şekil 4.12.	Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının prolin birikimine etkisi	44
Şekil 4.13.	Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının toplam fenolik madde içeriğine etkisi	45
Şekil 4.14.	Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının toplam şeker içeriğine etkisi	45
Şekil 4.15.	Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) içeriğine etkisi	46
Şekil 4.16.	Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının malondialdehit (MDA) içeriğine etkisi	47
Şekil 4.17.	Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının elektrolit sızıntısı (ES) değerlerine etkisi	47
Şekil 4.18.	Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesine etkisi	48
Şekil 4.19.	Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının katalaz (KAT) aktivitesine etkisi	49
Şekil 4.20.	Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının askorbat peroksidaz (APOD) aktivitesine etkisi	49
Şekil 4.21.	Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının peroksidaz (POD) aktivitesine etkisi	50

Şekil 4.22. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının nitrat redüktaz (NR) aktivitesine etkisi	51
Şekil 4.23. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının glutamin sentetaz (GS) aktivitesine etkisi	51
Şekil 4.24. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının glutamat sentaz (GOGAT) aktivitesine etkisi	52
Şekil 4.25. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının glutamat dehidrojenaz (GDH) aktivitesine etkisi	52
Şekil 4.26. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının yaprakların nitrat (NO ₃ -) içeriğine etkisi	53
Şekil 4.27. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının yaprakların amonyum (NH ₄ ⁺) içeriğine etkisi	54
Şekil 4.28. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının yaprakların toplam amino asit (TAA) içeriğine etkisi	54
Şekil 4.29. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının yaprakların toplam çözünür protein içeriğine etkisi	55
Şekil 4.30. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının yaprak ve köklerde Ni birikimine etkisi	56
Şekil 4.31. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının hücre organellerinde Ni dağılımına etkisi	57
Şekil 4.32. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının yaprakların azot (N) içeriğine etkisi	57
Şekil 4.33. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının köklerin azot (N) içeriğine etkisi	58
Şekil 4.34. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının yaprakların fosfor (P) içeriğine etkisi	58
Şekil 4.35. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının köklerin fosfor (P) içeriğine etkisi	59
Şekil 4.36. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının yaprakların potasyum (K) içeriğine etkisi	59
Şekil 4.37. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının köklerin potasyum (K) içeriğine etkisi	60
Şekil 4.38. Cr toksisitesine maruz kalan biber fidelerinin fenotipik görünümü	60
Şekil 4.39. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının üst aksam yaş ağırlığına etkisi	62
Şekil 4.40. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının üst aksam kuru ağırlığına etkisi	62
Şekil 4.41. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının üst aksam kuru ağırlığına etkisi	63
Şekil 4.42. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının kök kuru ağırlığına etkisi	63
Şekil 4.43. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının klorofil a içeriğine etkisi	64
Şekil 4.44. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının klorofil b içeriğine etkisi	65
Şekil 4.45. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının toplam klorofil içeriğine etkisi	65
Şekil 4.46. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının karotenoid içeriğine etkisi	66
Şekil 4.47. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının maksimum kuantum verimine (Fv/Fm) etkisi	66
Şekil 4.48. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının yaprak bağıl su içeriğine (BSİ) etkisi	67

Şekil 4.49. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının prolin birikimine etkisi	68
Şekil 4.50. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının fenolik madde içeriğine etkisi	68
Şekil 4.51. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının toplam şeker içeriğine etkisi	69
Şekil 4.52. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) içeriğine etkisi	70
Şekil 4.53. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının malondialdehit (MDA) içeriğine etkisi	70
Şekil 4.54. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının elektrolit sızıntısı (ES) değerlerine etkisi	71
Şekil 4.55. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının süperoksit dismütaz (SOD) aktivitesine etkisi	72
Şekil 4.56. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının katalaz (KAT) aktivitesine etkisi	72
Şekil 4.57. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının askorbat peroksidaz (APOD) aktivitesine etkisi	73
Şekil 4.58. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının peroksidaz (POD) aktivitesine etkisi	73
Şekil 4.59. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının nitrat redüktaz (NR) aktivitesine etkisi	74
Şekil 4.60. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının glutamin sentetaz (GS) aktivitesine etkisi	74
Şekil 4.61. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının glutamat sentaz (GOGAT) aktivitesine etkisi	75
Şekil 4.62. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının glutamat dehidrojenaz (GDH) aktivitesine etkisi	75
Şekil 4.63. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının yaprakların nitrat (NO ₃ ⁻) içeriğine etkisi	76
Şekil 4.64. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının yaprakların amonyum (NH ₄ ⁺) içeriğine etkisi	77
Şekil 4.65. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının yaprakların toplam amino asit (TAA) içeriğine etkisi	77
Şekil 4.66. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının yaprakların toplam çözünür protein içeriğine etkisi	78
Şekil 4.67. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının yaprak Cr birikimine etkisi	79
Şekil 4.68. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının yaprakların azot (N) içeriğine etkisi	79
Şekil 4.69. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının köklerin azot (N) içeriğine etkisi	80
Şekil 4.70. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının yaprakların fosfor (P) içeriğine etkisi	80
Şekil 4.71. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının köklerin fosfor (P) içeriğine etkisi	81
Şekil 4.72. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının yaprakların potasyum (K) içeriğine etkisi	81
Şekil 4.73. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H ₂ S) uygulamalarının köklerin potasyum (K) içeriğine etkisi	82

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Ni stresi uygulamaları	23
Çizelge 3.2. Cr stresi uygulamaları	25



SİMGELER

%: Yüzde

C: Derece

g : Gram

L: Litre

μ : Micro



KISALTMALAR

ANOVA : Analysis of Variance

As : Arsenik

AsA : Askorbik Asit

ATP : Adenozin Trifosfat

BSA : Bovine Serum Albumin

Cd : Kadmiyum

cm : Santimetre

Cr : Krom

EC : Elektriksel İletkenlik

FCR : Folin-Ciocalteu Reagent

GDH : Glutamat Dehidrojenaz

GOGAT : Glutamat Sentaz

GR : Glutasyon Redüktaz

GS : Glutamin Sentetaz

GSH : Glutasyon

GST : Glutathione S-transferase

IBM SPSS : International Business Machines Corporation Statistical Package for the Social Sciences

M : Molarity

mL : Mililitre

mM : Milimolar

mm : Milimetre

NADPH : Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat

Ni : Nikel

NO : Nitrik Oksit

NR : Nitrat Redüktaz

Pb : Kurşun

μ L : Mikrolitre

μ M : Mikromolar

1. GİRİŞ

Çevresel kirlilik, her geçen gün artan bir stres kaynağı haline gelmektedir. Bu kirlilik kaynakları, bitkilerden hayvanlara ve nihayetinde insan sağlığına zararlı etkileri olan birçok olumsuz sonuç doğurmaktadır. Ağır metal kirliliği, hızlı endüstrileşme, teknolojik ilerleme ve insan nüfusundaki hızlı artış nedeniyle ciddi bir çevresel tehdit haline gelmiştir (Nachana'a Timothy, 2019; Mishra ve ark., 2019; Kumari ve Mishra, 2021; Wang ve ark., 2022; Khatun ve ark., 2022). Ağır metaller, doğal (erozyon, volkanik patlamalar, mineral aşınması, kuyruklu yıldızlar vb.) ve antropojenik (kaplama, biyokatılar, alıştırma üretimi, atmosferik birikimler, gübreler, pestisitler vb.) süreçlerle tarımsal ekosisteme girmektedir (Kumar ve ark., 2022a; Abd Elnabi ve ark., 2023). Bu faaliyetler, metallerin yer altı suyuna karışmasına veya toprak yüzeyinde birikmesine yol açar (Doyi ve ark., 2018;). Ağır metallerin tümü biyolojik olarak parçalanamaz, yani herhangi bir doğal yöntemle çevreden atılamazlar ve dolayısıyla bitkilerin kök sistemi aracılığıyla alınarak besin zincirine girme potansiyeline sahiptir (Sing ve ark., 2011; Ghori ve ark., 2019; Yan ve ark., 2020; Kaur ve ark., 2022a).

Bitki kökleri tarafından ağır metallerin sürekli alınımı ve birikimi ağır metal stresine neden olur (Goyal ve ark., 2020). Ağır metaller, enzimlerin aktif bölgelerine bağlanarak yapılarını ve işlevlerini değiştirebilir. Bu durum belirli metabolik yolların inhibe edilmesine veya hızlandırılmasına neden olur (Witkowska ve ark., 2021). Ağır metal stresi, bitki büyümesi ve gelişimi için gerekli olan proteinlerin denatüre olmasına neden olur ve bu durum proteinlerin işlevlerini kaybetmesine yol açar (Hasan ve ark., 2017). Ayrıca ağır metaller, nükleik asitlerin sentezine ve stabilitesine müdahale ederek genetik bilgiyi etkileyebilir ve genel bitki sağlığına zarar verebilir (Shamsi ve Kraatz, 2013). Ağır metal toksisitesinin bu moleküller üzerindeki etkilerinin sonucunda, bitki dayanıklılığı ve bitki büyümesi azalır. Bitkilerde ağır metal stresi, süperoksit radikalleri (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalleri (OH) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumuna neden olur (Khan ve ark., 2022b; Altaf ve ark., 2023; Mitra ve ark., 2023). Bu oldukça reaktif moleküller, lipitler, proteinler ve nükleik asitler dahil olmak üzere hücre yapısına zarar vererek genel hücre işlevlerinin bozulmasına yol açar (Mandal ve ark., 2022; Faizan ve ark., 2023; Zheng ve ark., 2023).

Nikel (Ni), ekosisteme madencilik, endüstriler, volkanik emisyonlar, aşırı gübre ve pestisitlerin kullanımı yoluyla girmektedir (Pujari ve ark., 2021; Kumar ve ark., 2022a; Begum ve ark., 2022). Ni, düşük konsantrasyonlarda, bitkilerin çeşitli

fizyolojik fonksiyonlarında önemli bir rol oynar (Mustafa ve ark., 2023). Ni, bitkilerde normal büyüme, enzimatik aktiviteler (örneğin üreaz) ve azot metabolizması gibi temel olaylarda yer alır (Kaur ve ark., 2023). Ancak aşırı Ni seviyeleri birçok bitki için toksik olabilir (Hassan ve ark., 2019). Toksik seviyelerde Ni, bitkilerin besin alımını bozarak temel minerallerde dengesizliklere ve eksikliklere yol açar, stoma iletkenliğini, klorofil sentezini ve fotosentez hızını azaltır (Karthika ve ark., 2018; Matraszekve ark.,2016; Saleem ve ark., 2023; Saraiva ve ark., 2023). Ek olarak Ni, enzimler ve proteinlerdeki diğer iyonların yerini alarak (örneğin rubisco enzimindeki Mg'nin yerini) bunların yapısını ve işlevini etkileyebilir (Nowicka, 2022). Ni toksisitesi, fotosentetik elektron taşıma zincirindeki elektron akışını azaltan ve klorofil moleküllerinin sentezini engelleyen ROT'ların birikimi sonucu meydana gelen oksidatif strese neden olur (Prasad ve ark., 2005). Bazı bitkilerin (özellikle de hiperakümülatör olarak sınıflandırılanların), normal büyüme ve gelişmesi için Ni'ye ihtiyaç duyduğu bulunmuştur (Deng ve ark., 2018; Van der Pas ve Ingle, 2019). Ancak, kromun (Cr) normal bitki gelişimi için gerekli olmadığı düşünülmektedir ve yüksek konsantrasyonlarda bitkiler için toksik olduğu bilinmektedir (Mumtaz ve ark., 2022; Wani ve ark., 2022; Ali ve ark., 2023). Cr, kimyasalların imalatı, krom kaplama, boyalar, pestisitler, gübreler, kâğıt üretimi ve diğer endüstriyel işlemlerde yaygın olarak kullanılan en toksik ağır metallerden biridir (Jaishankar ve ark., 2014; Narayanasamy ve ark., 2022; Gürkan, 2023). Cr toprakta çeşitli formlarda bulunur, ancak iyi bilinen ve sabit formlar üç değerlikli Cr (III) ve altı değerlikli Cr(VI)'dır (Saud ve ark., 2022; Ulhassan ve ark., 2022). Cr (VI) yüksek oksidasyon ve yüksek çözünürlük durumundan dolayı üç değerlikli kromdan (CrIII) daha toksiktir ve bitkiler tarafından kolayca alınarak önemli hücresel yapıları diğer Cr formlarına göre daha fazla bozabilir (Alharby ve Ali, 2022; Singh ve ark., 2022; Bao ve ark., 2022). Cr, bitkilerde ROT üretimini artırır; bu da DNA, RNA, proteinler ve pigmentlerin oksidatif hasarına yol açar (Shahid ve ark., 2015; Sharma ve ark., 2020; Tang ve ark., 2022). Cr stresi, CO₂ fiksasyonu, elektron taşınması, fotofosforilasyon ve enzim aktiviteleri etkileyerek fotosentezi engeller (Subrahmanyam, 2008; Rodriguez ve ark., 2012). Ayrıca, Cr bitkilerin besin elementi alımında temel besin maddeleri ile rekabet edebilir ve besin asimilasyonunu bozabilir (Shahid ve ark., 2017; Kamran ve ark., 2017). Tüm bunların sonucunda biyokütle veriminin ve dolayısıyla bitki verimliliğinin azalmasına neden olur (Sharma ve ark., 2020; Ahmad ve ark., 2022; Kumar ve ark., 2023). Bu metabolik, fizyolojik ve biyokimyasal etkilerin karmaşık etkileşimi, bitkilerdeki Cr toksisitesini azaltmak için etkili stratejilere ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

Bitkiler, diğer stres faktörlerinde olduğu gibi ağır metal kaynaklı oksidatif

strese tepki olarak, ROT'un neden olduğu hasarı azaltmak için antioksidan savunma mekanizmalarını aktive eder (Panda ve ark., 2016). Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), askorbat peroksidaz (APOD), peroksidaz (POD) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimler, ROT'un temizlenmesinde ve nötralize edilmesinde önemli rol oynar (Hussain ve ark., 2019; Hasanuzzaman ve ark., 2020). Ayrıca, glutatyon (GSH), askorbat (AsA), karotenoidler, prolin, şekerler ve fenolik bileşikler gibi enzimatik olmayan antioksidanlar, ROT'un bitki hücrelerinden uzaklaştırılmasında görev alır (Soares ve ark., 2019; Garcia-Caparrós ve ark., 2021). Bu enzimlerin düzenlenmesini ve aktivitelerini anlamak, bitkinin oksidatif strese karşı koyma yeteneği hakkında fikir verir ve bitkinin ağır metal toksisitesine karşı toleransını arttırmaya yönelik stratejiler geliştirmeye olanak sağlar. Toksik metallerin fitoşelatinler ve metallotiyoneinler tarafından tutulması, bitkilerin toksik metallere karşı toleransı için bir başka önemli savunma sistemidir. Fitoşelatinler, antioksidatif enzimlerle birlikte ağır metal stresi altında sinerjistik bir savunma mekanizması oluşturabilir ve bu da bitkilerin metal toksisitesine karşı direncini güçlendirir (Raychaudhuri ve ark., 2021; Sethi ve ark., 2023). Ancak bu savunma mekanizmaları bitkilerin ağır metal stresini hafifletmesinde yeteri kadar savunma sağlayamayabilir. Bu nedenle savunma mekanizmasının geliştirilmesine yönelik stratejiler bitki toleransının artırılmasında etkili bir yöntem olabilir.

Ağır metaller, azot (N) alımı ve asimilasyonundan sorumlu olan metabolik olaylarda aksamalara neden olur (Khan ve ark., 2016a; Ayub ve ark., 2021). N, bitki büyümesi için önemli ve zorunlu bir besin elementidir (Anas ve ark., 2020). Bitkiler, nitrat (NO_3^-), amonyum (NH_4^+), üre ve amino asitler gibi farklı moleküllerden N elde edebilir. Daha sonra bunu protein, nükleik asitlerin üretimi ve sinyal molekülleri dahil olmak üzere farklı metabolik amaçlar için kullanırlar (Javed ve ark., 2022). NO_3^- tarım topraklarında bitkiler için başlıca N kaynağıdır ve verimlilik açısından hayati öneme sahiptir (Ciu ve ark., 2022). NO_3^- , bitkilerde protein ve diğer organik bileşiklerin sentezi için NH_4^+ formuna indirgenmelidir (Erdal ve Türk, 2016). Nitrat redüktaz (NR), bitki hücrelerinde NO_3^- 'ün nitrite (NO_2^-) indirger ve bu NO_2^- ise nitrit redüktaz (NiR) enzimi tarafından NH_4^+ 'e indirgenir (Rizwan ve ark., 2022). NH_4^+ , bitkide GS-GOGAT (glutamin sentetaz-glutamat sentaz) enzimleri veya GDH (glutamat dehidrojenaz) tarafından amino asitlere ve proteinlere asimile edilir (Chen ve ark., 2023; Liu ve ark., 2023). Ni ve Cr stresinin, N metabolizması enzimleri üzerindeki olumsuz etkileri birçok araştırmacı tarafından çeşitli bitkilerde bildirilmiştir (Sangwan ve ark., 2014; Rizwan ve ark., 2019; Tiwari ve ark., 2020; Verma ve ark., 2022; Khan ve ark., 2023b; Qin ve ark., 2024). Bu nedenle, ağır metal stresi altındaki bitkilerin normal büyüme ve gelişmesi için gerekli olan N

metabolizması enzimlerinin aktivitelerinin yükseltilmesi gerekir.

Biber (*Capsicum annuum* L.), ekonomik açıdan önemli Solanaceae familyasına ait tek yıllık bir bitkidir. Biber, flavonoidler, fenolik asitler, karotenoidler ve C, E, A vitaminleri gibi biyoaktif bileşiklerin yanı sıra iyi bir antioksidan ve besin kaynağıdır (Jayaprakasha ve ark., 2012). Biberin dünya çapında tüketiminin yüksek olması, kapsaisin maddesinin gıda katkı maddesi olarak kullanılması ve tıbbi kullanımı nedeniyle biberde ağır metal birikimi gibi toksik maddeler önemli sorunlara neden olabilmektedir (Antonious ve Kochhar, 2009). Tüm bu nedenlerden dolayı ağır metallerin bitkilerin metabolik süreçleri üzerindeki yıkıcı etkilerini azaltmak için etkili bir yaklaşım gereklidir.

Ağır metal stresinin kontrol altına alınmasında bitki gelişim düzenleyicilerinin kullanılması son zamanlarda büyük ilgi görmektedir. Sentetik ve doğal bitki büyüme düzenleyicileri hem stresli hem de normal koşullarda bitki büyümesinde yer alan metabolik olayları kontrol eden küçük kimyasal habercilerdir (Hossain ve ark., 2022; Zahid ve ark., 2023). Çok sayıda araştırma ağır metal stresli bitkilerde büyüme düzenleyicilerinin fizyolojik, biyokimyasal ve metabolik süreçleri düzenleyerek bitkilerin toleransını arttırdığını rapor etmiştir (Zaid ve ark., 2020; Javad ve ark., 2022; Poursattari ve Hadi, 2022; Qin ve ark., 2022; Bhardwaj ve ark., 2023; Kaya ve ark., 2023).

Nitrik oksit (NO), normal ve stresli koşullar altında bitki büyümesini ve gelişmesini düzenlemede önemli rol oynayan küçük, gaz halindeki bir sinyal molekülüdür (Khan ve ark., 2023a; Pal ve ark., 2023). NO, bitkileri yaralanma, patojen istilası, ultraviyole (UV) radyasyon, kuraklık stresi, tuz stresi, aşırı sıcaklıklar ve ağır metal stresi gibi çeşitli çevresel streslerden korumak için de önemli bir rol oynar (Khan ve ark., 2023a). NO'nun sinyal iletimi yoluyla bitkilerin antioksidan savunma sistemini uyararak oksidatif stresi azalttığı ve ağır metal stresini hafiflettiği bilinmektedir (Basit ve ark., 2022b; Kharbech ve ark., 2022; Meng ve ark., 2022). NO'nun eksojen uygulamasının antioksidan enzimlerin aktiviteleri iyileştirerek Ni stresini önemli ölçüde azaltıldığı birçok araştırmacı tarafından farklı bitkilerde rapor edilmiştir (Wang ve ark., 2010; Kazemi ve ark., 2010; Siddiqui ve ark., 2013; Rizwan ve ark., 2018; Soliman ve ark., 2019).

Bir diğer bileşik diüre, çevresel streslere karşı bitkilerde büyüme, fotosentetik aktivite ve antioksidan savunma sistemi gibi çeşitli metabolik olayları düzenlediği için önemli bir bitki büyüme düzenleyicisi olarak kabul edilir (Sahu, 2017; Patade ve

ark., 2020). Diüre bitkileri metaller, sıcaklık, tuzluluk ve kuraklık gibi çeşitli abiyotik streslerden koruduğu için mahsul veriminin artırılmasında etkili bir bileşiktir (Waqas ve ark., 2019). Çeşitli araştırmacılar, eksojen diüre uygulamasının çeşitli bitki türlerinde kurşun (Pb) stresini (Xalxo ve Keshavkant, 2019; Kaya ve ark., 2022), arsenik (As) stresini (Upadhyay ve ark., 2022; Talukdar, 2016) ve kadmiyum (Cd) stresini (Parveen ve ark., 2018) hafiflettiğini bulmuştur.

Bitkinin zorlu çevre koşullarına toleransını artıran bitki gelişim düzenleyicilerin uygulanması, Cr toksisitesi de dahil olmak üzere farklı streslerin zararlı etkilerini hafifletmek için etkili yöntem olabilir. Tiamin (TA), bitkilerde önemli bir büyüme düzenleyicisi olarak bilinmektedir ve bitkide TA birikiminin çevresel streslere karşı bitki toleransını arttırdığı rapor edilmiştir (Abidin ve ark., 2016). TA, karbonhidrat katabolizması, NADPH ve ATP sentezi, nükleik asitlerin oluşumu ve amino asit sentezinde önemli rol oynaması nedeniyle tüm canlı organizmaların düzgün işleyişi için gerekli olduğu bildirilmiştir (Goyer 2010; Subki ve ark., 2018). Çeşitli araştırmacılar TA'nın eksojen uygulamasının mısırdaki As stresi (Atif ve ark., 2022), çilekte Cd stresi (Kaya ve Aslan, 2020), buğdayda bor toksisitesi (El-Shazoly ve ark., 2019) ve mısırdaki tuz stresini (Hamada ve El-Hakimi, 2009) hafiflettiğini rapor etmişlerdir.

Hidrojen sülfürün (H_2S) bitkiler için toksik olduğu düşünülürken, son gelişmeler ile bitkilerde birçok görevde önemli bir sinyal molekülü olduğu anlaşılmıştır (Lisjak ve ark., 2013). H_2S , önemli sinyal yollarının düzenlenmesine ve strese duyarlı genlerin aktivasyonuna aktif olarak katılarak bitkinin ağır metal stresine karşı direncini artırır (Pandey ve Gautam, 2020; Arif ve ark., 2021). H_2S 'in metal alımı ve taşıma mekanizmalarının düzenlenmesinde rol oynadığı, metallerin bitki hücrelerinde tutulmasını ve bölümlendirilmesini etkilediği bildirilmiştir (Jia ve ark., 2020; Yang ve ark., 2023). H_2S donörü olan sodyum hidrosülfid uygulamasının, maş fasulyesi (Singh ve ark. 2023a), buğday (Singh ve ark., 2022), domates (Alamri ve ark., 2020) ve mısır (Kharbech ve ark., 2020) bitkilerinde Cr stresini hafiflettiği ve bitki büyümesini teşvik ettiği raporlanmıştır.

Farklı biyostimülanlar arasındaki etkileşimin ve bunların bitki fizyolojisi üzerindeki etkilerinin araştırılması, son yıllarda araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Biyostimülanların, birbirlerinin üretimini düzenlemek ve sinyal yollarını etkilemek gibi çeşitli şekillerde etkileşime girebileceğini bildirilmiştir (Rogatgi ve ark., 2023; Singh ve ark., 2023b). Farklı biyostimülanların sinerjistik olarak birlikte çalıştığı ve stres direncinin artırılmasında tek başına uygulanmalarına kıyasla birlikte

uygulandıklarında daha etkili oldukları birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Benito ve ark., 2022; Kaur ve ark., 2022b; Khan ve ark., 2022a; Ghasemifar ve ark., 2023). Bu nedenle, bu çalışmada farklı bitki gelişim düzenleyicilerinin Ni ve Cr toksisitesi altındaki biber bitkilerinde bitki büyümesi, mineral element alımı, metabolitler, antioksidan savunma sistemi enzimleri ve azot metabolizması üzerindeki bireysel ve kombine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Bitkilerde Nikel Stresi

Nikel (Ni), toprağın doğal bir bileşenidir (Hedfi ve ark. 2007) ve toprak profili boyunca düzgün bir şekilde dağılır (Hassan ve ark., 2019). Ancak madencilik, endüstriler, fosfatlı gübrelerin uygulanmasının ve pestisitlerin kullanımı yoluyla çevreye yayılarak toprak yüzeyindeki konsantrasyonu artar (Kumar ve ark., 2022a; Begum ve ark., 2022; Pujari ve ark., 2021;). Ni, düşük konsantrasyonlarda, bitkilerin çeşitli fizyolojik fonksiyonlarında önemli bir rol oynar (Mustafa ve ark., 2023), ancak aşırı Ni seviyeleri birçok bitki için toksik olabilir (Hassan ve ark., 2019). Yüksek seviyelerde Ni varlığı, besin alımını bozarak temel minerallerde dengesizliklere ve eksikliklere yol açar, stoma iletkenliğini, klorofil sentezini ve fotosentez hızını azaltır (Saleem ve ark., 2023; Saraiva ve ark., 2023; Karthika ve ark., 2018; Matraszekve ark.,2016).

Altaf ve ark. (2022) biber fidelerinde Ni'nin toksisite belirtilerini karakterize etmek amacıyla hidroponik koşullarda biber fidelerini yedi farklı Ni konsantrasyonuna (0, 10, 20, 30, 50, 75 ve 100 mg L⁻¹ Ni) maruz bırakmıştır. Ni toksisitesinin, genç yapraklarda klorozis belirtileri gösterdiğini bildirmiştir. Ni toksisitesinin büyümeyi, kök morfolojisini, gaz değişim parametrelerini, pigment içeriğini ve fotosistem fonksiyonunu azalttığını raporlamıştır. Araştırmacılar, büyüme tolerans indeksinin, bitkilerde 10, 20, 30, 50, 75 ve 100 mg L⁻¹ Ni koşullarında sırasıyla %88, %75, %60, %45, %30 ve %19 oranında azaldığını bulmuştur. Yüksek Ni konsantrasyonlarının, biber yapraklarında antioksidan enzim aktivitesini, reaktif oksijen türleri (ROT) birikimini, malondialdehit (MDA), elektrolit sızıntısı (ES) ve metabolitleri (prolin, çözünür şekerler, toplam fenoller ve flavonoidler) artırdığını bildirmiştir. Ayrıca, artan Ni ile, biber yapraklarında ve köklerinde Ni içeriğinin artırdığını, ancak azot (N), potasyum (K) ve fosfor (P) seviyelerinin düştüğünü raporlamıştır. Araştırmacılar, köklerde Ni birikiminin sürgünlere kıyasla daha yüksek olduğu bildirmiştir. Sonuç olarak 30 mg L⁻¹ ve üzerindeki Ni'nin biber fideleri için zararlı olduğu bildirilmiştir.

Altaf ve ark. (2021), hidroponik ortamda 50 µM Ni ile büyütülen domates fidelerinin Ni toksisitesine karşı tepkilerini incelemeyi amaçlamışlardır. Araştırmacılar, Ni toksisitesinin kök yapısını bozarak, fotosentez sürecini, besin alımını ve antioksidan enzimleri etkileyerek bitki büyümesini engellediği gözlemlemiştir. Ayrıca, ES, MDA içeriği ve ROT birikiminin önemli ölçüde arttığını bildirmiştir. Sonuç olarak, Ni toksisitesinin domates fidelerinde kök yapısını,

biyokütle üretimini, mineral homeostazı ve fotosentetik verimliliğini önemli düzeyde olumsuz etkilediğini raporlamıştır.

Jahan ve ark. (2020), hidroponik ortamda domates fidelerinde yaptıkları araştırmada 50µM Ni'ye maruz kalan fidelerin kök ve sürgünde Ni birikiminin gerçekleştiğini ve toksisite belirtilerinin gerçekleştiğini gözlemlemiştir. Araştırmacılar, Ni stresinin fotosentezi, mineral homeostazı, kök aktivitesini ve osmotik dengesini bozarak büyümeyi önemli ölçüde engellediğini bildirmiştir.

Helaoui ve ark. (2020), gerçekleştirdikleri çalışmada Ni stresinin yonca (*Medicago sativa*) üzerindeki etkilerini fizyolojik, biyokimyasal ve transkriptomik düzeylerde değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Bu amaçla bitkileri 60 gün boyunca beş Ni konsantrasyonuna (0, 50, 150, 250 ve 500 mg kg⁻¹) maruz bırakmışlardır. Araştırmacılar, bitkilerdeki Ni konsantrasyonunun topraktaki Ni konsantrasyonu ile birlikte önemli ölçüde arttığını bildirmiştir. Oksidatif stres belirteçleri ile ilgili olarak, özellikle en yüksek Ni konsantrasyonunun (500 mg/kg Ni) MDA birikimi ile peroksidaz ve glutathione s-transferase (GST) aktivitelerinde artışa neden olduğunu raporlamıştır. Ayrıca sürgünlerde ve köklerde *Prx1C* ve *GST* genlerinde önemli bir artış olduğunu gözlemlemiştir. Fitoşelatinlerin (PC) gen ekspresyonunun, farklı nikel konsantrasyonlarına yanıt olarak önemli ölçüde arttığını, bunun PC'lerin yonca bitkilerinde Ni detoksifikasyonundaki önemli rollerini ortaya koyduğunu raporlamıştır.

Abd_Allah ve ark. (2019), artan konsantrasyonlarda Ni'ye maruz kalan hardal bitkilerinin büyümesi, biyokimyasal özellikleri, fotosentetik pigmentleri, antioksidan tepkileri ve giloksalaz sistemlerini incelemişlerdir. Ni stresinin (150 µM), büyümeyi, klorofil pigment içeriğini, gaz değişim parametrelerini, yaprak bağıl içeriğini (BSİ) azalttığını, ancak H₂O₂, MDA ve metilglioksal (MG) içeriğini önemli düzeyde arttırdığını bildirmiştir. Ni stresinin ayrıca antioksidan enzimlerin, askorbat glutatyon (AsA-GSH) döngüsü ve glioksalaz sistemleri ile ilişkili enzimlerin aktivitelerini bozduğunu raporlamıştır.

Rizwan ve ark. (2019), Ni stresinin pirinç bitkilerinde azot metabolizması ve fotosentez üzerine etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar Ni stresinin bitki büyümesini, fotosentez özelliklerini, stoma iletkenliği, transpirasyon hızını, gaz değişim parametrelerini ve fotosentetik pigment içeriğini olumsuz etkilediğini gözlemlemiştir. Ayrıca Ni stresinin nitrat konsantrasyonunda azalmaya ve amonyum konsantrasyonunda artışa yol açtığını bildirmiştir. Araştırmacılar Ni stresi altında

azot metabolizması ile ilişkili nitrat redüktaz (NR), nitrit redüktaz (NiR), glutamin sentetaz (GS) ve glutamat sentaz (GOGAT) enzim aktivitelerinin önemli düzeyde düştüğünü, glutamat dehidrojenaz (GDH) enzim aktivitesinin ise arttığını raporlamıştır. Sonuç olarak Ni stresinin pirinçte hem aktivite hem de genetik düzeyde azot metabolizmasını bozduğunu bildirmiştir.

Valivand ve ark. (2019), 50 mg L⁻¹ düzeyindeki Ni'nin kabak kök ve yapraklarında bitki büyümesini azalttığını, oksidatif stresi, prolin birikimini, hidrojen sülfid (H₂S) içeriğini ve yapraklarda kalsiyumodulin (CaM) gen ekspresyonunu arttırdığını bulmuştur. Ayrıca Ni stresinin kabak bitkisinin kök ve yapraklarında POD ve KAT enzimlerini baskıladığını, SOD aktivitesini ise arttırdığını bildirmiştir.

Rizwan ve ark. (2018), pirinç bitkilerinde yaptıkları çalışmada Ni stresinin bitki büyümesini, fotosentetik pigment içeriğini, çözünür proteinleri azalttığını bildirmiştir. Ayrıca artan Ni konsantrasyonuna bağlı olarak bitki kök ve gövdesinde Ni birikiminin, oksidatif stres belirteçleri (H₂O₂, MDA ve ES) ve prolin seviyelerinin arttığını raporlamıştır. Ni stresi koşullarında SOD ekspresyon genlerinin azaldığını, buna karşın POD, KAT, APOD ve GR genlerinin transkript seviyesinin arttığını raporlamıştır.

Gupta ve ark. (2017), Ni stresinin yonca, incir ve yulaf fideleri üzerindeki etkisini fidelerin büyümesi, lipid peroksidasyonu, toplam klorofil, prolin içeriği ve enzimatik aktiviteler açısından incelenmiştir. Fidelerin çimlenme ve büyüme parametreleri bakımından, yoncanın en toleranslı tür olduğu bildirilmiştir. Ni birikiminin, köklere kıyasla sürgünlerde belirgin şekilde daha düşük olduğunu, birikimin en yüksek yoncada ve en düşük yulaf sürgünlerinde olduğunu raporlamıştır. Araştırmacılar, yüksek Ni konsantrasyonlarına maruz kalan bitkilerin klorofil miktarında önemli bir azalma ve prolin içeriğinde artış gözlemlemiştir. Ayrıca, MDA içeriği ve antioksidatif enzim aktivitesindeki önemli farkların, bitkilerde Ni stresine bağlı olarak redoks dengesizliği oluştuğunu raporlamıştır. Yüksek Ni konsantrasyonlarıyla POD ve SOD aktivitelerinde artış, KAT aktivitesinde azalma olduğu bildirilmiştir. Yoncanın, incir ve yulafın aksine, birikim ve ROT temizleme sistemi arasındaki dengeyi koruma konusunda daha yüksek bir yeteneğe sahip olduğu raporlanmıştır.

Rizwan ve ark. (2017), yüksek Ni konsantrasyonlarına maruz kalan pirinç bitkilerinin Ni alımını ve hücresel alt bölgelerdeki dağılımını, antioksidan üretimini ve osmolit birikimini incelemiştir. Araştırmacılar, pirinç fidelerinin yüksek Ni

konsantrasyonlarına maruz kalmasının kök ve sürgün uzunlukları, taze ve kuru ağırlığı üzerinde bir azalmaya neden olduğunu ve bu durumun fotosentetik pigment içeriklerinin azalması ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Araştırmacılar Ni'nin öncelikle köklerde, ardından sürgünlerde biriktiğini raporlamıştır. Ayrıca, Ni'nin hücre organelinden ziyade esas olarak çözünür fraksiyonda ve hücre duvarında biriktiğini, bunun da pirinç bitkilerinde Ni toksisitesine karşı önemli savunma bariyerleri olarak işlev gördüğünü öne sürmüştür. Ni'nin, artan H₂O₂ ve MDA nedeniyle oksidatif metabolizmayı bozarak toksisitesini arttırdığını, bitkilerin köklerinde ve sürgünlerinde katalaz, peroksidaz, askorbik asit ve glutatyonu artırarak antioksidan sistemini uyumsuz hale getirdiğini raporlamıştır. Ni stresinin ayrıca prolin birikim hızını tetiklediğini, çözünür protein ve çözünür şeker içeriğini azalttığını bildirmiştir. Sonuç olarak Ni'nin çoğunluğunun çözünür fraksiyonda bulunduğu ve Ni stresi altında osmolit birikimindeki değişikliklerin oksidatif stres karşısında ek savunma sağladığı raporlanmıştır.

Khan ve ark. (2016b), farklı fotosentetik kapasiteye sahip iki hardal çeşidinin, farklı konsantrasyonlardaki Ni karşısındaki tepkisi değerlendirmiştir. Ni stresinin her iki çeşitte de biyoması, yaprak alanını, klorofil içeriğini, rubisko enzim aktivitesini, fotosistem II'nin verimliliğini, stomal iletkenliği, net fotosentez miktarını, NR aktivitesini, bitki azot içeriğini ve sülfür içeriğini azalttığını raporlamıştır. Ni stresinin ayrıca membran hasarına yol açtığını ve AsA-GSH döngüsünü bozduğunu bildirmiştir. Her ne kadar hardal çeşitleri arasında Ni stresine karşı tepkiler farklılık gösterse de Ni stresi koşullarında bitki fiziksel ve biyokimyasal süreçlerin olumsuz etkilendiğini bildirilmiştir.

2.2. Bitkilerde Krom Stresi

Krom (Cr) doğal olarak oluşan bir ağır metaldir ve yer kabuğunda en çok bulunan 17. elementtir (Bhalerao ve Sharma, 2015). Cr, kimyasalların imalatı, krom kaplama, boyalar, pestisitler, gübreler, kâğıt üretimi ve diğer endüstriyel işlemlerde yaygın olarak kullanılan en toksik ağır metallerden biridir (Gürkan, 2023; Narayanasamy ve ark., 2022; Jaishankar ve ark., 2014). Çeşitli antropojenik faaliyetlerin yanı sıra doğal kaynaklar da sonuçta küresel olarak Cr kirliliğine yol açan toprak, hava ve suya Cr salınımından sorumludur (WHO, 2020). Zehirli Maddeler ve Hastalık Kayıt Dairesi (ATSDR, 2007), Cr'yi en tehlikeli maddeler arasında 17. sıraya koymuştur. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'na göre bir numaralı kanserojen olarak sınıflandırılmıştır (IARC, 1987). Bu nedenle, bu metalin bitkilerde alımının, taşınmasının ve biyolojik birikiminin doğru bir şekilde anlaşılmasına ve toprak-bitki sistemlerinde kapsamlı bir araştırmaya ihtiyaç vardır.

Anjum ve ark. (2017), farklı Cr seviyelerinin (0, 30, 60, 90, 120 ve 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$) iki mısır genotipi (Wandan 13 ve Runnong 35) üzerinde zararlı etkilerini keşfetmek amacıyla bitki dokularında Cr birikimini, osmolit birikiminde değişiklikleri, ROT oluşumunu ve savunma sistemi enzimlerinin aktivitesini ölçmüştür. Araştırmacılar, Cr stresinin yaprak alanını, koçan oluşumunu, 100-tane ağırlığını, sürgün taze ağırlığını ve verimi azalttığını bildirmiştir. Cr birikiminin her iki genotipte de kökler > yapraklar > sap > tohumlar şeklinde olduğu raporlanmıştır. Artan Cr toksisitesinin, serbest prolin, çözünür şekerler ve toplam fenolik içeriklerde artışa, çözünür protein içeriğinde azalmaya neden olduğunu raporlanmıştır. Ayrıca, MDA, H_2O_2 ve tiyobarbitürik asit reaktif madde birikimi ile ES'nin arttığını raporlamıştır. Araştırmacılar, SOD, POD, KAT, APOD, GPX ve GR enzimlerinin Cr toksisitesine karşı tolerans sağlanmasında merkezi bir rol oynadığını bildirmiştir.

Adhikari ve ark. (2020), üç farklı Cr stres seviyesi (50, 100 ve 200 mg L^{-1} Cr) altında mısır fidelerini yetiştirerek, antioksidan genlerin ekspresyonu, metabolitler, membran hasarı, H_2O_2 ve prolin birikimini incelemiştir. Araştırmada mısırın Cr stresine yanıtının genel bir görünümünün elde edilmesi planlanmıştır. Cr stresi koşullarında bitki boyunun, biyokütle veriminin, kök hücrelerinin canlılığının, *APX-1*, *Cu/Zn SOD* ve *DHAR* ekspresyonunun azaldığı ve köklerde yüksek Cr birikiminin gerçekleştiği bildirilmiştir. Yüksek seviyede Cr'a maruz kalan fidelerin yapraklarında MDAR ve DHAR ekspresyonunda düşüşün ve AsA/DHA oranında anlamlı olmayan değişikliklerin redoks homeostazında bozulmaya neden olduğunu raporlamıştır. Artan GR ekspresyonu ile birlikte yüksek GSH/GSSG, hücreleri oksidatif hasarlardan koruyamadığını, çünkü Cr'ye maruz kalan fidelerde yüksek MDA seviyesinin belirlendiğini raporlamıştır. Ayrıca, mısır yapraklarında artan prolin birikiminin, Cr stresine karşı çok fazla koruma sağlayamadığını raporlamıştır.

Christou ve ark. (2020), artan Cr seviyelerinin yonca bitkilerinin büyüme ve gelişimi üzerindeki etkilerini ve bu bağlamda kullanılan adaptasyon yanıtlarını incelemiştir. Sulama suyundaki Cr'nin eşik konsantrasyonunun, stres yanıtlarının başladığı konsantrasyon olan 1 mg L^{-1} olduğunu gözlemlemiştir. Daha düşük Cr seviyelerinin (0.5 mg L^{-1}), biyokütle ve yaprak alanında artışa yol açtığını bununda muhtemelen NO içeriğinde meydana gelen artıştan kaynaklandığını raporlamıştır. Araştırmacılar artan Cr seviyelerinin (5 ve 10 mg L^{-1}) oksidatif strese yol açarak biyokütle, yaprak boyutunda ve fotosentetik pigment içeriğinde azalmaya neden olduğunu gözlemlemiştir. Stres koşullarında *MnSOD*, *FeSOD*, *Cu/ZnSOD* ve *KAT* transkript seviyelerinin arttığını, SOD ve KAT enzimatik aktivitelerinde meydana

gelen değişimlerin stres yanıtlarını desteklediğini ifade etmiştir.

Alam ve ark. (2021), domates bitkilerinde Cr toksisitesinin etkisini incelemek üzere yaptıkları çalışmada, Cr toksisitesinin köklerde ve sürgünlerde Cr birikimini arttırarak bitki büyümesini ve biyokütle verimini azalttığını bulmuştur. Cr stresinin klorofil miktarını, klorofil floresans parametrelerini, gaz değişim parametrelerini ve BSİ'yi olumsuz etkileyerek bitki büyümesini engellediğini bildirmiştir. Araştırmacılar Cr stresinin domates bitkilerinin yapraklarında proline ve glisin beatin birikimine yol açtığını, oksidatif stres parametrelerini (H_2O_2 , MDA ve ES) attırdığını, AsA-GSH döngüsünü bozduğunu ve metilglioksal (MG) verilerinde artışın meydana geldiğini raporlamıştır.

Christou ve ark. (2021), artan Cr konsantrasyonlarına maruz kalan domates bitkilerinde verim, yapraklardaki stres yanıtları ve domates meyve kalitesi özelliklerinde meydana gelen değişimleri araştırmayı amaçlamıştır. Araştırmacılar 10 mg L^{-1} Cr içeren su ile sulanan bitkilerin, yapraklardaki fotosentetik pigment konsantrasyonunun daha düşük ve oksidatif stres parametrelerinin ise daha yüksek olduğunu bulmuştur. Yüksek konsantrasyondaki Cr'un (5 veya 10 mg L^{-1}), daha düşük ağırlıklı ve daha küçük boyutlu meyvelerin üretilmesine neden olduğu bildirmiştir. Ayrıca bitkilerde olgunlaşma indeksi, çözünür katılar, likopen, β -karoten ve çözünür karbonhidrat (fruktoz, sukroz, toplam şeker) içeriğinin arttığı raporlanmıştır. Araştırmacılar, meyve kalite özelliklerindeki değişikliklerin, sukroz ve karotenoid biyosentezi ile ilişkili transkriptlerin bolluğu tarafından doğrulandığını bildirmiştir. Tüm meyve örneklerindeki toplam Cr konsantrasyonu maksimum izin verilen limitlerin çok altında olduğu için, insan tüketimi için güvenli olduğunu raporlamıştır. Genel olarak, Cr'nin tarımsal ürünlerin kalitesi üzerinde biyokimyasal ve moleküler düzeyde önemli etkileri olabileceğini, bu nedenle Cr ile kirlenmiş suyun dikkatli bir şekilde kullanılması gerektiğini bildirmiştir.

Gupta ve Seth (2021), farklı Cr konsantrasyonlarına (0 , 50 ve $100 \text{ mg Cr kg}^{-1}$ toprak) maruz kalan domates bitkisinin fizyolojik ve biyokimyasal tepkilerini incelemiştir. Araştırmacılar, domates bitkilerinin Cr'ye maruz kalmasının, bitki büyümesinin azalmasına, kök ve sürgünde yüksek Cr birikimine yol açtığını, yüksek MDA ve süperoksit seviyeleri nedeniyle oksidatif hasara neden olduğunu ve AsA-GSH döngüsü enzimlerinde inhibisyona yol açtığını gözlemlemiştir. Ayrıca, Cr stresi altındaki domates bitkilerinde fotosentetik pigmentlerde ve gaz değişim parametrelerinde belirgin bir azalmanın meydana geldiğini raporlamıştır.

Ahmad ve ark. (2022), karnabahar (*Brassica oleracea botrytis* L.) bitkisini dört farklı seviyede (0, 10, 100 ve 200 μ M) Cr'ye maruz bırakarak bitki tepkilerini izlemiştir. Araştırmacılar Cr stresinin bitki büyümesinde, fotosentetik pigmentlerde, gaz alışveriş parametrelerinde ve biyokütle üretiminde önemli bir azalmaya neden olduğunu belirtmiştir. Spesifik olarak yüksek konsantrasyonda (200 μ M) Cr stresinin bitki boyunu (%57), kök uzunluğunu (%32), yaprak sayısını (%45) ve yaprak alanını (%29) azalttığı raporlanmıştır. Cr stresi nedeniyle, karnabaharın kök ve yapraklarında ES, MDA ve H_2O_2 birikiminin arttığı, antioksidatif enzim aktivitelerinin (SOD, KAT ve POD) azaldığı bildirilmiştir. 200 μ M Cr uygulaması ile kök kuru ağırlığı, sap kuru ağırlığı, yaprak kuru ağırlığı ve çiçek kuru ağırlığının sırasıyla %43, %40, %53 ve %72 oranında azaldığı bildirilmiştir.

Husain ve ark. (2022), altı değerli krom (Cr (VI), 50 μ M) stresinin baklagil bitkilerinden siyah fasulye ve mung fasulyesinin fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine etkisini incelemiştir. Cr'nin, her iki çeşit içinde kök ve sürgün uzunluğunu azalttığını, oksidatif stres belirteçlerinin birikimini arttırdığını, prolin metabolizmasında değişikliklere yol açtığını, kükürt asimilasyonu enzimlerini ve sisteini olumsuz etkilediğini raporlamıştır.

Kumar ve ark. (2022), farklı konsantrasyonlarda Cr'un (0, 25, 50, 100 ve 200 μ M) tatlı patates bitkilerinde toksik etkisini hidroponik bir sistemde araştırmıştır. Araştırmacılar Cr uygulamasının (25 μ M) büyümeyi, fotosentezi, osmolitleri, antioksidanları ve enzim aktivitelerini artırdığını, ancak yüksek düzeyde Cr uygulamasında önemli ölçüde zararlı etkiler gözlemlendiğini bildirmiştir. En yüksek Cr (200 μ M) uygulaması altında bitki büyüme özelliklerinde meydana gelen azalmanın, H_2O_2 ve MDA içeriklerinin (sırasıyla % 410 ve % 577) aşırı birikiminden kaynaklandığını raporlamıştır. Araştırmacılar yüksek Cr birikiminin fenotipik ve fizyolojik parametrelerle negatif olarak ilişkili olduğunu bulmuştur. Cr toksisitesinin, oksidatif strese yol açarak fotosentetik hızı, klorofil ve stomatal özellikleri olumsuz etkilediğini raporlamıştır. Kloroplastik ultra yapının zarar gördüğü ve daha yüksek Cr seviyelerinde daha belirgin hasar ve boyut azalması gözlemlendiği bildirilmiştir. Ayrıca tatlı patates yapraklarında artan Cr konsantrasyonunun osmolitlerin ve SOD aktivitesinin artışı ile pozitif korele olduğu bulmuştur. Sonuçta, osmolitler ve SOD aktivitesinde meydana gelen artışın, bitkileri yüksek Cr stresine karşı korumada yeterli olmadığı bildirilmiştir.

2.3. Bitkilerde ağır metal stresi toleransının arttırılmasında bitki gelişim düzenleyicilerinin kullanımı

Sentetik ve doğal bitki büyüme düzenleyicileri hem stresli hem de optimum büyüme koşullarında bitki büyümesinde yer alan metabolik olayları kontrol eden küçük kimyasal habercilerdir (Zahid ve ark., 2023; Hossain ve ark., 2022). Bu bileşikler birçok fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonu kontrol ederek bitki stres toleransını artırma yetenekleri nedeniyle tarımsal araştırmalarda yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Chen ve ark., 2024; Hilal ve ark., 2023; Mu ve ark., 2023; Hossain ve ark., 2022). Birçok çalışma, farklı biyostimülanların, birbirlerinin üretimini modüle etmek ve aşağı yöndeki sinyal yollarını etkilemek gibi çeşitli şekillerde etkileşime girebileceğini göstermiştir (Rogatgi ve ark., 2023; Singh ve ark., 2023b). Farklı biyostimülanlar arasındaki etkileşimin, bitki fizyolojisini etkilemek için sinerjistik olarak birlikte çalıştığı ve potansiyel olarak stres direncinin artmasına yol açtığı bilinmektedir (Ghasemifar ve ark., 2023; Benito ve ark., 2022; Kaur ve ark., 2022b; Khan ve ark., 2022a).

2.3.1. Ağır metal stresi toleransının arttırılmasında nitrik oksit kullanımı

Ahmad ve ark. (2021), civa (Hg) toksisitesi koşullarında NO uygulamasının soya fasulyesi çeşitlerinde (Pusa-24, Pusa-37 ve Pusa-40) bitki büyümesi ve metabolizması üzerindeki etkisini incelemiştir. Araştırmada, Hg stresinin tüm soya fasulyesi çeşitlerinde büyümeyi, biyokütle verimini ve gaz değişimi özelliklerini azalttığı, ancak NO uygulamasının bu parametreleri iyileştirerek Hg toksisitesini hafiflettiği raporlanmıştır. Hg stresi altında MDA ve H₂O₂ düzeylerinin yükselmesiyle birlikte ES'nin arttığı, ancak NO'nun dışarıdan uygulanmasıyla tüm çeşitlerde bu parametrelerin azaldığı bildirilmiştir. NO uygulamasının, Hg stresi nedeniyle bozulan antioksidan enzimlerin aktivitelerini ve AsA-GSH döngüsünü iyileştirdiği bildirilmiştir. Araştırmacılar, NO uygulaması sonrası sürgün ve köklerde Hg birikiminin azaldığını ve NO birikiminin arttığını gözlemlemiştir. Sonuç olarak NO'nun eksojen uygulamasının, Hg'den etkilenen toprakların ekonomik olarak kullanılması için sürdürülebilir bir yaklaşım olabileceği bildirilmiştir.

Emamverdian ve ark. (2021), Pb ve Cd toksisitesi altında yetişen bir bambu türünde (*Arundinaria pygmaea*) NO (200 µM) uygulamasının, ağır metal toksisitesinin hafifletilmesindeki rolünü değerlendirmek için bir deney gerçekleştirmiştir. Araştırmacılar, NO sentaz inhibitörü (L-NAME) ve NO temizleyici olarak Hb'nin uygulamasının oksidatif stresi önemli ölçüde arttırdığını ve hücre zarına zarar verdiğini bildirmiştir. Buna karşın, ağır metal (Pb ve Cd) toksisitesi altında NO uygulamasının antioksidan aktiviteyi, protein içeriğini, fotosentetik özellikleri, bitki biyokütlesini ve bitki büyümesini arttırdığını raporlamıştır. Genel olarak, NO'nun, antioksidan aktiviteleri arttırmak, köklerden

sürgünlere metal translokasyonunu sınırlamak, bitki bölümlerinde (kök, sürgün ve gövde) metal birikimini azaltmak gibi bazı temel mekanizmalarla metal toksisitesine karşı bitkinin toleransını artırabileceği sonucuna varıldığı bildirilmiştir.

Khan ve ark. (2021), domateste Cr tarafından baskılanan tohum çimlenmesi ve bitki büyümesi olaylarında NO'nun iyileştirici rolünü araştırmışmak üzere bir deney gerçekleştirmiştir. Cr stresinin, tohum çimlenme özelliklerini, a-amilaz ve proteaz gibi hidrolize edici enzimlerin aktivitesini önemli ölçüde bozduğu bildirilmiştir. Ancak NO uygulamasının, tohum çimlenme parametrelerini, a-amilaz ve proteaz enzimlerini önemli düzeyde iyileştirdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca NO uygulamasının bitkilerin azot, NO ve prolin içeriğini arttırdığı, prolin ve azot asimilasyonunda yer alan enzimlerin aktivitesini düzenlendiği bildirilmiştir. Araştırmacılar, Cr toksisite koşulları altında NO'nun, metal ligasyon bileşiklerinin (protein olmayan tiyoller ve toplam tiyoller), Asa ve GSH'nin içeriğini iyileştirdiğini bulmuştur. NO uygulamasının ayrıca Cr toksisitesi koşullarında enzimatik olmayan antioksidanları ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal temizleme aktivitesini arttırarak tohum çimlenmesini ve fidelerin toleransını arttırdığını bildirmiştir.

Imran ve ark. (2022), soya bitkilerinde ağır metal (Pb ve Cd) stresinin azaltılmasında NO'nun birlikte düzenleyici rolünü araştırmıştır. Araştırmacılar, NO'nun uygulanmasının oksidatif stresi azaltarak bitki biyokütlesini önemli ölçüde arttırdığını gözlemlemiştir. NO uygulamasının NCED3'ü aşağı regüle ederek, katabolik genleri (*CYP707A1* ve *CYP707A2*) yukarı regüle ederek, endojen absisik asit ve jasmonik asit seviyelerini önemli ölçüde azaltarak metal toksisitesini en aza indirdiği raporlanmıştır. Araştırmacılar NO'nun ağır metal stresini hafifletmesinin, artan *gmNR* ve *gmGSNOR* ifadesi nedeniyle endo-melatonin ve endo-S-nitrozotiol seviyelerinde meydana gelen artıştan kaynaklandığını bildirmiştir. NO uygulanmasının, organik asitlerin rizosfer içine salgılanmasını artırarak Ca^{2+} ve K^{+} alımını arttırdığını, toprak Cd ve Pb mobilizasyonunu ise azalttığını raporlanmıştır. Sonuç olarak, NO'nun, antioksidan ve moleküler transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu düzenleyerek Cd ve Pb toksisitesini hafifletmek için stres direnci mekanizmasını düzenlediğini bildirilmiştir.

Ma ve ark. (2022), şiddetli Cr stresine maruz kalan ıspanak (*Spinacia oleracea* L.) bitkilerine, NO (250 μ M) ve hidrojen sülfid'in (H_2S , 1 mM) tek başına veya kombinasyon halinde uygulamasının büyüme, fotosentetik pigmentler, gaz değişim karakteristikleri, oksidatif stres belirteçleri, antioksidan mekanizmaları, iyon alımı, organik asit salgılanması ve Cr alımı üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla

bir deney gerçekleştirmiştir. Araştırmacılar Cr'nin eklenmesinin bitki büyümesini, biyomas verimini, mineral alımını ve gaz değişim özelliklerini azalttığını bildirmiştir. Ayrıca Cr toksisitesinin oksidatif stres göstergesi olan MDA, H₂O₂ içeriğinin ve ES seviyelerinin artmasına neden olduğunu gözlemlenmiştir. Sonuçlarda, çeşitli antioksidan enzimlerin aktivitelerinin ve fenolik, flavonoid, askorbik asit ve antosiyanin gibi enzimatik olmayan antioksidanların içeriğinin topraktaki Cr konsantrasyonunun artmasıyla arttığı bildirilmiştir. Buna karşın NO ve H₂S uygulamasının bitki büyümesini ve biyomas verimini arttırdığı, fotosentetik parametreleri iyileştirdiği, antioksidan enzimler ve mineral alımını arttırdığı, *S. oleracea* köklerinde organik asit salgısını ve oksidatif stres belirteçlerini azaltarak Cr toksisitesini azalttığı bildirilmiştir. Sonuç olarak NO ve H₂S'in Cr toksisitesinin olumsuz etkilerinin azaltılmasında sinerjistik bir etki gösterdiği raporlanmıştır.

Nabaei ve Amooaghaie (2020), farklı Cd seviyelerinde (0, 50, 100 ve 200 mg Cd kg⁻¹ toprak) yetiştirilen *Catharanthus roseus* bitkilerine NO uygulamasının Cd toleransı ve birikimi üzerindeki etkileri değerlendirmiştir. Araştırmacılar, 50 mg kg⁻¹ Cd'nin kök ve sürgünlerin taze ve kuru ağırlığı ile klorofil a ve b içeriği üzerinde önemli bir etkisinin olmadığını ancak daha yüksek Cd seviyelerinin (100 ve 200 mg kg⁻¹) bu özellikleri önemli ölçüde azalttığını ve yaprak ES seviyesinde artışa ve besin dengesi bozukluğuna neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca KAT ve POD aktivitelerinin düşük Cd konsantrasyonlarında (50 ve 100 mg kg⁻¹) arttığını, ancak 200 mg kg⁻¹ Cd altında azaldığını bildirmiştir. NO uygulamasının, sürgün biyomasını, klorofil içeriğini, POD ve KAT aktivitelerini arttırdığını, elektrolit sızıntısını azalttığını ve yapraklardaki esansiyel katyonların dengesini iyileştirdiğini raporlamıştır. Araştırmacılar NO uygulamalarının hem köklerde hem de sürgünlerde Cd birikimini arttırdığını ve Cd'nin kökten sürgüne taşınmasını arttırdığını gözlemlemiştir. NO'nun, antioksidan enzim aktivitelerini artırarak ve mineral dengesini düzenleyerek Cd toleransını arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca, bitkilerin Cd fitoremediasyon verimliliğini artırarak, biyoması arttırdığı rapor edilmiştir.

2.3.2. Ağır metal stresi toleransının arttırılmasında diüre kullanımı

Talukdar ve ark. (2016), mercimek genotiplerinde As stresinin azaltılmasında diüre uygulamasının iyileştirici rolünü araştırmıştır. Araştırmacılar As'nin bitki sürgün ve köklerinde birikerek bitki kuru ağırlığını önemli düzeyde azalttığını bildirmiştir. Ancak, diüre uygulamasının As'nin bitki köklerden ve sürgüne taşınımının engellediği raporlanmıştır. Diürenin, mercimek bitkilerinin hem yapraklarında hem de köklerinde glikoksilaz sistemini (Gly I ve II), Asa-GSH redoksunu ve antioksidan savunma enzimlerini koordineli olarak düzenlediği

bildirilmiştir. Araştırmacılar diürenin, Gly sisteminin yükseltilmesinin toksik metilglikozal birikimini önlediğini, AsA-GSH döngü enzimleri ve KAT enziminin uyarmasıyla H_2O_2 'yi etkili bir şekilde temizleyerek oksidatif hasarın başlangıcını önlediğini gözlemlemiştir. Sonuç olarak dışardan verilen diürenin mercimek genotiplerinde As'nin neden olduğu oksidatif hasara karşı Gly ve antioksidan savunmayı düzenlediğini bildirmiştir.

Kaya ve ark. (2020), çilek bitkilerinde diürenin Cd toleransının arttırılmasında etkisini incelemek amacıyla bir deney gerçekleştirmiştir. Bu araştırmada Cd stresinin, bitki kuru ağırlığını, toplam klorofil miktarını, F_v/F_m değerlerini, yaprak potasyum (K^+) ve kalsiyum (Ca^{2+}) miktarını ve yaprak su potansiyelini önemli ölçüde azalttığı, ancak prolin, AsA, GSH, MDA, H_2O_2 , ES ve yaprak Cd'si ile endojen H_2S ve NO içeriğinin önemli düzeyde arttığı raporlanmıştır. Buna karşın diüre uygulamasının Cd stresine bağlı oksidatif stresi azalttığı, endojen H_2S ve NO içeriğini daha da arttırdığı bildirilmiştir. Araştırmacılar, diürenin iyileştirdiği Cd stres toleransının, H_2S uygulamasıyla daha da arttığını bulmuştur. Diüre ile bir H_2S inhibitörü olan hipotaurinin uygulanmasının, yaprak H_2S ve NO seviyelerini düşürerek diürenin Cd stres toleransını kısmen tersine çevirdiği raporlanmıştır. Araştırmacılar bu sonuçların bu bileşiklerin stres toleransının sağlanmasında sinerjistik bir etki gösterdiğinin bir kanıtı olduğunu düşünmektedir.

Yadav ve Srivastava (2021), As stresine toleranslı (Pooja) ve orta derecede duyarlı (CO-50) iki farklı pirinç genotipinde diüre uygulamasının As toksisitesine karşı iyileştirici etkisini araştırmıştır. As stresi koşullarında her iki çeşitte de büyümenin, fotosentetik pigmentlerin ve protein içeriğinin azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca, antioksidan enzimlerin aktivitesinin ve toplam S miktarının arttığı, kök anatomik yapısının bozulduğu raporlanmıştır. Araştırmacılar, diürenin iki As stresi koşullarında bitkinin büyümesini arttırdığını gözlemlemiştir. As stresli bitkilerde diürenin, fotosentez ve antioksidan aktiviteyi iyileştirdiği, her iki çeşitte As konsantrasyonlarında önemli bir azalmaya yol açtığı raporlanmıştır. Sonuç olarak, diüre uygulamasının pirinçte As toksisitesini ve birikimini azaltmak için sürdürülebilir ve uygun bir yol olabileceği bildirilmiştir.

Kaya ve ark. (2022a) gerçekleştirdikleri çalışmada, Pb stresinin buğday bitkilerinin büyümesini, klorofil içeriğini ve fotosistem sistem II (PSII) verimliliğini önemli ölçüde azalttığını bulmuştur. Pb stresinin ayrıca yapraklarda ve köklerde Pb birikimini, yaprak prolin içeriğini ve oksidatif stresle ilgili özellikleri artırdığı raporlanmıştır. Pb stresi koşullarında diüre uygulamasının, GSH, AsA, APOD, KAT,

SOD, GST, DHAR ve GR enzimlerini düzenleyerek stresin etkilerini hafiflettiğini raporlamıştır. Ayrıca diüre uygulamasının, nitrat redüktaz, nitrit redüktaz, glutamat sentaz ve glutamin sentetazın aktivitelerini uyararak azot metabolizmasını düzenlediğini bildirmiştir.

Shukla ve ark. (2023), As ile kirlenmiş bir tarlada yetiştirilen buğday bitkilerine yaprakdan diüre uygulamasının bitkilerinin çeşitli bölümlerinde As birikimi, büyüme ve verim üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Eksojen diüre uygulamasının, buğdayın As birikiminde önemli bir azalmaya yol açtığı bildirilmiştir. Diüre uygulamasıyla As birikiminde meydana gelen azalmanın, tehlike katsayısını (HQ) ve artan ömür boyu kanser riskini (ILCR) güvenli seviyelere indirdiği raporlanmıştır. Diüre uygulamasının ortalama tahıl verimini %30 oranında artırdığı bildirilmiştir. Araştırmacılar, diürenin antioksan enzimleri düzenleyerek MDA konsantrasyonları önemli düzeyde azalttığını bulmuştur. Sonuç olarak, diüre uygulamasının buğday tanelerindeki As birikimini azalttığı ve As stresini iyileştirerek mahsul verimini artırdığı bildirilmiştir.

Upadhyay ve ark. (2022), diüre uygulamasının iki farklı pirinç çeşidinde As stresinin hafifletilmesindeki rolünü araştırmak amacıyla bir arazi çalışması gerçekleştirmiştir. Diüre uygulamasının As birikimini azalttığını, verimi ve fotosentetik pigment içeriğini artırdığını, Si asimilasyonu ve antioksidan enzimlerin aktivitelerini düzenlediğini bildirmiştir. Diüre muamelesi sonrası As ile ilgili taşıyıcı genlerin ifadesinin her iki çeşit içinde değiştiğini ve bu durumun As birikiminin azalmasından sorumlu olabileceği raporlanmıştır. Araştırmacılar, diüre uygulamasının As ile kirlenmiş tarla koşullarında pirinç bitkilerinde As toksisini iyileştirmek için etkili ve sürdürülebilir bir tarımsal uygulama olduğunu bildirmiştir.

2.3.3. Ağır metal stresi toleransının arttırılmasında hidrojen sülfid kullanımı

Rizwan ve ark. (2019), pirinç bitkilerinin Ni stresi altında büyüme performansının iyileştirilmesinde H_2S 'in rollerini araştırmak amacıyla hidroponik ortamda bir deney gerçekleştirmiştir. Araştırmacılar, H_2S uygulamasının, Ni stresi nedeniyle olumsuz etkilenen bitki büyümesi, biyokütle verimi, fotosentez oranları, stomal iletkenlik, transpirasyon oranı, iç CO_2 konsantrasyonu ve fotosentetik pigment içeriği gibi fotosentez özellikleri önemli düzeyde iyileştirdiğini gözlemlemiştir. Ayrıca, H_2S uygulaması sonrası bitkilerin Ni alımının ve birikiminin azaldığı bildirilmiştir. Araştırmada, Ni stresinin yaprakların NO_3^- içeriğini ve asimilasyonunda yer alan enzimleri azalttığı, NH_4^+ içeriğinde ise artışa yol açtığı bildirilmiştir. H_2S uygulamasının azot metabolizması ile ilişkili genlerin transkript

seviyelerini düzenleyerek Ni stresinin olumsuz etkilerini tersine çevirdiği raporlanmıştır. Sonuç olarak, Ni stresi altındaki pirinç bitkilerinde kloroplast biyogenezini ve azot metabolizmasını kontrol etmede H₂S'in önemli rolü ortaya konmuştur.

Kharbech ve ark. (2020), mısır fidelerinin Cr stresi karşısında direncini arttırmada NO ve H₂S arasındaki potansiyel etkileşimi analiz etmeyi amaçlamıştır. Araştırmacılar Cr'un, süperoksit ve hidroksil radikallerinin seviyelerini arttırdığını, hücrel membran hasarına neden olduğunu ve metilglükoksal seviyelerini artırdığını bulmuştur. NO veya H₂S uygulamasının, endojen NO ve H₂S seviyelerini önemli ölçüde artırdığını, lipid peroksidasyonunu azalttığı ve bazı antioksidan enzim aktivitelerini artırdığını bildirmiştir. Araştırmacılar, H₂S'in Cr toksisitesini hafifletmesinin H⁺-ATPaz ve glioksalaz yollarının düzenlemesi, ROT ve MG baskılanmasının downstream etkileri olarak GSH seviyelerinin korunmasından kaynaklandığını raporlamıştır.

Li ve ark. (2021), Brassica rapa bitkilerinde H₂S tarafından Cd stresinin hafifletilmesindeki fizyolojik ve biyokimyasal stratejileri incelemek üzere bir deney gerçekleştirmiştir. Araştırmada, Cd stresi koşullarında yaprak bağıl su içeriği, fotosentetik pigmentler, toplam çözünür proteinler, mineral alımı, antioksidan enzimler ve büyümede azalma meydana geldiği bildirilmiştir. Ayrıca, artan Cd içeriğinin, EL ve MG seviyelerinde artışa neden olduğu raporlanmıştır. Tohumların H₂S ile muamele edilmesinin Cd stresli bitkilerde daha iyi fenotip, büyüme ve biyokütle üretimine yol açtığı bildirilmiştir. Araştırmacılar H₂S uygulaması ile antioksidan enzimlerin aktivitelerinin artması sonucu ROT, ES, MDA ve MG seviyelerinin azaldığını bulmuştur. Ayrıca H₂S muamelesi ile indol asetik asit, sistein ve toplam fenolik içeriğinde artış meydana geldiği ve Cd birikiminin azaldığı bildirilmiştir. Sonuç olarak H₂S'in, büyüme parametrelerini ve antioksidan sistemi düzenleyerek B. rapa'da stres toleransını iyileştirdiği ve Cd stresini azalttığı bildirilmiştir.

Valivand ve Amooaghaie (2021), Ni stres koşullarında kabak bitkilerinde yapraktan H₂S donörü olan NaHS uygulamasının büyüme, besin elementi içeriği ve azot metabolizması üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçlamıştır. Araştırmacılar Ni stresinin kök ve sürgünlerin taze ve kuru ağırlıklarını, yaprak alanını, yaprak su içeriğini ve fotosentetik pigment içeriğini azalttığını bildirmiştir. Ayrıca, Ni stresinin, kabak bitkisinin yapraklarında ES seviyelerini arttırdığını, KAT ve NR aktivitelerini azalttığını gözlemiştir. Ni stresi koşullarında H₂S uygulamasının büyüme

parametrelerini ve klorofil pigment içeriğini arttırdığını bildirmiştir. Eksojen H₂S takviyesinin köklerde ve sürgünlerde Ni birikimini, Ni taşıma faktörü değerlerini ve ES seviyelerini azalttığı, ancak yapraklardaki KAT aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca, H₂S uygulamasının, Ni stresi altındaki kabak bitkilerinin köklerinde ve sürgünlerinde makro ve mikrobeyin elementlerinin (N, P, K, Ca, Mg, Fe ve Cu) seviyelerini, toplam protein içeriğini ve yapraklardaki NR aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir.

Javad ve ark. (2022) H₂S uygulamasının çemen otu fidelerinde Cd toksisitesinin etkilerinin azaltılmasında potansiyelini belirlemek üzere bir araştırma gerçekleştirmiştir. Cd stresinin çemen otu fidelerinin büyümesini, yaprağın bağıl su içeriğini, hücreler arası CO₂ konsantrasyonunu, net fotosentezi, stoma iletkenliğini ve transpirasyonu azalttığı bildirilmiştir. H₂S uygulamasının, Cd ile kirlenmiş toprakta APOD, KAT ve SOD gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak fidelerin morfolojik özelliklerini önemli ölçüde iyileştirdiği raporlanmıştır. Araştırmada, H₂S uygulamasının ayrıca fenolik ve flavonoid içeriğini de düzenlediği gözlemlenmiştir. H₂S uygulamasının aynı zamanda Cd stresi koşullarında yetiştirilen fidelerde H₂O₂ üretimini ve ES değerlerini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Araştırmacılar, H₂S uygulaması sonrası Cd stresine maruz kalan çemen otu fidelerinin büyüme ve fizyolojik performansındaki iyileşmenin, spermidin ve putresin biyosentezinde meydana gelen artıştan kaynaklandığını düşünmektedir.

Singh ve ark. (2023), H₂S uygulamasının Cr stresine maruz kalan maş fasulyesinin büyümesi ve biyokimyasal özellikleri üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla bir deney gerçekleştirmiştir. Cr stresi kaynaklı reaktif oksijen türlerinin birikmesinin hücre ölümüne neden olduğu ve kök anatomisini ve büyümesini etkilediği bildirilmiştir. Eksojen H₂S uygulamasının antioksidan aktivitelerini iyileştirdiği, Cr birikimini ve translokasyonunu azaltarak hücre ölümünü azalttığı ve sonuçta bitki büyümesini arttırdığı bildirilmiştir. H₂S uygulamasının fotosentez, iyon alımı, glutatyon ve prolin seviyelerini arttırdığı ve oksidatif stresi azalttığı raporlanmıştır. H₂S'in, bitkilerin toprak üstü kısımlarına Cr translokasyonunu azalttığını, böylece askorbat-glutatyon döngüsünü düzenleyerek ve antioksidan mekanizmayı aktive ederek bitkileri oksidatif stresten kurtardığı bildirilmiştir. Genel olarak H₂S uygulamasının, Cr stresli maş fasulyesi bitkilerinin besin içeriğini ve iyonik homeostazisini iyileştirtirdiği raporlanmıştır.

2.3.4. Ağır metal stresi toleransının arttırılmasında tiamin kullanımı

Kaya ve Aslan (2019), Cd stresi altındaki çilek bitkilerinin yapraklarına TA

püskürtülmesinin bitki toleransına etkisini değerlendirmiştir. Araştırmacılar Cd stresi koşullarında, bitki kuru ağırlığı, toplam klorofil, F_v/F_m , yaprak potasyumu ve kalsiyumu ile yaprak su potansiyelinin önemli ölçüde azaldığını göstermiştir. Ayrıca Cd stresi altında prolin, AsA, GSH, MDA, H_2O_2 , ES ve yaprak Cd konsantrasyonlarının önemli düzeyde arttığı bildirilmiştir. Ancak Cd stresi koşullarında TA uygulamasının bitki kuru madde miktarını, klorofil içeriğini, F_v/F_m değerini, yaprak potasyum ve kalsiyumunu önemli düzeyde arttırdığını bildirmiştir. Ayrıca TA'nın bitki yapraklarında Cd birikimini azalttığı ve antioksidan enzimleri yükselterek oksidatif stresi hafiflettiği raporlanmıştır. Sonuç olarak TA uygulamasının antioksidan enzimleri, endojen H_2S ve NO içeriğini arttırarak Cd stresini hafiflettiğini bildirmiştir.

Sanjari ve ark. (2019), Cd toksisitesi altında yetişen kanola bitkilerinde tiamin (TA) uygulamasının bazı fizyolojik ve biyokimyasal parametreler üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Araştırmacılar, TA uygulamasının Cd stres koşullarında sürgün uzunluğu, sürgün kuru ağırlığı ve toplam klorofil içeriği gibi büyüme ve biyokimyasal parametreleri önemli ölçüde arttırdığını bildirmiştir. Aynı zamanda, MDA, H_2O_2 ve yapraklardaki Cd birikimini azalttığını bildirmiştir. TA uygulamasının enzimatik olmayan antioksidanların içeriğini ve KAT, POD ve APOD enzimlerinin aktivitelerini arttırdığını raporlamıştır. Araştırmacılar, TA'nın DPPH radikal temizleme potansiyelini artırmasıyla birlikte Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) aktivitesinin artmasının, kanola bitkilerinde Cd stresi nedeniyle meydana gelen oksidatif stresin azaldığını bulmuştur. Genel olarak TA uygulaması Cd stresi koşullarında meydana gelen oksidatif stresi hafifleterek bitki büyümesini arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca TA'nın etkinliğinin 24-epibrassinolide birlikte uygulandığında daha da arttığı bildirilmiştir.

Atif ve ark. (2022), gerçekleştirdiği deneyde farklı As stres seviyeleri (0, 50 ve 100 mg kg⁻¹ NaAsO₂) altında yetişen mısır bitkilerine TA uygulamasının iyileştirici rollerini araştırmıştır. Araştırmacılar, As stresinin besin alımı, toplam fenoller, toplam çözünür proteinler üzerinde olumsuz etki yaparak mısır büyümesini azalttığını bulmuştur. Ayrıca As stresi koşullarında antioksidan enzimlerin aktivitelerinde (KAT, SOD, POD ve APOD), oksidatif stres parametrelerinde (H_2O_2 ve MDA), prolin, toplam çözünür şekerler, serbest amino asitler ve askorbik asit seviyelerinde önemli artışların gerçekleştiğini gözlemlemiştir. Ancak As stresi koşullarında TA uygulaması ile bitki büyüme özelliklerinde önemli bir artış gerçekleştiği bildirilmiştir. Ayrıca, TA uygulamasının klorofil, bitki su durumu, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan aktivitelerini olumlu yönde etkilediği

raporlanmıştır. Genel olarak TA'nın As stresi altında bitki büyümesi ve biyokütle verimini arttırdığı, ancak indol asetik asit ile kombinasyon halinde uygulandığında daha da etkili olduğu bildirilmiştir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışma Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü seralarında gerçekleştirildi. Araştırma bitkisi olarak Türkiye Tohumculuk A.Ş.'ye bağlı Yüksel Tohumculuk Tarım Sanayi ve Ticaret Ltd. Şti.'den temin edilen Kıraç F1 çeşidi kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

Çimlenme öncesi, tohumlar sterilize edilmesi için %1 sodyum hipoklorit (NaOCl) solüsyonu ile muamele edildi ve daha sonra distile su ile üç kez yıkandı. Sterilizasyondan sonra tohumlar torf-perlit karışımında çimlendirildi. Bir haftalık çimlenmeden sonra fideler, saksı başına 2 bitki olacak şekilde perlit içeren plastik saksılara nakledildi ve sulandı. Deneme boyunca bitkiler Hoagland besin solüsyonu (Hoagland ve Arnon, 1950) ile sulandı. Biber fidelerinin saksılara aktarılmasından 5 gün sonra farklı kimyasallar yapraklardan püskürtülerek uygulandı. Spreyleme işlemi 6 gün boyunca toplamda 3 kez tekrarlandı. Ardından bitkiler, 14 gün boyunca besin solüsyonuna Nikel (Ni) veya Krom (Cr) eklenerek sulandı.

Ni stresi koşullarında yetişen biber fidelerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamasının bitki toleransına etkisi araştırıldı. Araştırmada NO ve diüre uygulama dozunun belirlenmesinde daha önce yapılan çalışmalarda en etkili bulunan NO dozu araştırıldı. Kazemi (2012) Ni stresi, Rizwan ve ark. (2018) Ni stresi, Soliman ve ark. (2019) Ni stresi, Kaya ve ark. (2019b) Cd ve Pb stresi koşullarında 0,1 mM düzeyinde NO uygulamasının bitki toleransını etkili bir şekilde arttırdığını raporlamıştır. Kaya ve ark. (2019a) bor toksisitesi, Kaya ve ark. (2022a) Pb stresi ve Shukla ve ark. (2023) As stresi koşullarında 400 mg L⁻¹ diüre püskürtülmesinin bitki toleransını geliştirdiğini bildirmiştir. Bu bağlamda, Ni stresi çalışması için, %0.01 Tween-20 içinde sodyum nitroprussid kaynağından hazırlanan 0,1 mM NO ve 400 mg L⁻¹ diüre çözeltisi tek başına veya karışım halinde yapraklardan püskürtülerek uygulandı. Kontrol bitkilerine sadece %0.01 Tween-20 içeren su püskürtüldü. Püskürtme işleminin ardından bitkiler 100 µM nikel klorür (NiCl₂) içeren besin solüsyonu ile sulanarak Ni stresine maruz bırakıldı. Kontroller ise sadece besin solüsyonu ile beslendi. Deneme planlarını gösteren tablo Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Ni stresi uygulamaları

No	Uygulamalar	Ni	NO	Diüre
----	-------------	----	----	-------

1	Kontrol	-	-	-
2	Nitrik Oksit (NO)	-	0,1 mM	-
3	Diüre	-	-	400 mg L ⁻¹
4	NO + Diüre	-	0,1 mM	400 mg L ⁻¹
5	Nikel (Ni)	100 µM	-	-
6	Ni + NO	100 µM	0,1 mM	-
7	Ni + Diüre	100 µM	-	400 mg L ⁻¹
8	Ni + NO + Diüre	100 µM	0,1 mM	400 mg L ⁻¹

Cr stresi koşullarında yetişen biber fidelerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamasının bitki toleransına etkisi araştırıldı. TA ve H₂S uygulama dozunun belirlenmesinde daha önce yapılan çalışmalarda kullanılan dozlar araştırıldı. Kaya ve ark. (2019a) bor toksisitesi, Kaya ve Aslan (2020) Cd stresi, Bashir ve ark. (2023) kuraklık stresi koşullarında 50 mg L⁻¹ TA uygulamasının bitki toleransını arttırdığını bildirmiştir. Liu ve ark. (2016) Zn toksisitesi, Rizwan ve ark. (2019) Ni stresi, Ahmad ve ark. (2020) Cr stresi, Javad ve ark. (2022) Cd stresi, Kaya ve ark. (2023) Cr stresi koşullarında 0,2 mM H₂S uygulamasının bitki yanıtlarını ve toleransını geliştirdiğini bildirmiştir. Sonuçta Cr stresi çalışması için, %0,01 Tween-20 içinde hazırlanan 50 mg L⁻¹ TA ve 0,2 mM H₂S çözeltisi tek başına veya karışım halinde yapraklardan püskürtüldü. Kontrol bitkilerine sadece %0,01 Tween-20 içeren su püskürtüldü. Püskürtme işleminin ardından bitkiler 100 µM potasyum dikromat (K₂Cr₂O₇) içeren besin solüsyonu ile sulanarak Cr stresine maruz bırakıldı. Kontroller ise sadece besin solüsyonu ile beslendi. Deneme planlarını gösteren tablo Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Cr stresi uygulamaları

No	Uygulamalar	Cr	TA	H ₂ S
1	Kontrol	-	-	-
2	Tiamin (TA)	-	50 mg L ⁻¹	-
3	Hidrojen Sülfid (H ₂ S)	-	-	0,2 mM
4	TA + H ₂ S	-	50 mg L ⁻¹	0,2 mM
5	Krom (Cr)	100 µM	-	-

6	Cr + TA	100 μ M	50 mg L ⁻¹	-
7	Cr + H ₂ S	100 μ M	-	0,2 mM
8	Cr + TA + H ₂ S	100 μ M	50 mg L ⁻¹	0,2 mM

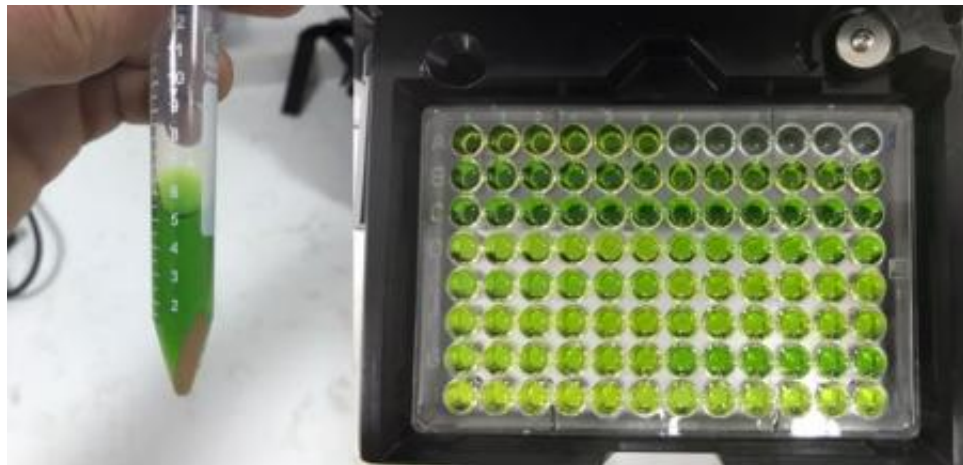
3.2.1. Bitki Yaş ve Kuru Ağırlıkları

Bitki yaş ve kuru ağırlıklarının belirlenmesine yönelik ölçümler, stres koşullarının ve bitki büyüme düzenleyicilerinin bitki fizyolojisi üzerindeki etkilerini anlamak ve değerlendirmek için temel bir parametre oluşturmaktadır. Bu amaçla bitkiler, kök boğazından kesilerek gövde ve köklerin yaş ağırlıkları tartıldı. Yaş ağırlıkları alınan örnekler bir kurutma fırınında 72 saat boyunca 65°C’de bekletildi ve kuru ağırlıkları tartıldı.

3.2.2. Fotosentez ile ilişkili parametrelerin belirlenmesi

Numunelerin klorofil ve karotenoid seviyeleri, Arnon (1949) tarafından bildirilen teknik kullanılarak belirlendi. Bunun için yaklaşık 0,1 g taze yaprak %80 aseton ile homojenize edildikten sonra örnekler 4600 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj edilen örneklerin 663 nm, 645 nm ve 470 nm’deki absorbanları mikropate spektrofotometre ile belirlenmiştir (Şekil 3.1.). Klorofil a, klorofil b ve karotenoid içeriklerine ait sonuçlar mg g⁻¹ taze ağırlık (TA) olarak ifade edilmiştir.

Maksimum kuantum verimini (F_v/F_m) belirlemek için taşınabilir fotosentez verim analizörü (Walz, Almanya) kullanıldı. Bitkiler 30 dakika karanlıkta bekletildikten sonra ölçümler alındı ve F_v/F_m değerleri Maxwell ve Johnson (2000) yöntemine göre hesaplandı.



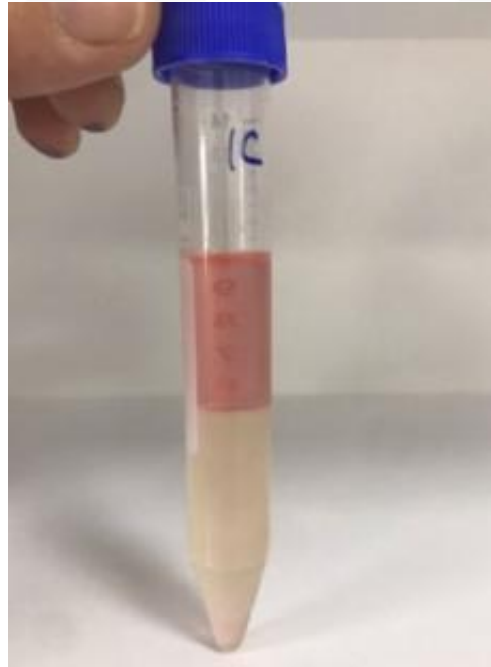
Şekil 3.1. Klorofil ölçümü

3.2.3. Yaprak bağıl su içeriği tayini

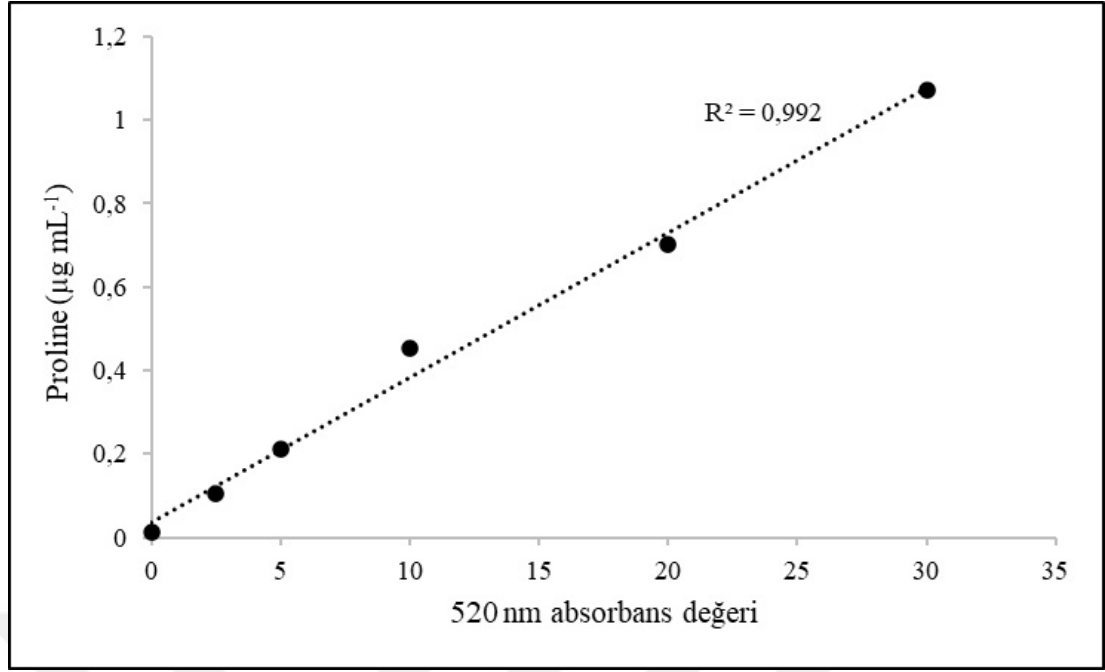
Bağıl su içeriğinin (BSİ) belirlenmesinde Barrs ve Weatherley (1962) tarafından bildirilen prosedür uygulandı. İlk ağırlığı not edilen taze yapraklar, turgor haline gelmeleri için altı saat boyunca petri kaplarında deiyonize su içinde bekletildi ve turgor ağırlıkları (TA) alındı. Ardından yapraklar 70°C’ de 72 saat etüvde kurutuldu ve kuru ağırlıkları (KA) not edildi. Yaprak örneklerinin bağıl su içeriği $[(YA - KA) / (TA - KA)] \times 100$ formülü ile % olarak hesaplandı.

3.2.4. Prolin içeriği tayini

Prolin seviyelerinin belirlenmesi için taze bitki yaprakları %3'lük sulfosalisilik asit içerisinde homojenize edildi ve homojenat filtre kâğıdı ile süzüldü. Bir kısım süpernatant (2 mL) yeni bir test tüpüne aktarıldı. Üzerine aynı miktarda asit-ninhidrin karışımı (Bates ve ark., 1973) ve glasiyal asetik asit ilave edildi. Daha sonra tüpler 100 °C de inkübe edildi. Bir saat sonunda tüpler buz banyosunda soğutuldu ve 4 mL toluen eklenerek vortekslendi. İki faz oluşana kadar beklendi (Şekil 3.2.) ve sonunda üst faz UV mikropate spektrometrede 520 nm dalga boyunda okundu. Elde edilen veriler L-proline kullanılarak oluşturulan standart grafik (Şekil 3.3.) ile hesaplandı ve sonular $\mu\text{mol g}^{-1}$ taze ağırlık olarak ifade edildi (Bates ve ark.,1973).



Şekil 3.2. Prolin testinde iki faz oluşumu



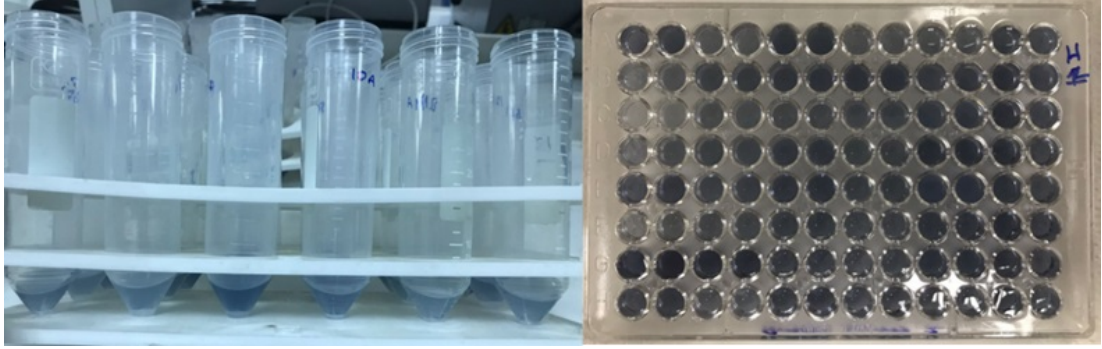
Şekil 3.3. L-prolin ile hazırlanan standart eğri

3.2.5. Toplam çözünür şeker içeriği tayini

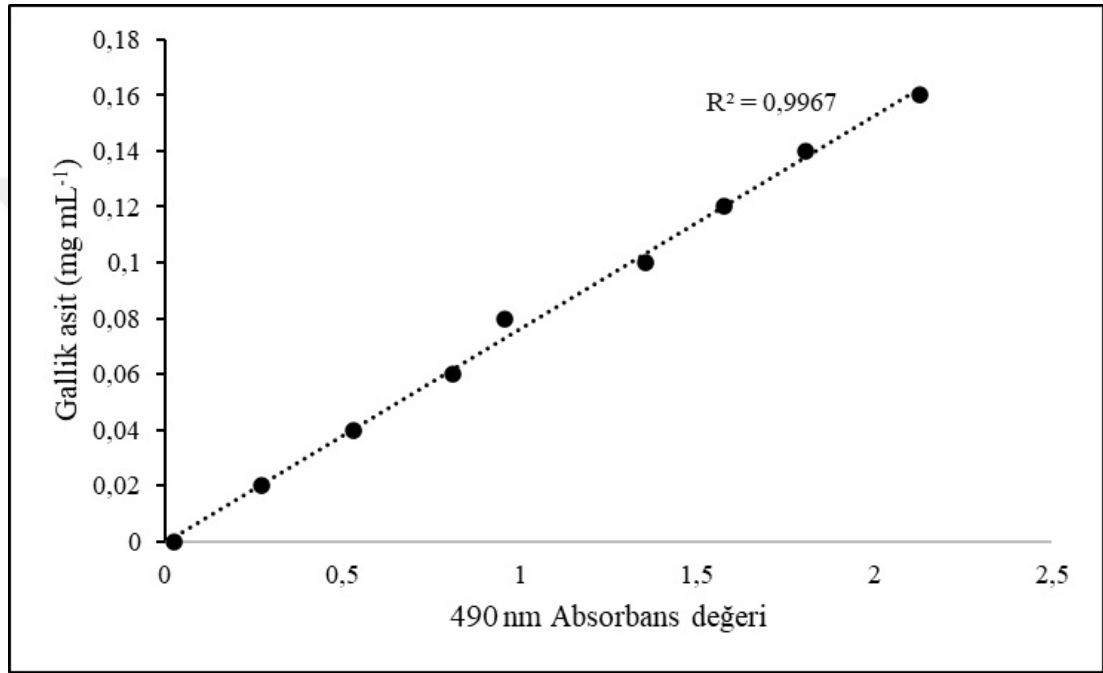
Yaprak örneklerinin toplam şeker içeriğini ölçmek için Dubois ve ark. (1956) tarafından bildirilen yöntem kullanıldı. 100 mg kurutulmuş ve toz haline getirilmiş yapraklar üzerine 5000 µL HCl (2,5 N) eklendi ve 120 dk. 80°C ayarlı su banyosunda ısıtıldı. Isıtma işleminin ardından 1 mL süpernatant üzerine 5 mL konsantre sülfürik asit ve %5 fenol eklenerek karışım çalkalandı. Daha sonra 490 nm'de absorbans mikropate spektrofotometre ile ölçüldü ve toplam şeker, glikoz standart grafiği kullanılarak hesaplandı.

3.2.6. Toplam fenolik madde konsantrasyonu tayini

Yaprak örneklerinin toplam fenolik içeriğini belirlemek için Shetty ve ark. (1995) tarafından bildirilen prosedür kullanıldı. Bunun için taze yaprak örneği %1 HCl içerisinde hazırlanan %80 metanol içeren test tüpleri, istenen bileşikleri çıkarmak için 95°C'de 30 dakika ısıtıldı. Seyreltilmiş ekstrakt üzerine 1,5 mL FCR (%10) ilave edildikten 5 dakika sonra karışımın üzerine 1,2 mL NaCO₃ (%20) eklendi. 15 sn çalkalama işleminden sonra 40°C'de 30 dakika karanlıkta bekletildi. Oluşan rengin intensitesi mikropate spektrofotometre ile belirlendi (Şekil 3.4.). Toplam fenolik içerik, gallik asit kullanılarak hazırlanan standart eğri oluşturularak belirlendi (Şekil 3.5.)



Şekil 3.4. Biber yapraklarında fenolik madde tayini



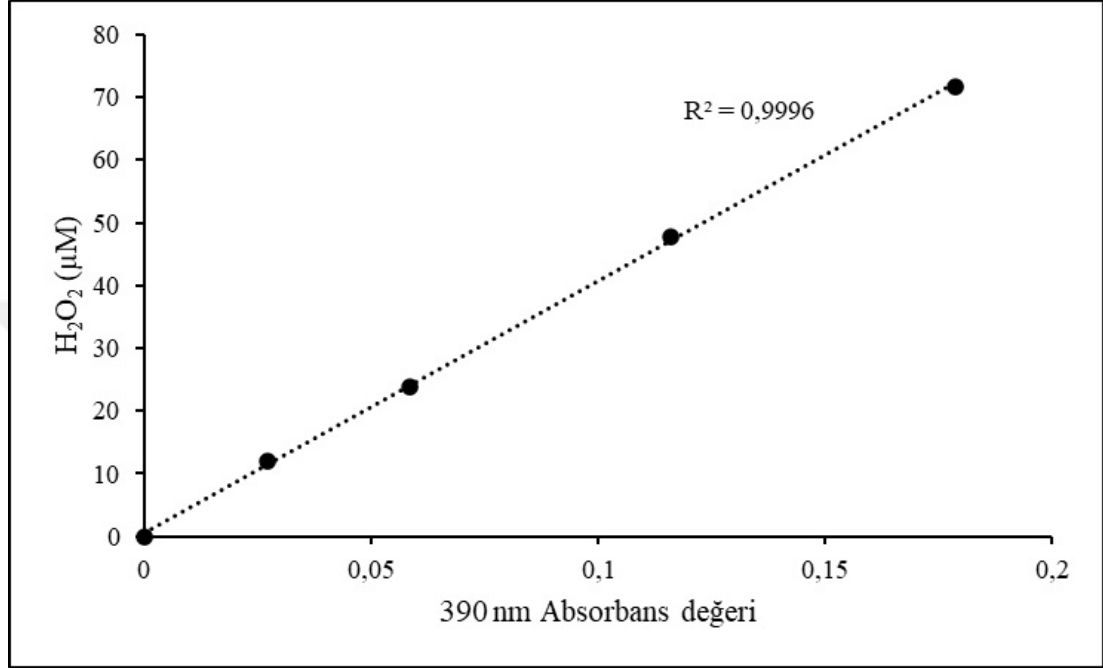
Şekil 3.5. Gallik asit standartından oluşturulan kalibrasyon eğrisi

3.2.7. Oksidatif stres ile ilişkili parametrelerin ölçümü

Sıvı azot ile toz haline getirilen taze bitki yaprakları %0,1 TCA ile homojenize edildi ve 15.000 rpm ve +4°C'de 15 dk süreyle santrifüj edildi.

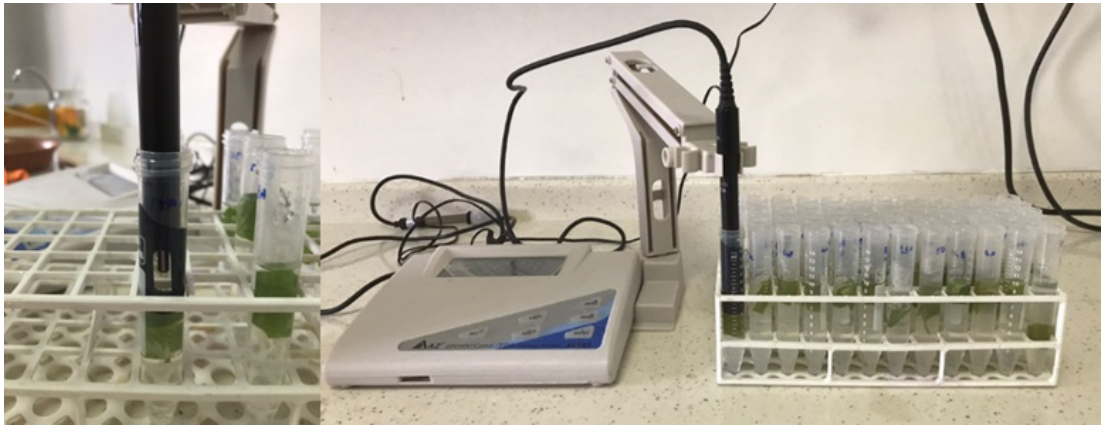
Lipid peroksidasyonun bir sonucu olarak ortaya çıkan ve oksidatif stresin önemli bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) belirlenmesi için bir kısım homojenat (1000 µL) alınarak yeni bir tüpe aktarılmış ve üzerine 4 mL %20 TCA ile hazırlanmış %5'lik tiyobarbiturik asit (TBA) ilave edilmiştir. Karışım 30 dakika 95°C sıcak su banyosunda bekletilmiş ve ardından buz üzerinde soğutulmuştur. Karışımın 532 ve 600 nm'deki absorbansları mikrotiter spektrofotometre ile belirlenmiş ve sonuçlar MDA nmol g⁻¹ taze ağırlık olarak ifade edilmiştir (Weisany ve ark., 2012).

Yaprakların hidrojen peroksit (H_2O_2) konsantrasyonlarının belirlenmesinde Loreto ve Velikova (2001) tarafından bildirilen prosedür uygulandı. Homojenattan 0,5 mL alınarak, üzerine 0,5 mL 10 mmol L^{-1} K-fosfat tampon (pH 7.0) ve 1,5 mL 1 M KI ilave edilerek 390 nm'deki absorpsanları kaydedildi. Standart grafik (Şekil 3.6.) ile hesaplanan sonuçlar $\mu\text{mol g}^{-1}$ taze ağırlık olarak sunuldu.



Şekil 3.6. H_2O_2 standartından oluşturulan kalibrasyon eğrisi

Elektrolit sızıntısı (ES) için taze yaprak örnekleri 5 mm uzunluğunda kesilerek test tüplerine aktarıldı ve üzerine 10 mL deiyonize su ilave edildi. Tüpler 32°C 2 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra EC1 ölçüldü. Bu aşamadan sonra 121°C 20 dk bekletildikten sonra EC2 ölçüldü (Şekil 3.7.) ve sonuçlar $EC/EC2*100$ formülü ile hesaplandı (Dionisio-Sese ve Tobita, 1998).



Şekil 3.7. EC metre ile ölçümlerin yapılması

3.2.8. Antioksidan enzimlerin aktiviteleri ve toplam çözünür protein tayini

Bir kısım taze bitki yaprağı tartılarak sıvı azot ile öğütülmüştür. Daha sonra 0,1 mol L⁻¹ K-fosfat tamponu (%1 polyvinylpyrrolidone ve 0,1 mmol L⁻¹ EDTA içerir, pH: 7.0) içerisinde homojenize edildi. Ekstrakt 15.000 rpm ve +4°C sıcaklıkta 15 dk. santrifüj edildi. Sonuçta süpernatant antioksidan enzim aktiviteleri ve toplam çözünür protein içeriğinin belirlenmesinde kullanıldı.

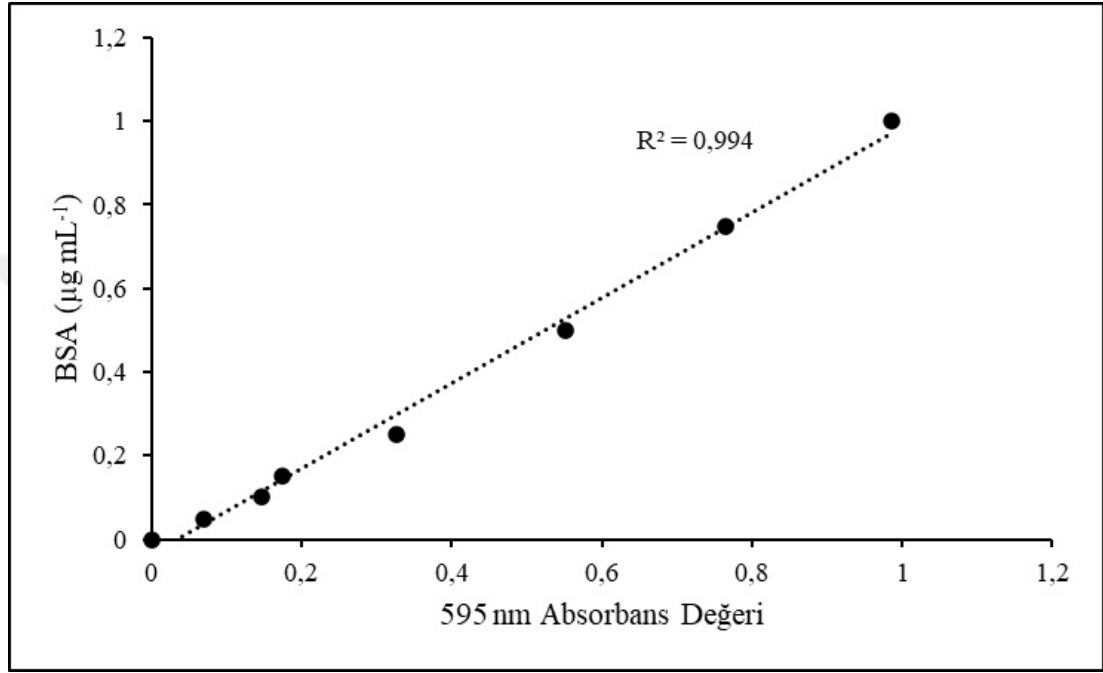
Süper Oksit Düsmütaz (SOD) aktivitesi Beauchamp and Fridovich (1971) tarafından bildirilen nitro blue tetrazolium kloridin (NBT) ışık altında indirgemesi yöntemine göre ölçülmüştür. SOD aktivitesi, reaksiyon karışımının (0,05 M K-fosfat (pH 7.8), 0,05 M sodyum karbonat, 13 mM L-methionine, 100 µmM EDTA, 75 µM NBT, 5 µM riboflavin ve 25 µL süpernatant) 15 dakika boyunca floresan lamba altında bekletilmesinden sonra 560 nm'deki absorbanslarının mikropate spektrofotometrede ölçümü ile belirlendi. Enzim özütü içermeyen bir tüp kontrol çözeltisi olarak alındı. Işınlanmayan ve renk geliştirmeyen tam bir karışım kör olarak belirlendi.

Katalaz (KAT) enzim aktivitesinin belirlenmesinde Aebi (1984) tarafından bildirilen prosedür uygulanmıştır. Reaksiyon karışımının (50 mmol L⁻¹ K-fosfat, 10 mmol L⁻¹ H₂O₂, 4 mmol L⁻¹ Na₂EDTA ve 10 µL süpernatant) 240 nm'deki absorbans değişimi 5 dakika boyunca ölçüldü. Sonuçlar ünite mg-1 protein olarak ifade edilmiş olup, bir KAT enzim ünitesi 1 dakika içinde 1 mmol H₂O₂'in parçalanmasını sağlayan enzim miktarı olarak belirtilmiştir (Karakaş, 2013).

Peroksidaz (POD) enzim aktivitesinin belirlenmesinde Cvikorová ve ark. (1994) tarafından bildirilen prosedür uygulanmıştır. Reaksiyon karışımının (50 mmol L⁻¹ K-fosfat (pH 7.0), 5 mmol L⁻¹ H₂O₂, 13 mmol L⁻¹ guaiacol ve 10 µL süpernatant) 470 nm' deki absorbans değişimi 5 dakika boyunca ölçüldü. Bir ünite peroksidaz aktivitesi dakikada 470 nm' de absorbans değişiminin, ekstinksiyon katsayısı ile çarpılıp, protein miktarına bölünmesi ile hesaplandı ve sonuçlar ünite mg-1 protein olarak belirtilmiştir.

Askorbat peroksidaz (APOD) enzim aktivitesinin belirlenmesinde Nakano ve Asada (1981) tarafından bildirilen prosedür uygulanmıştır. Reaksiyon karışımının (50 mmol L⁻¹ K-fosfat, 0,5 mmol L⁻¹ H₂O₂, 500 µmol L⁻¹ askorbik asit, 1 mmol L⁻¹ EDTA ve 10 µL süpernatant) 290 nm'deki absorbans değişimi 3 dakika boyunca ölçüldü. Enzim aktivitesi askorbatın ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplandı.

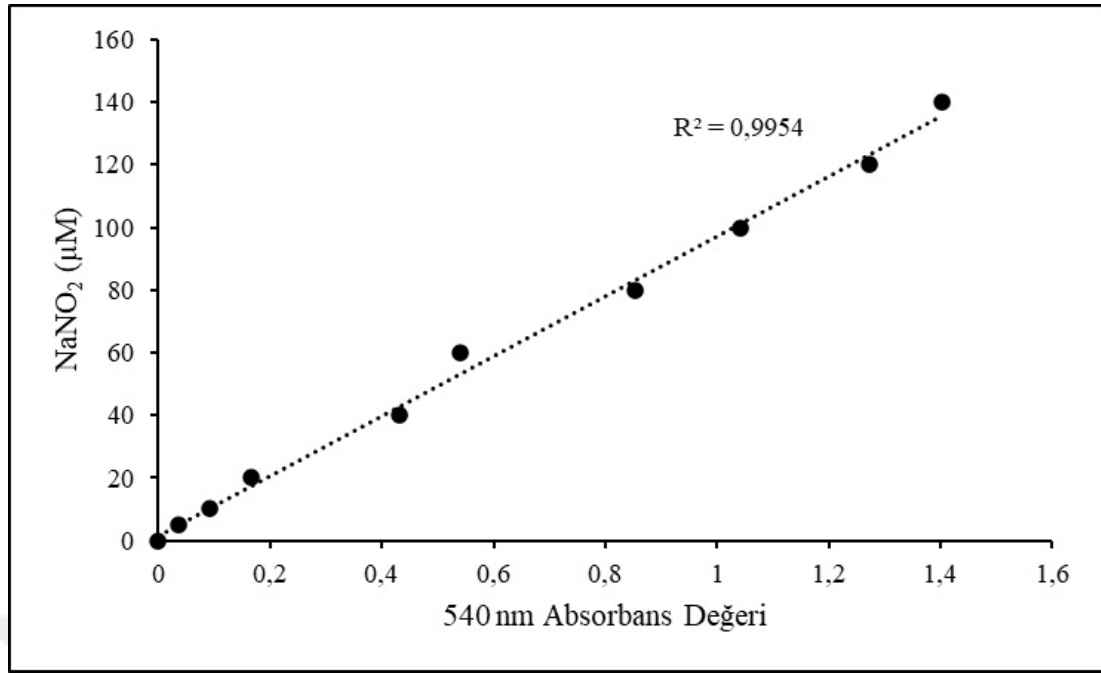
Toplam çözünür protein içeriği, Bradford (1976) yöntemine göre belirlendi. Özetle, 10 µL protein ekstraktı üzerine 200 µL Bradford ayracı eklendi (Bradford (1976) tarifine göre hazırlandı). Örnekler oda sıcaklığında 15 dk bekletilerek 595 nm absorbansları mikropate spektrofotometre ile belirlendi. Sonuçlar Bovine Serum Albumin (BSA) ile hazırlanan bir standart eğri (Şekil 3.8.) ile hesaplandı ve mg/taze ağırlık olarak ifade edildi.



Şekil 3.8. BSA ile hazırlanan standart eğri

3.2.9. Azot metabolizması ile ilişkili enzim aktivitelerinin tayini

Nitrat redüktaz (NR) aktivitesinin belirlenmesi için Jaworski (1971) tarafından bildirilen yöntem izlendi. Bu amaçla taze yaprak diskleri 0,1 M fosfat tampon (20 mM KNO₃⁻ ve %5 propanol içerir) içeren test tüplerine aktarıldı ve karanlık ortamda 25°C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 0,4 mL alikot üzerine 0,3 mL %1 sülfanilamid ve %0,02 naftilendiamin dihidroklorür karışımı eklendi. 20 dakika sonra 0,4 mL deiyonize su ile seyreltilen numunelerin 540 nm'deki absorbansları mikropate spektrofotometre ile belirlendi. Nitrit oluşumu, bir NaNO₂ kalibrasyon grafiği (Şekil 3.9.) kullanılarak ölçüldü ve NR aktivitesi µmol NO₂⁻ g⁻¹ taze ağırlık saat⁻¹ olarak hesaplandı.



Şekil 3.9. NaNO₂ ile hazırlanan standart grafiği

Glutamin sentetaz (GS) ve glutamat dehidrojenaz (GDH) aktivitelerinin belirlenmesi için, taze yaprak dokusu 1 mmol L⁻¹ MgCl₂, 1 mmol L⁻¹ EDTA, 1 mmol L⁻¹ ditiotritol, 10 mmol L⁻¹ β-merkaptotanol, ve 0,5% PVP içeren 0,05 M Tris-HCl tamponunda (pH 7.6) homojenize edildi. Daha sonra ekstrakt, 20 dakika boyunca 20.000 rpm'de santrifülemeye tabi tutuldu. Elde edilen süpernatant solüsyonu GS ve GDH aktivitelerinin miktarının belirlenmesi için kullanıldı.

GS'nin aktivitesi, Agbaria ve ark. (1998) yöntemi izlenerek belirlendi. Bunun için 1 mM ADP, 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 7.2), 20 mM MgCl₂, 50 mM glutamin, 20 mM sodyum arsenat ve 13 mM hidroksilamin klorür içeren karışımının üzerine enzim ekstraktının eklenmesiyle reaksiyon başlatıldı ve 30 dakika süreyle 30°C'de inkübe edildi. Enzim ekstraktı ve ADP dışındaki tüm reaktiflerle hazırlanan tüpler kontrol olarak kullanıldı. Daha sonra üzerine, 3 mL 200 mM FeCl₃, 0,5 M HCl ve 240 mM TCA karışımı eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Proteinin çöktürülmesi için tüplerdeki içerik 3.000 g'de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj işleminin ardından karışımın 540 nm'deki absorbansı mikropate spektrofotometrede izlendi.

GDH enzim aktivitesi için Groat ve Vance (1981) tarafından bildirildiği gibi 340 nm'de NADH'nin oksidasyonu gözlemlenerek yapıldı. NADH-GDH aktivitesinin belirlenmesi için 100 mM Tris-HCl tamponu (pH 8.0), 11 mM 2-oksooglutarik asit, 200 µM NADH, 0,1 M NH₄Cl ve enzim ekstraktı içeren reaksiyon karışımı oluşturuldu. Kör için NH₄Cl içermeyen tam bir reaksiyon karışımı alındı. Reaksiyon

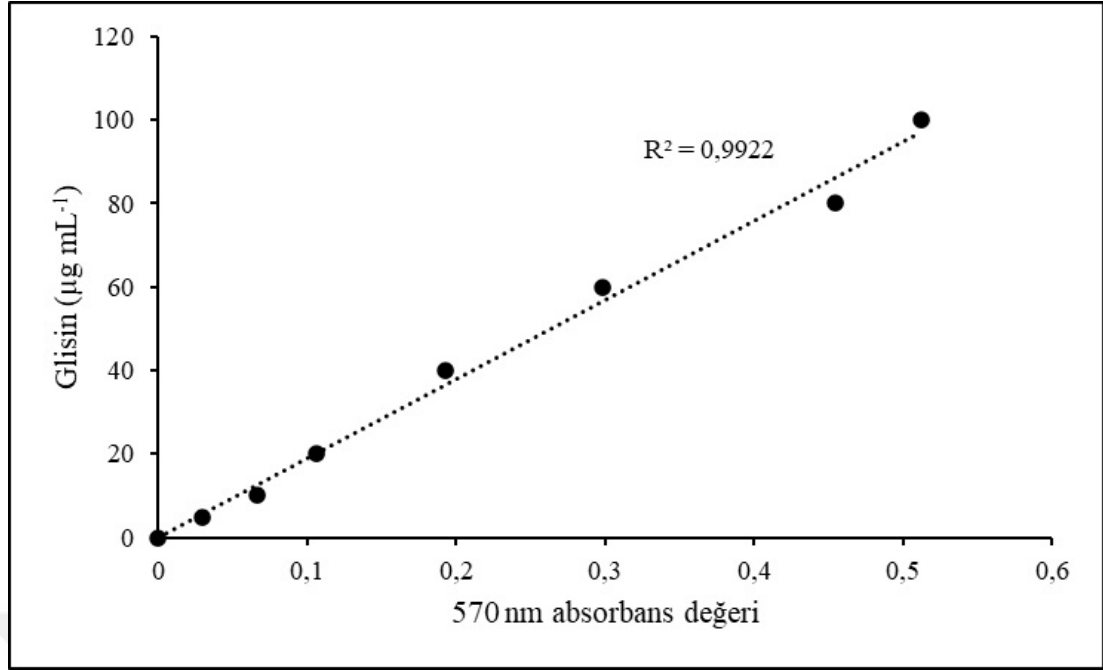
NADH eklenerek başlatıldı ve NADH'nin 340 nm'de oksidasyonu 5 dakika boyunca takip edildi. Enzim aktivitesi NADH'nin 340 nm'deki yok olma katsayısı ($6,3 \times 10^3$ L mol/cm) kullanarak hesaplandı.

GOGAT aktivitesi Groat ve Vance'in (1981) protokolüne göre ölçüldü. Bunun için taze yaprak doku 10 mM KCl, 2 mM EDTA, 1 mM fenilmetilsülfonil florür, 14 mM β -merkaptoetanol ve 3,6 M etilen glikol içeren 50 mM potasyum fosfat tamponunda (pH 7.5) homojenize edildi. Daha sonra, örnek karışımı 20,000 rpm'de 20 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından 0.1 M potasyum fosfat tamponu (pH 7.5), 10 mM glutamin, 150 μ M NADH, 5 mM 2-oksooglutarik asit ve enzim ekstraktı içeren karışım hazırlandı. Reaksiyon NADH eklenerek başlatıldı ve absorbanslar 5 dakika boyunca 340 nm'de izlendi. Enzim aktivitesi NADH'nin 340 nm'deki yok olma katsayısı ($6,3 \times 10^3$ L mol/cm) kullanarak hesaplandı.

3.2.10. Toplam serbest amino asitler, nitrat (NO₃⁻) ve amonyum (NH₄⁺) tayini

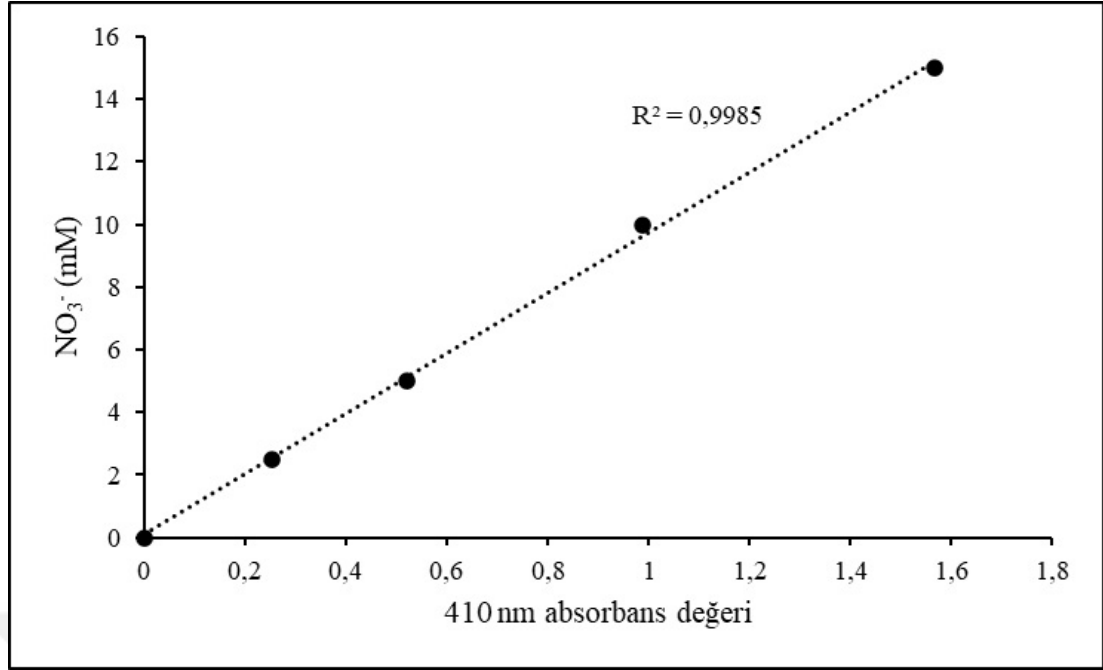
Taze bitki yaprakları, 45°C'de 10 mL su içinde 1 saat inkübe edildi. Daha sonra 5.000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilerek bitki parçacıkları içermeyen süzük elde edildi. Santrifüjlenen numuneler, amino asitler, NO₃⁻ ve NH₄⁺ tayini için kullanıldı.

Toplam amino asitler Lee ve Takahashi (1966) tarafından bildirilen ninhidrin yöntemine göre ölçüldü. Bunun için 0,1 mL süpernatant üzerine 1,9 mL ninhidrin-glycerol-citrate tampon çözeltisi ilave edildi. Karışım 12 dakika boyunca kaynar suda bekletildikten sonra oda sıcaklığında musluk suyu banyosunda soğutuldu. Soğuyan tüpler çalkalandı ve 570 nm'deki absorbanları mikropate spektrofotometre ile belirlendi. Toplam amino asitler glisin ile hazırlanan standart grafik (Şekil 3.10.) ile hesaplandı ve sonuçlar mg g⁻¹ taze ağırlık olarak sunuldu.



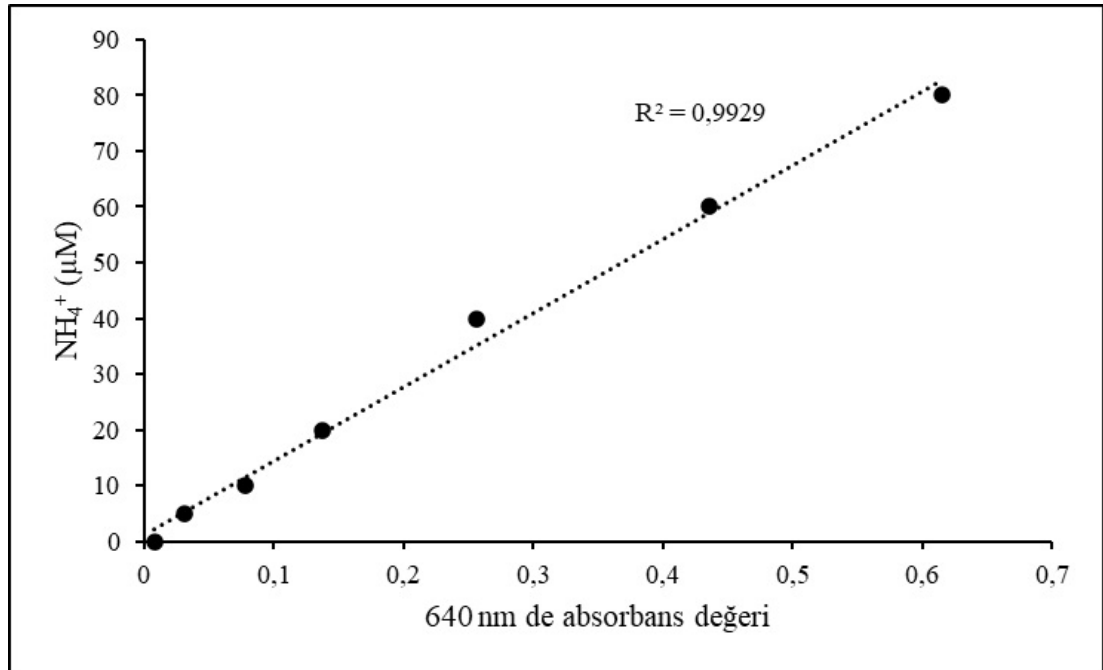
Şekil 3.10. Glisin ile hazırlanan standart grafiği

Yaprakların NO_3^- konsantrasyonunun ölçümü için Cataldo ve ark. (1975) tarafından bildirilen prosedür takip edildi. Bu amaçla 200 µL süzük üzerine 800 µL %5 salisilik asit ilave edilerek iyice karışması amacıyla hafifçe çalkalandı ve oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildi. Ardından 19 mL 2 N NaOH çözeltisi hafifçe çalkalanarak ilave edildi ve örnekler oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletildikten sonra 410 nm dalga boyuna ayarlı mikropate spektrofotometrede okundu. Sonuçlar potasyum nitrat (KNO_3) ile hazırlanan standart grafik (Şekil 3.11.) ile hesaplandı ve sonuçlar mg g^{-1} taze ağırlık olarak sunuldu.



Şekil 3.11. KNO_3 - ile hazırlanan standart grafiği

Yaprakların NH_4^+ konsantrasyonunu belirlemek için fenol tipi kolorimetrik yöntem kullanıldı (Husted ve ark., 2000). Bu amaçla 800 μL doku özütü, 100 μL fenol çözeltisi (11 mM), 100 μL sodyum nitroprussit çözeltisi (1,7 mM) ve 250 μL oksitleyici çözelti ile karıştırıldı. Karışım karanlıkta 25°C'de 60 dakika bekletildikten sonra 640 nm'deki absorbansları UV mikroplate spektrofotometrede ölçüldü. Sonuçlar amonyum sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ile hazırlanan standart grafik (Şekil 3.12.) ile hesaplandı ve sonuçlar mg g^{-1} taze ağırlık olarak sunuldu.



Şekil 3.12. (NH₄)₂SO₄ ile hazırlanan standart grafiği

3.2.11. Nikel'in hücresel dağılımının belirlenmesi

Hücre altı dokularını çıkarmak için Liu ve ark. (2009) tarafından bildirilen prosedür uygulandı. Bunun için yaprak ve kök örnekleri 0,05 M Tris-HCl (pH 7.5), 0,25 M sukroz ve 1 mM DL-ditiyoeritritol içeren ekstraksiyon tamponunda homojenize edildi. Homojenat santrifüj tüpüne aktarıldı ve 300 g'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüj işlemi sonunda pelet hücre duvarı fraksiyonu olarak alındı ve süpernatant yeni bir tüpe aktarılarak hücre organellerinin çöktürülmesi için 2000 g'de 45 dakika daha santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonunda pelet organel fraksiyonu ve süpernatant çözelti ise çözünür fraksiyon olarak adlandırıldı. Daha sonra bu dokular, 220°C'de 2 saat boyunca HNO₃-HClO₄-HF karışımında ısıtıldı. Fraksiyonlardaki Ni konsantrasyonları ICP-OES kullanılarak analiz edildi (Chen ve ark., 2016).

3.2.12. Ağır metal, azot (N), fosfor (P) ve potasyum tayini (K)

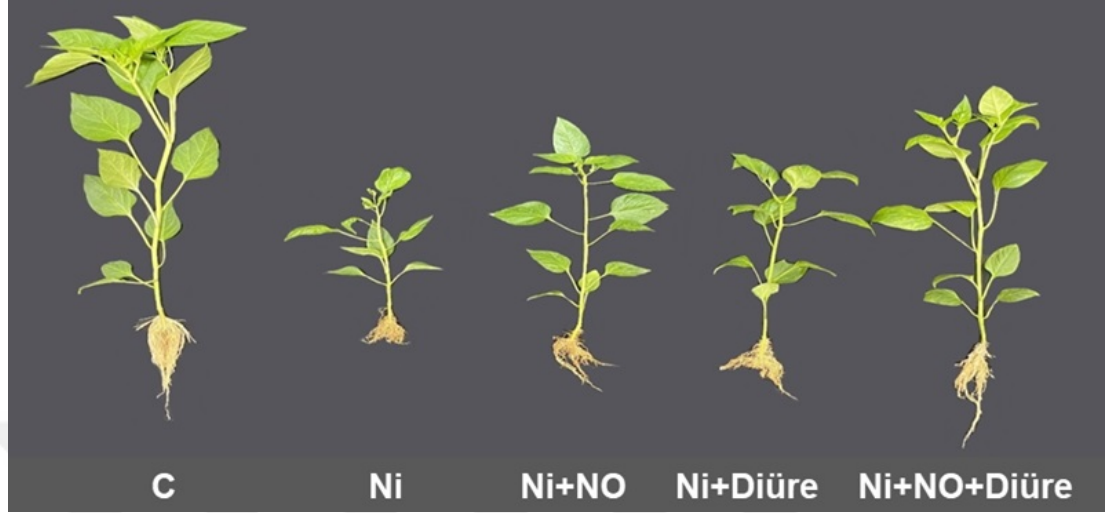
Kurutulmuş yaprak ve kök örnekleri öğütme işleminin ardından perklorik ve sülfürik asit 4:1 (v/v) karışımı ile sindirildi. Yaprak ve kök P içeriği, vanadomolibdofosforik sarı renk yöntemi kullanılarak analiz edildi. Yaprak ve köklerin ağır metal ve K içeriği Inductively Coupled Plasma (ICP, Perkin Elmer) cihazında belirlenmiştir. Yaprak ve kök N içerikleri, bitki dokusunun sülfürik asit içinde sindirilmesini, ardından sodyum hidroksit ile damıtmayı ve standardize asit ile titrasyon yapılmasını içeren Kjeldahl tekniği kullanılarak belirlendi.

3.2.13. İstatistiksel analiz

Veriler, anlamlılığı belirlemek amacıyla SPSS sürüm 21.0 kullanılarak ANOVA ile analiz edildi. Uygulamalar arasındaki anlamlı farklılıkları belirlemek için Duncan's multiple range testi uygulandı.

4. BULGULAR

4.1. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının bitki toleransına etkisi



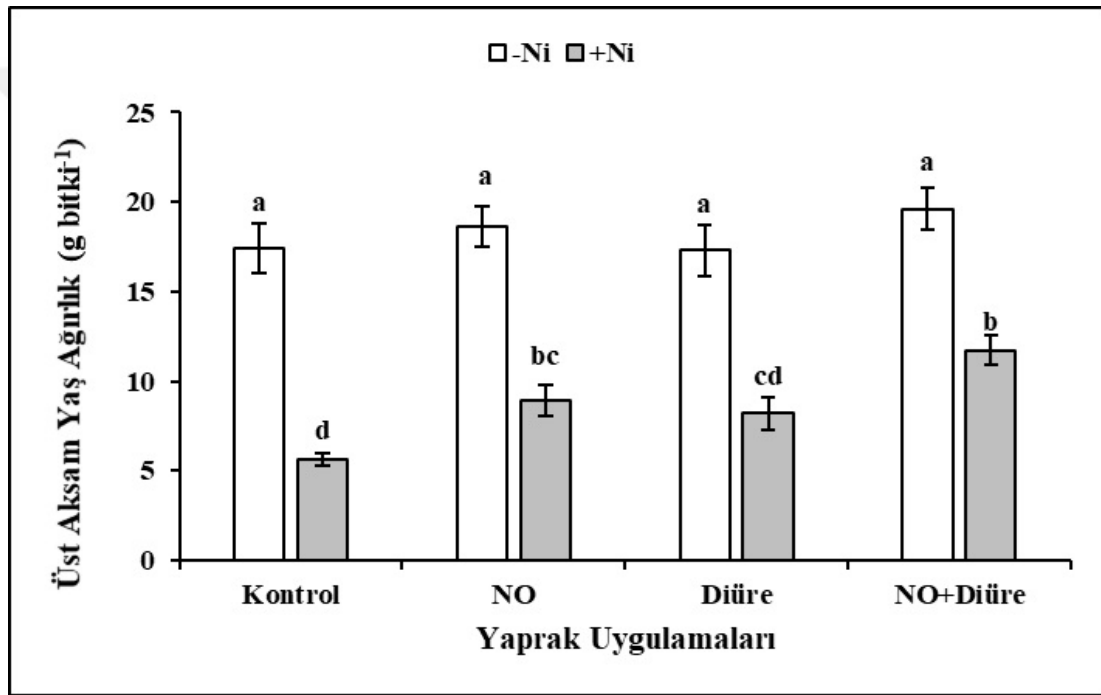
Şekil 4.1. Ni toksisitesine maruz kalan biber fidelerinin fenotipik görünümü

Ni toksisitesi, büyümenin durmasına, yaprak boyutu ve şeklindeki değişikliklerin yanı sıra deformasyonların gelişmesine neden oldu. Bununla birlikte, NO ve diüre'nin ayrı ayrı veya birlikte yapraktan uygulanması, bitkilerde Ni toksisitesinin olumsuz etkilerini azalttı (Şekil 4.1.). NO ve diüre uygulamasının, yüksek Ni konsantrasyonlarının varlığında bile bitki büyümesini teşvik ettiği, Ni toksisitesinin olumsuz etkilerini en aza indirmeye yönelik etkili yaklaşımlar olarak potansiyel taşıdığı bulunmuştur.

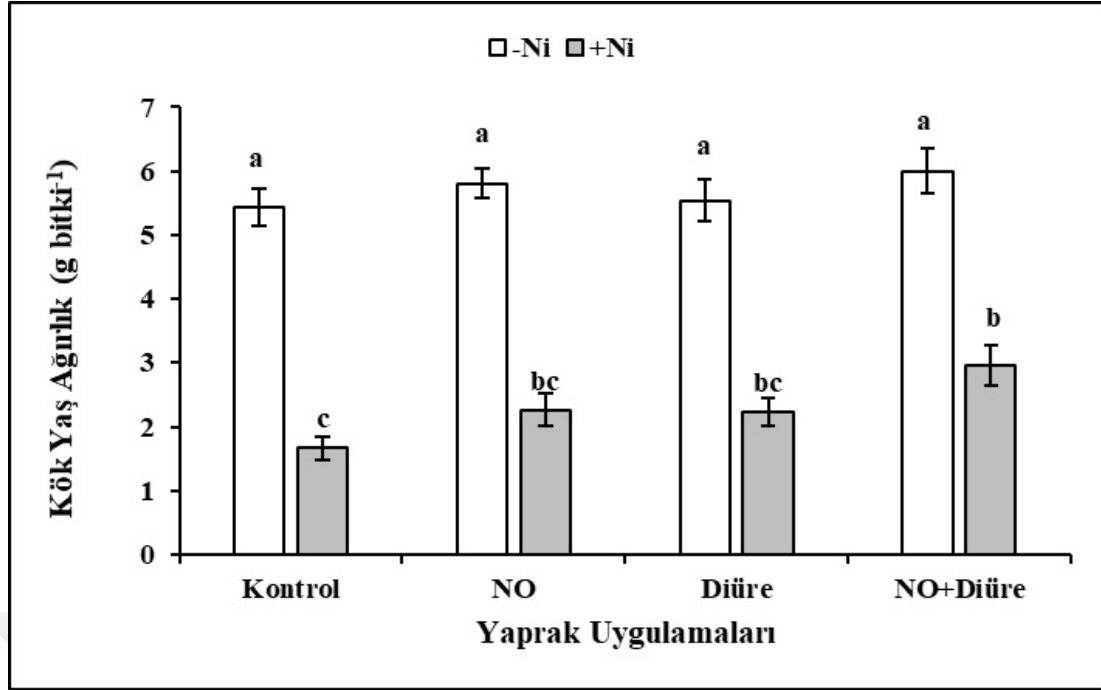
Ni stresine maruz kalan biber bitkilerine yapraktan NO ve diüre uygulamalarının üst aksam ve kök yaş ağırlığına etkisi Şekil 4.2 ve 4.3.'te sunulmuştur. Ni toksisitesi biber bitkilerinin üst aksam ve kök yaş ağırlığını sırasıyla %67 ve %69 oranında düşürdü. Ni stresli bitkilerin NO ve diüre ile muamelesi azalan bu parametreleri önemli düzeyde iyileştirdi. En verimli sonuçlar bu iki kimyasalın birlikte uygulanması ile elde edildi. Ni koşullarındaki biber bitkilerine NO+diüre uygulaması yalnızca Ni ile muamele edilen bitkilere kıyasla bu özellikleri sırasıyla %108 ve %78 oranında arttırdı. NO ve diürenin Ni stresi olmadan birlikte uygulanması, kontrole kıyasla sürgün ve kök taze ağırlığında sırasıyla %12,6 ve %10 oranında artışa yol açtı.

Ni toksisitesi koşullarında biber bitkilerine yapraktan NO ve diüre uygulamalarının üst aksam ve kök kuru ağırlığına etkisi Şekil 4.4 ve 4.5.'te sunulmuştur. Ni stresi biber bitkilerinin üst aksam ve kök kuru ağırlığını sırasıyla

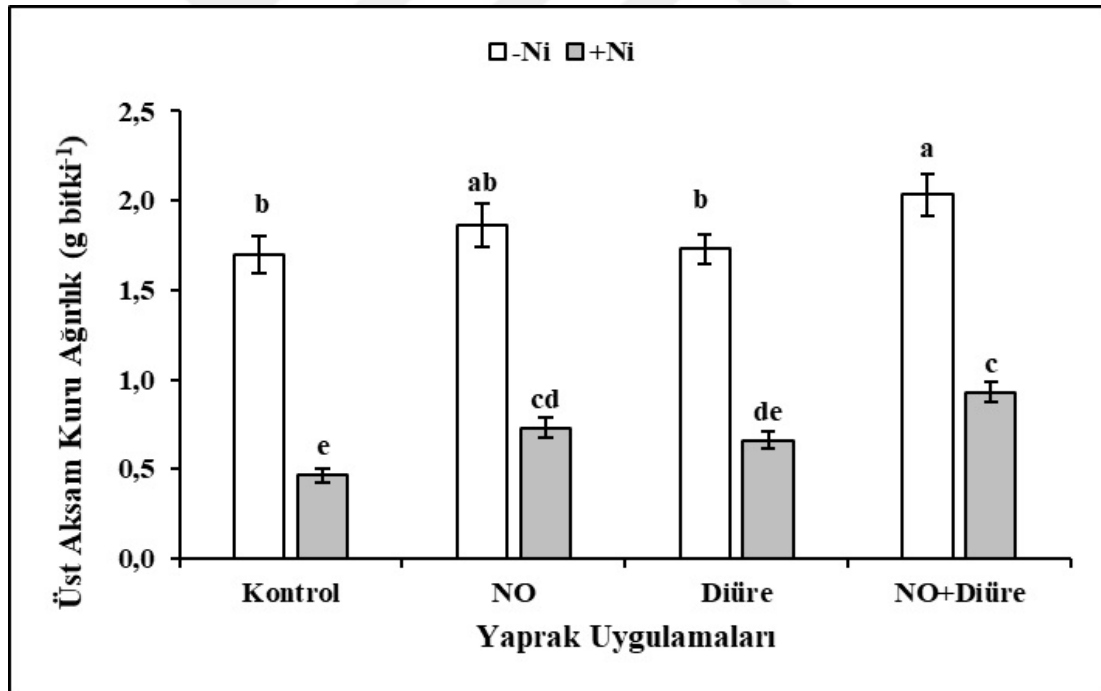
%73 ve %62 oranında düşürdü. NO ve diüre muamelesi Ni nedeniyle baskılanan biyomas verimini iyileştirdi. Ancak Ni toksisitesi koşullarında maksimum değerler NO ve diürenin kombinasyonunda elde edildi. NO ve diürenin kombinasyonunun uygulanması, yalnızca Ni muamelesi edilmiş bitkilerle karşılaştırıldığında, üst aksam ve kök kuru ağırlığı için sırasıyla %96 ve %41 oranında artışa yol açtı. Bu, Ni stresinin bitki büyümesi üzerindeki zararlı etkilerini azaltmada NO ve diüre arasında sinerjistik bir etki olduğunu gösterir. Ayrıca NO ve diürenin Ni stresi olmadan birlikte uygulanması, kontrole kıyasla sürgün ve kök biyokütlesinde sırasıyla %19 ve %4 oranında artışa yol açtı. Bu durum, bu bileşiklerin normal koşullarda bile bitki büyümesi üzerinde uyarıcı bir etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir.



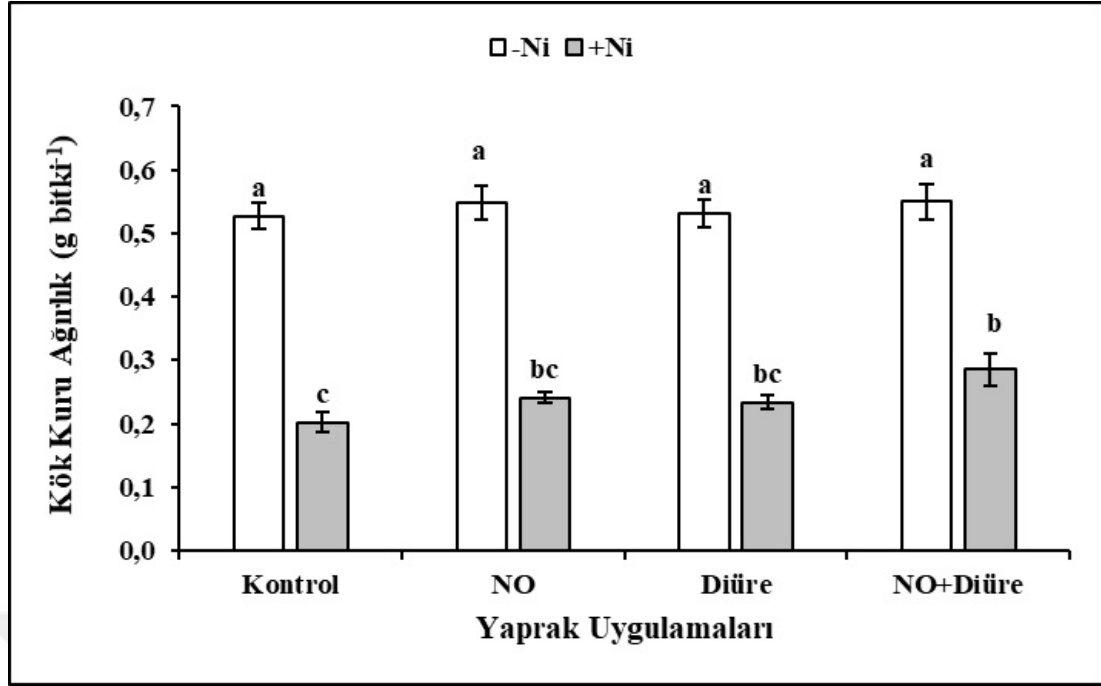
Şekil 4.2. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının üst aksam yaş ağırlığına etkisi



Şekil 4.3. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının üst aksam kuru ağırlığına etkisi

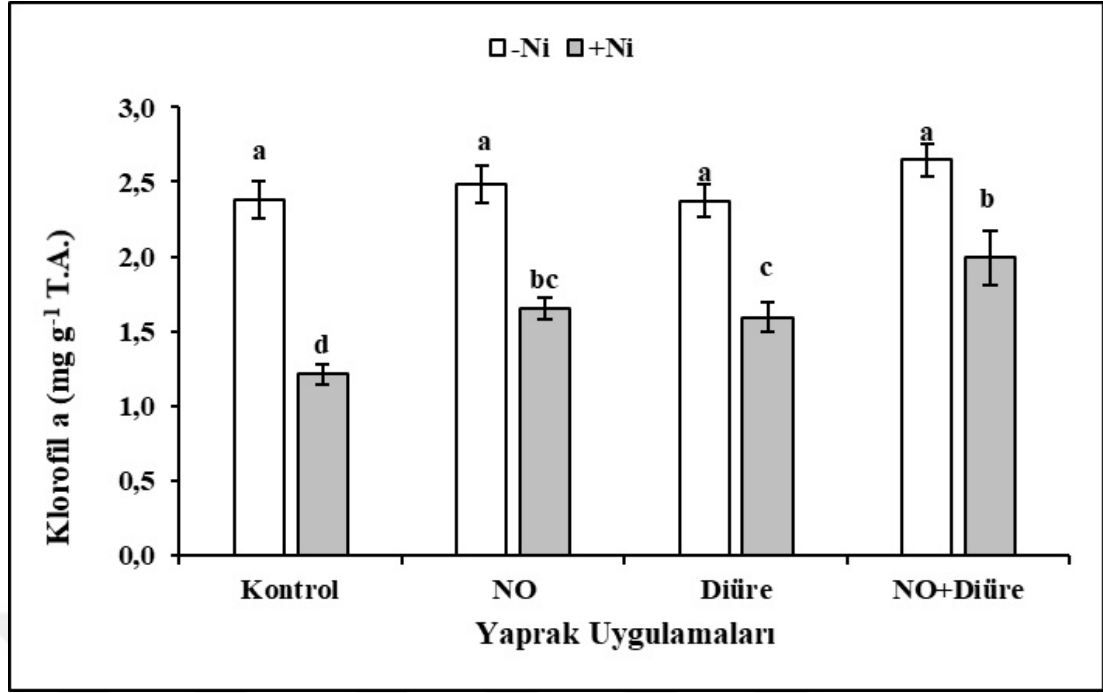


Şekil 4.4. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının üst aksam kuru ağırlığına etkisi

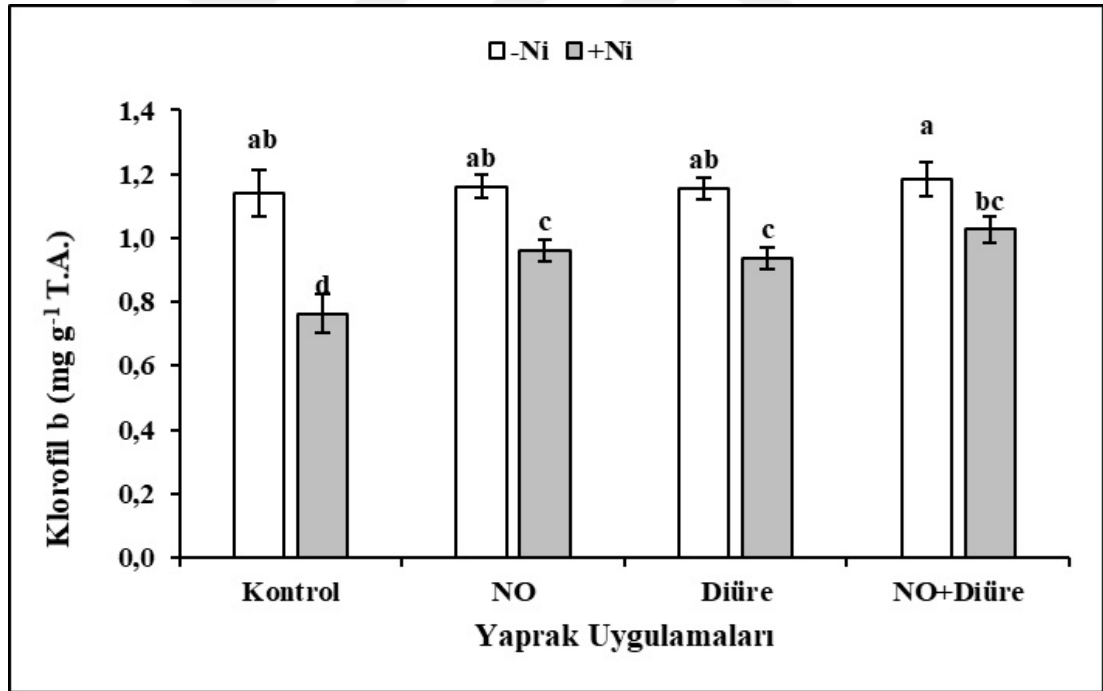


Şekil 4.5. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının kök kuru ağırlığına etkisi

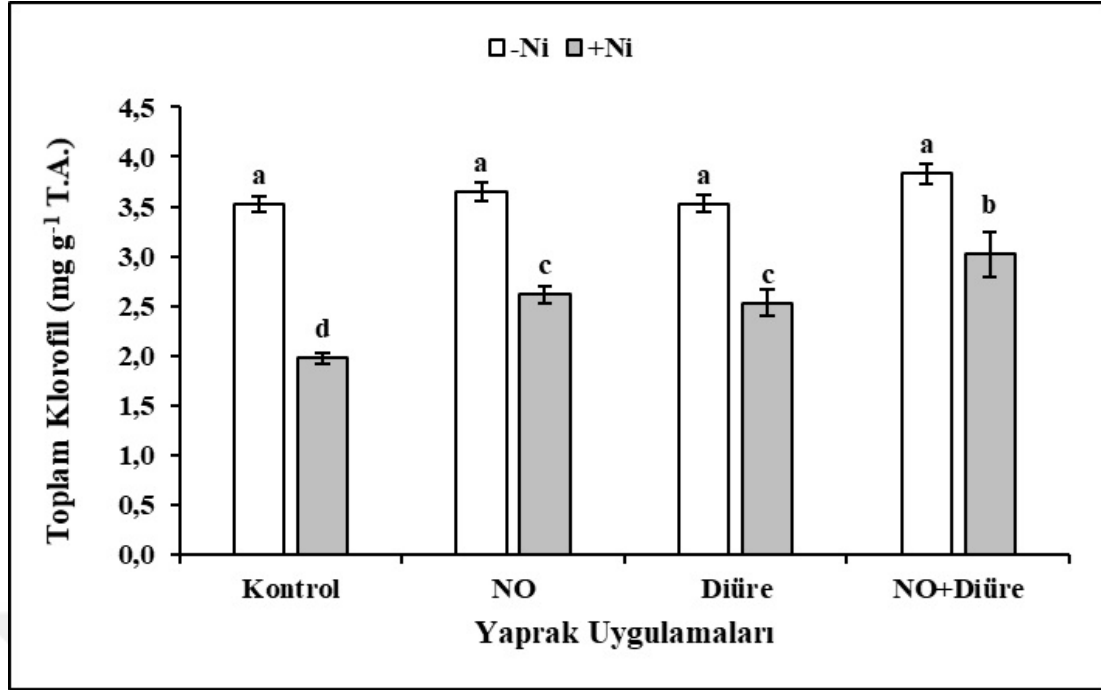
Nikel toksisitesi koşullarında yapraktan NO ve diüre uygulamalarının klorofil a, klorofil b, toplam klorofil, karotenoidler ve maksimum kuantum verimini (F_v/F_m) özelliklerine etkisini gösteren grafikler sırasıyla Şekil 4.6., Şekil 4.7., Şekil 4.8., Şekil 4.9. ve Şekil 4.10.'da sunulmuştur. Ni stresi, kontrole kıyasla klorofil a, klorofil b, toplam klorofil, karotenoidler ve F_v/F_m parametrelerini sırasıyla %49, %33, %44, %39 ve %23 azalttı. NO ve diürenin tek başına uygulanması Ni stresi altında fotosentetik pigment içeriği ve F_v/F_m değerlerinde artışa yol açtı. Ni stresi altında en verimli sonuçlar NO ve diüre kombinasyonunda elde edildi. Spesifik olarak, bu kombinasyon, yalnızca Ni ile muamele edilmiş bitkilerle karşılaştırıldığında ilgili özelliklerde %64, %35, %53, %65 ve %24'lük artışlara yol açtı. Ni stresi olmadan NO+diüre uygulaması bu parametreleri önemli ölçüde değiştirmede.



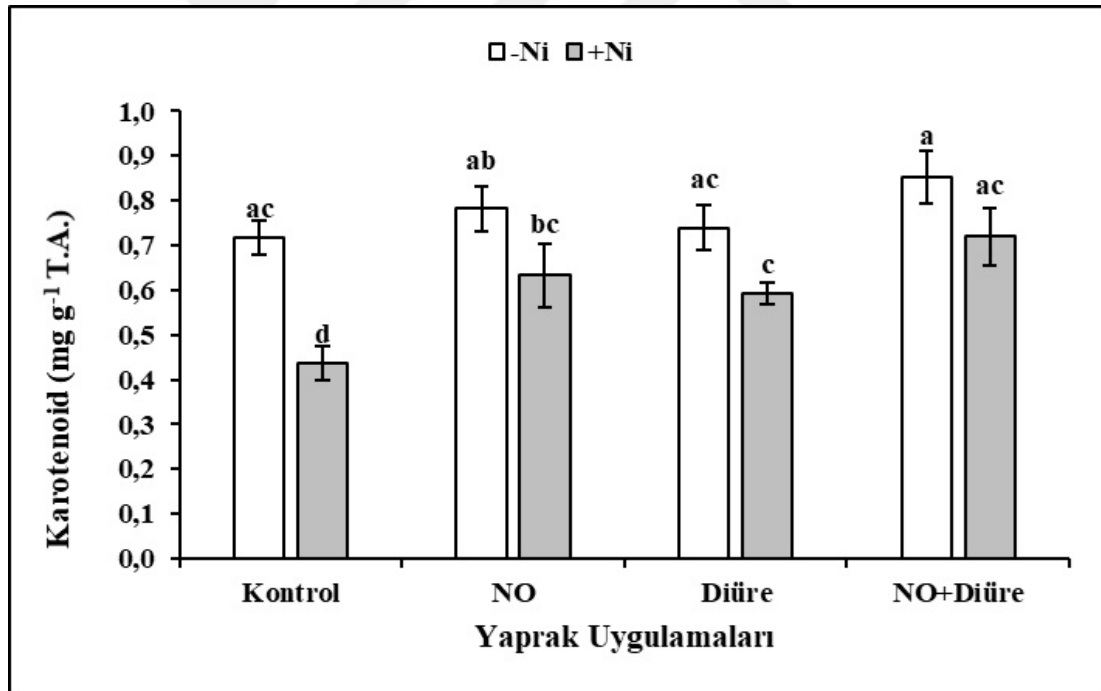
Şekil 4.6. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının klorofil a içeriğine etkisi



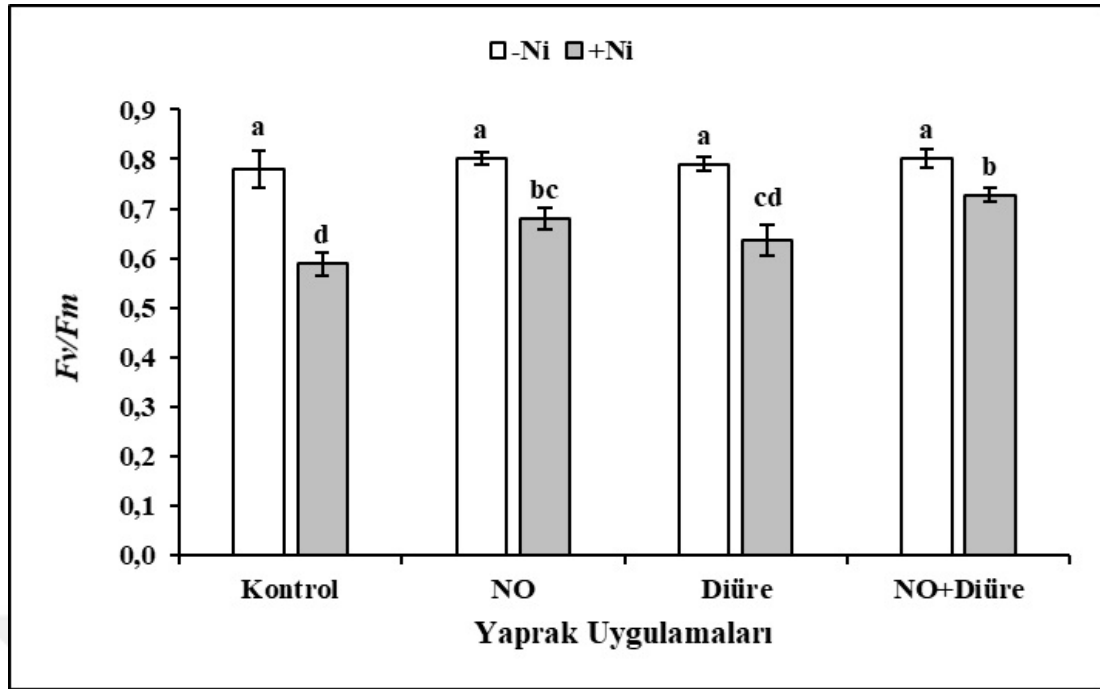
Şekil 4.7. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının klorofil b içeriğine etkisi



Şekil 4.8. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının toplam klorofil içeriğine etkisi



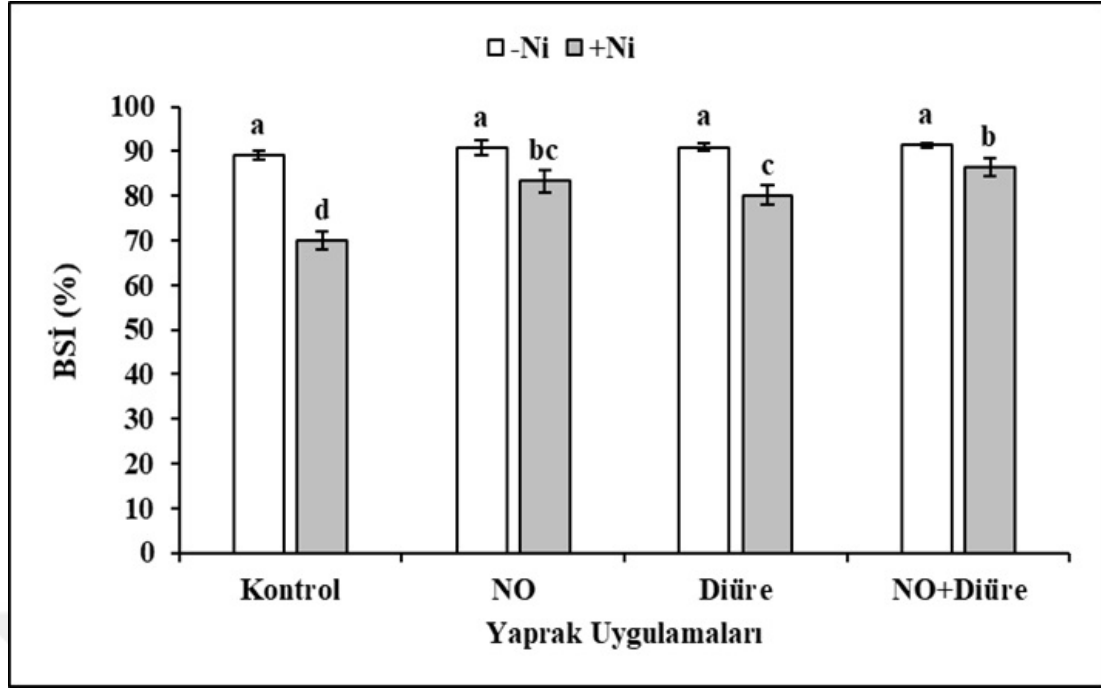
Şekil 4.9. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının karotenoid içeriğine etkisi



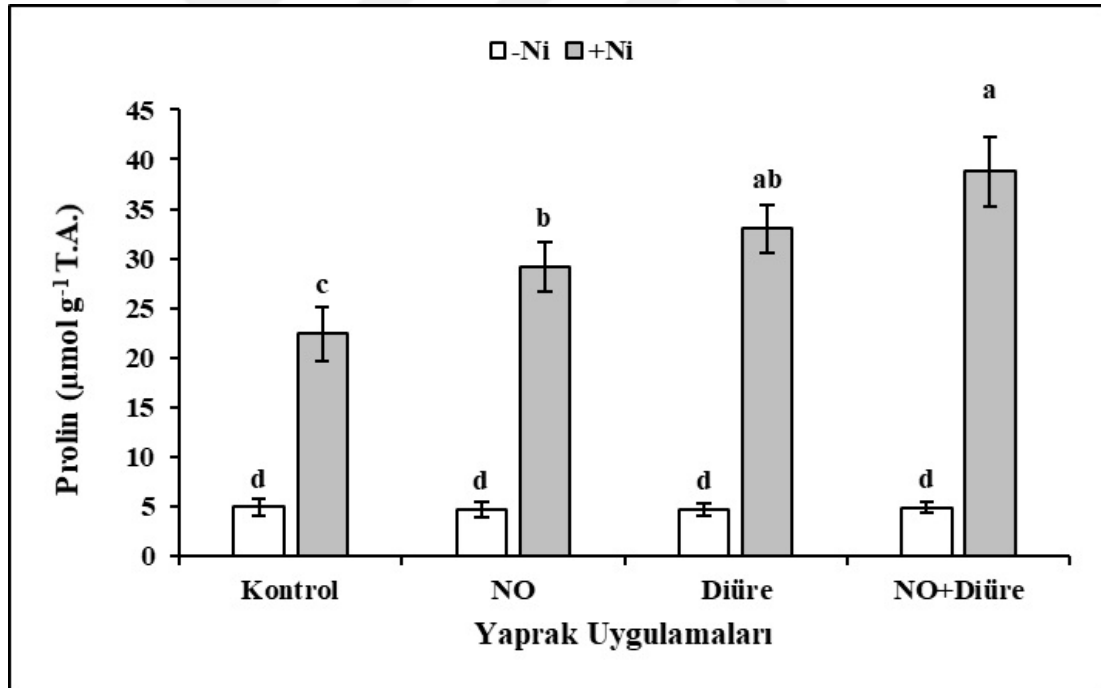
Şekil 4.10. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının maksimum kuantum verimine (Fv/Fm) etkisi

Farklı uygulamaların biber bitkilerinin yaprak bağıl su içeriğine (BSİ) etkisi Şekil 4.11.'de sunulmuştur. Ni'ye maruz kalan bitkilerin BSİ'si, maruz kalmayan bitkilere kıyasla %21 oranında azaldı. Ni stresine maruz kalan bitkilerde NO, diüre ve NO+Diüre uygulamaları, yalnızca Ni ile muamele edilmiş bitkilere kıyasla BSİ'yi sırasıyla %19, %15 ve %21 oranında iyileştirdi.

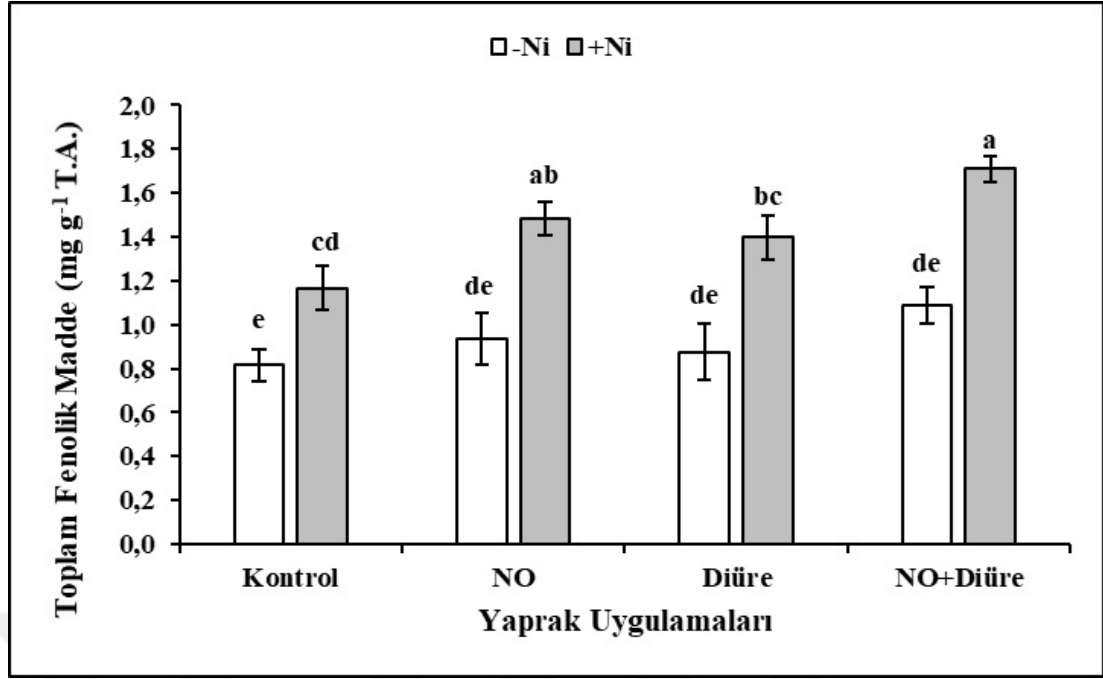
Ni stresi, NO ve diüre uygulamalarının prolin, fenolik madde ve toplam şeker içeriğine etkisi Şekil 4.12., 4.13., ve 4.14.'te sunulmuştur. Ni toksisitesi prolende 4,5 kat ve fenolik madde içeriğinde %43 oranında artışa yol açtı, ancak toplam çözünür şeker içeriğinde %47 oranında bir düşüşe yol açtı. Eksojen NO ve diürenin tek başına veya kombinasyonun uygulanması, Ni stresine maruz kalan bitkilerde prolin ve fenolik madde içeriğini iyileştirdi. Nikel stresli bitkilerde prolin, fenolik madde ve toplam çözünür şeker içeriği için maksimum değerler NO+Diüre uygulaması ile elde edildi. Spesifik olarak, NO+Diüre uygulaması, Ni toksisitesine maruz kalan bitkilerde prolini %73, fenolikleri %47 ve toplam şekeri %60 artırdı. NO+Diüre'nin Ni stresi olmayan bitkilere uygulanması, toplam şeker ve fenolik madde içeriğinde artışa yol açtı, ancak BSİ ve prolin içeriği önemli ölçüde değişmedi.



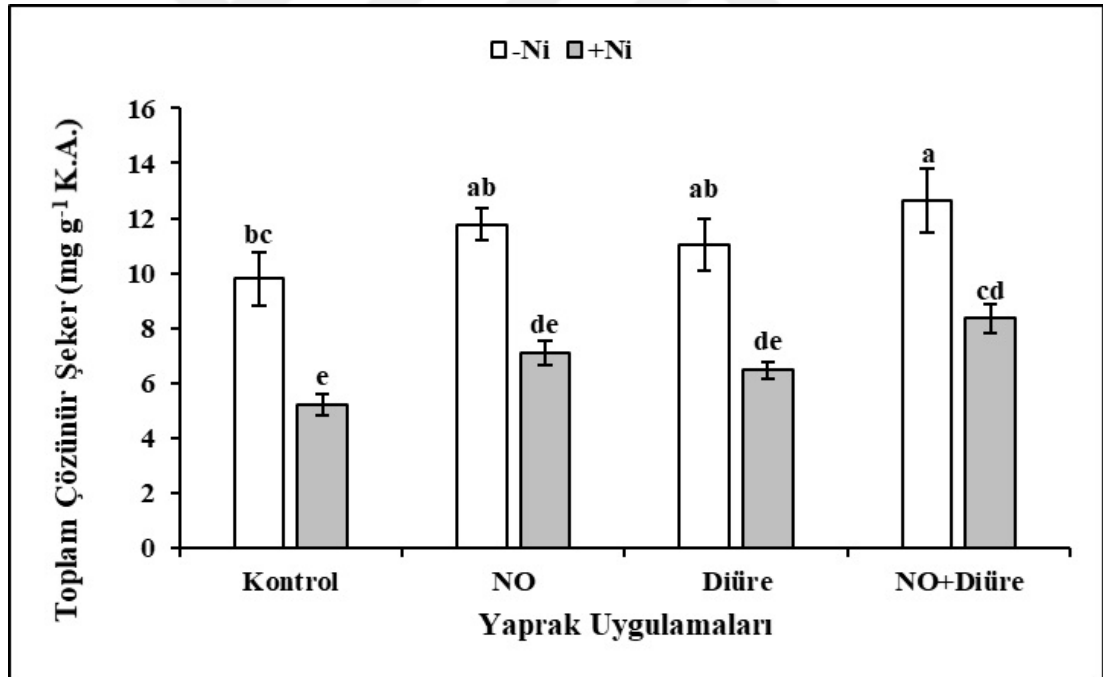
Şekil 4.11. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının yaprak bağıl su içeriğine (BSİ) etkisi



Şekil 4.12. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının prolin birikimine etkisi



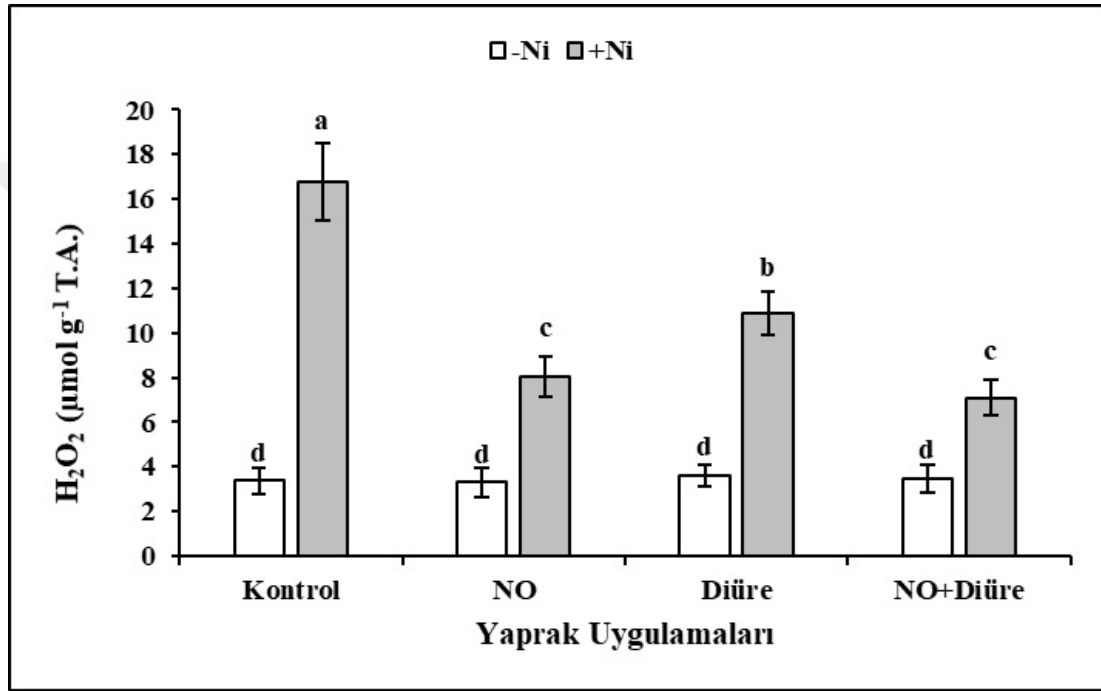
Şekil 4.13. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının toplam fenolik madde içeriğine etkisi



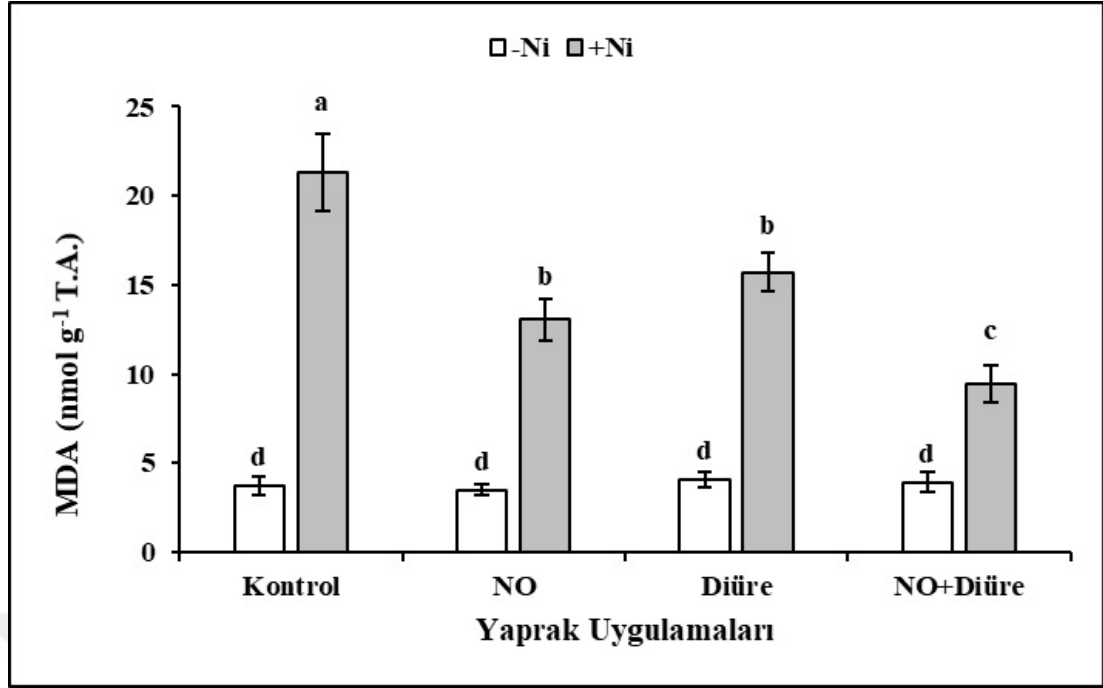
Şekil 4.14. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının toplam şeker içeriğine etkisi

Ni stresi altında NO ve diüre uygulamalarının oksidatif stresin önemli belirteçleri olan hidrojen peroksit (H_2O_2), malondialdehit (MDA) ve elektrolit sızıntısı (ES) değerlerine etkisini gösteren grafikler Şekil 4.15., Şekil 4.16. ve Şekil 4.17.'de sunulmuştur. Ni stresi, tedavi edilmeyen gruba kıyasla H_2O_2 , MDA ve ES

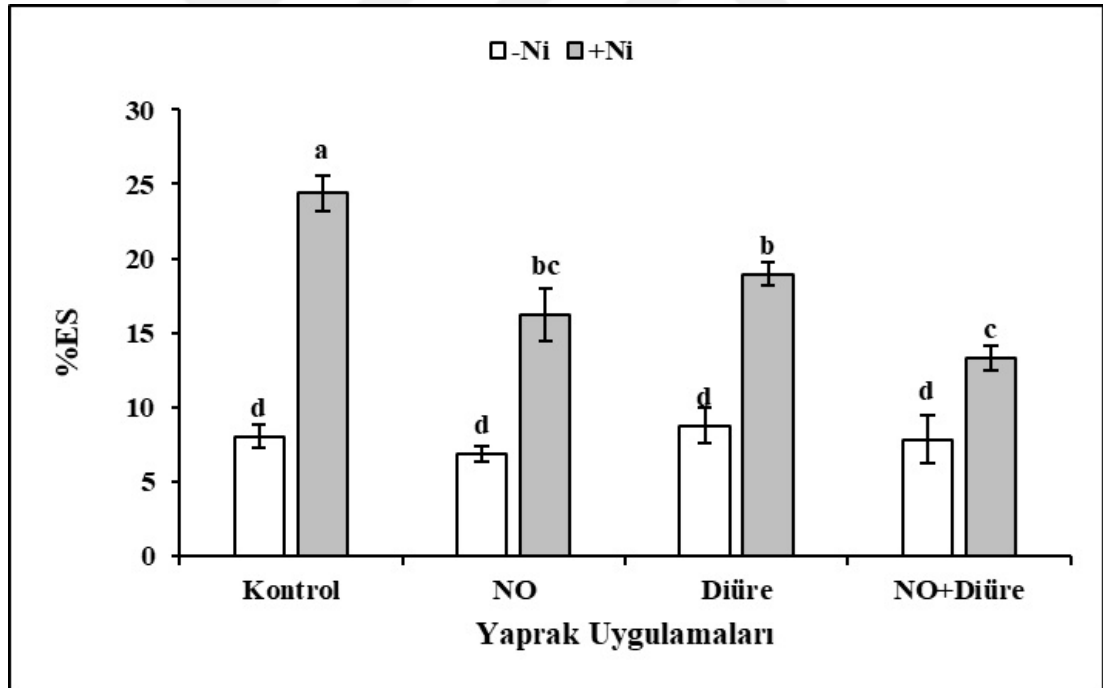
içeriğini sırasıyla %398, %471 ve %204 artırdı. Eksojen NO ve diüre takviyesi oksidatif stresle ilgili parametrelerde önemli bir düşüşle sonuçlandı. Ancak NO ve diüre kombinasyonu Ni'nin neden olduğu oksidatif stresi azaltmada daha etkili bulundu. NO ve diüre kombinasyonu Ni ile stres altındaki bitkilere püskürtüldüğünde, yalnızca Ni ile muamele edilen bitkilere kıyasla H_2O_2 , MDA ve ES'yi sırasıyla %58, %56 ve %46 oranında azalttı. Bu sonuçlar NO ve diürenin Ni stresi altında oksidatif stresin hafifletilmesinde sinerjistik bir etkiye sahip olduğunu gösterdi.



Şekil 4.15. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının hidrojen peroksit (H_2O_2) içeriğine etkisi



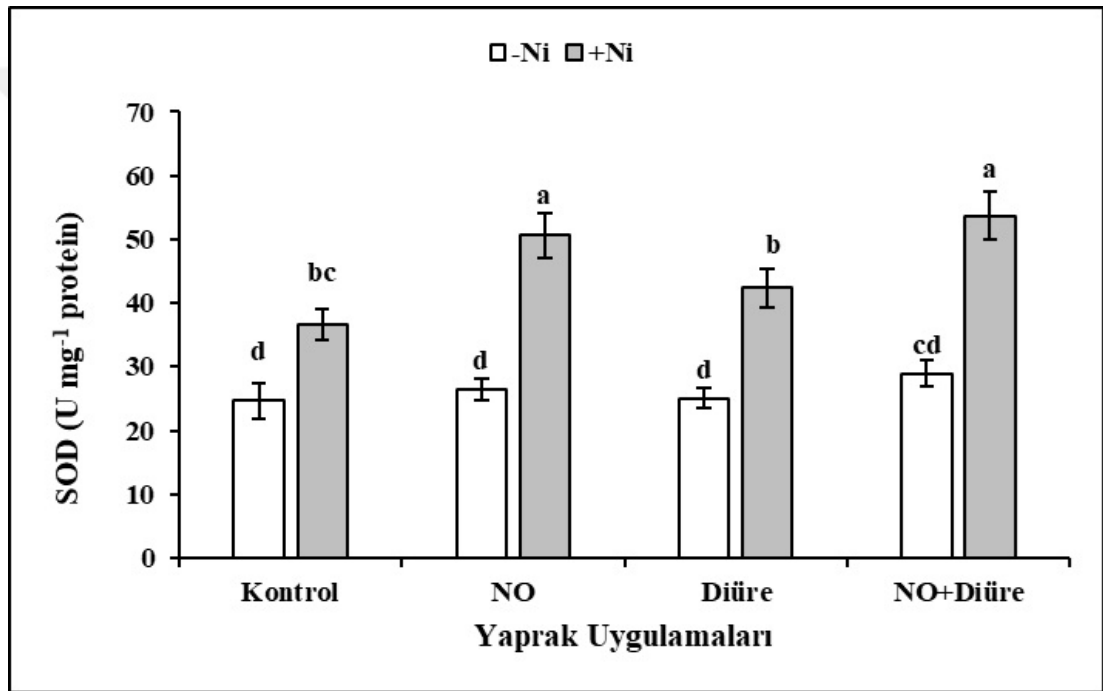
Şekil 4.16. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının malondialdehit (MDA) içeriğine etkisi



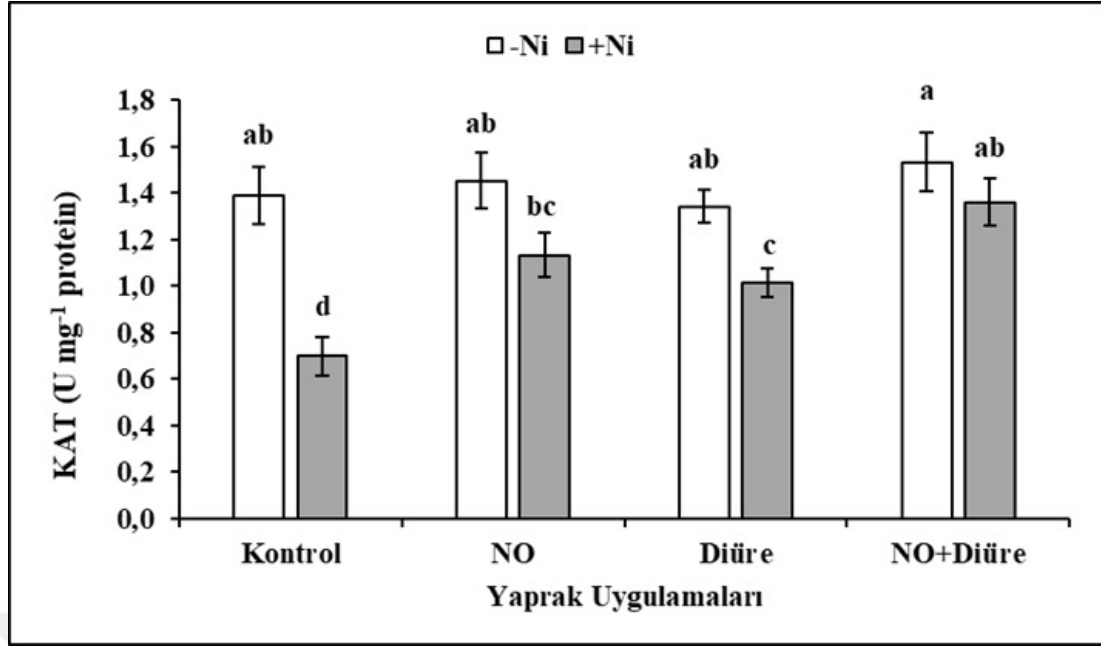
Şekil 4.17. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının elektrolit sızıntısı (ES) değerlerine etkisi

Ni stresi, NO ve diüre ile muamele edilen biber bitkilerinin süperoksit dismütaz (SOD), katalaz (KAT), askorbat peroksidaz (APOD) ve peroksidaz (POD) enzim aktivitelerine ilişkin sonuçlar sırasıyla Şekil 4.18., 4.19., 4.20. ve 4.21.'de grafikler halinde sunulmuştur.

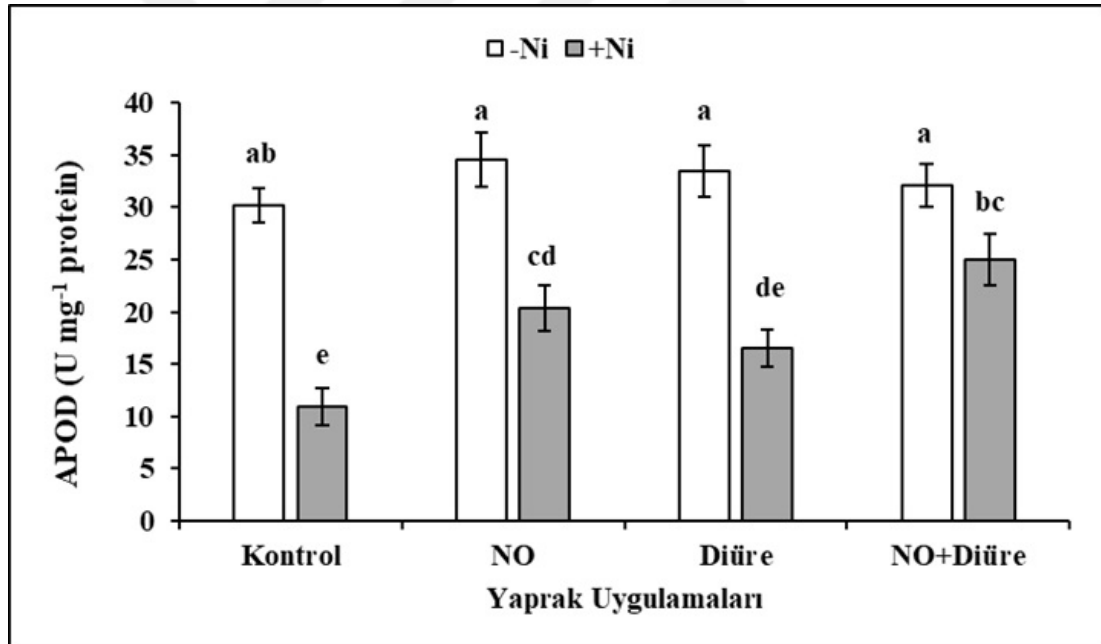
Ni stresi altında, SOD ve POD aktivitesi sırasıyla %49 ve %255 oranında artarken, KAT ve APOD aktivitesi sırasıyla %50 ve %64 oranında azaldı. NO'nun tek başına uygulanması, Ni stresli bitkilerde SOD, KAT, APOD ve POD enzim aktivitelerini önemli ölçüde artırdı. Bununla birlikte, tek başına diürenin eksojen takviyesi, Ni-stresli koşullar altında KAT enzimi dışındaki diğer enzim aktivitelerini önemli ölçüde değiştirmede. İki kimyasal (NO ve diüre) birlikte uygulandığında, bu enzimlerin aktivitesini, Ni toksisitesi yaşayan bitkilerde gözlemlenen seviyelerin daha yukarısına yükselttiler. SNP ve diürenin yapraktan uygulanması, Ni içermeyen koşullar altında bu enzim aktivitelerini önemli ölçüde değiştirmede.



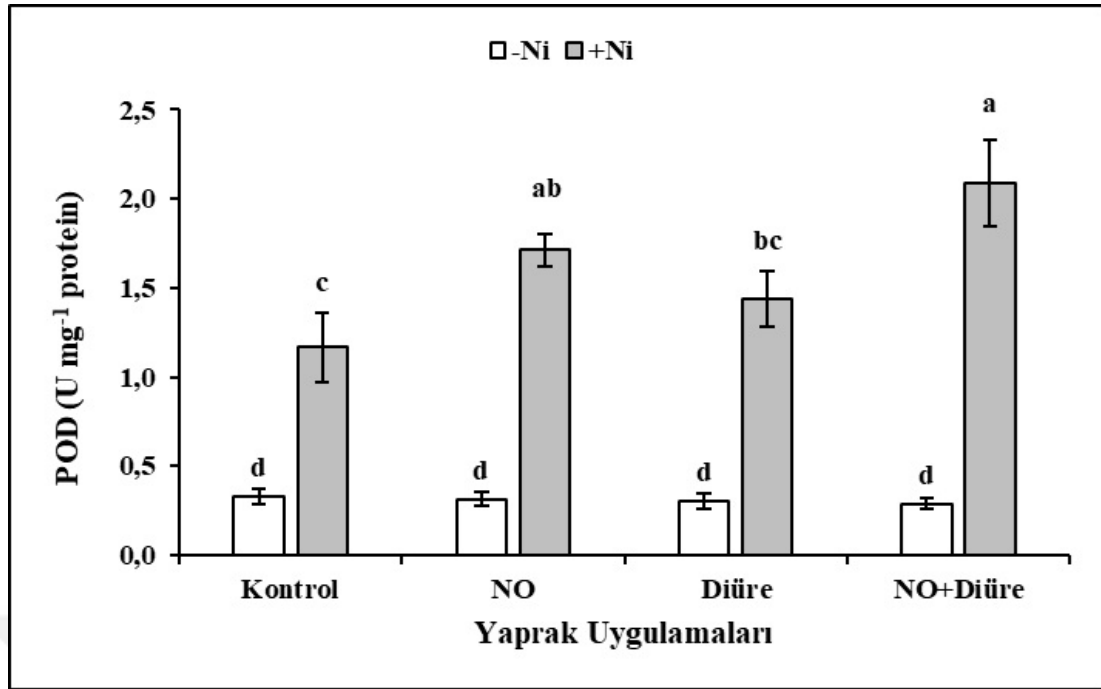
Şekil 4.18. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının süperoksit dismütaz (SOD) aktivitesine etkisi



Şekil 4.19. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının katalaz (KAT) aktivitesine etkisi



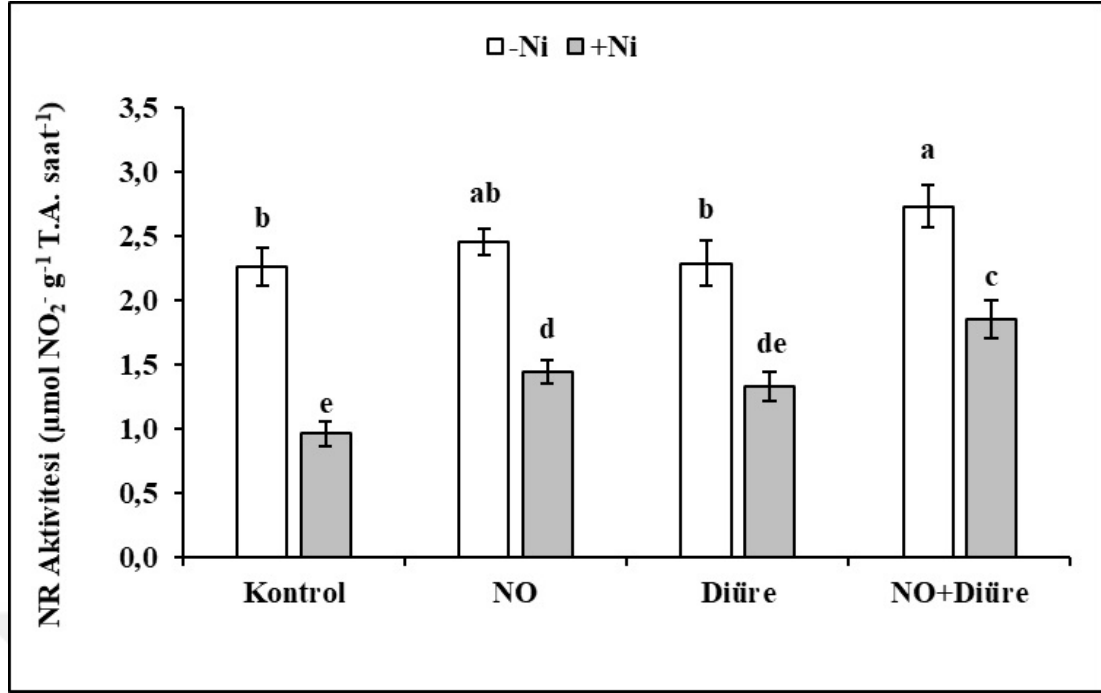
Şekil 4.20. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının askorbat peroksidaz (APOD) aktivitesine etkisi



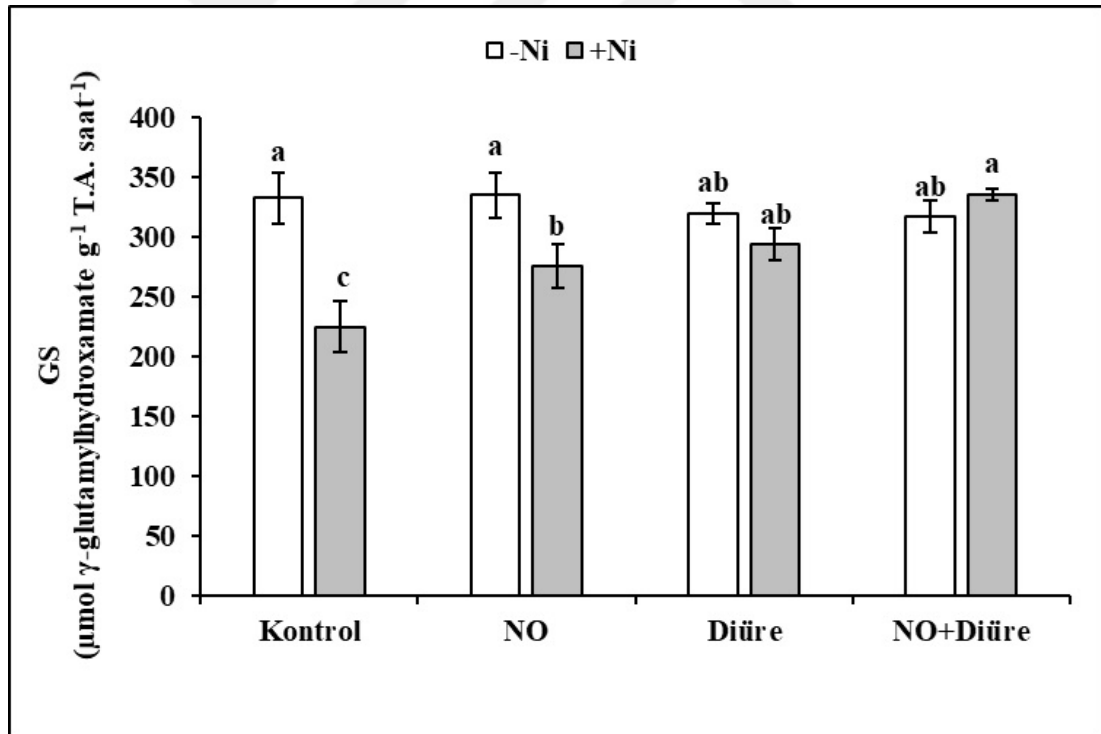
Şekil 4.21. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının peroksidaz (POD) aktivitesine etkisi

Ni stresi, NO ve diüre uygulamalarının nitrat redüktaz (NR), glutamin sentetaz (GS), glutamat sentaz (GOGAT) ve glutamat dehidrojenaz (GDH) enzimlerinin aktivitesine etkisine ilişkin sonuçlar sırasıyla Şekil 4.22., 4.23., 4.24. ve 4.25.'de grafikler halinde sunulmuştur.

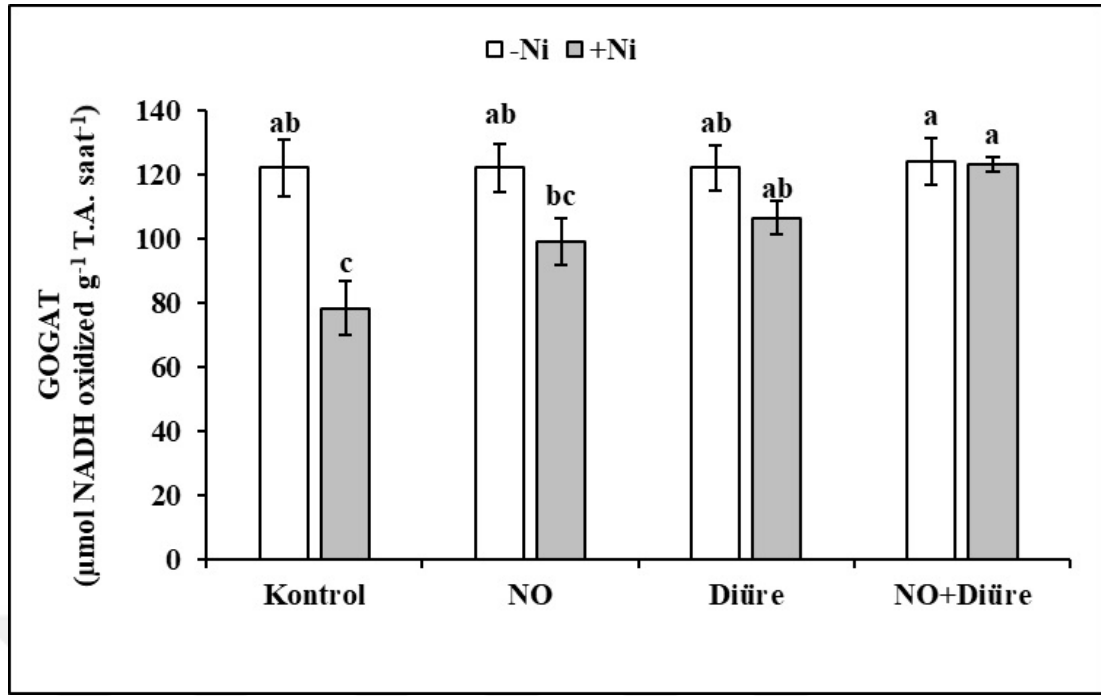
Ni stresi NR, GS, GOGAT ve GDH'nin aktivitesini sırasıyla %57, %32, %36 ve %38 oranında azalttı. NO'nun uygulanması, Ni stresinin neden olduğu NR ve GS aktivitelerinin azalmayı önemli ölçüde iyileştirmiştir. Diüre uygulaması, Ni tarafından baskılanan GS, GOGAT ve GDH aktivitelerini önemli ölçüde iyileştirmiştir. Ancak en etkili sonuçlar SNP ve diürenin birlikte uygulanmasıyla elde edilmiştir. NO+diüre'nin yaprağa uygulanması, Ni stresi altındaki bitkilere kıyasla NR, GS, GOGAT ve GSH aktivitelerinde sırasıyla %93, %49, %57 ve %62'lik bir artış ile sonuçlandı. Ni stresinin yokluğunda, NO uygulaması NR aktivitesini arttırdı, ancak tek başına diüre uygulamasının etkisi anlamlı değildi. En yüksek değerler NO ve diüre birlikte kullanıldığında elde edilmiştir.



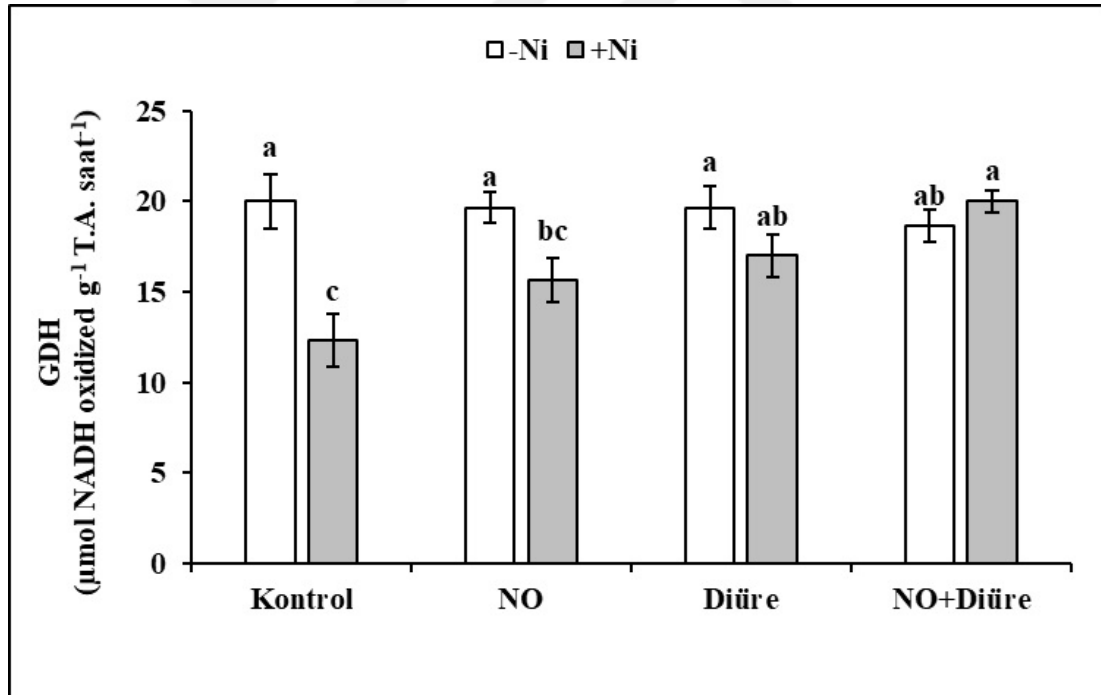
Şekil 4.22. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının nitrat redüktaz (NR) aktivitesine etkisi



Şekil 4.23. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının glutamin sentetaz (GS) aktivitesine etkisi



Şekil 4.24. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının glutamat sentaz (GOGAT) aktivitesine etkisi

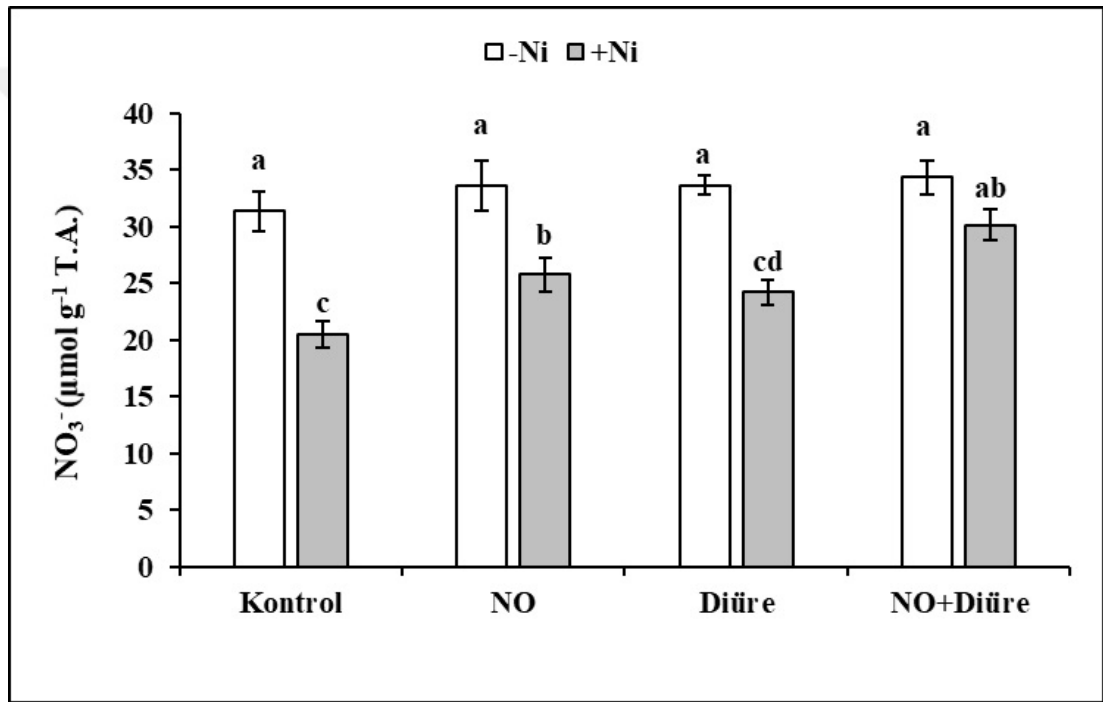


Şekil 4.25. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının glutamat dehidrojenaz (GDH) aktivitesine etkisi

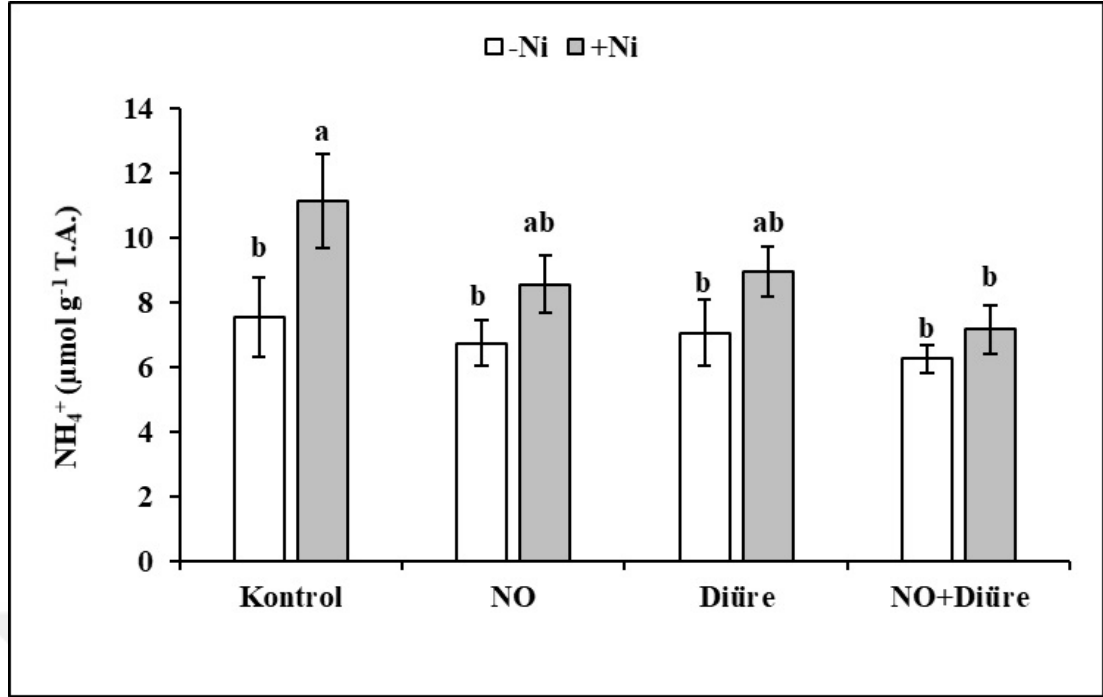
Farklı uygulamaların bitkilerin nitrat (NO_3^-), amonyum (NH_4^+), toplam amino asit (TAA) ve toplam çözünür protein içeriğine ilişkin sonuçlar Şekil 4.26., 4.27., 4.28., ve 4.29.'da sunulmuştur. Ni stresi NO_3^- içeriğinde %35 azalmaya ve NH_4^+ içeriğinde %48 artışa neden olmuştur. Ni stresli fidelerde NO veya diüre uygulaması,

NO_3^- içeriğinde artışa ve NH_4^+ içeriğinde azalmaya yol açmıştır. NO+Diüre uygulaması, Ni toksisitesi altında NO_3^- içeriğini %47 artırırken, NH_4^+ içeriğini %36 azaltmıştır. Ni toksisitesi koşullarında NO_3^- içeriğinde en büyük artış ve NH_4^+ içeriğinde en büyük azalma, NO+Diüre uygulaması ile elde edilmiştir.

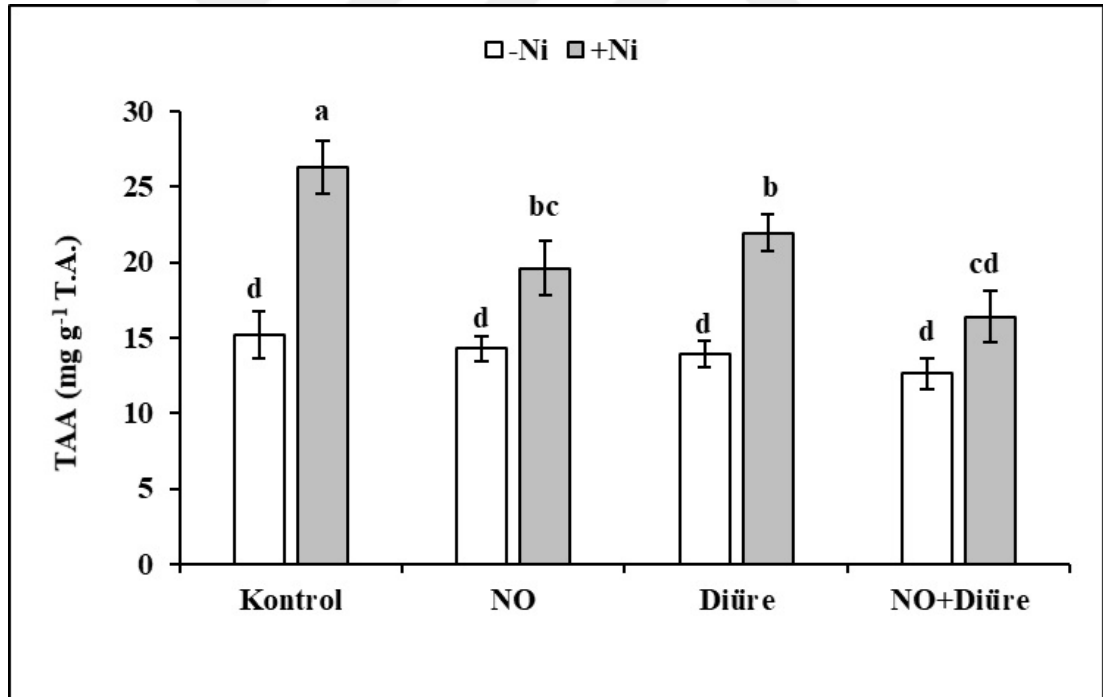
Kontrollere kıyasla, Ni toplam çözünür proteinini %50 azaltmış ve TAA seviyesini %73 artırmıştır. Biber bitkilerine NO veya diüre uygulaması, Ni stresi altında toplam çözünür protein içeriğinde artışa ve TAA içeriğinde azalmaya yol açmıştır. NO ve diürenin kombinasyonunun uygulanması Ni stresli fidelerde, toplam çözünür proteinini %66 artırırken TAA'yı %38 azaltmıştır.



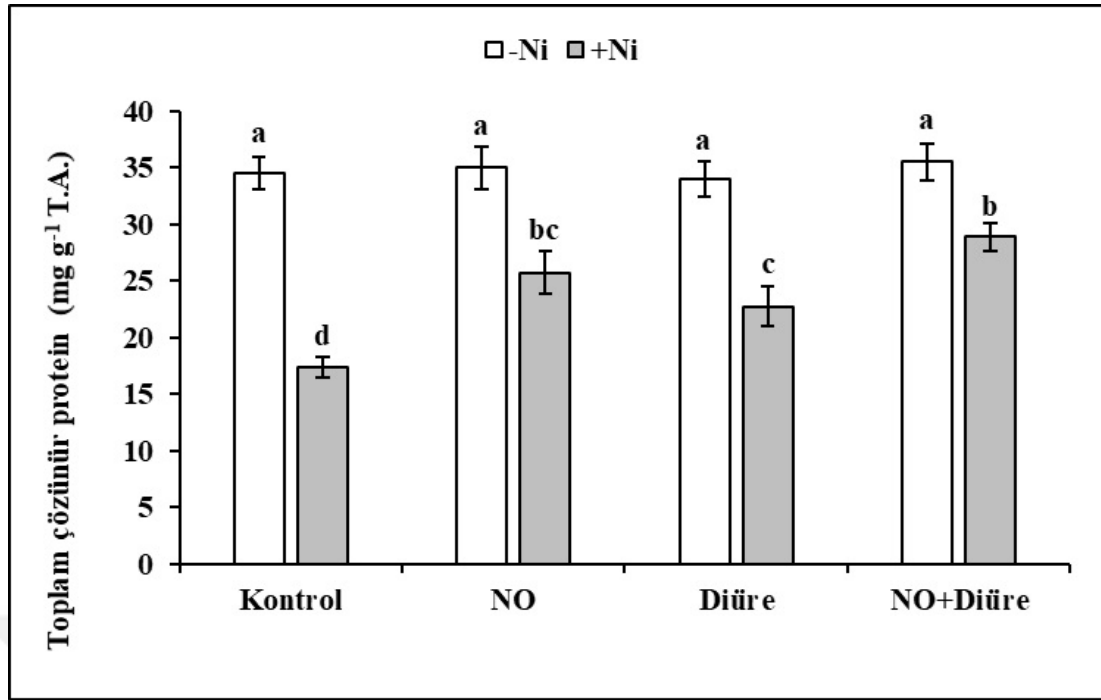
Şekil 4.26. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının yaprakların nitrat (NO_3^-) içeriğine etkisi



Şekil 4.27. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının yaprakların amonyum (NH₄⁺) içeriğine etkisi



Şekil 4.28. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının yaprakların toplam amino asit (TAA) içeriğine etkisi



Şekil 4.29. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının yaprakların toplam çözünür protein içeriğine etkisi

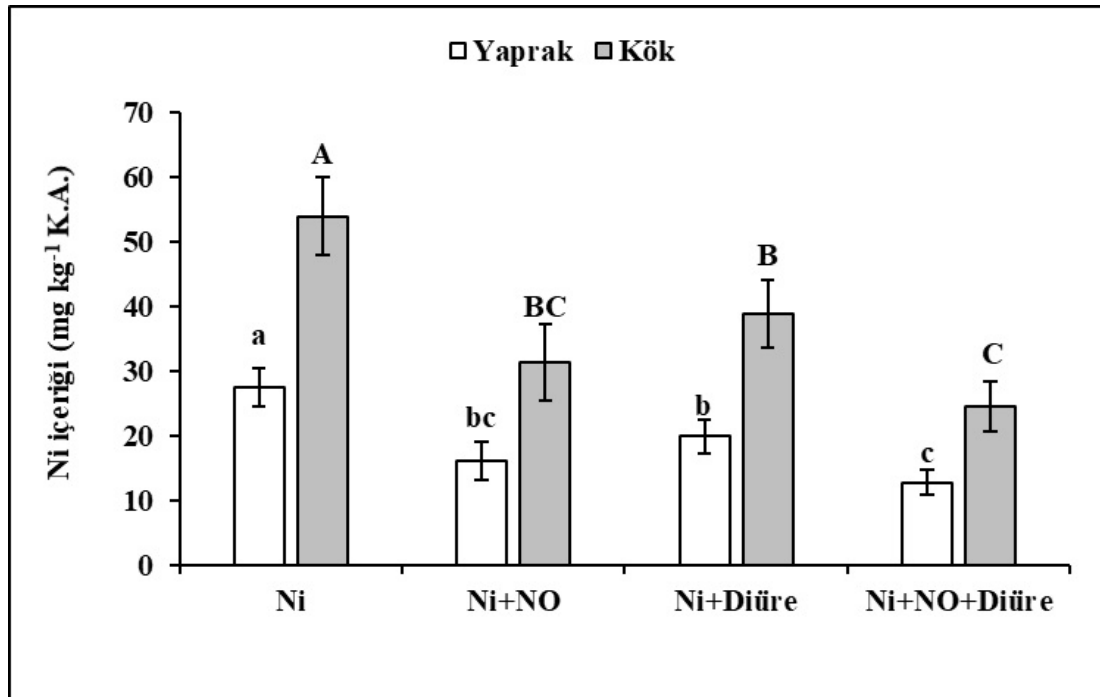
Biber fideleri Ni'ye maruz kaldığında yapraklarında ve köklerinde Ni biriktirdi (Şekil 4.30.). Yaprak ve köklerdeki Ni içeriği, NO ve diürenin yaprağa püskürtülmesiyle etkili bir şekilde azaltılmıştır. Spesifik olarak, NO, yapraklarda ve köklerde Ni içeriğini sırasıyla %40 ve %42 azaltırken, diüre sırasıyla %25 ve %28'lik bir düşüşe neden oldu. Ek olarak, NO ve diüre birlikte uygulandığında, bitki yaprağı ve kökündeki Ni içeriğini azaltmada daha etkili oldular. Bu kombine tedavi, yapraklarda ve köklerde Ni içeriğini sırasıyla %57 ve %60 oranında azalmasına neden oldu.

NO ve diüre uygulamaları, sadece Ni ile muamele edilen bitkilere kıyasla yapraklarda hücre duvarı Ni konsantrasyonunda artışa yol açtı. Ni+NO+Diüre uygulamasında Ni'nin %75,6'sı yaprak hücre duvarında bulunurken, tek başına Ni uygulanan bitkilerde Ni'nin %22'si hücre duvarında bulundu (Şekil 4.31.). Buna karşılık, yaprak hücresi organellerindeki Ni konsantrasyonu, NO veya diüre uygulamaları ile azaldı. Yaprak hücresi organellerindeki en düşük konsantrasyon Ni+NO+Diüre uygulamasında elde edildi. Ni stresli koşullarda NO+Diüre uygulaması hücre organellerindeki Ni konsantrasyonunun 11,7 µg'dan 2 µg'a düşmesine neden oldu. Ni stresi altında, Ni birikiminin en fazla olduğu kısım yapraklardaki hücre dokusunun çözünür bölümdü. NO ve diüre uygulaması, yaprak dokusunun çözünür kısmındaki Ni konsantrasyonunun azalmasına yol açtı. Bu bölümde en düşük konsantrasyon Ni + NO + Diüre uygulamasında gözlemlendi.

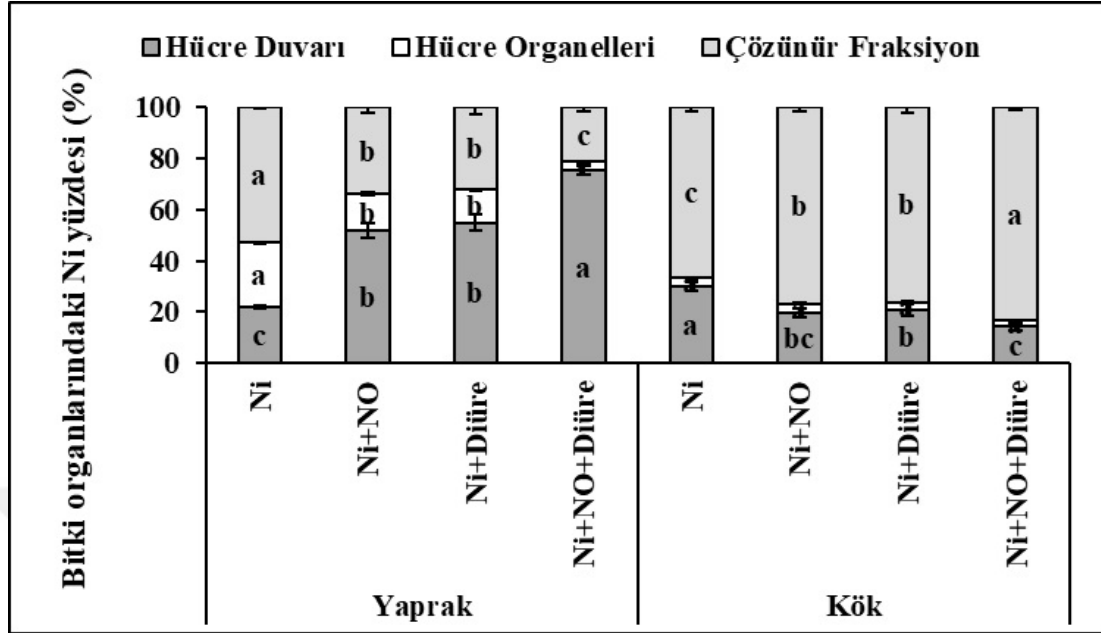
Ni stresli koşullarda NO+Diüre uygulaması çözünür kısımdaki Ni konsantrasyonunun 24,6 µg'dan 12,3 µg'a düşmesine yol açtı.

Sonuçlar, vakuolar çözünebilir fraksiyonun, biber bitkilerinin kökleri içindeki Ni birikiminde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Sadece Ni ile muamele edilen bitkilerle karşılaştırıldığında, NO, Diüre veya NO+Diüre uygulamaları bu fraksiyon içindeki Ni konsantrasyonunda önemli artışa yol açtı. Bu bölümde en yüksek Ni konsantrasyonu 72,4 µg olarak Ni + NO + Diüre uygulamasında elde edildi. Bu durum, NO ve diürenin birlikte uygulanmasının, Ni'nin kök hücresindeki vakuoller içinde çözünmesini ve tutulmasını sağlayabileceğini göstermektedir. Genel olarak bulgularımız, NO ve diüre kombinasyonunun yaprak ve kök dokularında Ni birikimini ve dağılımını önemli ölçüde etkileyebileceğini göstermektedir.

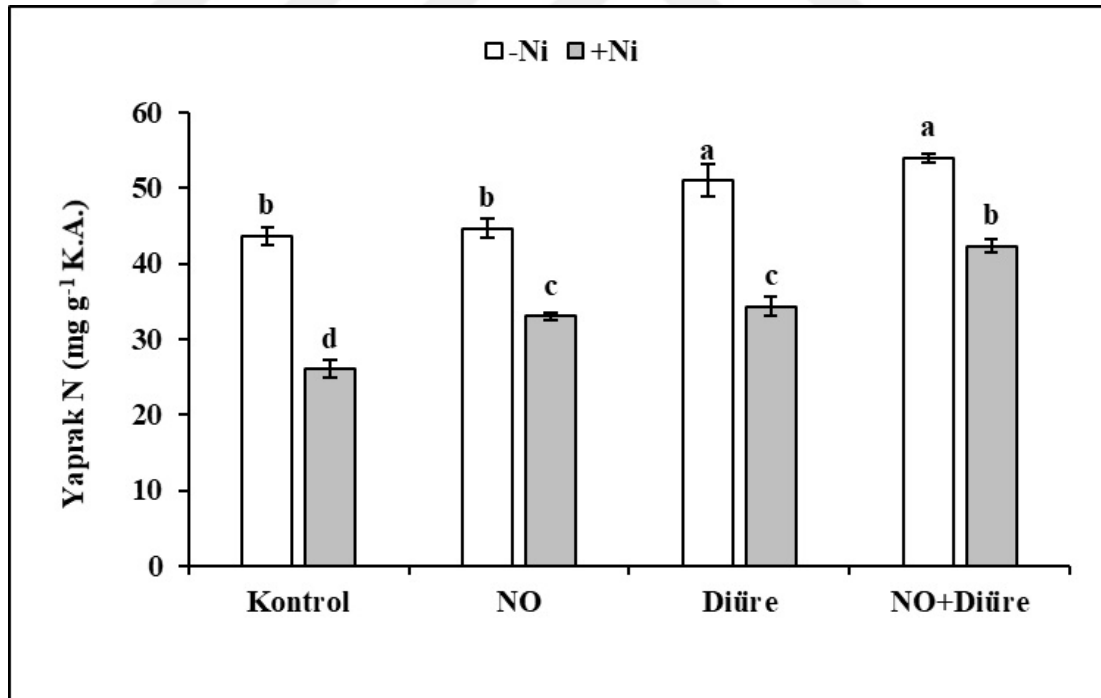
Ni stresi, kontrole kıyasla hem yapraklarda hem de köklerde N, P ve K⁺ seviyelerini düşürdü (Şekil 4.32.- 4.37.). Yapraklarda N, P ve K sırasıyla %41, %49 ve %39 oranında azalırken, köklerde sırasıyla %42, %42 ve %37 oranında azaldı. NO veya diüre uygulaması, Ni stresli bitkilerin hem yapraklarında hem de köklerinde N, P ve K⁺ seviyelerini arttırdı. NO ve diürenin kombinasyonu, N, P ve K⁺ seviyelerinde daha yüksek bir artışla sonuçlanarak sinerjistik bir etki gösterir. Stresiz bitkilerde, tek başına veya kombinasyon halinde NO veya diüre, besin seviyelerini önemli ölçüde artırmadı.



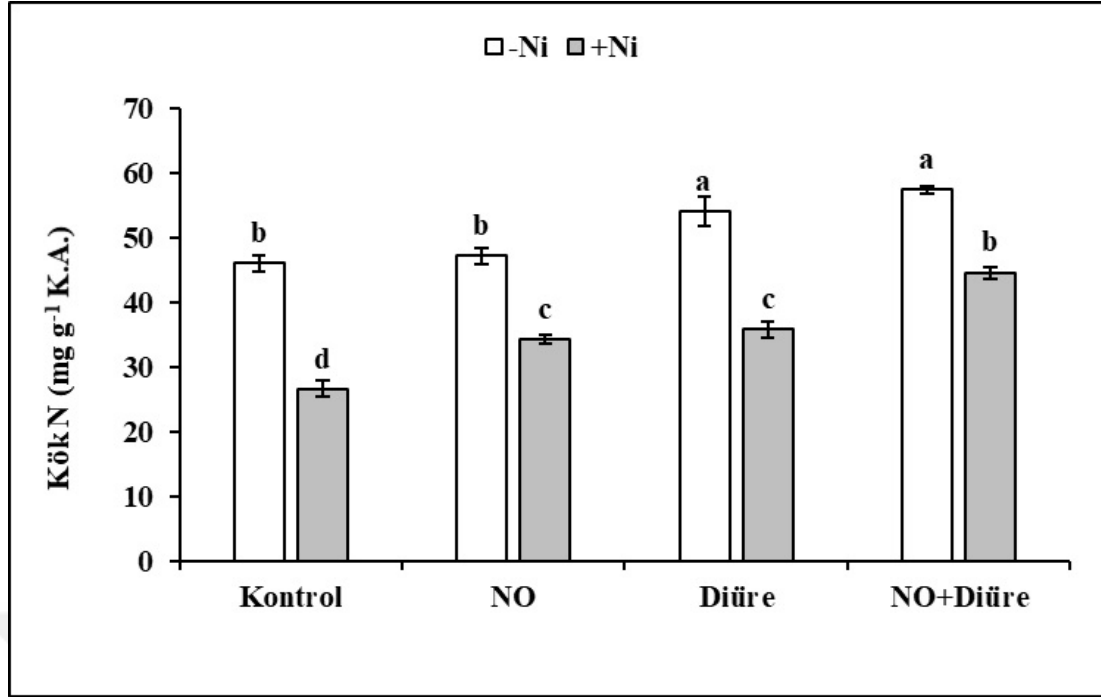
Şekil 4.30. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının yaprak ve köklerde Ni birikimine etkisi



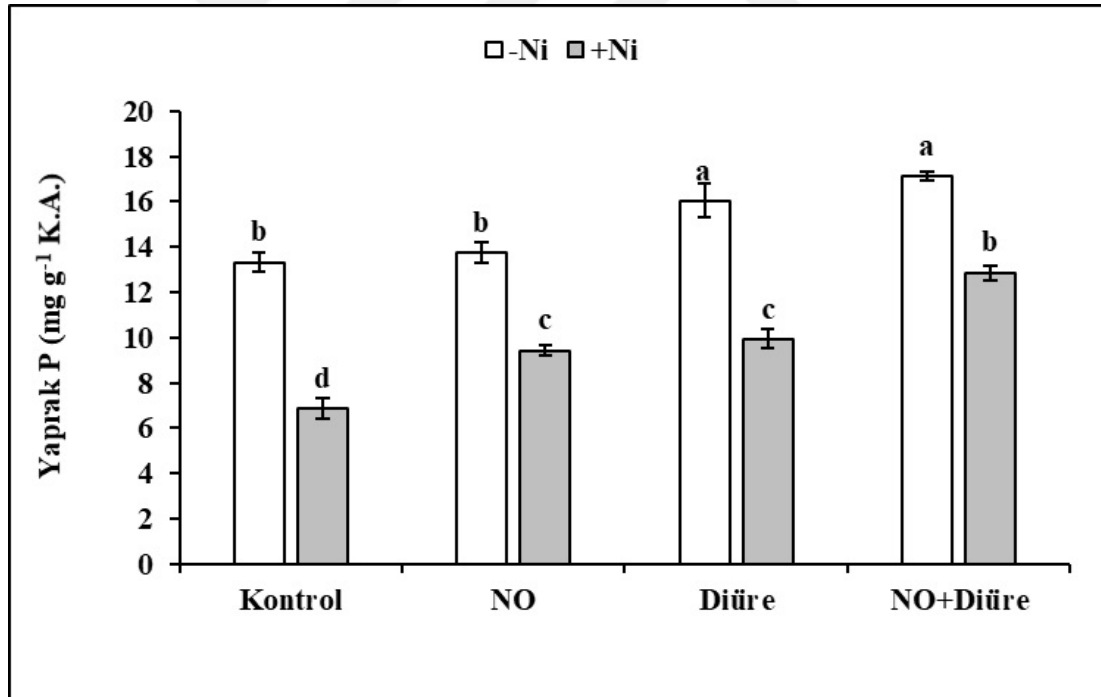
Şekil 4.31. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının hücre organellerinde Ni dağılımına etkisi



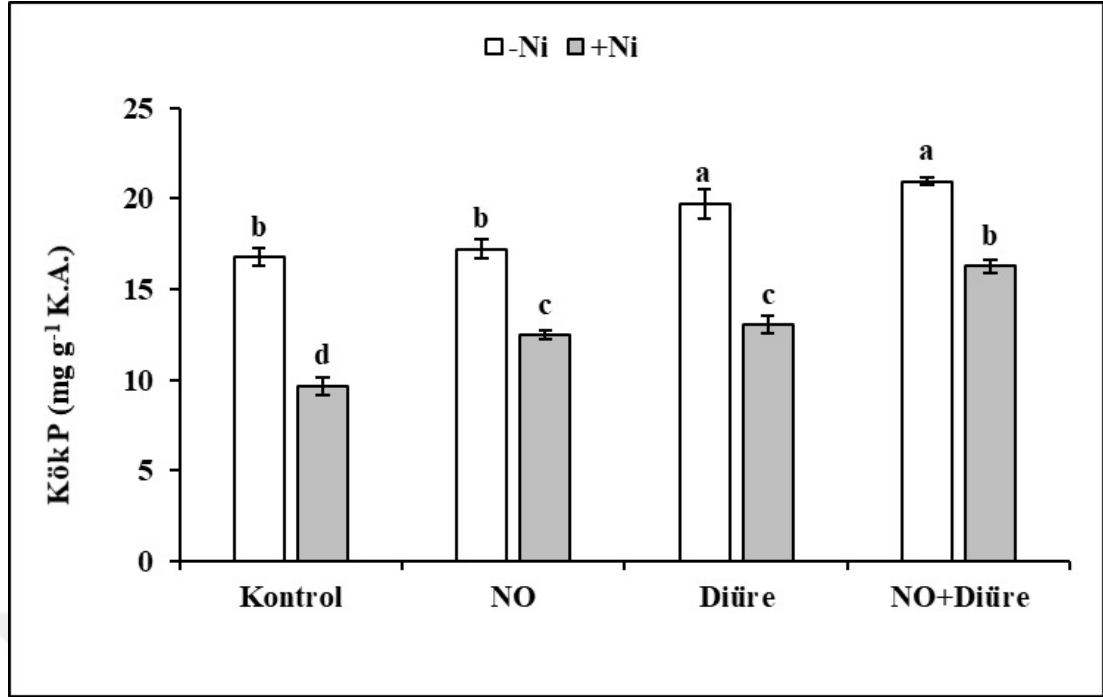
Şekil 4.32. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının yaprakların azot (N) içeriğine etkisi



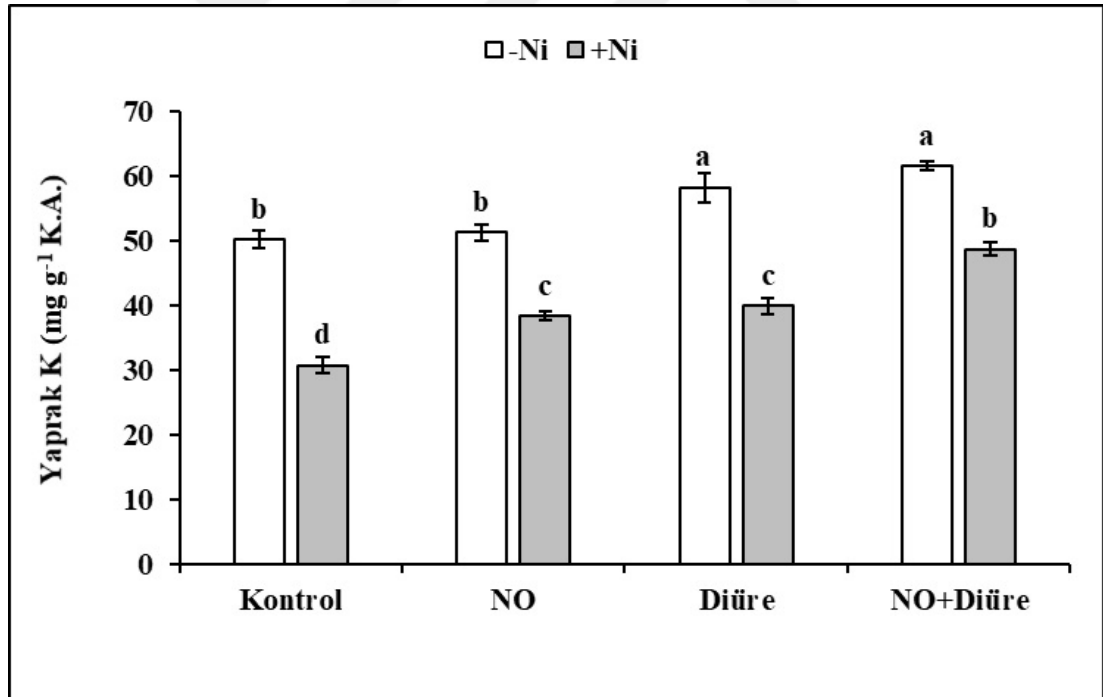
Şekil 4.33. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının köklerin azot (N) içeriğine etkisi



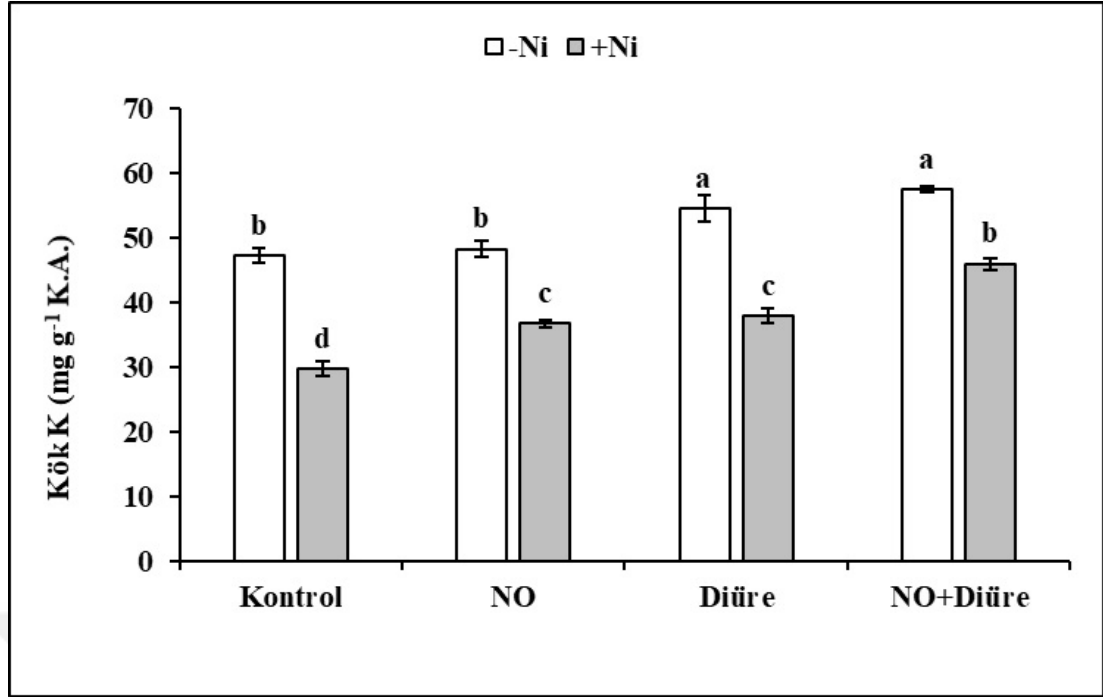
Şekil 4.34. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının yaprakların fosfor (P) içeriğine etkisi



Şekil 4.35. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının köklerin fosfor (P) içeriğine etkisi



Şekil 4.36. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının yaprakların potasyum (K) içeriğine etkisi



Şekil 4.37. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının köklerin potasyum (K) içeriğine etkisi

4.2. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının bitki toleransına etkisi



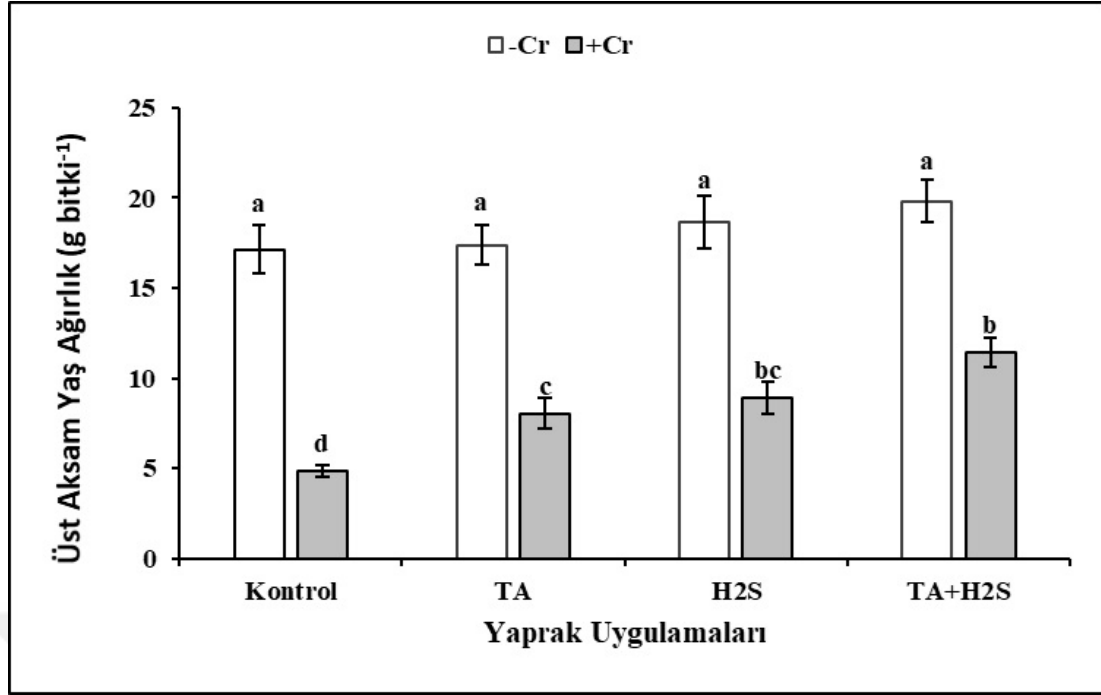
Şekil 4.38. Cr toksisitesine maruz kalan biber fidelerinin fenotipik görünümü

Cr toksisitesi, bitki büyümesinin azalmasına, yaprak boyutu ve şeklindeki değişikliklerin yanı sıra anormal büyüme veya deformasyonlarına neden oldu. Ancak, Tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulaması, bitkilerde Cr toksisitesinin olumsuz etkilerini azalttı (Şekil 4.38.). Cr'un yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu

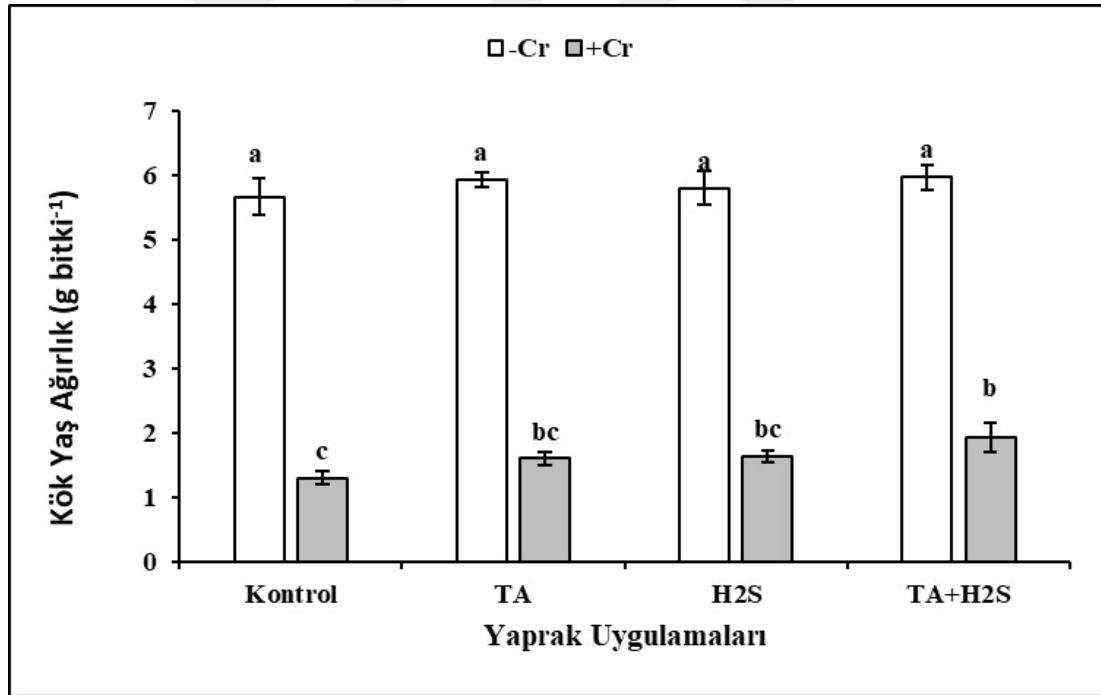
durumlarda bile TA ve H₂S uygulamasının, bitki büyümesini teşvik ettiği, Cr toksisitesinin olumsuz etkilerini en aza indirmeye yönelik etkili yaklaşımlar olabileceği bulundu.

Cr stresine maruz kalan biber bitkilerine yapraktan TA ve H₂S uygulamalarının üst aksam ve kök yaş ağırlığına etkisi Şekil 4.39. ve 4.40.'da sunulmuştur. Cr toksisitesi biber bitkilerinin üst aksam ve kök yaş ağırlığını sırasıyla %72 ve %77 oranında düşürdü. Cr stresli bitkilerin TA ve H₂S ile muamelesi azalan bu parametreleri önemli düzeyde iyileştirdi. En verimli sonuçlar bu iki kimyasalın birlikte uygulanması ile elde edildi. Cr stresi altındaki biber bitkilerine TA+ H₂S uygulaması yalnızca Cr ile muamele edilen bitkilere kıyasla bu özellikleri sırasıyla %134 ve %49 oranında arttırdı. TA ve H₂S'in Cr stresi olmadan birlikte uygulanması, sürgün ve kök yaş ağırlıklarını sırasıyla %15 ve %5 oranında bir artışa yol açtı.

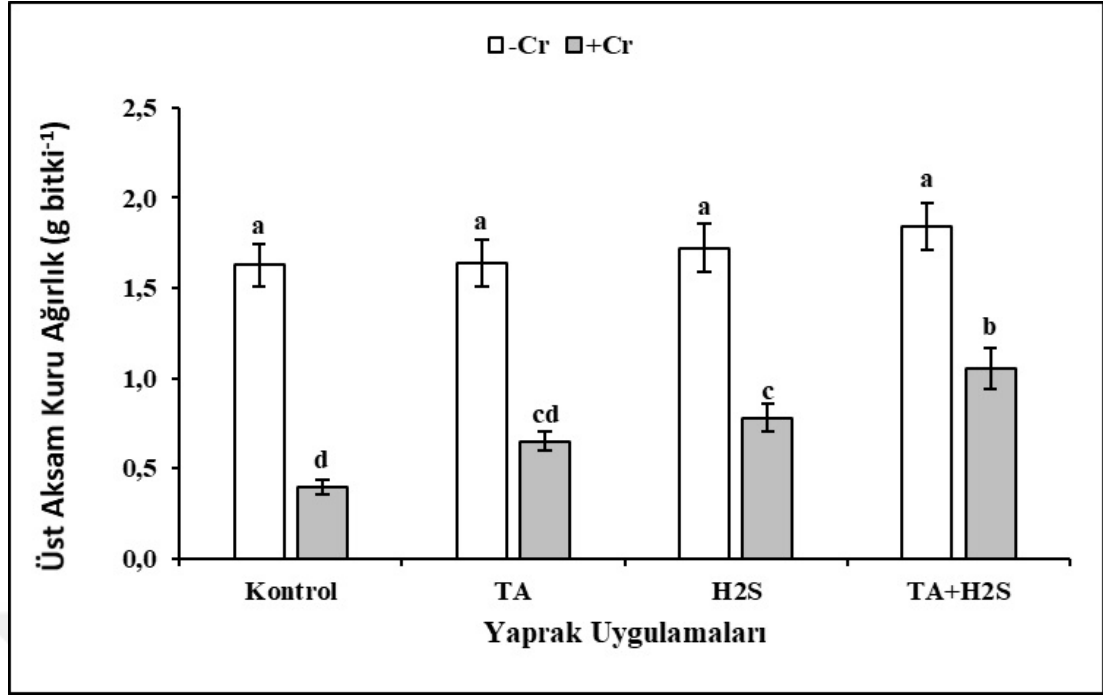
Cr toksisitesi koşullarında biber bitkilerine yapraktan TA ve H₂S uygulamalarının üst aksam ve kök kuru ağırlığına etkisi Şekil 4.41 ve 4.42.'de sunulmuştur. Cr stresi biber bitkilerinin üst aksam ve kök kuru ağırlığını sırasıyla %75 ve %65 oranında düşürdü. TA ve H₂S muamelesi Cr nedeniyle baskılanan biyomas verimini iyileştirdi. Ancak Cr toksisitesi koşullarında maksimum değerler TA ve H₂S'in birlikte uygulanması ile elde edildi. TA ve H₂S kombinasyonunun uygulanması, yalnızca Cr muamelesi edilmiş bitkilerle karşılaştırıldığında, üst aksam ve kök kuru ağırlığı için sırasıyla %165 ve %47 oranında bir artışa yol açtı. Ayrıca TA ve H₂S'in Cr stresi olmadan birlikte uygulanması, kontrole kıyasla sürgün ve kök yaş ağırlığında sırasıyla %13 ve %7'lik bir artışa yol açtı. Bu durum, bu bileşiklerin stresin hafifletilmesinde ve hatta stresli olmayan koşullarda sinerjistik bir etkiye sahip olduklarının göstergesi olabilir.



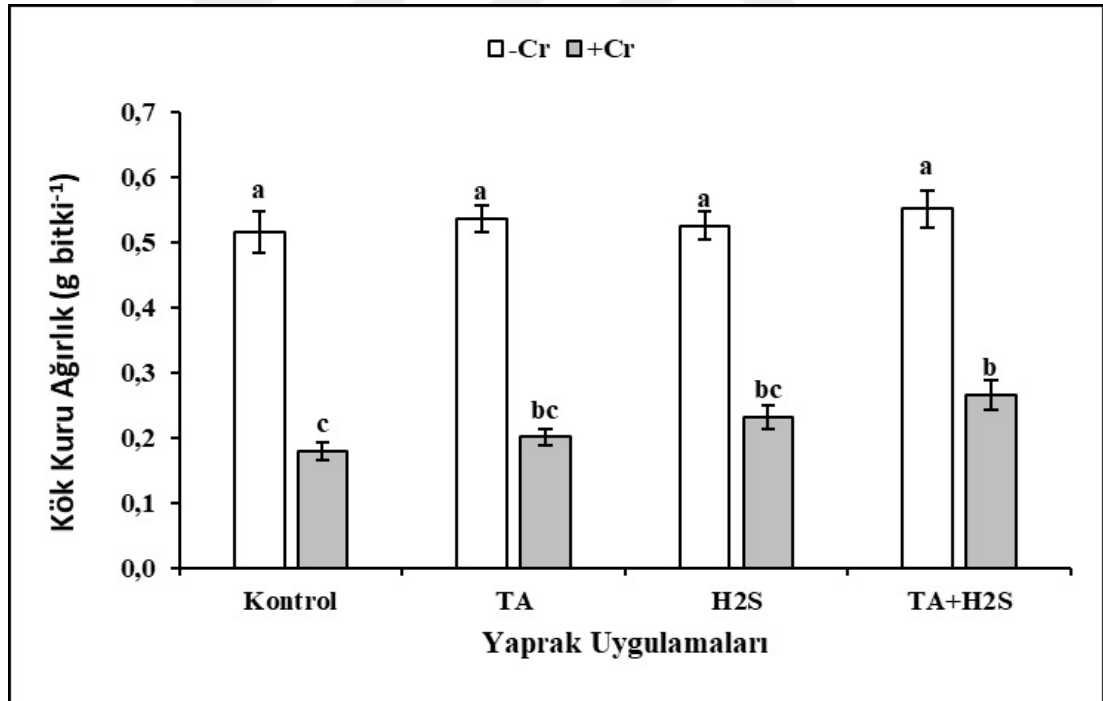
Şekil 4.39. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının üst aksam yaş ağırlığına etkisi



Şekil 4.40. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının üst aksam kuru ağırlığına etkisi



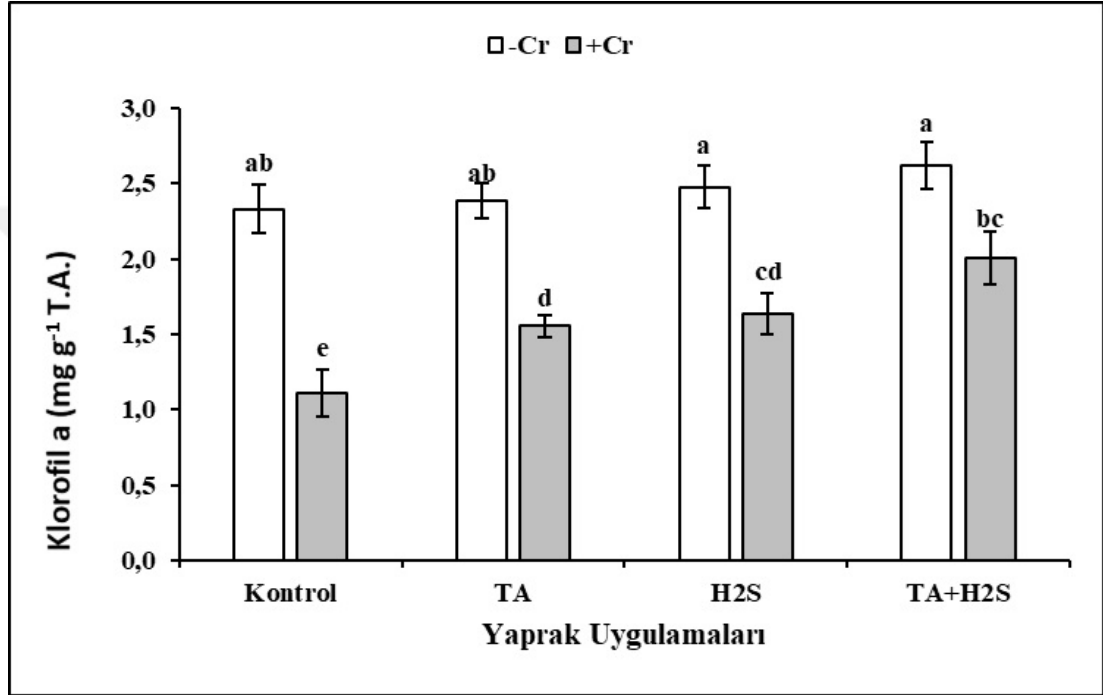
Şekil 4.41. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının üst aksam kuru ağırlığına etkisi



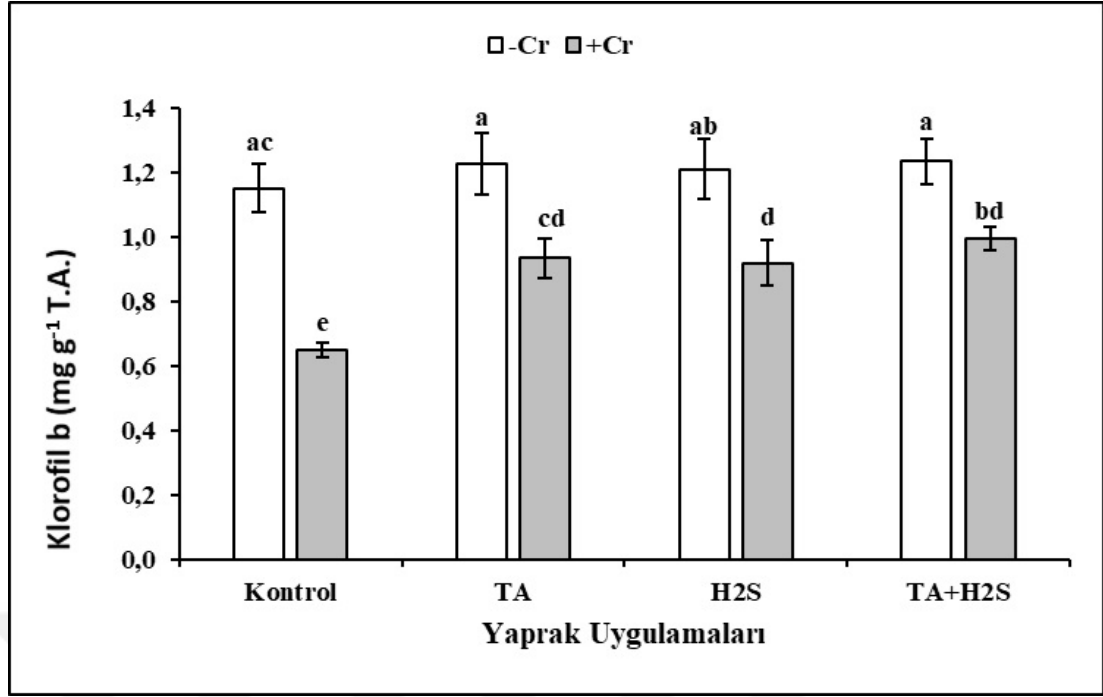
Şekil 4.42. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının kök kuru ağırlığına etkisi

Cr toksisitesi koşullarında yapraktan TA ve H₂S uygulamalarının klorofil a, klorofil b, toplam klorofil, karotenoidler ve *Fv/Fm* özelliklerine etkisini gösteren grafikler sırasıyla Şekil 4.43., Şekil 4.44., Şekil 4.45., Şekil 4.46. ve Şekil 4.47.'da sunulmuştur. Cr stresi, kontrole kıyasla klorofil a, klorofil b, toplam klorofil,

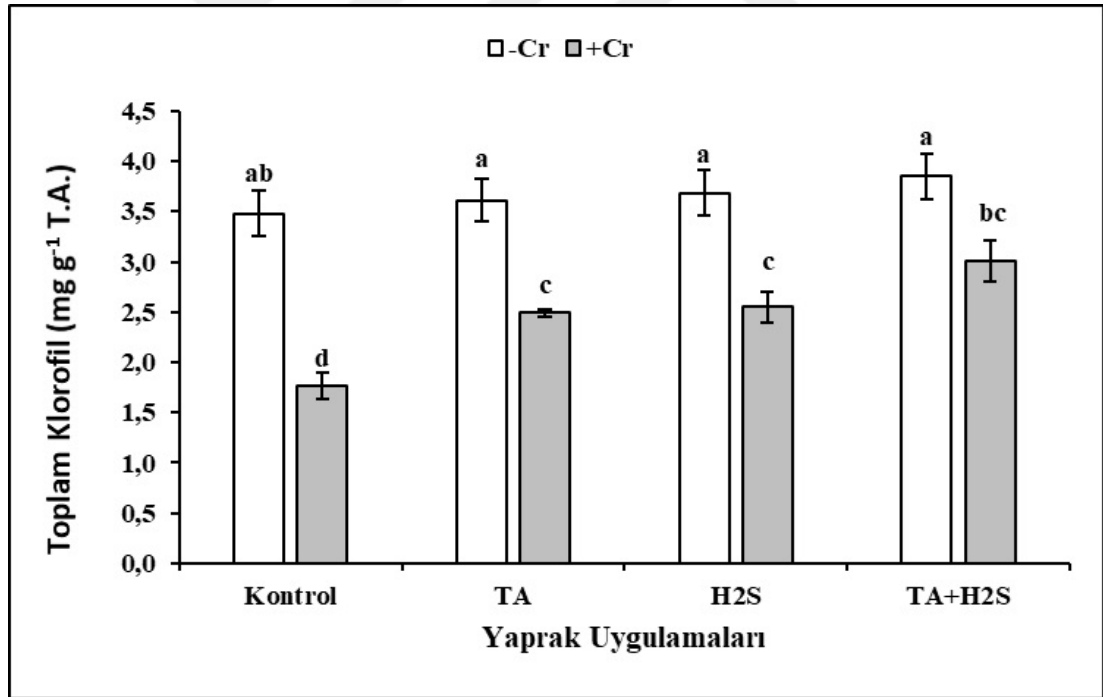
karotenoidler ve F_v/F_m 'yi sırasıyla %52, %43, %49, %54 ve %29 oranında azalttı. TA ve H_2S tek başına uygulanması Cr stresi altında bu parametrelerde önemli artışa yol açtı. Ancak Cr stresi altında en verimli sonuçlar TA ve H_2S kombinasyonunda elde edildi. Bu kombinasyon, yalnızca Cr ile muamele edilmiş bitkilerle karşılaştırıldığında ilgili özelliklerde %81, %53, %70, %84 ve %26 oranında artışlara yol açtı. Cr stresi olmadan TA+ H_2S uygulaması bu parametreleri önemli ölçüde değiştirmede.



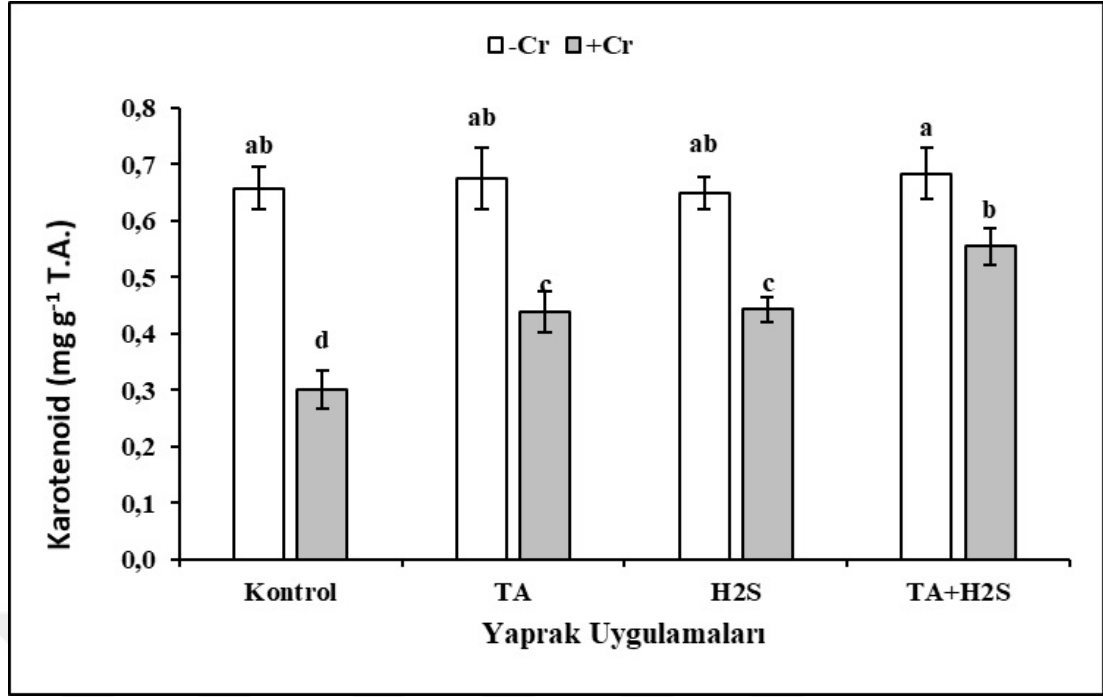
Şekil 4.43. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H_2S) uygulamalarının klorofil a içeriğine etkisi



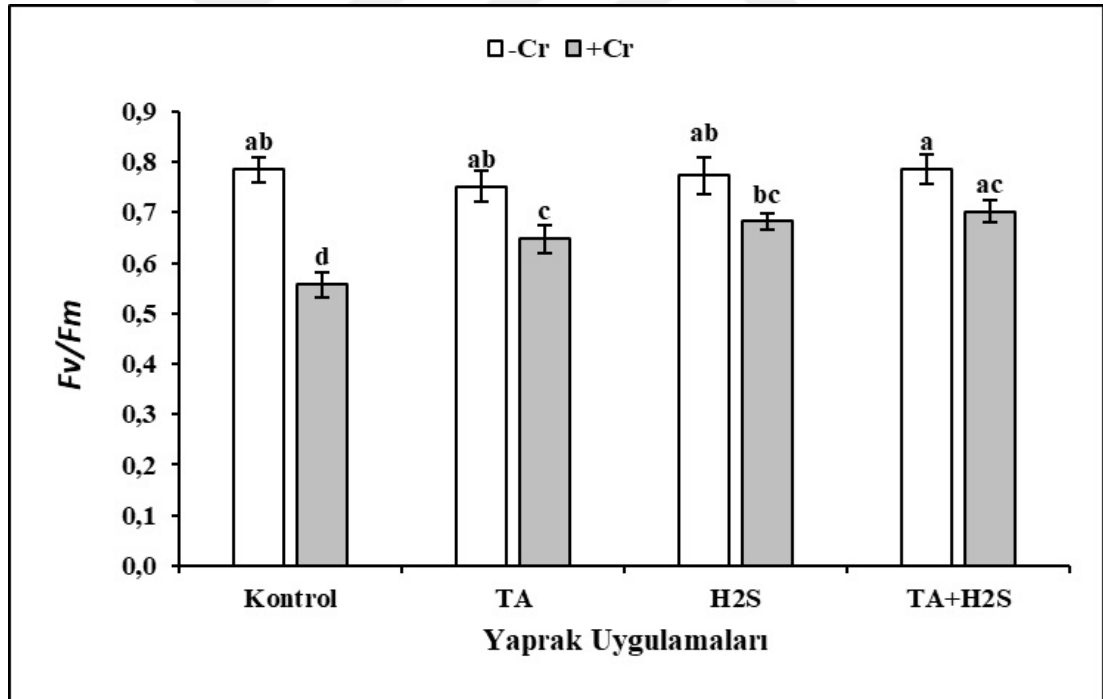
Şekil 4.44. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının klorofil b içeriğine etkisi



Şekil 4.45. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının toplam klorofil içeriğine etkisi



Şekil 4.46. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının karotenoid içeriğine etkisi

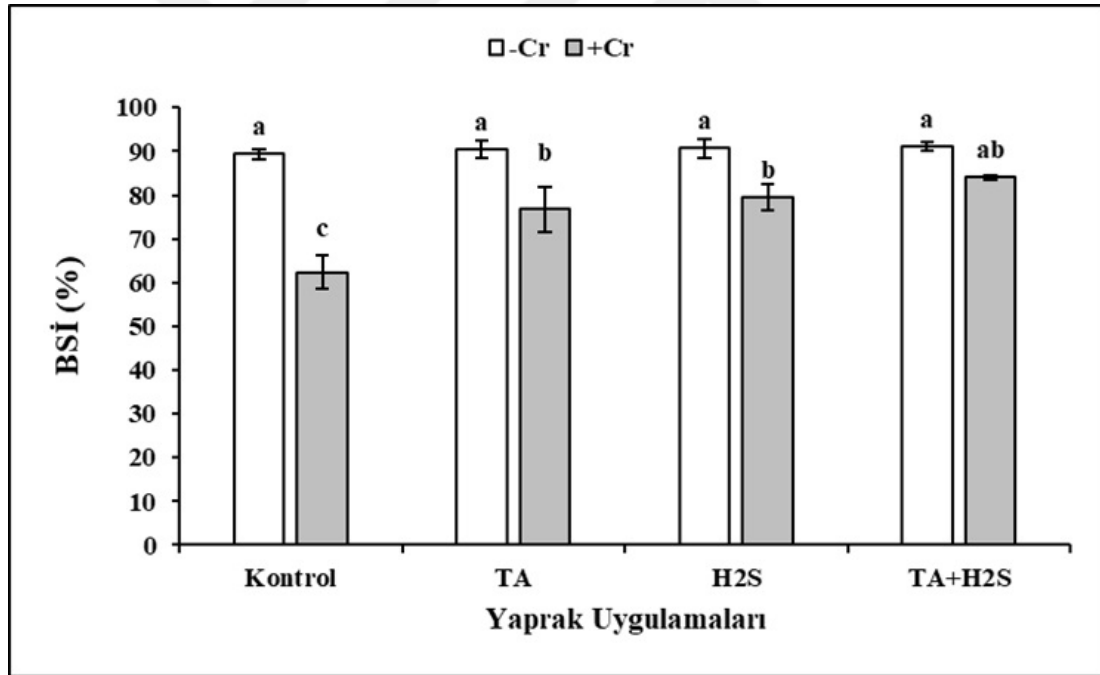


Şekil 4.47. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının maksimum kuantum verimine (Fv/Fm) etkisi

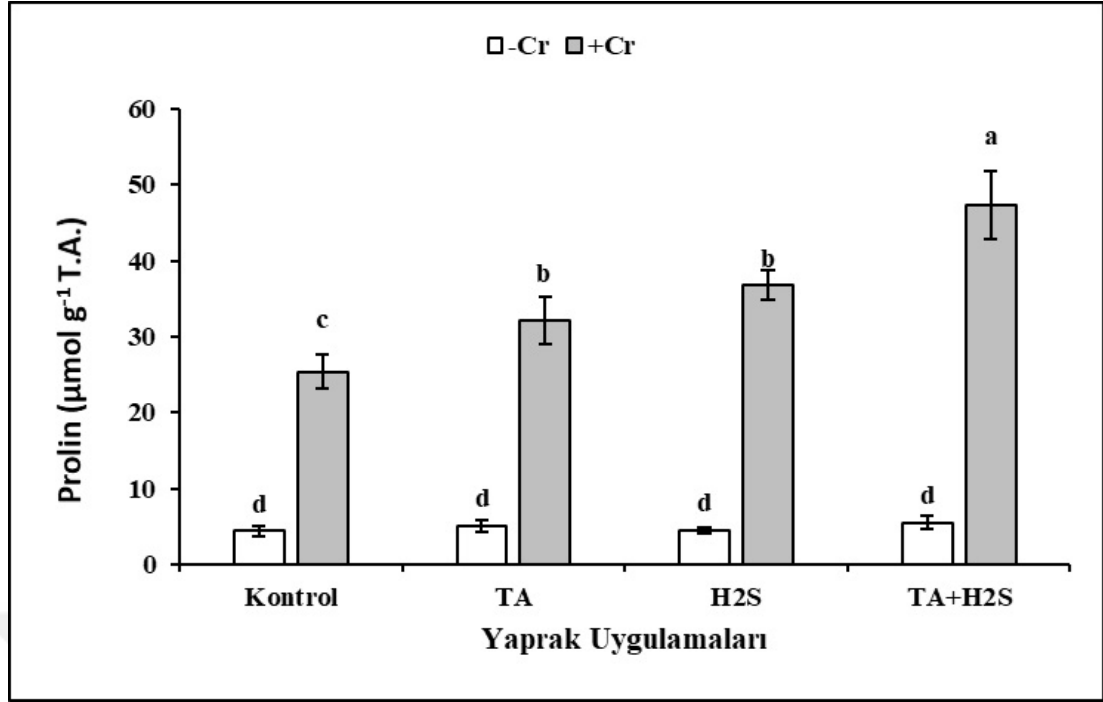
Cr toksisitesi koşullarında TA ve H₂S uygulamasının biber bitkilerinin yaprak bağıl su içeriğine (BSİ) etkisi Şekil 4.48.'de sunulmuştur. Cr'a maruz kalan bitkilerin BSİ'si, maruz kalmayan bitkilere kıyasla %30 oranında azaldı. Cr stresine maruz

kalan bitkilerde TA, H₂S ve TA+H₂S uygulamaları, yalnızca Cr ile muamele edilmiş bitkilere kıyasla BSI'yi sırasıyla %23, %28 ve %35 oranında iyileştirdi. Stres olmadan bu bileşiklerin uygulanması BSI'yi önemli ölçüde değiştirmedir.

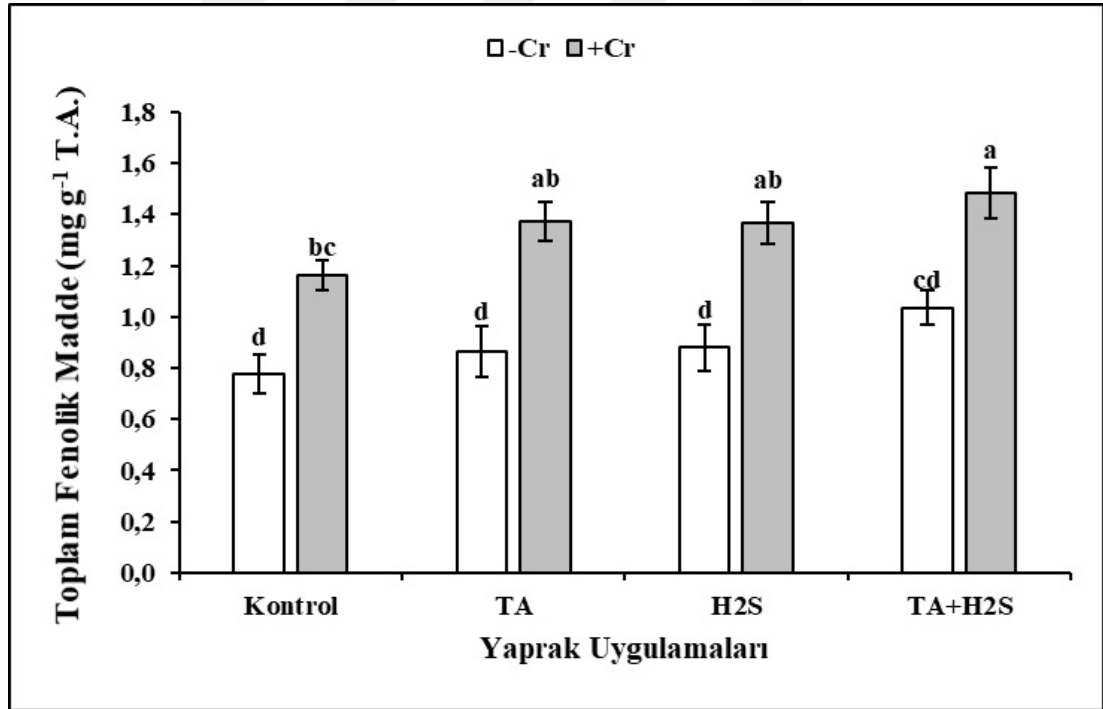
Cr stresi, TA ve H₂S uygulamalarının prolin, fenolik madde ve toplam şeker içeriğine etkisi Şekil 4.49., 4.50., ve 4.51.'de sunulmuştur. Cr toksisitesi prolinde 5,7 kat ve fenolik madde içeriğinde %50 oranında artışa yol açtı. Cr stresi ayrıca toplam çözünür şeker içeriğinde %48 oranında bir düşüşe neden oldu. Yapraktan TA, H₂S ve TA+H₂S uygulaması, Cr stresine maruz kalan bitkilerde prolin ve fenolik madde içeriğinde artışa neden oldu. Cr stresli bitkilerde prolin, fenolik madde ve toplam çözünür şeker içeriği için maksimum değerler TA+H₂S uygulaması ile elde edildi. Spesifik olarak, TA+H₂S uygulaması, Ni toksisitesine maruz kalan bitkilerde prolini %87, fenolikleri %28 ve toplam şekeri %64 artırdı. TA+H₂S'in Cr stresi olmayan bitkilere uygulanması, toplam şeker artışa yol açtı, ancak fenolik madde ve prolin içeriği önemli ölçüde değişmedi.



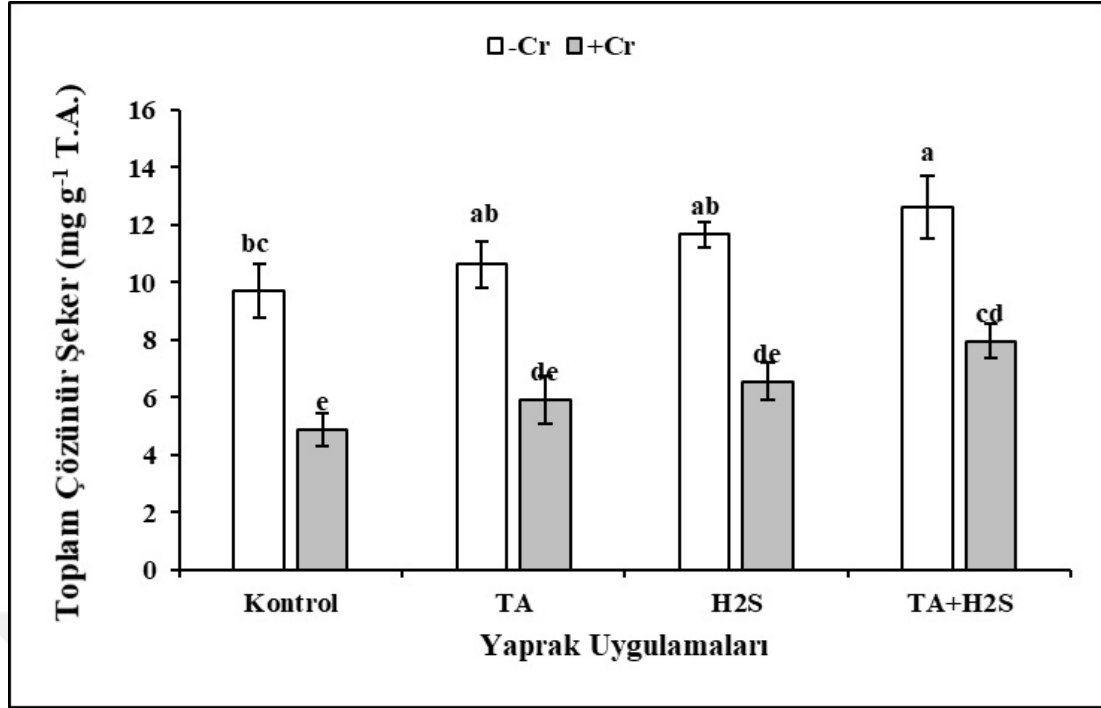
Şekil 4.48. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının yaprak bağıl su içeriğine (BSİ) etkisi



Şekil 4.49. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının prolin birikimine etkisi

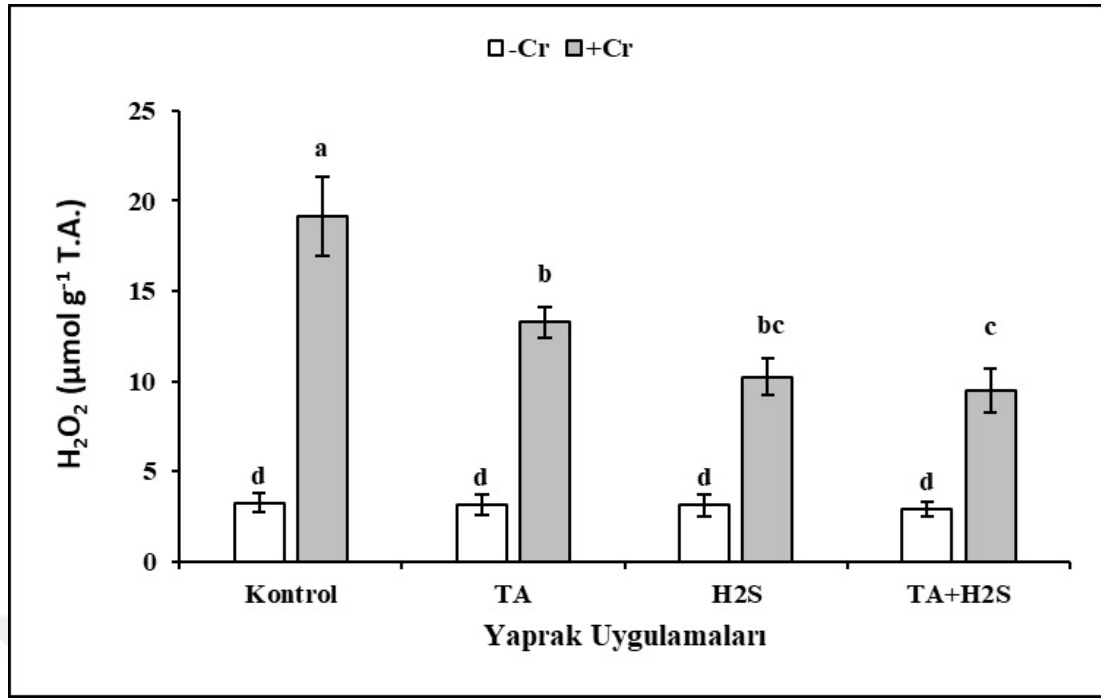


Şekil 4.50. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının fenolik madde içeriğine etkisi

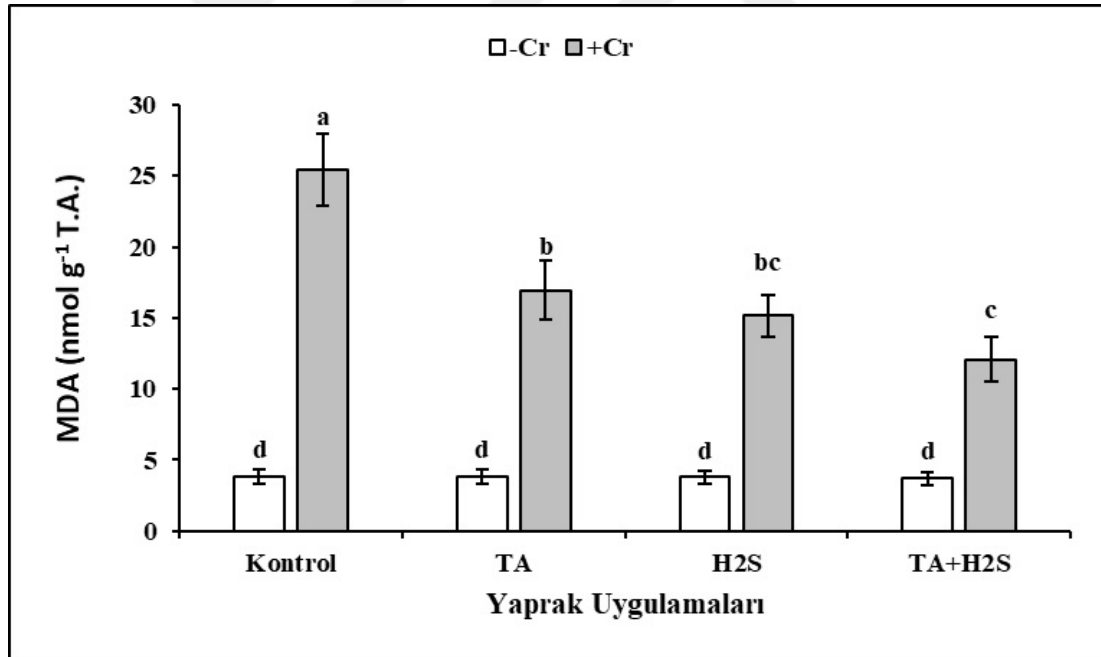


Şekil 4.51. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının toplam şeker içeriğine etkisi

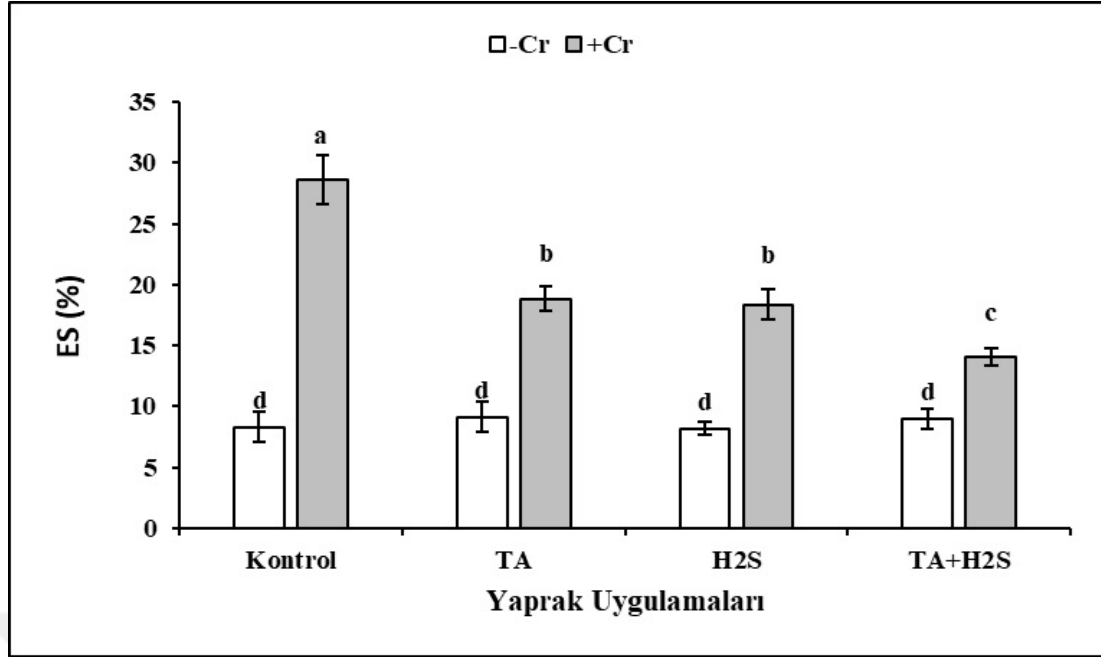
Cr stresi koşullarında TA ve H₂S uygulamalarının oksidatif stresin göstergeleri olan H₂O₂, MDA ve ES değerlerine etkisini gösteren grafikler sırasıyla Şekil 4.52., Şekil 4.53. ve Şekil 4.54.'te sunulmuştur. Cr toksisitesi, kontrole kıyasla biber bitkilerinin H₂O₂, MDA ve ES içeriğinde sırasıyla %488, %565 ve %244 oranında artışa neden oldu. Yapraklardan TA ve H₂S'in püskürtülmesi oksidatif stresin önemli belirteçleri olan bu parametrelerde önemli bir düşüşe neden oldu. Ancak TA ve H₂S kombinasyonu Cr'nin neden olduğu oksidatif stresi azaltmada tek başına uygulamalarından daha etkiliydi. TA ve H₂S karışımının uygulanması stres altındaki bitkilere püskürtüldüğünde, yalnızca Cr ile tedavi edilen bitkilere kıyasla H₂O₂, MDA ve ES'yi sırasıyla %50, %53 ve %51 oranında azalttı. Bu sonuçlar TA ve H₂S'in Cr stresinin neden olduğu oksidatif stresin hafifletilmesinde sinerjistik bir etkiye sahip olduğunu gösterdi.



Şekil 4.52. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının hidrojen peroksit (H₂O₂) içeriğine etkisi



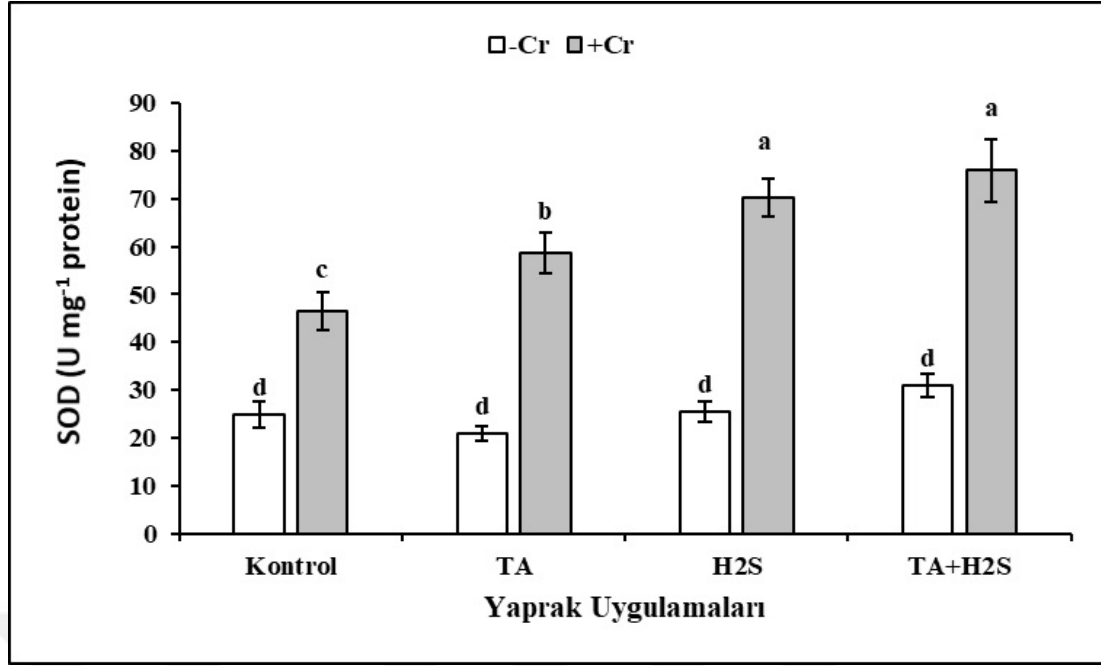
Şekil 4.53. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının malondialdehit (MDA) içeriğine etkisi



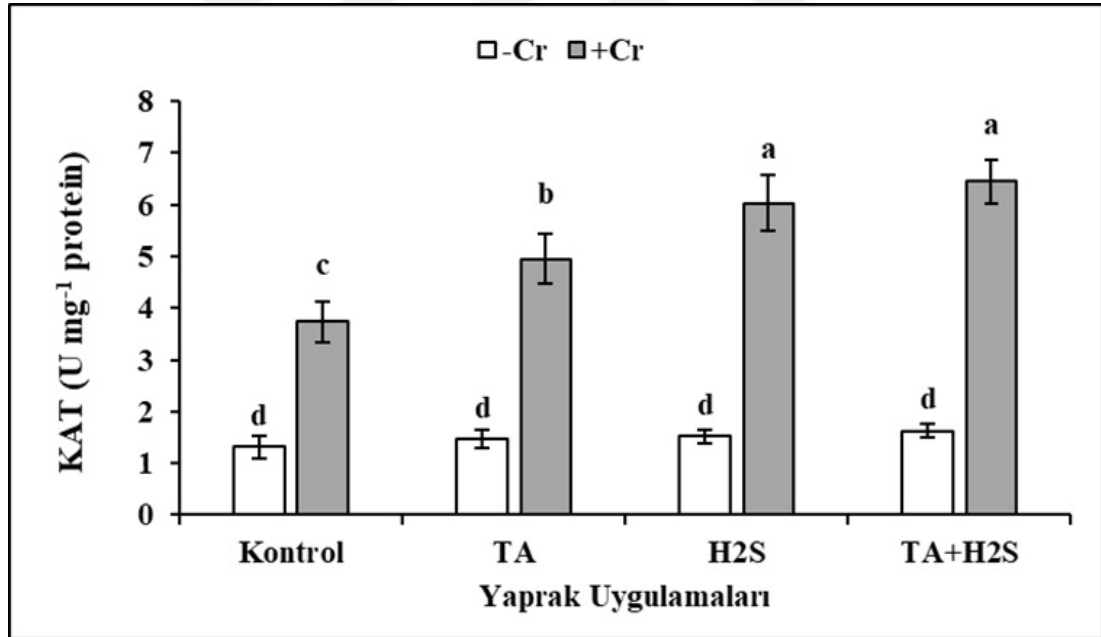
Şekil 4.54. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetiştirilen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının elektrolit sızıntısı (ES) değerlerine etkisi

Cr stresi koşullarında TA ve H₂S ile muamele edilen biber bitkilerinin SOD, KAT, APOD ve POD enzim aktivitelerine ilişkin sonuçlar sırasıyla Şekil 4.55., 4.56., 4.57. ve 4.58.'de grafikler halinde sunulmuştur.

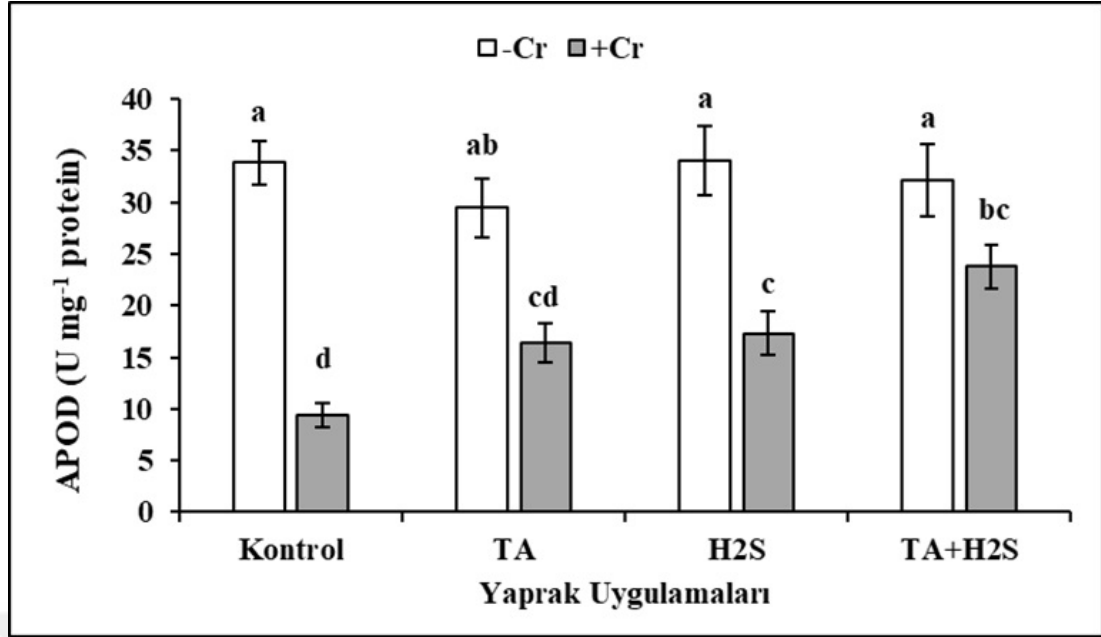
Cr toksisitesi koşullarında biber bitkilerinde, SOD, KAT ve POD aktivitesi sırasıyla %87, %184 ve %208 oranında artarken, APOD aktivitesi %72 oranında azaldı. TA'nın tek başına uygulanması, Cr stresli bitkilerde SOD, KAT ve POD enzim aktivitelerini önemli ölçüde artırdı ancak APOD aktivitesinde önemli düzeyde değişmedi. Bununla birlikte, tek başına H₂S'in eksojen takviyesi, Cr stres koşulları altında tüm enzim aktivitelerini önemli düzeyde artırdı. TA ve H₂S birlikte uygulandığında, bu enzimlerin aktivitesini sırasıyla %63, %7 ve %152 oranında artırdı. Cr stres koşulları altında H₂S'in tek başına uygulanması KAT ve SOD enzimleri üzerinde TA+H₂S kombinasyonu ile aynı etkiyi gösterdi. Stresiz koşullar altında bu bileşiklerin uygulanmasının enzim aktiviteleri üzerinde etkisi önemli bulunmadı.



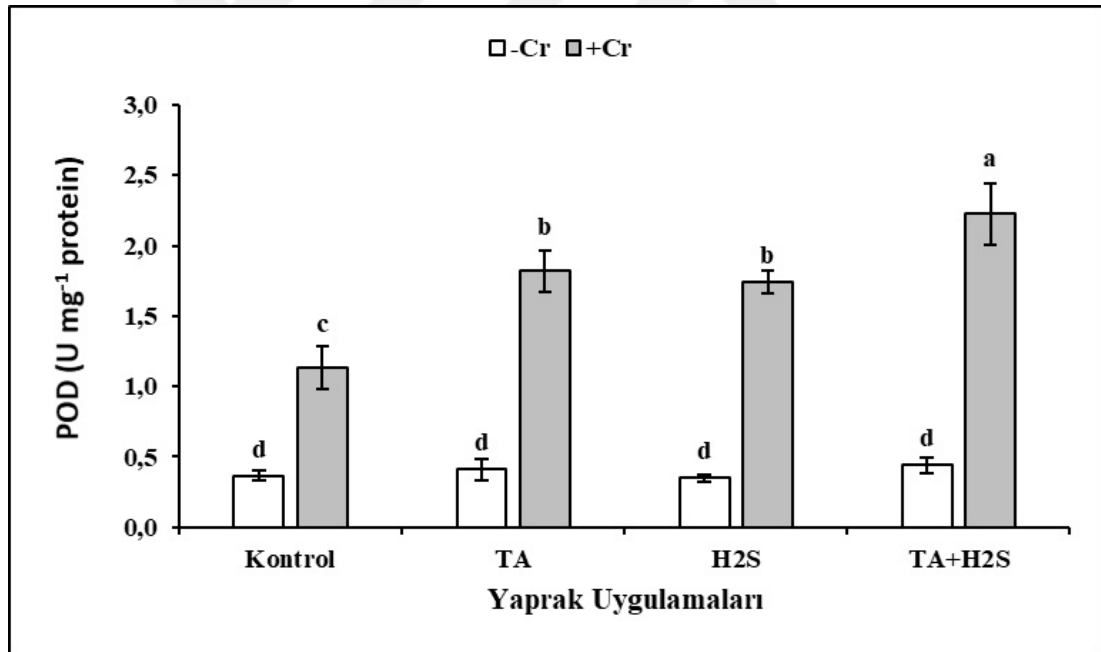
Şekil 4.55. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesine etkisi



Şekil 4.56. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının katalaz (KAT) aktivitesine etkisi



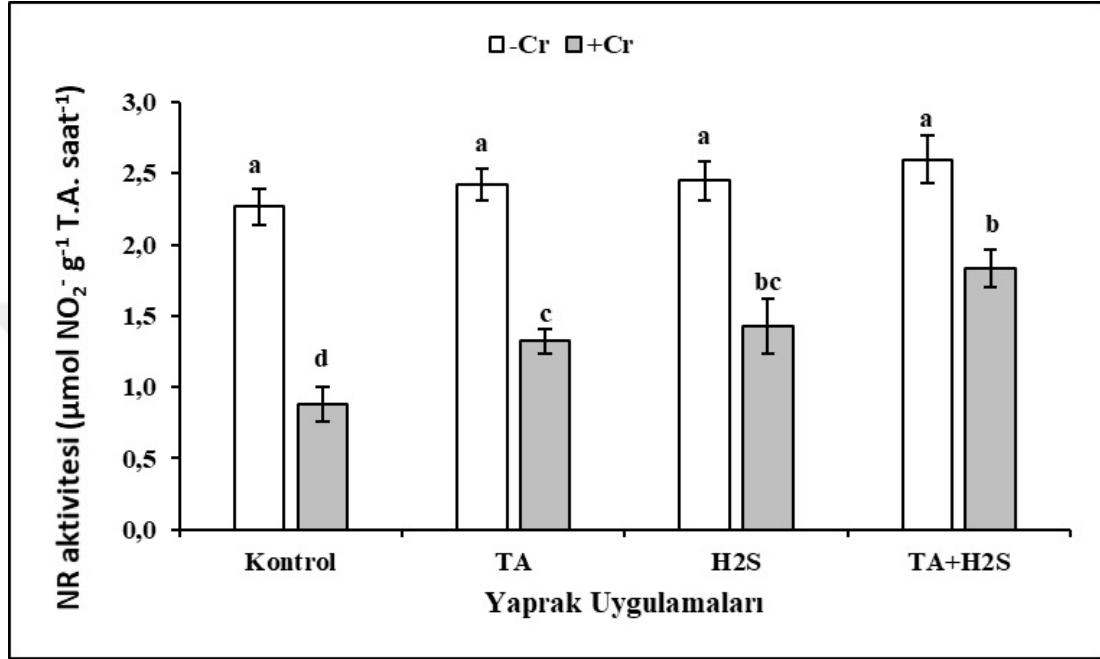
Şekil 4.57. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının askorbat peroksidaz (APOD) aktivitesine etkisi



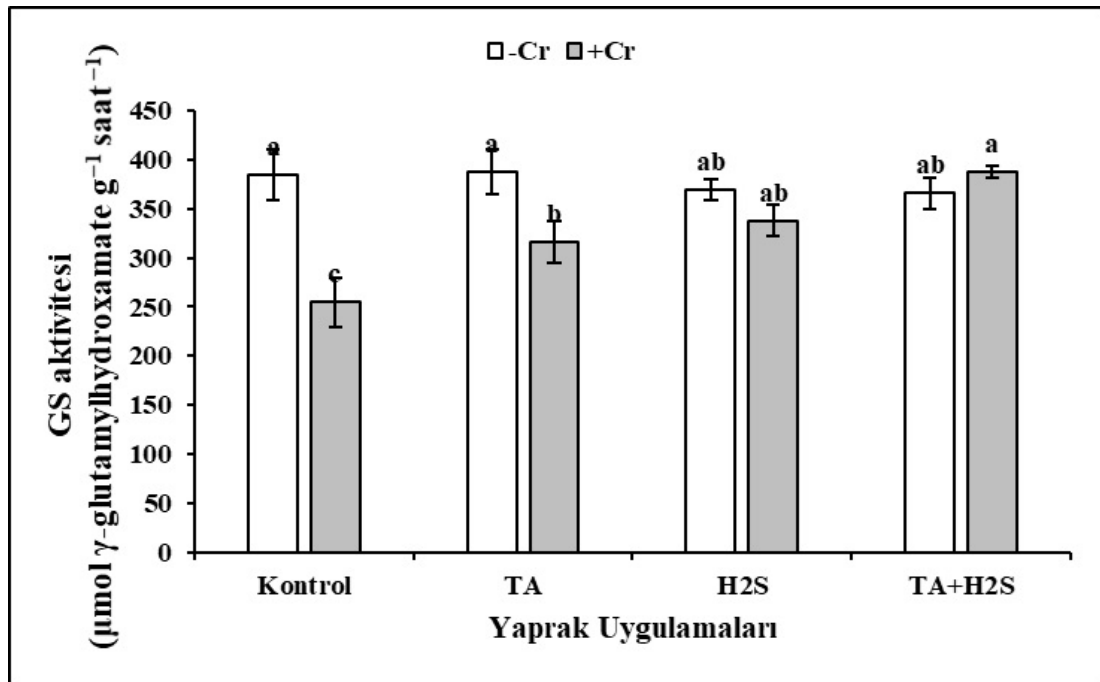
Şekil 4.58. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının peroksidaz (POD) aktivitesine etkisi

Cr stresi koşullarında TA ve H₂S uygulamalarının azot metabolizması ile ilişkili NR, GS, GOGAT ve GDH enzimlerinin aktivitelere etkisini gösteren grafikler sırasıyla Şekil 4.59., 4.60., 4.61. ve 4.62.'de sunulmuştur. Cr stresi NR, GS, GOGAT ve GDH'nin aktivitesini sırasıyla %61, %34, %40, %43 oranında azalttı. TA ve H₂S'in yapraktan püskürtülmesi, Cr stresinin tarafından baskılanan bu enzimlerin

aktivitelerini önemli düzeyde iyileştirmiştir. Ancak en etkili sonuçlar TA ve H₂S'in birlikte uygulanmasıyla elde edilmiştir. Cr stresi koşullarında TA+H₂S'in uygulanması, NR, GS, GOGAT ve GSH aktivitelerinde sırasıyla %109, %52, %58 ve %77 oranında bir artışa yol açtı. Cr stresinin yokluğunda, bu bileşiklerin uygulamasının azot metabolizması enzimleri üzerindeki etkisi anlamlı değildi.

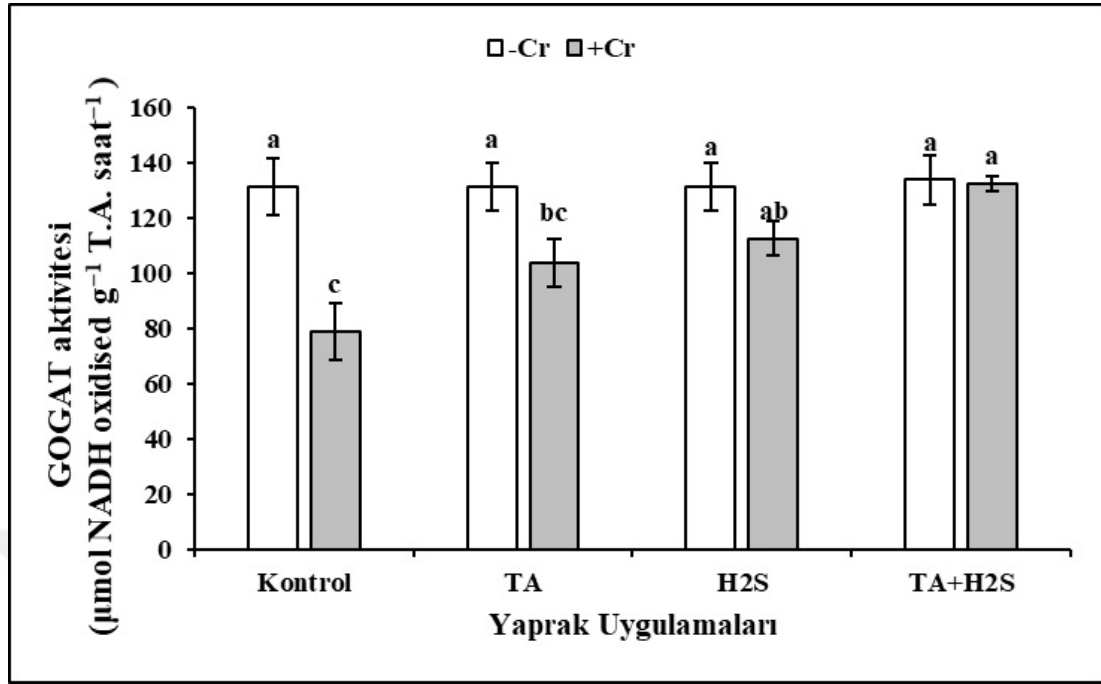


Şekil 4.59. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının nitrat redüktaz (NR) aktivitesine etkisi

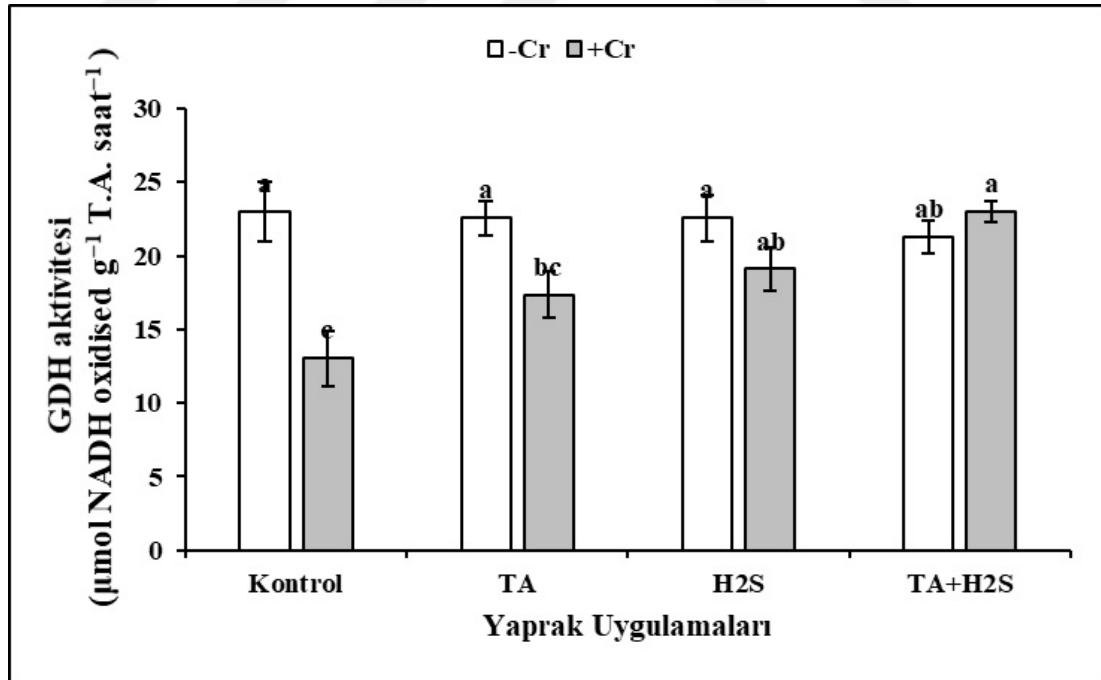


Şekil 4.60. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA)

ve hidrojen sülfid (H_2S) uygulamalarının glutamin sentetaz (GS) aktivitesine etkisi



Şekil 4.61. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H_2S) uygulamalarının glutamat sentaz (GOGAT) aktivitesine etkisi

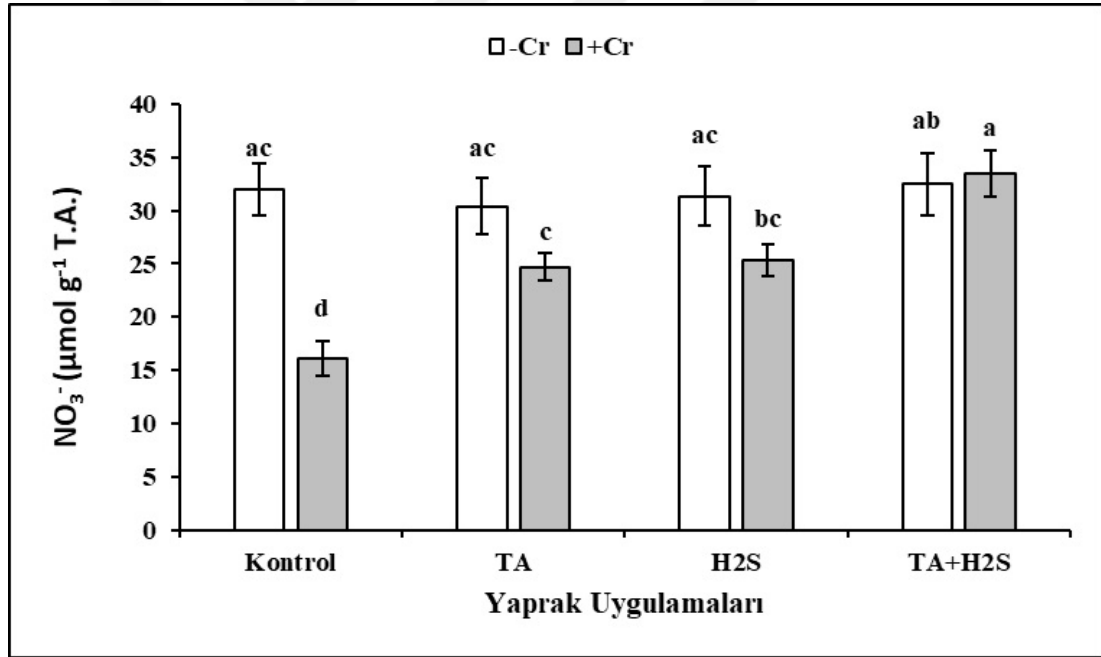


Şekil 4.62. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H_2S) uygulamalarının glutamat dehidrojenaz (GDH) aktivitesine etkisi

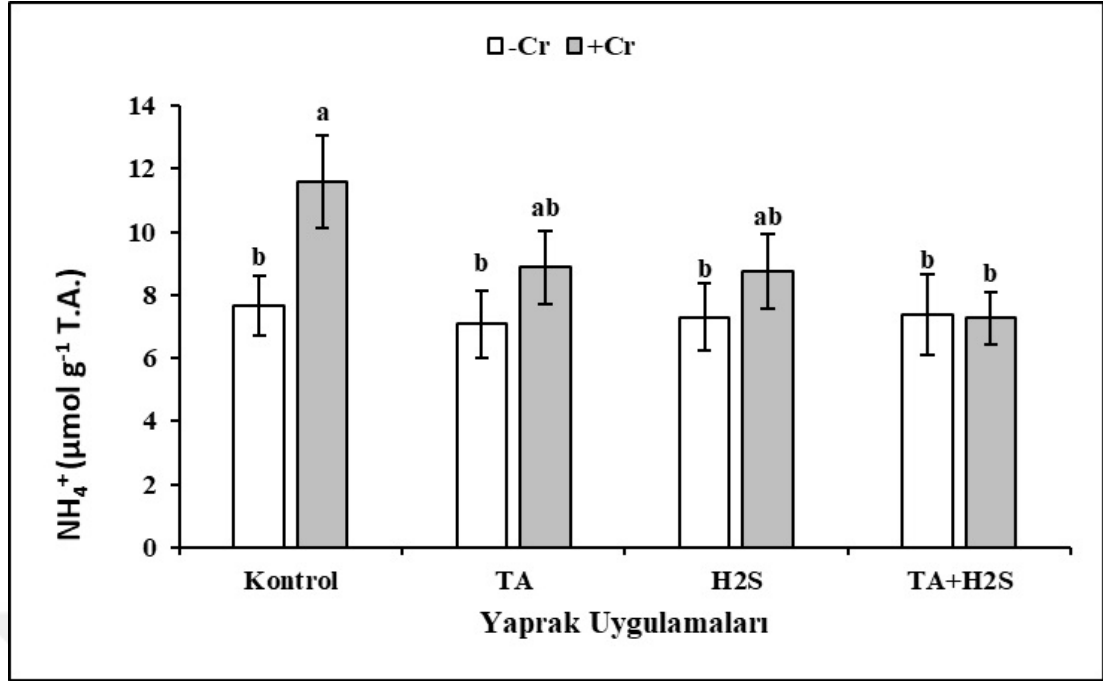
Cr, TA ve H_2S uygulamalarının biber bitkilerinin NO_3^- ve NH_4^+ içeriğine

etkisini gösteren sonuçlar sırasıyla Şekil 4.63. ve 4.64.'te grafikler halinde sunulmuştur. Cr stresi NO_3^- içeriğinde %49 azalmaya ve NH_4^+ içeriğinde %51 artışa neden olmuştur. Cr stresli bitkilerin TA veya H_2S ile muamele edilmesi, NO_3^- içeriğinde artışa ve NH_4^+ içeriğinde azalmaya yol açmıştır. TA+ H_2S uygulaması, Cr toksisitesi altında NO_3^- içeriğini %107 artırırken, NH_4^+ içeriğini %37 azaltmıştır. Cr stresi koşullarında en büyük NO_3^- içeriği artışı ve NH_4^+ azalması, TA+ H_2S uygulaması ile elde edilmiştir. Cr stresi olmadan bu bileşiklerin NO_3^- ve NH_4^+ içeriğine etkisi önemi bulunmamıştır.

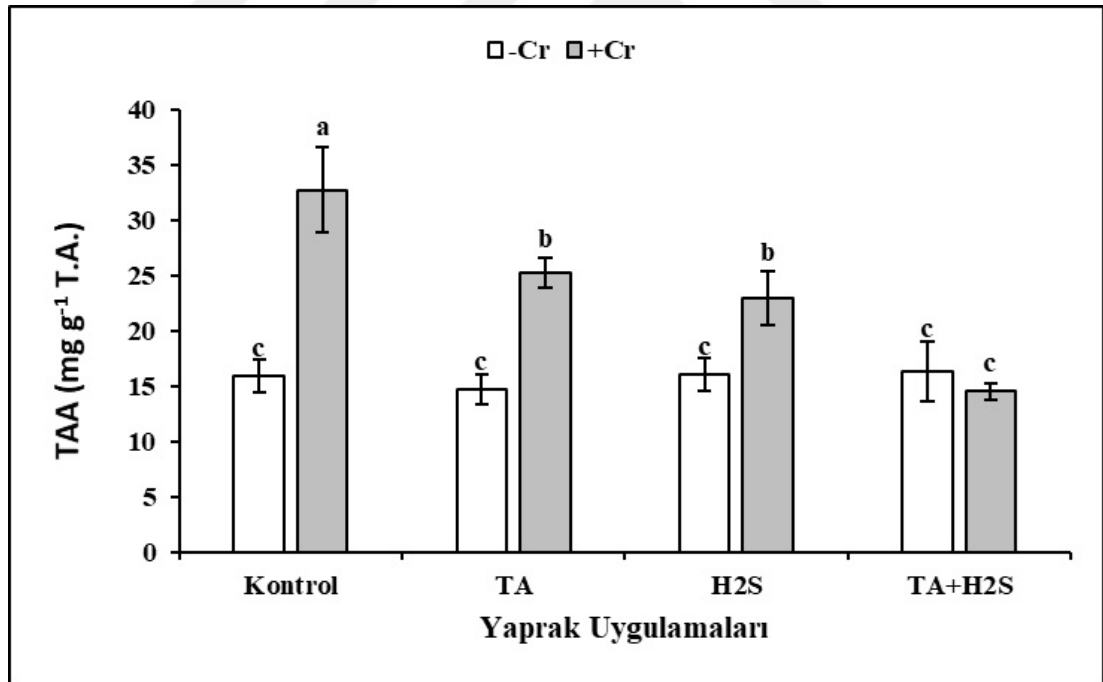
Kontrole kıyasla, Cr toplam çözünür proteinini %33 azalttı ve TAA seviyesini %105 arttırdı (Şekil 4.65. ve 4.66.). Biber bitkilerine TA veya H_2S uygulaması, Cr stresi altında toplam çözünür protein içeriğinde artışa ve TAA içeriğinde azalmaya yol açmıştır. TA ve H_2S 'in kombinasyonu Cr stresli fidelerde, toplam çözünür proteinini %38 artırırken TAA'yı %56 azaltmıştır.



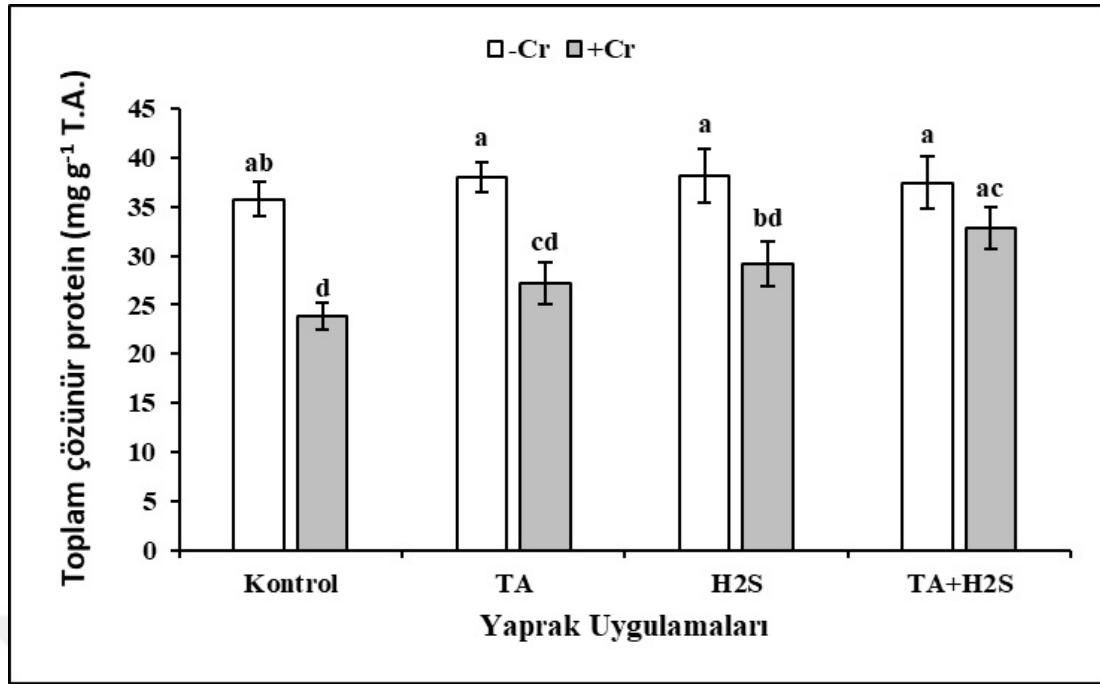
Şekil 4.63. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H_2S) uygulamalarının yaprakların nitrat (NO_3^-) içeriğine etkisi



Şekil 4.64. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının yaprakların amonyum (NH₄⁺) içeriğine etkisi



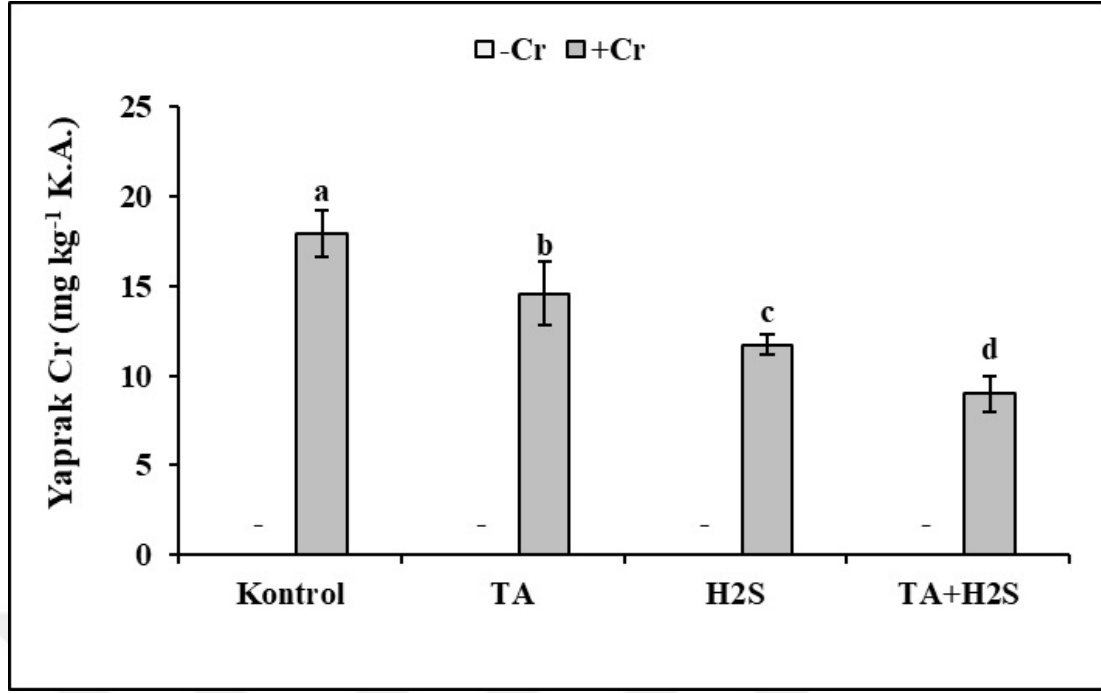
Şekil 4.65. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının yaprakların toplam amino asit (TAA) içeriğine etkisi



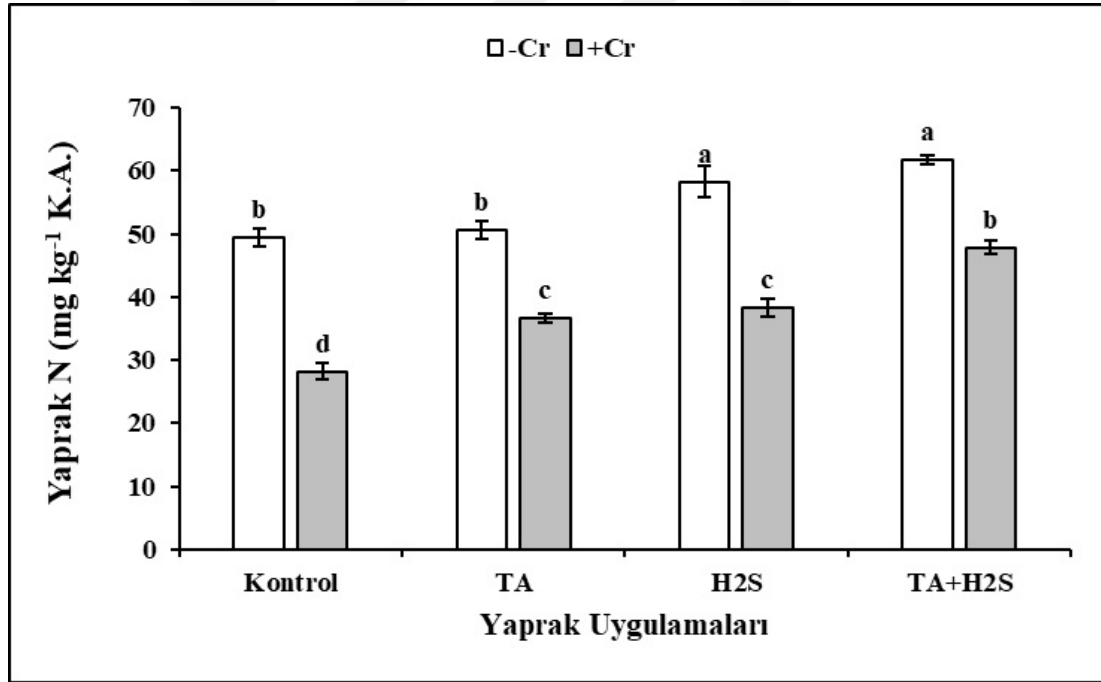
Şekil 4.66. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının yaprakların toplam çözünür protein içeriğine etkisi

Cr'a maruz kalan biber bitkilerinin yapraklarında Cr birikimi gözlemlendi (Şekil 4.67.). Yaprak Cr içeriği, TA ve H₂S'in yaprağa püskürtülmesiyle etkili bir şekilde azaltılmıştır. Bu kimyasallar tek başına uygulandığında H₂S yaprak Cr birikimini azaltmada TA'ya göre daha etkiliydi. Ancak TA ve H₂S'in birlikte uygulanmasının yaprak Cr içeriğinin azaltılmasında tek başına uygulanmalarından daha etkili olduğu gözlemlendi. Spesifik olarak TA, H₂S ve TA+H₂S muameleleri yaprakların Cr içeriğinde sırasıyla %19, %35 ve %49 oranında bir düşüşe neden oldu.

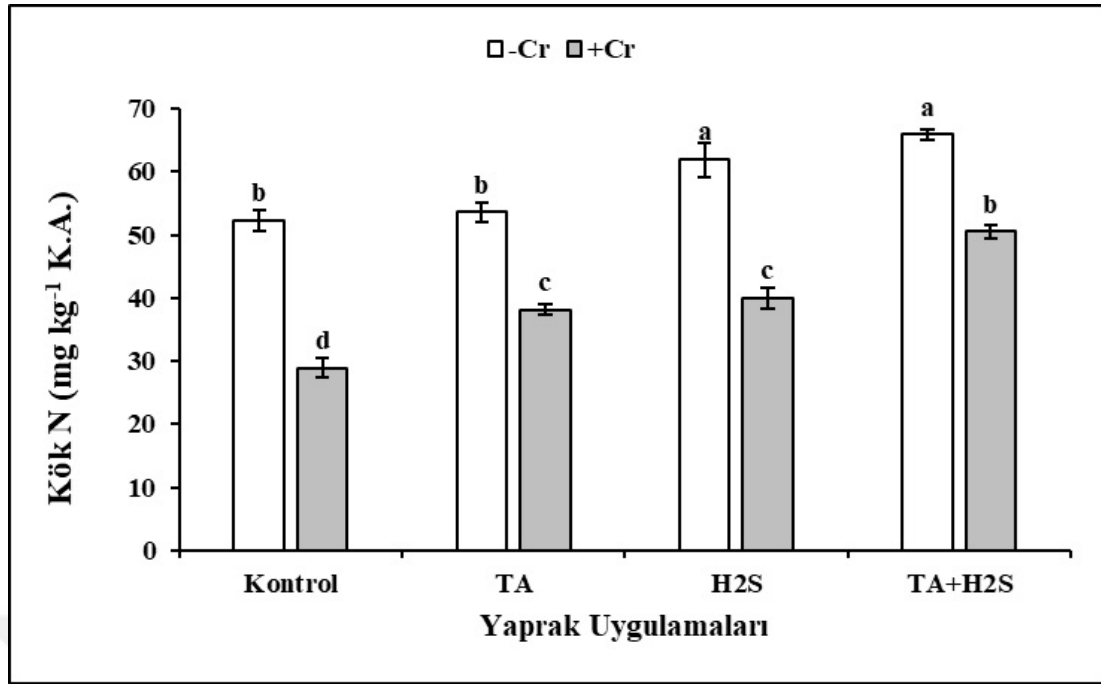
Cr stresi, kontrole kıyasla hem yapraklarda hem de köklerde N, P ve K seviyelerini düşürdü (Şekil 4.68.- 4.73.). Yapraklarda N, P ve K sırasıyla %43, %53 ve %42 oranında azalırken, köklerde sırasıyla %44, %45 ve %40 oranında azaldı. TA veya H₂S uygulaması, Cr stresli bitkilerin hem yapraklarında hem de köklerinde N, P ve K seviyelerini arttırdı. TA ve H₂S kombinasyonu, N, P ve K seviyelerinde bireysel uygulamalarına göre daha yüksek bir artışla sonuçlanarak sinerjistik bir etki gösterdi. Stressiz bitkilerde, H₂S ve TA+H₂S uygulamaları hem yaprak hem de köklerin besin seviyelerini önemli ölçüde arttırdı. Buna karşın tek başına TA muamelesi stressiz koşullar altında besin seviyelerini önemli ölçüde değiştirmedi.



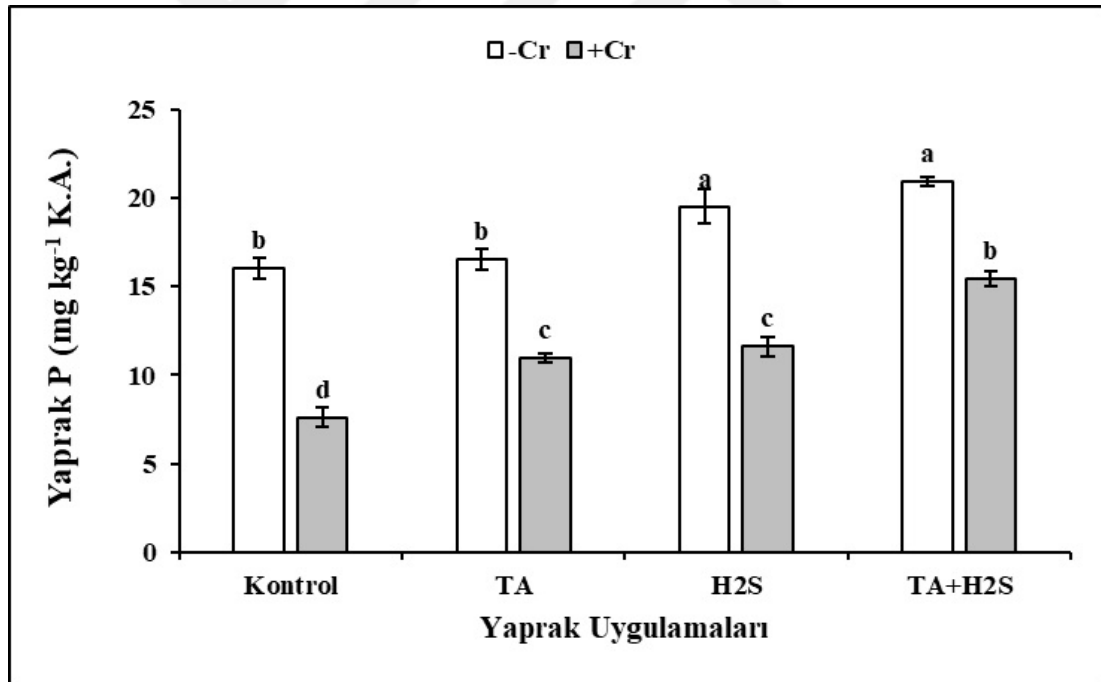
Şekil 4.67. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının yaprak Cr birikimine etkisi



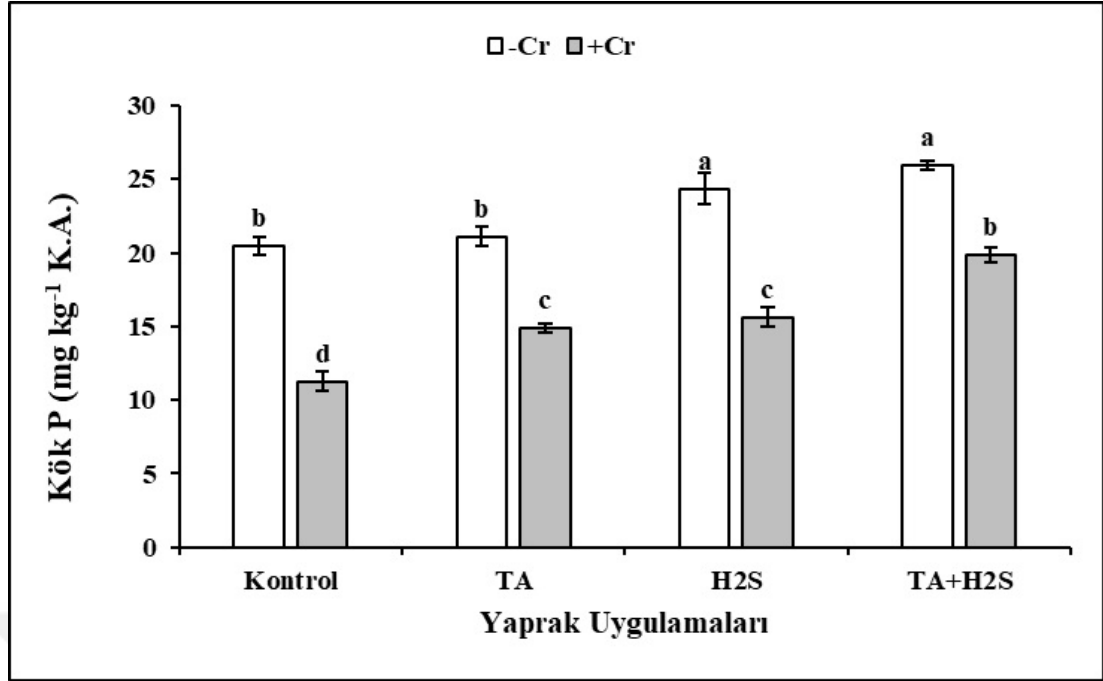
Şekil 4.68. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının yaprakların azot (N) içeriğine etkisi



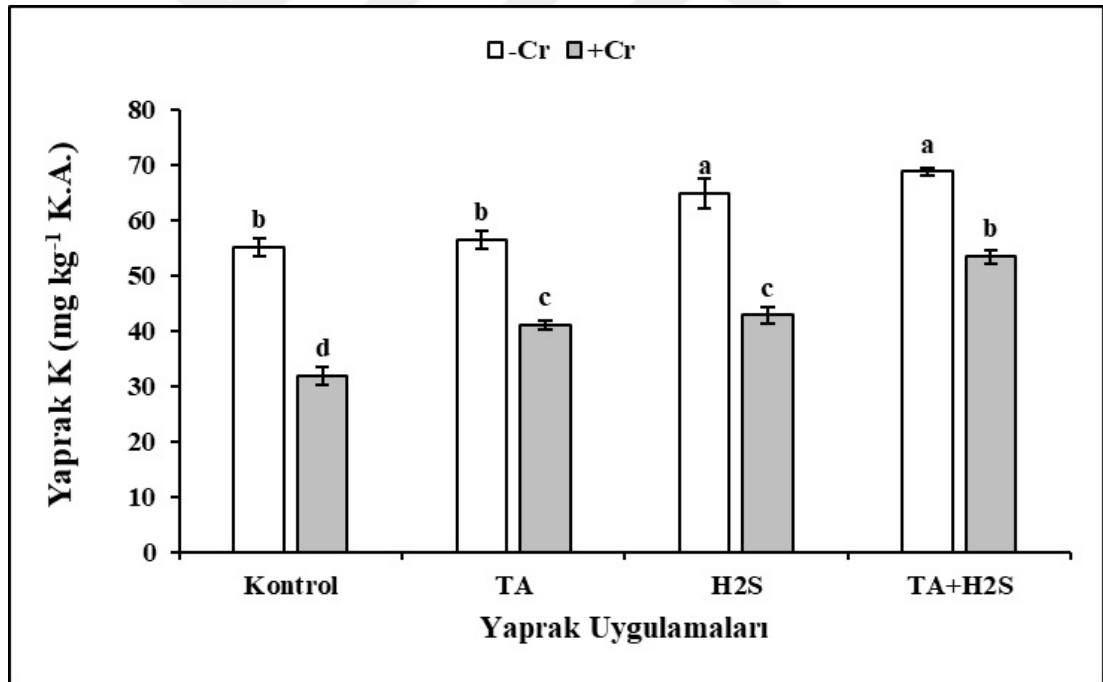
Şekil 4.69. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının köklerin azot (N) içeriğine etkisi



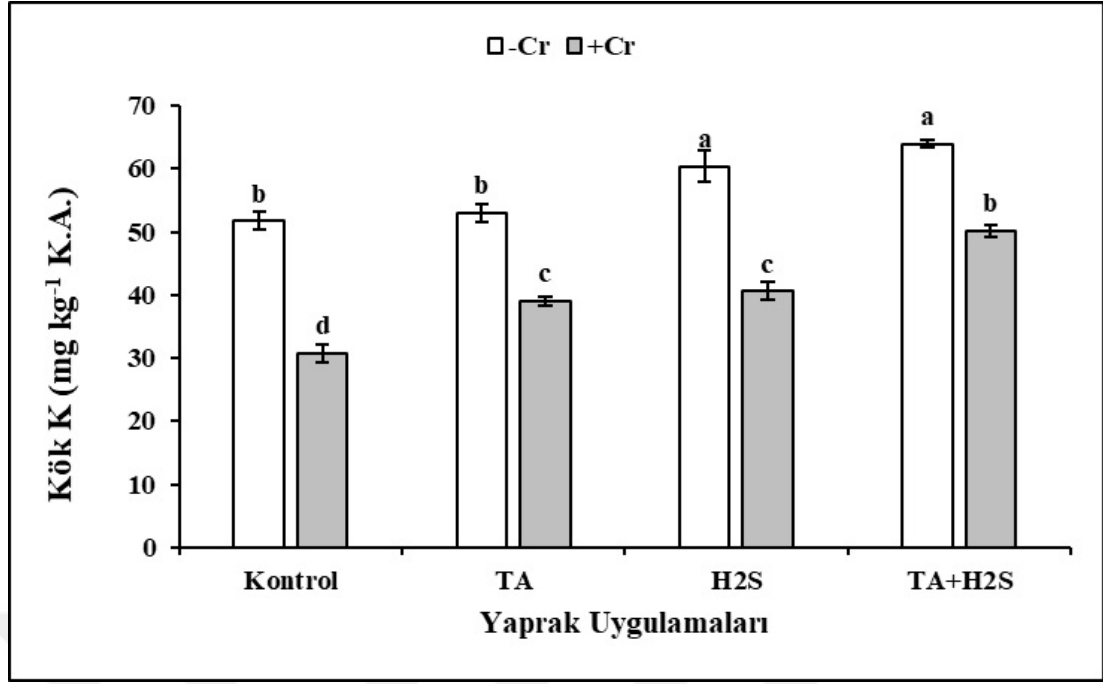
Şekil 4.70. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının yaprakların fosfor (P) içeriğine etkisi



Şekil 4.71. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının köklerin fosfor (P) içeriğine etkisi



Şekil 4.72. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının yaprakların potasyum (K) içeriğine etkisi



Şekil 4.73. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında yetişen biber bitkilerine tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının köklerin potasyum (K) içeriğine etkisi

5. TARTIŞMA

5.1. Nikel (Ni) toksisitesi koşullarında nitrik oksit (NO) ve diüre uygulamalarının bitki toleransına etkisi

Çalışmamızda Ni stresi, daha önceki raporlarla tutarlı olarak biber bitkisinin kuru ağırlığını azaltmıştır (Badawy ve ark., 2022; Najafi-Kakavand ve ark., 2022). NO ve diüre uygulamaları, daha önce kadmiyum (Cd) (Ahmad ve ark., 2018) ve arsenik (As) (Shukla ve ark., 2022) stresinde bildirildiğine benzer şekilde, Ni toksisitesinin biber büyümesi üzerindeki olumsuz etkilerini azaltmıştır. Tek başına NO uygulaması besin alımını iyileştirdi ve kök yapısını korudu, bu da kurşun (Pb) stresi altındaki biberde (Kaya ve ark., 2019b) ve Cr stresi altındaki ıspanak bitkilerinde (Ma ve ark., 2020) bildirildiği gibi bitki büyümesini arttırdı. Benzer şekilde diüre uygulamasının mercimek ve çemen otu bitkilerinde farklı stres koşullarında sürgün uzunluğunu ve kuru maddeyi arttırdığı bildirilmiştir (Talukdar, 2016; Xalxo and Keshavkant, 2019). Bitki büyümesi üzerindeki bu olumlu etkiler, antioksidan enzimlerin aktivasyonuna, osmolit üretiminin artmasına, elektrolit sızıntısının azalmasına ve bitki dokularında metal birikiminin azalmasına bağlanabilir (Waqas ve ark., 2019). Yüksek metal seviyeleri, metallerin kökler tarafından emiliminin artmasına ve sürgünlere iletilerek birikmesine neden olur. Bitki dokularındaki yüksek Ni konsantrasyonu, fotosentezi ve antioksidan enzimleri olumsuz etkileyerek büyümeyi ve biyokütle üretimini engeller (Altaf ve ark., 2021). Bulgularımız önceki çalışmalarla tutarlı olarak Ni stresi altındaki sürgünlerde Ni konsantrasyonunun arttığını gösterdi (Altaf ve ark., 2022; Rizwan ve ark., 2022). Buna karşın hem NO hem de diüre, sürgünlerde biriken Ni'de önemli bir azalmaya yol açtı. NO ve diürenin kombinasyon halinde uygulanması sürgünlerde Ni birikimini azaltmada tek başına uygulanmasından daha etkili olmuştur. Bu durum, NO'nun kökten sürgüne Ni translokasyonunu azaltmasından kaynaklanıyor olabilir (Kazemi ve ark., 2010). NO'nun Ni birikiminin azaltılmasında üzerindeki olumlu etkisinin kesin mekanizması, metal alımı ve taşınmasıyla ilgili gen ifadesinin modülasyonu ile ilgili olabilir.

Ni stresi, *Mentha arvensis* (Nabi ve ark., 2021) ve çemen otu (Aqeel ve ark., 2022) üzerinde yapılan önceki araştırmalarla tutarlı olarak biber yapraklarında klorofil, karotenoidler ve *Fv/Fm*'de azalmaya yol açtı. Ancak NO ve diüre uygulamaları Ni stresli biber fidelerinde bu fotosentetik parametreleri iyileştirmiştir. NO'nun fotosentez üzerindeki olumlu etkileri, stres sırasında oluşan ROT'u temizleme ve fotosentetik pigmentleri koruma kabiliyetine (Bhalerao ve ark., 2015) ve RuBisCO aktivitesindeki değişimlere (Beri ve Sharma, 2016) bağlanabilir. Önceki

araştırmalar NO'nun fotosentezle ilgili parametreleri desteklediğini bildirmiştir (Wei ve ark., 2022). Ayrıca diürenin buğdayda bu parametreler üzerinde faydalı etkileri daha önce Pb stresi koşullarında gözlemlenmiştir (Kaya ve ark., 2022a).

Yaprığın bağıl su içeriği, bitkinin su durumunun değerlendirilmesinde önemli bir belirteçtir ve stres koşullarında olumsuz yönde etkilenir (Elsayed ve ark., 2011). Ni stresi, daha önceki çalışmalarla tutarlı olarak, biber fidelerinde yaprak BSI'sini azalttı (Kumar ve ark., 2022c; Altaf ve ark., 2022). Sonuçlarımız, Ni stresinin biber fidelerinde prolin seviyelerinde bir artışa yol açtığını göstermektedir. Bu durum, Cr stresli ıspanak (Hussain ve ark., 2022) ve Ni stresli biber (Altaf ve ark., 2022) üzerinde yapılan önceki çalışmalarla tutarlıdır. Ek olarak Ni stresi, toplam çözünür şeker içeriğinde azalmaya neden olmuştur. Bu sonuçlar Nie ve ark. (2015) yüksek Ni konsantrasyonuna maruz kalan mısır yapraklarındaki bulgularıyla uyumludur. Hem NO hem de diürenin kombinasyon halinde uygulanması, Ni stresli biber fidelerinde yaprak BSI, prolin ve toplam çözünür şeker seviyelerini iyileştirerek bitkinin stres toleransını arttırdı. NO'nun bu parametreler üzerindeki faydalı etkileri, Ni stresli patlıcan (Soliman ve ark., 2019) ve tuz stresli pirinç (Alnusairi ve ark., 2021) gibi çeşitli streslere maruz kalan bitkilerde bildirilen sonuçlarla uyumludur. NO, bitki su ilişkilerini düzenlemek için stoma açıklığını kontrol ederek su alımını ve terlemeyi düzenlediği bildirilmiştir (Lubyanova ve ark., 2022). Ayrıca, diürenin kuraklık stresi altındaki bitkilerde ozmotik dengeyi koruyarak ve terleme oranını azaltarak su ilişkilerini iyileştirdiği kanıtlanmıştır (Ahmad ve ark., 2021).

Shikimic asit veya Fenilpropanoid yolları tarafından oluşturulan fenolik bileşikler, farklı çevresel stresler altında zorunlu antioksidanlar olarak görev yapar (Vuolo ve ark., 2019). Bu çalışmada, Ni toksisitesi altında NO ve diüre uygulamasıyla fenolik konsantrasyonunun arttığı bulunmuştur. Bhardwaj ve ark. (2023) Ni stresi koşullarında NO uygulamasının turp (*Raphanus sativus* L.) bitkilerinde fenolik bileşikleri arttırdığını bildirmiştir. Ayrıca, As stresi altında Vicia faba'da NO uygulaması sonrası fenolik metabolizmasının uyarılmasıyla fenolik konsantrasyonunun arttığı rapor edilmiştir (Mohamed ve ark., 2016). Ni stresinin NO ve diüre tarafından iyileştirilmesi muhtemelen artan metabolit içeriğinden kaynaklanmaktadır.

Bu çalışmada, Ni stresi koşullarında oksidatif stres belirteçlerinin (ES, MDA ve H₂O₂) düzeylerinin yükseldiği, NO ve diürenin tek başına ve kombinasyon halinde uygulanmasının bu parametreleri azalttığı bulunmuştur. Rahim ve ark.

(2022), NO'nun pirinçte ES, MDA ve H_2O_2 seviyelerini azalttığını raporlamıştır. Ayrıca Kaya ve ark. (2022a), diürenin Pb stresi altındaki buğdayda bu parametreleri azalttığını bildirmiştir. Wang ve ark. (2021), NO'nun membran bütünlüğünün korunmasına yardımcı olduğunu ve lipid peroksidasyonunun bir yan ürünü olan MDA konsantrasyonunu azalttığını bildirmiştir. Zhao ve ark. (2016), NO'nun Cd kaynaklı lipid peroksidasyonunu azalttığını, hücre zarının fonksiyonel ve yapısal bütünlüğünü koruduğunu bildirmiştir. Ek olarak Rizwan ve ark. (2018), NO uygulamasının pirinçte elektrolit sızıntısını, metilglioksal, MDA ve H_2O_2 konsantrasyonlarını azalttığını bulmuştur. As stresi koşullarında mercimek yapraklarında H_2O_2 ve MDA konsantrasyonlarının arttığı, ancak diüre uygulanmasının As alımını ve translokasyonunu azaltarak bu oksidatif stres belirteçlerinin konsantrasyonunu önemli ölçüde azalttığı raporlanmıştır (Talukdar, 2016). Hem NO hem de diürenin, elektrolit sızıntısını, MDA ve H_2O_2 konsantrasyonlarını azalttığı ve sonuç olarak bitkilerde oksidatif stresi hafiflettiği Rizwan ve ark. (2018) tarafından da raporlanmıştır. Oksidatif stres, iki doku ve organellerine zarar veren ROT'ların aşırı birikmesiyle meydana gelir (Fryzova ve ark., 2017). Bitkilerde ROT'un aşırı birikmesi proteinler, lipidler ve nükleik asitler gibi çeşitli biyomoleküllerin zarar görmesine neden olur (Kumar ve ark., 2022b). Bitkilerdeki antioksidan savunma sistemi, ROT oluşumunu ve temizlenmesini düzenleyerek ROT dengesinin korunmasına yardımcı olur.

Bitkinin antioksidan savunma sistemi, SOD, KAT, POD, GPX, APOD ve GR gibi enzimatik antioksidanların yanı sıra askorbat ve glutatyon gibi enzimatik olmayan antioksidanları içerir (Rezayian ve ark., 2019). H_2O_2 detoksifikasyonunda önemli enzimler arasında KAT ve APOD bulunmaktadır. SOD ve H_2O_2 temizleyici enzimler arasındaki hassas denge, H_2O_2 birikimini kontrol etmek ve oksidatif hasarı önlemek için çok önemlidir (Berwal ve ark., 2021). Ni stresi altında KAT aktivitesindeki azalma, artan ROT üretimi veya APOD ve POD gibi enzimler arasındaki dengesizliklerden kaynaklanabilir (Soares ve ark., 2016). Kesin mekanizma bilinmemektedir, ancak enzim dengesindeki değişiklikler KAT aktivitesindeki azalmaya katkıda bulunabilir. NO'nun, enzim aktivitelerini (POD, SOD, APOD ve KAT) uyarak pirincin Ni stresine karşı toleransını artırdığı ve ROT oluşumunu azalttığı bildirilmiştir (Rizwan ve ark., 2018).

Hem metal şelatörü hem de ROT temizleyici olarak görev yapan diüre, bitkilerdeki antioksidan enzimleri düzenleyerek metal stresini etkili bir şekilde azaltır (Talukdar, 2016; Waqas ve ark., 2019). Çok sayıda çalışma, diürenin ağır metal stresi altındaki çeşitli bitki türlerinde antioksidatif enzim aktiviteleri üzerindeki faydalı

etkilerini göstermiştir (Xalxo ve Keshavkant, 2019; Upadhyay ve ark., 2022). Kaya ve ark. (2022a), diüre takviyesinin, ROT seviyelerini ve MDA konsantrasyonlarını azaltarak buğdayda Pb stresini hafiflettiğini bildirilmiştir. Diüre uygulamasının, ROT temizleme mekanizmalarını güçlendirerek ve antioksidatif enzim aktivitesini uyararak bor stresi kaynaklı lipid peroksidasyonunu ve oksidatif stresi azalttığı raporlanmıştır (Kaya ve ark., 2013). Ayrıca SOD, KAT, APOD ve POD aktivitesini artırarak tuz stresinin neden olduğu oksidatif hasara karşı koruma sağladığı bildirilmiştir (Sanaullah ve ark., 2016). Araştırma sonuçlarımız, Ni'ye maruz kalan biber bitkilerine NO, diüre veya her ikisinin birlikte uygulanmasının antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırdığını gösterdi. Bu bulgular NO'nun biber bitkilerinde Ni kaynaklı oksidatif hasarı azaltmadaki etkinliğini göstermektedir.

NO_3^- tarım topraklarındaki bitkiler için önemli bir azot kaynağıdır ve bitki hücrelerinde NR enzimi tarafından NO_2^- 'ye dönüştürülür (Loqué ve ark., 2003; Gioseffi ve ark., 2012). Ancak Ni stresi, NO_3^- alımını ve taşıma mekanizmalarını bozarak yaprak NO_3^- konsantrasyonunu azaltabilir (Rizwan ve ark., 2019; Aqeel ve ark., 2022). NR aktivitesindeki azalma ise, ROT'ların artmasından veya NO_3^- mevcudiyetinin azalmasından kaynaklanabilir (Rizwan ve ark., 2019). Çalışmamızda Ni stresi hem NO_3^- konsantrasyonunda hem de NR aktivitesinde önemli bir azalmaya yol açtı. NO_3^- bitkilerde protein ve diğer organik bileşiklerin sentezi için NH_4^+ formuna indirgenmelidir (Erdal ve Türk, 2016). NH_4^+ , esas olarak GS-GOGAT enzimleri veya GDH ile amino asitlere ve proteinlere asimile edilir (Chen ve ark., 2023; Liu ve ark., 2023). Ni stresi de dahil olmak üzere ağır metal stresi, GS-GOGAT döngüsünü olumsuz yönde etkileyebilir ve GDH aktivitesini artırarak bitkilerde daha yüksek NH_4^+ seviyelerine yol açabilir (Sayyadi ve ark., 2022; Kaya ve ark., 2022b). Sonuç olarak araştırmamızda, NH_4^+ ve amino asit birikiminde bir artış, çözünür protein içeriğinde bir azalma gözlemlendi. NO ve diürenin yaprağa uygulanması biber bitkilerinde NR aktivitesini, NO_3^- seviyelerini, N asimilasyonunu ve protein sentezini düzenledi. Aynı zamanda GS-GOGAT döngüsünü düzenleyerek Ni toksisitesi altındaki NH_4^+ içeriğini azalttı. Bu etkiler, Ni toksisitesinin biber bitkileri üzerindeki olumsuz etkisini hafifleterek stres toleransını artırır.

Çalışmamızda, Ni stresi koşullarında yapraklarda ve köklerde Ni birikiminin arttığı, N, P ve K seviyelerinin azaldığı gözlemlendi. Bu bulgular, Altaf ve ark. (2022) topraktaki Ni'nin mineral besin dengesini bozarak besin eksikliklerine yol açtığını vurgulayan sonuçlarıyla uyumludur. Bu çalışma, besin dengesizliklerini önlemek ve sağlıklı bitki büyümesini teşvik etmek için topraktaki ağır metal kirliliğini yönetmenin önemini vurgulamaktadır. Besin seviyelerindeki düşüş, stresli

koşullar altında yaygın olarak gözlemlenen fizyolojik ve metabolik süreçlerdeki bozukluklara bağlanmaktadır (Hassan ve ark., 2019). Yapraktan NO veya diüre uygulaması, bitki kökleri ve yapraklarındaki Ni konsantrasyonunu azaltırken N, P ve K seviyelerini artırmıştır. Bu sonuçlar, Soliman ve ark. (2019) sonuçlarıyla uyumludur.

Ni stresi koşullarındaki biber bitkilerine NO ve diürenin tek başına veya birlikte uygulanması hücre organellerindeki Ni konsantrasyonunun azalmasına yol açtı. Bu durum Ni'nin hücresel olaylar üzerindeki toksik etkilerini önlemek için bir strateji olabilir (Zhang ve ark. 2019). Bu bulguların ardındaki mekanizmaların daha iyi anlaşılması için daha fazla deney ve analiz gerekmektedir. Ancak sonuçlarımız, Ni toksisitesinin önlenmesine yönelik Ni'nin hücre duvarında birikmesi ve Ni alımının düzenlenmesi gibi bilinen bitki stratejileriyle uyumludur. Yapraklar ve kökler, birbirinden farklı fizyolojik işlevleri nedeniyle strateji bakımından farklılık gösterir (Arıkan ve ark. 2023). Yapraklar, Ni iyonlarını hücre duvarına bağlayarak ve organellerdeki alımı azaltarak sitoplazmadaki Ni iyonlarının konsantrasyonunu sınırlar ve bu durum Ni toksisitesinin hafifletilmesinde etkili rol oynar (Saito ve ark. 2010). NO ve diüre uygulamalarından sonra köklerin vakuoler çözünebilir fraksiyonundaki Ni konsantrasyonunun artması, Ni birikimi için farklı bir stratejinin varlığını göstermektedir. Bitkiler ağır metal stresi ile başa çıkmak amacıyla fazla metalleri vakuollerde biriktirirler (Syta ve ark. 2021). NO ve diüre uygulamaları, Ni'nin bu organeller içinde çözünürlüğünü ve tutulmasını artırabilir, böylece fazla Ni'yi hassas hücresel olaylardan etkili bir şekilde izole edip depolayabilir (Mustafa ve ark. 2023).

Ni, üreyi NH_4^+ dönüştüren üreazın kofaktörü olarak N metabolizması için çok önemlidir (Barcelos ve ark., 2018; Joseph ve ark., 2022). Yetersiz Ni, yapraklardaki üreaz aktivitesini azaltır, toksik üre oluşumuna neden olur, N metabolizmasını bozar, kloroz ve nekroza yol açar (Ali, 2022). Yüksek Ni konsantrasyonları aynı zamanda üreaz aktivitesini de tehlikeye atarak bitkilerdeki azot metabolizmasını etkileyebilir. Araştırma sonuçları diürenin yüksek Ni koşulları altında Ni alımını azaltarak bitki stresini hafifletebileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, yüksek Ni konsantrasyonuna sahip bölgelerde, özellikle de ürenin tek azot kaynağı olduğu durumlarda diüre kullanımını optimize etmek önemlidir. Bu uyarı diürenin üreaz enzimi üzerindeki inhibitör etkisinden kaynaklanmaktadır (Khan ve ark., 2014). Bu gibi durumlarda, yüksek Ni konsantrasyonları nedeniyle zaten azalmış olan üreaz enzim aktivitesi, diüre tarafından daha da bastırılabilir ve bitkilerde N kullanımı etkilenebilir.

5.2. Krom (Cr) toksisitesi koşullarında tiamin (TA) ve hidrojen sülfid (H₂S) uygulamalarının bitki toleransına etkisi

Cr bitkilerde normal metabolik süreçleri etkileyerek bitki büyümesini engelleyebilir (Ali ve ark., 2023). Bu çalışmada Cr stresi, daha önceki raporlarla tutarlı olarak biber bitkisinin biyokütlesini azaltmıştır (Singh ve ark., 2023a). Eksojen TA uygulamalarının, As (Atif ve Perveen, 2023) ve Cd (Kaya ve Aslan, 2020) stresi altında bitki büyümesini iyileştirdiği raporlanmıştır. Benzer şekilde H₂S'in Cr (Singh ve ark., 2023a), Cd (Guo ve ark., 2023) ve Pb (Gahghi ve ark., 2022) stresi koşullarında bitki büyümesini iyileştirdiği bildirilmiştir. Bu çalışmada önceki çalışmalarda benzer şekilde TA ve H₂S'in Cr stresi altında biber bitkilerinin gövde ve kök büyümesini iyileştirdiği ve sonuç olarak biyomas üretimini arttırdığı bulunmuştur. Bulgularımızda önceki çalışmalarla tutarlı olarak Cr stresi altında sürgünlerde Cr konsantrasyonunun arttığı gözlemlendi (Fu ve ark., 2023; Sun ve ark., 2023a). Buna karşın hem TA hem de H₂S, sürgünlerde biriken Cr miktarında önemli bir azalmaya yol açtı. TA'nın As stresinde (Atif ve Perveen, 2023) ve H₂S'in Cr (Yang ve ark., 2023) stresinde benzer etkileri raporlanmıştır. Ancak mevcut literatürde TA+H₂S uygulamasının Cr'nin detoksifikasyonundaki sinerjistik rolünü açıklayan bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada TA ve H₂S kombinasyonu sürgünlerde Cr birikimini azaltmada tek başına uygulanmasından daha etkili olmuştur. TA ve H₂S uygulaması ile biyokütle üretiminin artması, muhtemelen kökler tarafından besin elementlerinin alımının artması ve Cr'nin kökten üst kısımlarına transferinin azaltılması gibi faktörlere bağlı olabilir. Aynı zamanda TA ve H₂S'in oksidatif stresin azaltılmasında rol alan osmolitlerin, antioksidan enzimlerin ve klorofil biyosentezinin üzerindeki arttırıcı etkilerine de bağlı olabilir (Haghi ve ark., 2022).

Cr stresinin klorofil bozulmalarına yol açarak bitkilerin fotosentetik verimliliğini doğrudan düşürdüğü bilinmektedir (Malik ve ark., 2021). Aynı zamanda, ROT üretimi elektron taşıma zincirini bozar ve bu da PS-II verimliliğini daha da azaltır (Oukarroum ve ark., 2015). Çalışmamızda Cr toksisitesi, domates (Sun ve ark., 2023b) ve buğday (Albqmi ve ark., 2023) üzerinde yapılan önceki araştırmalarla tutarlı olarak biber yapraklarında klorofil, karotenoidler ve *Fv/Fm*'de azalmaya yol açtı. Cr stresi koşullarında aşırı H₂O₂ üretiminin yanı sıra Cr'nin δ -aminolevulinic acid dehidratase aktivitesi üzerindeki etkisi fotosentetik pigment içeriğinde meydana gelen azalmanın nedeni olabilir (Alamri ve ark., 2020). TA ve H₂S uygulamaları Cr stresli biber fidelerinde bu fotosentetik parametreleri iyileştirmiştir. H₂S'in Cr stresi altında fotosentezle ilgili parametreleri desteklediği

bildirmiştir (Ahmad ve ark., 2020). Ayrıca TA'nın Cd stresi altındaki çilek bitkilerinde bu parametreler üzerinde faydalı etkileri raporlanmıştır (Kaya ve Aslan, 2020). Araştırmamızda fotosentetik parametreler üzerine en etkili sonuçlar her iki kimyasalın kombinasyonunda elde edildi.

Yaprakların bağıl su içeriği bitki su durumunu bildiren önemli bir abiyotik stres göstergesidir (Pandain ve ark., 2020). Cr stresi, buğday (Askari ve ark., 2021), mısır (Bashir ve ark., 2021), pirinç (Yang ve ark., 2021) ve domates (Jan ve ark., 2020), bitkilerinde bildirilen sonuçlarla benzer şekilde, biber fidelerinin yaprak BSİ'sini azalttı. TA ve H₂S'in tek başına veya kombinasyon halinde uygulanması, Cr stresli biber fidelerinde yaprak BSİ'sini iyileştirmiştir. Bu durum azalan membran hasarı sonucu su dengesinin iyileşmesinden kaynaklanıyor olabilir. H₂S'in, Cr birikimini ve yer değiştirme oranını azaltarak, kök/sürgün uzunluklarını artırarak ve antioksidan özellikleri iyileştirerek BSİ'sini arttırabildiği raporlanmıştır (Singh ve ark., 2023). Bitkiler, metal toksisitesine karşı toleransı artıran prolin, flavonoidler ve fenolikler gibi çeşitli ikincil metabolitler üretir. Bitki doku ve organlarındaki prolin birikimi, metal toksisitesine bir tepki olmasına rağmen, bu durum sinyal iletimi ile ilişkili olabilir ve stres koşullarında meydana gelen membran bozulmasını önler (Hussain ve ark., 2022). Ayrıca bu bileşikler bitkilerde su dengesinin korunmasında önemli rol oynar. Sonuçlarımız, Cr stresinin prolin ve fenolik seviyelerinde artışa yol açtığını göstermektedir. Bu durum, Cr stresli Pisum sativum (Umar ve ark., 2023) ve Triticum aestivum (Ashraf ve ark., 2022) üzerinde yapılan önceki çalışmalarla tutarlıdır. TA ve H₂S'in kombinasyon halinde uygulanması, Cr stresli biber fidelerinde yaprak BSİ, prolin ve fenolik bileşik seviyelerini iyileştirerek bitkinin stres toleransını arttırdı. H₂S'in bu parametreler üzerindeki etkisi, Ni stresli kabak (Valivand ve Amooaghaie, 2021) bitkilerinde bildirilen sonuçlarla uyumludur. Ayrıca, TA'nın bu parametreleri düzenleyerek ve oksidatif stresi azaltarak su ilişkilerini iyileştirdiği kanıtlanmıştır (Jabeen ve ark., 2022). Sonuç olarak Cr stresinin TA ve H₂S tarafından iyileştirilmesi muhtemelen artan metabolit içeriğinden kaynaklanmaktadır.

Önceki çalışmalar, Cr toksisitesinin reaktif oksijen türlerinin oluşumunu tetiklediğini ve bitkide büyük ölçüde biriktiğini rapor etmişlerdir (Wakeel ve ark., 2020; Basit ve ark., 2022a; Sun ve ark., 2023a). Çalışmamızda, Cr stresi biber bitkilerinde oksidatif stresin önemli göstergeleri olan ES, MDA ve H₂O₂'nin yükselmesine neden oldu. Buna karşın TA ve H₂S'in tek başına veya kombinasyon halinde uygulanmasının bu parametreleri önemli düzeyde azalttığı yani oksidatif stresi hafiflettiği bulundu. Bashir ve ark. (2023), TA'nın buğdayda ES, MDA ve

H₂O₂ seviyelerini azalttığını raporlamıştır. Singh ve ark. (2022), H₂S'in Cr stresi altındaki buğday ve pirinçte bu parametreler üzerindeki benzer etkilerini bildirmiştir. Bitkiler, hücrelerde aşırı ROT oluşumunu önleyen yerleşik bir antioksidan savunma mekanizmasına sahiptir (Ali ve ark., 2019). Bu antioksidan enzimler ROT'un temizlenmesinde ve nötralize edilmesinde önemli rol oynar (Hasanuzzaman ve ark., 2020). Çalışmamızda, Cr'ye maruz kalan biber bitkilerine TA ve H₂S uygulanmasının antioksidatif enzimlerin aktivitesini arttırdığını gözlemledik. Daha önceki raporlar TA'nın antioksidan enzimlerin geliştirilmesi yoluyla bitkilerde oksidatif stresi hafiflettiğini bildirmiştir (Bahuguna ve ark., 2012; Kaya ve ark., 2015; Naheed ve ark., 2022). Bu durum Cr stresi altında TA uygulaması ile bitki büyümesinde meydana gelen artışın, antioksan enzimlerin artmasıyla oksidatif stresin azalmasının sonucunda fotosentezde meydana gelen artıştan kaynaklandığını göstermektedir. Çok sayıda çalışma, H₂S'in antioksidan enzim aktivitelerini teşvik ederek ağır metal kaynaklı oksidatif hasarı azalttığını, böylece MDA ve H₂O₂ konsantrasyonlarını düşürdüğünü ileri sürmüştür (Javad ve ark., 2022; Kaur ve ark., 2022b; Li ve ark., 2021). Bu bulgular, mevcut deneyimizde kaydedilen sonuçlar ile uyumludur. Araştırmamızda, TA ve H₂S kombinasyonun antioksidan savunma sistemini güçlendirmede tek başına olduklarından daha etkili oldukları gözlemlendi. Kaya ve Aslan (2020), TA ve H₂S'in birlikte uygulanmasının çilek bitkisinde Cd kaynaklı oksidatif stresin hafifletilmesinde tek başına uygulanmalarından daha etkili olduğu bildirmiştir. Bu sonuçlar iki bileşiğin oksidatif stresi azaltmada sinerjistik etki gösterdiklerinin kanıtıdır.

Bitkiler tarafından alınan NO₃⁻ 'ün organik bileşiklere katılmadan önce NH₄⁺'e indirgenmesi gerekir (Gajewska ve Sklodowska, 2009). NR, bu indirgeme sürecindeki ilk enzimdir. Bu çalışmada, biber fidelerinin sürgünlerinde Cr toksisitesi altında NR aktivitelerinde ve NO₃⁻ seviyelerinde belirgin bir azalma kaydedildi. NR aktivitelerindeki bu azalma, kökler tarafından NO₃⁻ alımının azalmasından ve ksilemde düşük NO₃⁻ taşınmasından kaynaklanıyor olabilir (Gangwar ve Singh, 2011). NR ve NiR aktiviteleri sonucu veya doğrudan alımın yoluyla biriken NH₄⁺, GS-GOGAT ve GDH ile amino asitlere ve proteinlere asimile edilir (Chen ve ark., 2023; Liu ve ark., 2023). NH₄⁺, hücre için oldukça toksiktir ve bu nedenle hızla asimile edilmelidir. Çalışmamızda Cr toksisitesi koşullarında biber fidelerinde NH₄⁺ içeriğinin arttığı gözlemlendi. NH₄⁺ konsantrasyonunda meydana gelen bu artış NH₄⁺ asimilasyonunda rol oynayan enzimlerin aktivitelerinde meydana gelen azalmadan kaynaklanıyor olabilir. Daha önceki raporlar Cr toksisitesi koşullarında NH₄⁺ konsantrasyonunda önemli bir artış, GDH ve GOGAT aktivitelerinde ise belirgin bir azalmanın meydana geldiğini bildirmiştir (Shahid ve ark., 2018; Khan ve ark.,

2023c). Çalışmamızda daha önceki raporlarla benzer şekilde Cr stresi altında GS-GOGAT ve GDH aktivitelerinde düzensizlik gözlemlendi. Bu durum stresli fidelerin GS-GOGAT sisteminin NH_4^{+} 'ü, N içeren organik bileşiklere etkili bir şekilde asimile etmediğini göstermektedir. GS ve GOGAT aktivitelerindeki azalmanın bu enzim proteinlerinin tahribatına neden olan ROT üreminden kaynaklandığı düşünülmektedir (Gangwar ve ark., 2011). Sonuç olarak araştırmamızda, çözünür protein içeriğinde azalma ve serbest amino asitlerde artış gözlemledik. Bu durum, N asimilasyonunun ve çözünür proteinlerin biyosentezinin azaldığını göstermektedir. TA ve H_2S 'in yaprağa uygulanması biber bitkilerinde NR aktivitesi ve GS-GOGAT döngüsünü düzenleyerek N asimilasyonunu iyileştirdi ve protein sentezini arttırdı. N asimilasyonu sürecinin düzenlenmesi ve protein sentezinin geliştirilmesi stresin hafifletilmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

Cr, birçok temel elementle yakın yapısal benzerliğe sahip olduğundan, bitkilerde mineral besin durumunu etkileyebilir (Ali ve ark., 2018). Bu yapısal benzerlik nedeniyle besinlerin alımını, translokasyonunu ve birikmesini engeller (Zaheer ve ark., 2020). Çalışmamızda, Cr stresinin bitki büyümesini olumsuz etkilediği, yaprakların Cr içeriğini arttırdığı, yapraklarda ve köklerde N, P ve K seviyelerini azalttığı gözlemlendi. Bu bulgular, Ma ve ark. (2022)'nin gelişme ortamında artan Cr'nin mineral besin dengesini bozarak besin eksikliklerine yol açtığını vurgulayan sonuçlarıyla uyumludur. Besin seviyelerindeki düşüş, stresli koşullar altında yaygın olarak gözlemlenen fizyolojik ve metabolik süreçlerdeki bozukluklara bağlanmaktadır (Hassan ve ark., 2019). TA veya H_2S uygulaması, yapraklarındaki Cr konsantrasyonunu azaltırken, yaprak ve köklerde N, P ve K seviyelerini artırmıştır. Sonuçta TA ve H_2S kombinasyonu Cr stresi koşullarında mineral beslenme, fotosentez, antioksidan enzimlerin iyileştirilmesi ve azot metabolizmasının düzenlenmesi yoluyla biber bitkilerinde büyümenin artmasını sağlamıştır. Tüm bu sonuçlar açısından bu iki bileşin kombinasyonu tek başına uygulamalarından daha etkili bulunmuştur.

6. SONUÇLAR

Bitki büyüme düzenleyicilerinin tek başına uygulamalarının hem normal hem de stresli koşullar altında bitki büyümesini desteklediği bilinmektedir. Bu çalışma, biber fidelerinde nikel ve krom toksisitesinin azaltılmasında farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin sinerjistik etkilerini ortaya koymaktadır.

Nikel ve Krom stresinin bitkilerde kök büyümesinin, besin ve su alımının azalmasına, fotosentetik mekanizmanın bozulmasına, azot metabolizmasının bozulmasına ve oksidatif strese yol açarak bitki büyümesini engellediğini gözlemledik. NO ve Diürenin bireysel uygulamalarına kıyasla kombinasyonlarının stresin etkilerinin azaltılmasında daha etkili oldu. Sonuçlar bu iki bileşiğin Ni stresi koşullarında, antioksidan savunma sisteminin, azot metabolizmasının ve hücre içi nikel dağılımının düzenlenmesi yoluyla stresi hafiflettiğini göstermektedir. TA ve H₂S'in bireysel uygulamalarına kıyasla kombinasyonlarının Cr stresinin etkilerinin azaltılmasında önemli rol oynadığını gözlemledik. Bu iki kimyasalın birlikte uygulanması muhtemelen Cr'un transkasyonunu azaltarak, besin alımını, antioksidan savunma sistemini ve azot metabolizmasını düzenleyerek Cr stresinin etkilerini azalttı.

7. ÖNERİLER

Çalışma bitki stres fizyolojisi ve biyokimyası alanında gelecekteki araştırmalar için yeni öneriler sunmaktadır. Gelecekteki çalışmalarda bu bileşiklerin farklı bitki türlerinde ve çeşitli ağır metal stresleri altındaki kombine etkileri araştırılmalıdır. Ek olarak, bu bileşiklerin ağır metallere karşı bitki toleransını arttırmadaki sinerjik etkilerinin altında yatan mekanizmaların anlaşılması için gen ifadelerindeki değişimler ve diğer hormonların endojen birikimleri incelenmelidir.

Bu bileşiklerin iyileştirici etkileri ağır metallerce kirlenmiş topraklarda test edilmelidir. Ayrıca, bu çalışmada elde edilen sonuçlar dikkate alınarak, ağır metalle kirlenmiş alanlarda yapılacak saha çalışmaları ile bitkisel üretim boyutunda ele alındığı uygun maliyetli, ekonomik bir çözümün olup olamayacağı ortaya konulmalıdır.

KAYNAKLAR

- Abd_Allah, E. F., Hashem, A., Alam, P., and Ahmad, P., 2019. Silicon alleviates nickel-induced oxidative stress by regulating antioxidant defense and glyoxalase systems in mustard plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38, 1260-1273. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09931-y>
- Abd Elnabi, M. K., Elkaliny, N. E., Elyazied, M. M., Azab, S. H., Elkhalfa, S. A., Elmasry, S., Mouhamed, M. S., Shalamesh, E. M., Alhorieny, N. A., and Abd Elaty, A. E., 2023. Toxicity of heavy metals and recent advances in their removal: A review. *Toxics*, 11(7), 580. <https://doi.org/10.3390/toxics11070580>
- Abidin, A. A. Z., Wong, S. Y., Rahman, N. S. A., Idris, Z. H. C., and Balia Yusof, Z. N., 2016. Osmotic, oxidative and salinity stresses upregulate the expressions of thiamine (Vitamin B1) biosynthesis genes (THIC and THI1/THI4) in oil palm (*Elaies guineensis*). *Journal of Oil Palm Research*, 28(3), 308-319. <https://doi.org/10.21894/jopr.2016.2803.07>
- Adhikari, A., Adhikari, S., Ghosh, S., Azahar, I., Shaw, A. K., Roy, D., Saha, S., and Hossain, Z., 2020. Imbalance of redox homeostasis and antioxidant defense status in maize under chromium (VI) stress. *Environmental and Experimental Botany*, 169, 103873. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103873>
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)
- Agbaria, H., Heuer B., and Zieslin, N., 1998. Rootstock-imposed alterations in nitrate reductase and glutamine synthetase activities in leaves of rose plants. *Biologia Plantarum*, 41, 85–91. <https://doi.org/10.1023/A:1001716617289>
- Ahmad, A., Khan, W. U., Shah, A. A., Yasin, N. A., Naz, S., Ali, A., Tahir, A., and Batool, A. I., 2021. Synergistic effects of nitric oxide and silicon on promoting plant growth, oxidative stress tolerance and reduction of arsenic uptake in *Brassica juncea*. *Chemosphere*, 262, 128384. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128384>
- Ahmad, P., Ahanger, M. A., Alyemeni, M. N., Wijaya, L., and Alam, P., 2018. Exogenous application of nitric oxide modulates osmolyte metabolism, antioxidants, enzymes of ascorbate-glutathione cycle and promotes growth under cadmium stress in tomato. *Protoplasma*, 255(1), 79-93. <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1132-x>
- Ahmad, P., Alyemeni, M. N., Wijaya, L., Ahanger, M. A., Ashraf, M., Alam, P., Paray, B. A., and Rinklebe, J., 2021. Nitric oxide donor, sodium nitroprusside, mitigates mercury toxicity in different cultivars of soybean. *Journal of Hazardous Materials*, 408, 124852. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124852>
- Ahmad, R., Ali, S., Abid, M., Rizwan, M., Ali, B., Tanveer, A., Ahmad, I., AZAM, M., and GHANI, M. A., 2020. Glycinebetaine alleviates the chromium toxicity in *Brassica oleracea* L. by suppressing oxidative stress and

- modulating the plant morphology and photosynthetic attributes. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 1101-1111. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06761-z>
- Ahmad, R., Ali, S., Rizwan, M., Dawood, M., Farid, M., Hussain, A., Wijaya, L., Alyemeni, M. N., and Ahmad, P., 2020. Hydrogen sulfide alleviates chromium stress on cauliflower by restricting its uptake and enhancing antioxidative system. *Physiologia Plantarum*, 168(2), 289-300. <https://doi.org/10.1111/ppl.13001>
- Ahmad, S., Mfarrej, M. F. B., El-Esawi, M. A., Waseem, M., Alatawi, A., Nafees, M., Saleem, M. H., Rizwan, M., Yasmeen, T., Anayat, A., and ALi, S., 2022. Chromium-resistant *Staphylococcus aureus* alleviates chromium toxicity by developing synergistic relationships with zinc oxide nanoparticles in wheat. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 230, 113142. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.113142>
- Alam, P., Balawi, T. H., Altalayan, F. H., Hatamleh, A. A., Ashraf, M., and Ahmad, P., 2021. Silicon attenuates the negative effects of chromium stress in tomato plants by modifying antioxidant enzyme activities, ascorbate–glutathione cycle and glyoxalase system. *Acta Physiologiae Plantarum*, 43(7), 110. <https://doi.org/10.1007/s11738-021-03276-4>
- Alamri, S., Ali, H.M., Khan, M.I.R., Singh, V.P., and Siddiqui, M.H., 2020. Exogenous nitric oxide requires endogenous hydrogen sulfide to induce the resilience through sulfur assimilation in tomato seedlings under hexavalent chromium toxicity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 20-34. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.07.003>
- Albqmi, M., Selim, S., Yaghoubi Khanghahi, M., Crecchio, C., Al-Sanea, M. M., Alnusaire, T. S., Amuhayawi, M.S., Al-Jaouni, S.K., Hussein, S., Warrad, M., and Abdelgawad, H., 2023. Chromium (VI) Toxicity and Active Tolerance Mechanisms of Wheat Plant Treated with Plant Growth-Promoting Actinobacteria and Olive Solid Waste. *ACS Omega*, 8(36), 32458-32467. <https://doi.org/10.1021%2Facsomega.3c02447>
- Alharby, H. F., and Ali, S., 2022. Combined role of Fe nanoparticles (Fe NPs) and *Staphylococcus aureus* L. in the alleviation of chromium stress in rice plants. *Life*, 12(3), 338. <https://doi.org/10.3390/life12030338>
- Ali, B., 2022. Physiological role, toxicity, hyperaccumulation, and tolerance of nickel in plants. V., Kumar, A., Sharma and R., Setia (Ed.), *Appraisal of Metal (Loids) in the Ecosystem* (s. 105-134). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85621-8.00001-7>
- Ali, M. A., Fahad, S., Haider, I., Ahmed, N., Ahmad, S., Hussain, S., and Arshad, M., 2019. Oxidative stress and antioxidant defense in plants exposed to metal/metalloid toxicity. M., Hasanuzzaman, V., Fotopoulos, K., Nahar and M., Fujita (Ed.), *Reactive oxygen, nitrogen and sulfur species in plants: production, metabolism, signaling and defense mechanisms* (s. 353-370). John

- Ali, S., Mir, R. A., Tyagi, A., Manzar, N., Kashyap, A. S., Mushtaq, M., M., Raina, A., Park, S., Sharma, S., Mir, Z.A., and Bae, H., 2023. Chromium toxicity in plants: signaling, mitigation, and future perspectives. *Plants*, 12(7), 1502. <https://doi.org/10.3390/plants12071502>
- Ali, S., Rizwan, M., Bano, R., Bharwana, S. A., Rehman, M. Z. U., Hussain, M. B., and Al-Wabel, M. I., 2018. Effects of biochar on growth, photosynthesis, and chromium (Cr) uptake in *Brassica rapa* L. under Cr stress. *Arabian Journal of Geosciences*, 11, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s12517-018-3861-3>
- Alnusairi, G. S., Mazrou, Y. S., Qari, S. H., Elkelish, A. A., Soliman, M. H., Eweis, M., Abdelaal, K., El-Samad, G. A., Ibrahim M. F. M., and Elnahhas, N., 2021. Exogenous nitric oxide reinforces photosynthetic efficiency, osmolyte, mineral uptake, antioxidant, expression of stress-responsive genes and ameliorates the effects of salinity stress in wheat. *Plants*, 10(8), 1693. <https://doi.org/10.3390/plants10081693>
- Altaf, M. A., Hao, Y., He, C., Mumtaz, M. A., Shu, H., Fu, H., and Wang, Z., 2022. Physiological and Biochemical Responses of Pepper (*Capsicum annuum* L.) Seedlings to Nickel Toxicity. *Frontiers in Plant Science*, 13, 950392. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.950392>
- Altaf, M. A., Hao, Y., Shu, H., Mumtaz, M. A., Cheng, S., Alyemeni, M. N., Parvaiz, A., and Wang, Z., 2023. Melatonin enhanced the heavy metal-stress tolerance of pepper by mitigating the oxidative damage and reducing the heavy metal accumulation. *Journal of Hazardous Materials*, 454, 131468. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131468>
- Altaf, M. A., Shahid, R., Ren, M. X., Altaf, M. M., Jahan, M. S., and Khan, L. U., 2021. Melatonin mitigates nickel toxicity by improving nutrient uptake fluxes, root architecture system, photosynthesis, and antioxidant potential in tomato seedling. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 21(3), 1842-1855. <https://doi.org/10.1007/s42729-021-00484-2>
- Anas, M., Liao, F., Verma, K. K., Sarwar, M. A., Mahmood, A., Chen, Z. L., Li, Q., Zeng, X. P., Liu, Y., and Li, Y. R., 2020. Fate of nitrogen in agriculture and environment: agronomic, eco-physiological and molecular approaches to improve nitrogen use efficiency. *Biological Research*, 53(1), 1-20. <https://doi.org/10.1186/s40659-020-00312-4>
- Anjum, S. A., Ashraf, U., Imran, K. H. A. N., Tanveer, M., Shahid, M., Shakoor, A., and Longchang, W. A. N. G., 2017. Phyto-toxicity of chromium in maize: oxidative damage, osmolyte accumulation, anti-oxidative defense and chromium uptake. *Pedosphere*, 27(2), 262-273. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60315-1](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60315-1)
- Antonious, G. F., and Kochhar, T. S., 2009. Mobility of heavy metals from soil into hot pepper fruits: a field study. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82(1), 59-63. <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9512-8>

- Aqeel, U., Parwez, R., Aftab, T., Khan, M. M. A., and Naeem, M., 2022. Exogenous calcium repairs damage caused by nickel toxicity in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) by strengthening its antioxidant defense system and other functional attributes. *South African Journal of Botany*, 150, 153-160. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.07.025>
- Arif, M. S., Yasmeen, T., Abbas, Z., Ali, S., Rizwan, M., Aljarba, N. H., Alkahtani, S., and Abdel-Daim, M. M., 2021. Role of exogenous and endogenous hydrogen sulfide (H₂S) on functional traits of plants under heavy metal stresses: a recent perspective. *Frontiers in Plant Science*, 11, 545453. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.545453>
- Arikan, B., Yildiztugay, E., and Ozfidan-Konakci, C., 2023. Protective role of quercetin and kaempferol against oxidative damage and photosynthesis inhibition in wheat chloroplasts under arsenic stress. *Physiologia Plantarum*, 175, e13964. <https://doi.org/10.1111/ppl.13964>
- Arnon, D. I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24, 1–15. <https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1>
- Ashraf, M. A., Rasheed, R., Hussain, I., Iqbal, M., Farooq, M. U., Saleem, M. H., and Ali, S., 2022. Taurine modulates dynamics of oxidative defense, secondary metabolism, and nutrient relation to mitigate boron and chromium toxicity in *Triticum aestivum* L. plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(30), 45527-45548. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19066-5>
- Askari, S. H., Ashraf, M. A., Ali, S., Rizwan, M., and 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, 36205-36225. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13221-0>
- Atif, M., and Perveen, S., 2023. Maize grain nutritional quality amelioration with seed-applied thiamine and indole-3-acetic acid under arsenic toxicity. *Environment, Development and Sustainability*, 26(3), 7827–7855. <https://doi.org/10.1007/s10668-023-03037-y>
- Atif, M., Perveen, S., Parveen, A., Mahmood, S., Saeed, M., and Zafar, S., 2022. Thiamine and indole-3-acetic acid induced modulations in physiological and biochemical characteristics of maize (*Zea mays* L.) under arsenic stress. *Sustainability*, 14(20), 13288. <https://doi.org/10.3390/su142013288>
- Atsdr, U., 2007. CERCLA priority list of hazardous substances. <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html>.
- Ayub, M. A., Ur Rehman, M. Z., Umar, W., Adnan, M., Farooqi, Z. U. R., Naveed, M., Aslam, M. Z., and Ahmad, H. R., 2021. Physiological mechanisms and adaptation strategies of plants under heavy metal micronutrient deficiency/toxicity conditions. T., Aftab and K.R., Hakeem (Ed.), *Frontiers in Plant-Soil Interaction* (s. 413-458). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90943-3.00016-X>

- Badawy, I. H., Hmed, A. A., Sofy, M. R., and Al-Mokadem, A. Z., 2022. Alleviation of Cadmium and Nickel Toxicity and Phyto-Stimulation of Tomato Plant L. by Endophytic *Micrococcus luteus* and *Enterobacter cloacae*. *Plants*, 11(15), 2018. <https://doi.org/10.3390/plants11152018>
- Bahuguna, R. N., Joshi, R., Shukla, A., Pandey, M., and Kumar, J., 2012. Thiamine primed defense provides reliable alternative to systemic fungicide carbendazim against sheath blight disease in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 57, 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.05.003>
- Bao, Z., Feng, H., Tu, W., Li, L., and Li, Q., 2022. Method and mechanism of chromium removal from soil: a systematic review. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(24), 35501-35517. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19452-z>
- Barcelos, J.P.Q., Reis, H.P.G., Godoy, C.V., Grato, P.L., Furlani Junior, E., Putti, F. F., Campos, M., and Reis, A. R., 2018. Impact of foliar nickel application on urease activity, antioxidant metabolism and control of powdery mildew (*Microspheera diffusa*) in soybean plants. *Plant Pathology*, 67(7), 1502-1513. <https://doi.org/10.1111/ppa.12871>
- Barrs, H.D., and Weatherley, P.E., 1962. A Re-Examination of the Relative Turgidity Technique for Estimating Water Deficits in Leaves. *Australian Journal of Biological Sciences*, 15, 413-428. <http://dx.doi.org/10.1071/BI9620413>
- Bashir, M. A., Wang, X., Naveed, M., Mustafa, A., Ashraf, S., Samreen, T., Nadeem, S. M., and Jamil, M., 2021. Biochar mediated-alleviation of chromium stress and growth improvement of different maize cultivars in tannery polluted soils. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(9), 4461. <https://doi.org/10.3390/ijerph18094461>
- Bashir, R., Iqbal, S., Awais, M., Afzal, B., Shakoor, M. B., and Iqbal, M., 2023. Thiamine (vitamin B1) helps to regulate wheat growth and yield under water limited conditions by adjusting tissue mineral content, cytosolutes and antioxidative enzymes. *Plant Growth Regulation*, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s10725-023-01045-6>
- Basit, F., Bhat, J. A., Dong, Z., Mou, Q., Zhu, X., Wang, Y., Hu, J., Jan, B.L., Shakoor, A., Guan, Y., and Ahmad, P., 2022a. Chromium toxicity induced oxidative damage in two rice cultivars and its mitigation through external supplementation of brassinosteroids and spermine. *Chemosphere*, 302, 134423. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134423>
- Basit, F., Ulhassan, Z., Mou, Q., Nazir, M. M., Hu, J., Hu, W., Song, W., Sheteiwy, M.S., Zhou, W., Bhat, J.A., Jeddi, K., Hessini, K., and Allakhverdiev, S., 2022b. Seed priming with nitric oxide and/or spermine mitigate the chromium toxicity in rice (*Oryza sativa*) seedlings by improving the carbon-assimilation and minimising the oxidative damages. *Functional Plant Biology*.

<https://doi.org/10.1071/FP21268>

- Bates, L. S., Waldren, R. P., and Teare, I. D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studied. *Plant and Soil*, 39, 205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Beauchamp, C., and Fridovich, I., 1971. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*, 44, 276-287. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370)
- Begum, W., Rai, S., Banerjee, S., Bhattacharjee, S., Mondal, M. H., Bhattarai, A., and Saha, B., 2022. A comprehensive review on the sources, essentiality and toxicological profile of nickel. *RSC Advances*, 12(15), 9139-9153. <https://doi.org/10.1039/D2RA00378C>
- Benito, P., Ligorio, D., Bellón, J., Yenush, L., and Mulet, J. M., 2022. A fast method to evaluate in a combinatorial manner the synergistic effect of different biostimulants for promoting growth or tolerance against abiotic stress. *Plant Methods*, 18(1), 1-17. <https://doi.org/10.1186/s13007-022-00943-6>
- Beri, A., and Sharma, R., 2016. Nickel toxicity to photosynthetic attributes in the leaves of lentil (*Lens culnaris Medic. Masar*). *International Journal of Advanced Research*, 2(8), 239-242.
- Berwal, M.K., Kumar, R., Prakash, K., Rai, G.K., Hebbar, K.B. 2021 Antioxidant Defense System in Plants Against Abiotic Stress. G.K., Rai, R.R., Kumar and S., Bagati (Ed.), *Abiotic Stress Tolerance Mechanisms in Plants* (s. 175-202). CRC Press, London. <https://doi.org/10.1201/9781003163831>
- Bhalerao, S. A., and Sharma, A. S., 2015. Chromium: As an environmental pollutant. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(4), 732-746.
- Bhalerao, S. A., Sharma, A. S., and Poojari, A. C. 2015. Toxicity of nickel in plants. *International Journal of Pure and Applied Bioscience* 3(2), 345-355.
- Bhardwaj, S., Verma, T., Raza, A., and Kapoor, D., 2023. Silicon and Nitric Oxide-Mediated Regulation of Growth Attributes, Metabolites and Antioxidant Defense System of Radish (*Raphanus sativus* L.) under Arsenic Stress. *Phyton*, 92(3). <http://dx.doi.org/10.32604/phyton.2023.025672>
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micro gram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Cataldo, D.A., Maroon, M., Schrader, L.E., and Youngs, V.L., 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 6(1), 71-80. <https://doi.org/10.1080/00103627509366547>
- Chen, M., Zhu, K., Xie, J., Liu, J., Qiao, Z., Tan, P., and Peng, F., 2023. Ammonium-nitrate mixtures dominated by NH₄⁺-N promote the growth of pecan (*Carya*

- illinoensis*) through enhanced N uptake and assimilation. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1186818. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1186818>
- Chen, T., Liu, X., Zhang, X., Chen, X., Tao, K., and Hu, X., 2016. Effect of alkyl polyglucoside and nitrilotriacetic acid combined application on lead/ pyrene bioavailability and dehydrogenase activity in co-contaminated soils. *Chemosphere* 154, 515–520. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.127>
- Chen, Z., Liu, Q., Zhang, S., Hamid, Y., Lian, J., Huang, X., Zou, T., Lin, Q., Feng, Y., He, Z., and Yang, X., 2024. Foliar application of plant growth regulators for enhancing heavy metal phytoextraction efficiency by *Sedum alfredii* Hance in contaminated soils: Lab to field experiments. *Science of The Total Environment*, 913, 169788. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169788>
- Christou, A., Georgiadou, E. C., Zissimos, A. M., Christoforou, I. C., Christofi, C., Neocleous, D., Dalias, P., Torrado, S.O.C.A., Argyaki, A., and Fotopoulos, V., 2020. Hexavalent chromium leads to differential hormetic or damaging effects in alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants in a concentration-dependent manner by regulating nitro-oxidative and proline metabolism. *Environmental Pollution*, 267, 115379. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115379>
- Christou, A., Georgiadou, E. C., Zissimos, A. M., Christoforou, I. C., Christofi, C., Neocleous, D., Dalias, P., Torrado, S.O.C.A., Argyaki, A., and Fotopoulos, V., 2021. Uptake of hexavalent chromium by tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants and mediated effects on their physiology and productivity, along with fruit quality and safety. *Environmental and Experimental Botany*, 189, 104564. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104564>
- Cui, Z., Gao, Y., Guo, L., Wu, B., Yan, B., Wang, Y., Liu, H., Li, G., Wang, Y., and Wang, H., 2022. Optimal Effects of Combined Application of Nitrate and Ammonium Nitrogen Fertilizers with a Ratio of 3: 1 on Grain Yield and Water Use Efficiency of Maize Sowed in Ridge–Furrow Plastic Film Mulching in Northwest China. *Agronomy*, 12(12), 2943. <https://doi.org/10.3390/agronomy12122943>
- Cvikrova, M., Hrubcova, M., Vigner, M., Machackova, I. and Eder, J., 1994. Phenolic acids and peroxidase activity in alfalfa (*Medicago sativa*) embryogenic cultures after ethephon treatment. *Physiologia Plantarum*, 91, 226-233. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb00423.x>
- Deng, T. H. B., Van Der Ent, A., Tang, Y. T., Sterckeman, T., Echevarria, G., Morel, J. L., and Qiu, R. L., 2018. Nickel hyperaccumulation mechanisms: a review on the current state of knowledge. *Plant and Soil*, 423, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3539-8>
- Dionisio-Sese, M. L., and Tobita, S., 1998. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science*, 135, 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00025-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00025-9)
- Doyi, I., Essumang, D., Gbeddy, G., Dampare, S., Kumassah, E., and Saka, D., 2018.

- Spatial distribution, accumulation and human health risk assessment of heavy metals in soil and groundwater of the Tano Basin, Ghana. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 165, 540-546. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.015>
- Dubois, M., Gilles, A., Hamilton, K., Rebers, A., and Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- El-Shazoly, R. M., Metwally, A. A., and Hamada, A. M., 2019. Salicylic acid or thiamin increases tolerance to boron toxicity stress in wheat. *Journal of Plant Nutrition*, 42(7), 702-722. <https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1549670>
- Elsayed, S., Mistele, B., and Schmidhalter, U., 2011. Can changes in leaf water potential be assessed spectrally?. *Functional Plant Biology*, 38(6), 523-533. <https://doi.org/10.1071/FP11021>
- Emamverdian, A., Ding, Y., Barker, J., Mokhberdoran, F., Ramakrishnan, M., Liu, G., and Li, Y., 2021. Nitric oxide ameliorates plant metal toxicity by increasing antioxidant capacity and reducing Pb and Cd translocation. *Antioxidants*, 10(12), 1981. <https://doi.org/10.3390/antiox10121981>
- Erdal, S., and Turk, H., 2016. Cysteine-induced upregulation of nitrogen metabolism-related genes and enzyme activities enhance tolerance of maize seedlings to cadmium stress. *Environmental and Experimental Botany* 132, 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.08.014>
- Faizan, M., Alam, P., Rajput, V. D., Faraz, A., Afzal, S., Ahmed, S. M., Yu, F. Y., Minkina, T., and Hayat, S., 2023. Nanoparticle mediated plant tolerance to heavy metal stress: what we know?. *Sustainability*, 15(2), 1446. <https://doi.org/10.3390/su15021446>
- Fryzova, R., Pohanka, M., Martinkova, P., Cihlarova, H., Brtnicky, M., Hladky, J., and Kynicky, J., 2017. Oxidative stress and heavy metals in plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 245, 129-156. https://doi.org/10.1007/398_2017_7
- Fu, X., Mehmood, S., Ahmed, W., Ou, W., Suo, P., Zhang, Q., Fu, X., Sun, Z., and Li, W., 2023. Reducing chromium toxicity in Chinese cabbage through synergistic effects of silicon and selenium: A study of plant growth, chromium content, and biochemical parameters. *Sustainability*, 15(6), 5361. <https://doi.org/10.3390/su15065361>
- Gajewska, E., and Skłodowska, M., 2009. Nickel-induced changes in nitrogen metabolism in wheat shoots. *Journal of Plant Physiology*, 166(10), 1034-1044. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.12.004>
- Gangwar, S., and Singh, V. P., 2011. Indole acetic acid differently changes growth and nitrogen metabolism in *Pisum sativum* L. seedlings under chromium (VI) phytotoxicity: implication of oxidative stress. *Scientia Horticulturae*, 129(2),

321-328. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.03.026>

- Gangwar, S., Singh, V. P., Prasad, S. M., and Maurya, J. N., 2011. Differential responses of pea seedlings to indole acetic acid under manganese toxicity. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 451-462. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0565-z>
- Garcia-Caparrros, P., DE Filippis, L., Gul, A., Hasanuzzaman, M., Ozturk, M., Altay, V., and Lao, M. T., 2021. Oxidative stress and antioxidant metabolism under adverse environmental conditions: a review. *The Botanical Review*, 87, 421-466. <https://doi.org/10.1007/s12229-020-09231-1>
- Ghasemifar, E., Habibi, G., and Bakhshi-Khaniki, G., 2023. Pretreatment with salicylic acid and nitric oxide alleviates silver nanoparticles toxicity in medicinal *Hypericum perforatum* plants. *Journal of Plant Process and Function*, 11(52), 83-93.
- Ghori, N. H., Ghori, T., Hayat, M. Q., Imadi, S. R., Gul, A., Altay, V., and Ozturk, M., 2019. Heavy metal stress and responses in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16, 1807-1828. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02215-8>
- Gioseffi, E., De Neergaard, A., and Schjørring, J. K., 2012. Interactions between uptake of amino acids and inorganic nitrogen in wheat plants. *Biogeosciences*, 9(4), 1509-1518. <https://doi.org/10.5194/bg-9-1509-2012>
- Goyal, D., Yadav, A., Prasad, M., Singh, T. B., Shrivastav, P., Ali, A., Dantu, P. M., and Mishra, S., 2020. Effect of heavy metals on plant growth: an overview. M., Naeem, A., Ansari and S., Gill (Ed.), *Contaminants in Agriculture: Sources, Impacts and Management* (s. 79-101). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41552-5_4
- Goyer, A., 2010. Thiamine in plants: aspects of its metabolism and functions. *Phytochemistry*, 1615-1624. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.06.022>
- Groat, R.G., and Vance, C.P., 1981. Root Nodule Enzymes of Ammonia Assimilation in Alfalfa (*Medicago sativa* L.): Developmental Patterns and Response to Applied Nitrogen. *Plant Physiology*, 67(6), 1198-1203. <https://doi.org/10.1104/pp.67.6.1198>
- Guo, L., Ling, L., Wang, X., Cheng, T., Wang, H., and Ruan, Y., 2023. Exogenous hydrogen sulfide and methylglyoxal alleviate cadmium-induced oxidative stress in *Salix matsudana* Koidz by regulating glutathione metabolism. *BMC Plant Biology*, 23(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04089-y>
- Gupta, S., and Seth, C. S., 2021. Salicylic acid alleviates chromium (VI) toxicity by restricting its uptake, improving photosynthesis and augmenting antioxidant defense in *Solanum lycopersicum* L. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27, 2651-2664. <https://doi.org/10.1007/s12298-021-01088-x>

- Gupta, V., Jatav, P. K., Verma, R., Kothari, S. L., and Kachhwaha, S., 2017. Nickel accumulation and its effect on growth, physiological and biochemical parameters in millets and oats. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 23915-23925. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0057-4>
- Gürkan, M., 2023. Assessment of Hexavalent Chromium Accumulation of *Beta Vulgaris* L. Var. Cicla and the Change of Its Antibacterial Activity. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 12(1), 2002-2013. <https://doi.org/10.1080/00103624.2023.2211112>
- Haghi, V., Namdjoyan, S., and Soorki, A. A., 2022. Interactive effects of exogenous melatonin and hydrogen sulfide in alleviating lead toxicity in safflower seedlings. *Industrial Crops and Products*, 187, 115523. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115523>
- Hamada, A., and Al-Hakimi, A., 2009. Exogenous ascorbic acid or thiamine increases the resistance of sunflower and maize plants to salt stress. *Acta Agronomica Hungarica*, 57(3), 335-347. <https://doi.org/10.1556/AAgr.57.2009.3.8>
- Hasan, M.K., Cheng, Y., Kanwar, M.K., Chu, X.Y., Ahammed, G.J., and Qi, Z.Y., 2017. Responses of plant proteins to heavy metal stress—a review. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1492. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01492>
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Mahmud, J. A., Futita, M., and Fotopoulos, V., 2020. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, 9(8), 681. <https://doi.org/10.3390/antiox9080681>
- Hassan, M. U., Chattha, M. U., Khan, I., Chattha, M. B., Aamer, M., Nawaz, M., Ali, A., Khan, M.A.U., and Khan, T. A., 2019. Nickel toxicity in plants: reasons, toxic effects, tolerance mechanisms, and remediation possibilities—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 12673-12688. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04892-x>
- Hedfi, A., Mahmoudi, E., Boufahja, F., Beyrem, H., and Aïssa, P., 2007. Effects of increasing levels of nickel contamination on structure of offshore nematode communities in experimental microcosms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 79, 345-349. <https://doi.org/10.1007/s00128-007-9261-0>
- Helaoui, S., Boughattas, I., Hattab, S., Mkhinini, M., Alphonse, V., Livet, A., Bousserhine, M., and Banni, M., 2020. Physiological, biochemical and transcriptomic responses of *Medicago sativa* to nickel exposure. *Chemosphere*, 249, 126121. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126121>
- Hilal, B., Khan, T. A., and Fariduddin, Q., 2023. Recent advances and mechanistic interactions of hydrogen sulfide with plant growth regulators in relation to abiotic stress tolerance in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*.

<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.03.006>

- Hoagland, D. R., and Arnon, D. I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California agricultural experiment station*, 347, 39.
- Hossain, A., Pamanick, B., Venugopalan, V. K., Ibrahimova, U., Rahman, M. A., Siyal, A. L., Maitra, S., Chatterjee, S., and Aftab, T., 2022. Emerging roles of plant growth regulators for plants adaptation to abiotic stress-induced oxidative stress. T., Aftab and M., Naeem (Ed.), *Emerging Plant Growth Regulators in Agriculture* (s. 1-72). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91005-7.00010-2>
- Husain, T., Suhel, M., Prasad, S. M., and Singh, V. P., 2022. Ethylene and hydrogen sulphide are essential for mitigating hexavalent chromium stress in two pulse crops. *Plant Biology*, 24(4), 652-659. <https://doi.org/10.1111/plb.13324>
- Hussain, I., Saleem, M.H., Mumtaz, S., Rasheed, R., Ashraf, M.A., Maqsood, F., and Ali, S., 2022. Choline chloride mediates chromium tolerance in spinach (*Spinacia oleracea* L.) by restricting its uptake in relation to morpho-physio-biochemical attributes. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(4), 1594-1614. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10401-7>
- Hussain, S., Rao, M. J., Anjum, M. A., Ejaz, S., Zakir, I., Ali, M. A., Ahmad, N., and Ahmad, S., 2019. Oxidative stress and antioxidant defense in plants under drought conditions. M., Hasanuzzaman, K., Hakeem, K., Nahar and H., Alharby (Ed.), *Plant abiotic stress tolerance: agronomic, molecular and biotechnological approaches* (s. 207-219). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-06118-0_9
- Husted, S., Hebborn, C. A., Mattsson, M., and Schjoerring, J. K. 2000. A critical experimental evaluation of methods for determination of NH_4^+ in plant tissue, xylem sap and apoplastic fluid. *Physiologia Plantarum*, 109(2), 167-179. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.100209.x>
- Iarc, 1987. Overall evaluations of carcinogenicity: and updating of IARC monographs, vol. 1 to 42. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: Supplement 7. IARC, 7, 1-440.
- Imran, M., Khan, A. L., Mun, B. G., Bilal, S., Shaffique, S., Kwon, E. H., and Lee, I. J., 2022. Melatonin and nitric oxide: Dual players inhibiting hazardous metal toxicity in soybean plants via molecular and antioxidant signaling cascades. *Chemosphere*, 308, 136575. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136575>
- Jabeen, M., Akram, N. A., Ashraf, M., Tyagi, A., El-Sheikh, M. A., and Ahmad, P., 2022. Thiamin stimulates growth, yield quality and key biochemical processes of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. Botrytis) under arid conditions. *PlosOne*, 17(5), e0266372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266372>

- Jahan, M. S., Guo, S., Baloch, A. R., Sun, J., Shu, S., Wang, Y., Ahammed, G.J., Kabir, K., and Roy, R., 2020. Melatonin alleviates nickel phytotoxicity by improving photosynthesis, secondary metabolism and oxidative stress tolerance in tomato seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 197, 110593. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110593>
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., and BEEREGOWDA, K. N., 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology*, 7(2), 60–72. <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0009>
- Jan, S., Noman, A., Kaya, C., Ashraf, M., Alyemeni, M. N., and Ahmad, P., 2020. 24-Epibrassinolide alleviates the injurious effects of Cr (VI) toxicity in tomato plants: Insights into growth, physio-biochemical attributes, antioxidant activity and regulation of Ascorbate–glutathione and Glyoxalase cycles. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39, 1587-1604. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10169-2>
- Javad, S., Shah, A. A., Ramzan, M., Sardar, R., Javed, T., Al-Huqail, A. A., Ali, H.M., Chaudhry, O., Yasin, N. A., Ahmed, S., Hussain, R. A., and Hussain, I., 2022. Hydrogen sulphide alleviates cadmium stress in *Trigonella foenum-graecum* by modulating antioxidant enzymes and polyamine content. *Plant Biology*, 24(4), 618-626. <https://doi.org/10.1111/plb.13393>
- Javed, T., Singhal, R. K., Shabbir, R., Shah, A. N., Kumar, P., Jinger, D., Dharmappa, P.M., Shad, M. A., Saha, D., Anuragi, H., Adamski, R., and Siuta, D., 2022. Recent advances in agronomic and physio-molecular approaches for improving nitrogen use efficiency in crop plants. *Frontiers in Plant Science*, 13, 877544. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.877544>
- Jaworski, E. G., 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 43(6), 1274–1279. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(71\)80010-4](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(71)80010-4)
- Jayaprakasha, G. K., Bae, H., Crosby, K., Jifon, J. L., and Patil, B. S., 2012. Bioactive compounds in peppers and their antioxidant potential. M.H., Tunick and E.G., de Mejía (Ed.), *Hispanic foods: Chemistry and bioactive compounds* (s. 43-56). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2012-1109.ch004>
- Jia, H., Wang, X., Shi, C., Guo, J., Ma, P., Ren, X., Wei, T., Liu, H., and Li, J., 2020. Hydrogen sulfide decreases Cd translocation from root to shoot through increasing Cd accumulation in cell wall and decreasing Cd₂⁺ influx in *Isatis indigotica*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 605-612. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.08.033>
- Joseph, P. S., Musa, D. A., Egwim, E. C., and Uthman, A., 2022. Function of Urease in Plants with Reference to Legumes: A Review. J.C., Jimenez-Lopez and A., Clemente (Ed.), *Legumes Research-Volume 2*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.102646>

- Kamran, M., Eqani, S. A. M. A. S., Katsoyiannis, A., Xu, R., Bibi, S., Benizri, E., and Chaudhary, H., 2017. Phytoextraction of chromium (Cr) and influence of *Pseudomonas putida* on *Eruca sativa* growth. *Journal of Geochemical Exploration*, 182, 269-274.
- Karthika, K. S., Rashmi, I., and Parvathi, M. S., 2018. Biological functions, uptake and transport of essential nutrients in relation to plant growth. M., Hasanuzzaman, M., Fujita, H., Oku, K., Nahar and B., Hawrylak-Nowak (Ed.), *Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance* (s. 1-49). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-9044-8_1
- Kaur, B., Singh, B. P., and Devashree, Y., 2022a. Heavy Metal Sequestration in Plants. J., Kumar, S., Gaur, P.K., Srivastava, R.K., Mishra, S.H., Prasad and D.K., Chauhan (Ed.), *Heavy Metals in Plants* (s. 215-245). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003110576>
- Kaur, H., Hussain, S. J., Al-Huqail, A. A., Siddiqui, M. H., Al-Huqail, A. A., and Khan, M. I. R., 2022b. Hydrogen sulphide and salicylic acid regulate antioxidant pathway and nutrient balance in mustard plants under cadmium stress. *Plant Biology*, 24(4), 660-669. <https://doi.org/10.1111/plb.13322>
- Kaur, H., Kaur, H., Kaur, H., and Srivastava, S., 2023. The beneficial roles of trace and ultratrace elements in plants. *Plant Growth Regulation*, 100(2), 219-236. <https://doi.org/10.1007/s10725-022-00837-6>
- Kaya, C., Akram, N. A., Surucu, A., Ashraf, M., 2019b. Alleviating effect of nitric oxide on oxidative stress and antioxidant defence system in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants exposed to cadmium and lead toxicity applied separately or in combination. *Scientia Horticulturae*, 255, 52-60. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.05.029>
- Kaya, C., and Aslan, M., 2020. Hydrogen sulphide partly involves in thiamine-induced tolerance to cadmium toxicity in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 941-953. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07056-z>
- Kaya, C., Ashraf, M., Alyemeni, M. N., Rinklebe, J., and Ahmad, P., 2023. Citric acid and hydrogen sulfide cooperate to mitigate chromium stress in tomato plants by modulating the ascorbate-glutathione cycle, chromium sequestration, and subcellular allocation of chromium. *Environmental Pollution*, 335, 122292. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122292>
- Kaya, C., Ashraf, M., Sonmez, O., Tuna, A. L., Polat, T., and Aydemir, S., 2015. Exogenous application of thiamin promotes growth and antioxidative defense system at initial phases of development in salt-stressed plants of two maize cultivars differing in salinity tolerance. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1741-3>
- Kaya, C., Sarioglu, A., Akram, N. A., and Ashraf, M., 2019a. Thiourea-mediated nitric oxide production enhances tolerance to boron toxicity by reducing oxidative stress in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and durum wheat

- (*Triticum durum* Desf.) plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38, 1094-1109. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09916-x>
- Kaya, C., Sarioglu, A., Ashraf, M., Alyemeni, M. N., and Ahmad, P., 2022b. The combined supplementation of melatonin and salicylic acid effectively detoxifies arsenic toxicity by modulating phytochelatins and nitrogen metabolism in pepper plants. *Environmental Pollution*, 297, 118727. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118727>
- Kaya, C., Sonmez, O., Aydemir, S., Ashraf, M., Dikilitas, M., 2013. Exogenous application of mannitol and thiourea regulates plant growth and oxidative stress responses in salt-stressed maize (*Zea mays* L.). *Journal of Plant Interactions*, 8(3), 234-241. <https://doi.org/10.1080/17429145.2012.725480>
- Kaya, C., Ugurlar, F., Farooq, S., Ashraf, M., Alyemeni, M. N., and Ahmad, P., 2022a. Combined application of asparagine and thiourea improves tolerance to lead stress in wheat by modulating AsA-GSH cycle, lead detoxification and nitrogen metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 190, 119-132. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.08.014>
- Kazemi, N., 2012. Effect of exogenous nitric oxide on alleviating nickel-induced oxidative stress in leaves of tomato plants. *International Journal of AgriScience*, 2(9), 799-809.
- Kazemi, N., Khavari-Nejad, R. A., Fahimi, H., Saadatmand, S., and Nejad-Sattari, T., 2010. Effects of exogenous salicylic acid and nitric oxide on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in leaves of *Brassica napus* L. under nickel stress. *Scientia Horticulturae*, 126(3), 402-407. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.07.037>
- Khan, K. M., Naz, F., Taha, M., Khan, A., Perveen, S., Choudhary, M. I., and Voelter, W., 2014. Synthesis and in vitro urease inhibitory activity of N, N'-disubstituted thioureas. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 74, 314-323. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.01.001>
- Khan, M., Ali, S., Al Azzawi, T. N. I., and Yun, B. W., 2023a. Nitric Oxide Acts as a Key Signaling Molecule in Plant Development under Stressful Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4782. <https://doi.org/10.3390/ijms24054782>
- Khan, M. I. R., Iqbal, N., Masood, A., Mobin, M., Anjum, N. A., and Khan, N. A., 2016a. Modulation and significance of nitrogen and sulfur metabolism in cadmium challenged plants. *Plant Growth Regulation*, 78, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0071-9>
- Khan, M. I. R., Khan, N. A., Masood, A., Per, T. S., and Asgher, M., 2016b. Hydrogen peroxide alleviates nickel-inhibited photosynthetic responses through increase in use-efficiency of nitrogen and sulfur, and glutathione production in mustard. *Frontiers in Plant Science*, 7, 44. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00044>

- Khan, M. N., Alamri, S., Al-Amri, A. A., Alsubaie, Q. D., Al-Munqedi, B., Ali, H. M., Singh, V. P., and Siddiqui, M. H., 2021. Effect of nitric oxide on seed germination and seedling development of tomato under chromium toxicity. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40, 2358-2370. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10212-2>
- Khan, M. N., Siddiqui, M. H., Alhussaen, K. M., El-Alosey, A. R., Alomrani, M. A. M., and Kalaji, H. M., 2023b. Titanium dioxide nanoparticles require K⁺ and hydrogen sulfide to regulate nitrogen and carbohydrate metabolism during adaptive response to drought and nickel stress in cucumber. *Environmental Pollution*, 122008. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122008>
- Khan, M. N., Siddiqui, M. H., Mukherjee, S., Alsolami, M. A., Alhussaen, K. M., Alzuair, F. M., Siddiqui, Z.H., Al-Amri, A., and Alsubaie, Q. D., 2023c. Melatonin involves hydrogen sulfide in the regulation of H⁺-ATPase activity, nitrogen metabolism, and ascorbate-glutathione system under chromium toxicity. *Environmental Pollution*, 323, 121173. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121173>
- Khan, M. N., Siddiqui, Z. H., Naeem, M., Abbas, Z. K., and Ansari, M. W., 2022a. Nitric oxide and hydrogen sulfide interactions in plants under adverse environmental conditions. T., Aftab and M., Naeem (Ed.), *Emerging Plant Growth Regulators in Agriculture* (s. 215-244). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91005-7.00015-1>
- Khan, Z., Fan, X., Khan, M. N., Khan, M. A., Zhang, K., Fu, Y., and Shen, H., 2022b. The toxicity of heavy metals and plant signaling facilitated by biochar application: Implications for stress mitigation and crop production. *Chemosphere*, 308, 136466. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136466>
- Kharbech, O., Massoud, M. B., Sakouhi, L., Djebali, W., Mur, L. A. J., and Chaoui, A., 2020. Exogenous application of hydrogen sulfide reduces chromium toxicity in maize seedlings by suppressing NADPH oxidase activities and methylglyoxal accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 154, 646-656. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.06.002>
- Kharbech, O., Sakouhi, L., Mahjoubi, Y., Massoud, M. B., Debez, A., Zribi, O. T., Djebali, W., Chaoui, A., and Mur, L. A. J., 2022. Nitric oxide donor, sodium nitroprusside modulates hydrogen sulfide metabolism and cysteine homeostasis to aid the alleviation of chromium toxicity in maize seedlings (*Zea mays* L.). *Journal of Hazardous Materials*, 424, 127302. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127302>
- Kharbech, O., Sakouhi, L., Massoud, M. B., Mur, L. A. J., Corpas, F. J., Djebali, W., and Chaoui, A., 2020. Nitric oxide and hydrogen sulfide protect plasma membrane integrity and mitigate chromium-induced methylglyoxal toxicity in maize seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 157, 244-255. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.10.017>

- Khatun, J., Intekhab, A., and Dhak, D., 2022. Effect of uncontrolled fertilization and heavy metal toxicity associated with arsenic (As), lead (Pb) and cadmium (Cd), and possible remediation. *Toxicology*, 477, 153274. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2022.153274>
- Kumar, D., Dhankher, O. P., Tripathi, R. D., and Seth, C. S., 2023. Titanium dioxide nanoparticles potentially regulate the mechanism (s) for photosynthetic attributes, genotoxicity, antioxidants defense machinery, and phytochelatin synthesis in relation to hexavalent chromium toxicity in *Helianthus annuus* L. *Journal of Hazardous Materials*, 454, 131418. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131418>
- Kumar, P., Goud, E. L., Devi, P., Dey, S. R., and Dwivedi, P., 2022a. Heavy metals: transport in plants and their physiological and toxicological effects. K., Kumar and S., Srivastava (Ed.), *Plant metal and metalloid transporters* (s. 23-54). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-19-6103-8_2
- Kumar, S., Rani, V., Singh, S., Kapoor, D., Dhanjal, D. S., Thakur, A., Pujari, M., Ramamurthy, P. C., Singh, J., 2022b. Arsenic-Induced Responses in Plants: Impacts on Biochemical Processes. P.K., Srivastava, R., Singh, P., Parihar and S.M., Prasad (Ed.), *Arsenic in Plants: Uptake, Consequences and Remediation Techniques* (s. 112-128). John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119791461.ch6>
- Kumar, S., Wang, M., Fahad, S., Qayyum, A., Chen, Y., and Zhu, G., 2022. Chromium induces toxicity at different phenotypic, physiological, biochemical, and ultrastructural levels in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 13496. <https://doi.org/10.3390/ijms232113496>
- Kumar, S., Wang, M., Liu, Y., Fahad, S., Qayyum, A., Jadoon, S.A., Chen, Y., and Zhu, G., 2022c. Nickel toxicity alters growth patterns and induces oxidative stress response in sweetpotato. *Frontiers in Plant Science*, 13.
- Kumari, S., and Mishra, A., 2021. Heavy metal contamination. M.L., Larramendy and S., Soloneski (Ed.), *Soil Contamination-Threats and Sustainable Solutions*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.93412>
- Lee, Y. P., and Takahashi, T., 1966. An improved colorimetric determination of amino acids with the use of ninhydrin. *Analytical Biochemistry*, 14, 71-77. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(66\)90057-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(66)90057-1)
- Li, G., Shah, A. A., Khan, W. U., Yasin, N. A., Ahmad, A., Abbas, M., Ali, A., and Safdar, N., 2021. Hydrogen sulfide mitigates cadmium induced toxicity in *Brassica rapa* by modulating physiochemical attributes, osmolyte metabolism and antioxidative machinery. *Chemosphere*, 263, 127999. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127999>
- Li, J., Shi, C., Wang, X., Liu, C., Ding, X., Ma, P., Wang, X., and Jia, H., 2020. Hydrogen sulfide regulates the activity of antioxidant enzymes through persulfidation and improves the resistance of tomato seedling to copper oxide

- nanoparticles (CuO NPs)-induced oxidative stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 156, 257-266. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.09.020>
- Lisjak, M., Teklic, T., Wilson, I. D., Whiteman, M., and Hancock, J. T., 2013. Hydrogen sulfide: environmental factor or signalling molecule?. *Plant, Cell & Environment*, 36(9), 1607-1616. <https://doi.org/10.1111/pce.12073>
- Liu, J., Duan, C. Q., Zhang, X. H., Zhu, Y. N., and Hu, C., 2009. Subcellular distribution of chromium in accumulating plant *Leersia hexandra* Swartz. *Plant and Soil*, 322, 187–195. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9907-2>
- Liu, X., Chen, J., Wang, G. H., Wang, W. H., Shen, Z. J., Luo, M. R., Gao, G. F., Simon, M., Ghoto, K., and Zheng, H. L., 2016. Hydrogen sulfide alleviates zinc toxicity by reducing zinc uptake and regulating genes expression of antioxidative enzymes and metallothioneins in roots of the cadmium/zinc hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Plant and Soil*, 400, 177-192. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2719-7>
- Liu, Y., Wang, S., Yang, H., Chen, L., Jiang, Q., Ma, X., Deng, X., and Wang, H., 2023. Effects of nitrogen addition on enzyme activity and metabolites related to nitrogen transformation in *Suaeda salsa*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 45(10), 116. <https://doi.org/10.1007/s11738-023-03601-z>
- Loqué, D., Tillard, P., Gojon, A., and Lepetit, M., 2003. Gene expression of the NO₃-transporter NRT1. 1 and the nitrate reductase NIA1 is repressed in Arabidopsis roots by NO₂⁻ the product of NO₃⁻ reduction. *Plant Physiology*, 132(2), 958-967. <https://doi.org/10.1104/pp.102.018523>
- Loreto, F., and Velikova, V. 2001. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology*, 127, 1781-1787. <https://doi.org/10.1104/pp.010497>
- Ma, J., Saleem, M. H., Yasin, G., Mumtaz, S., Qureshi, F. F., Ali, B., Ercisli, S., Alhag, S. K., Ahmed, A. E., Vodnar, D. C., Hussain, I., Marc, R. A., and Chen, F., 2022. Individual and combinatorial effects of SNP and NaHS on morpho-physio-biochemical attributes and phytoextraction of chromium through Cr-stressed spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Frontiers in Plant Science* 13, 973740. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.973740>
- Malik, Z., Afzal, S., Dawood, M., Abbasi, G. H., Khan, M. I., Kamran, M., Zhuran, M., Tahir, M.T., Aslam, M. N., and Rafay, M., 2021. Exogenous melatonin mitigates chromium toxicity in maize seedlings by modulating antioxidant system and suppresses chromium uptake and oxidative stress. *Environmental Geochemistry and Health*, 1-19. <https://doi.org/10.1007/s10653-021-00908-z>
- Mandal, M., Sarkar, M., Khan, A., Biswas, M., Masi, A., Rakwal, R., Agrawal, G.K., Srivastava, A., and Sarkar, A., 2022. Reactive Oxygen Species (ROS) and Reactive Nitrogen Species (RNS) in plants—maintenance of structural individuality and functional blend. *Advances in Redox Research*, 5, 100039. <https://doi.org/10.1016/j.arres.2022.100039>

- Matraszek, R., Hawrylak-Nowak, B., Chwil, S., and Chwil, M., 2016. Macronutrient composition of nickel-treated wheat under different sulfur concentrations in the nutrient solution. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 5902–5914. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5823-6>
- Maxwell, K., and Johnson, G. N., 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51, 659-668. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>
- Meng, Y., Jing, H., Huang, J., Shen, R., and Zhu, X., 2022. The role of nitric oxide signaling in plant responses to cadmium stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 6901. <https://doi.org/10.3390/ijms23136901>
- Mishra, S., Bharagava, R. N., More, N., Yadav, A., Zainith, S., Mani, S., and Chowdhary, P., 2019. Heavy metal contamination: an alarming threat to environment and human health. R., Sobti, N., Arora and R., Kothari (Ed.), *Environmental biotechnology: For Sustainable Future* (s. 103-125). Springer, Singapore. <https://doi.org/10.14419/ijag.v6i1.9174>
- Mitra, M., Agarwal, P., and Roy, S., 2023. Plant response to heavy metal stress: an insight into the molecular mechanism of transcriptional regulation. V., Srivastava, S., Mishra, S., Mehrotra and S.K., Upadhyay (Ed.), *Plant Transcription Factors* (s. 337-367). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90613-5.00004-2>
- Mohamed, H. I., Latif, H. H., and Hanafy, R. S., 2016. Influence of Nitric Oxide Application on Some Biochemical Aspects, Endogenous Hormones, Minerals and Phenolic Compounds of Vicia faba Plant Grown under Arsenic Stress. *Gesunde Pflanzen*, 68, 99–107. <https://doi.org/10.1007/s10343-016-0363-7>
- Mu, D., Lin, W., and Luo, J., 2023. Non-negligible Effect of Native Rhizobacteria on Cooperation with Plant Growth Regulators Improve Tolerance to Cadmium: A Case Study Using Duckweed Spirodela polyrhiza as Indicating Plant. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00344-023-10954-9>
- Mumtaz, M. A., Hao, Y., Mehmood, S., Shu, H., Zhou, Y., Jin, W., Chen, C., Li, L., Altaf, M. A., and Wang, Z., 2022. Physiological and Transcriptomic analysis provide molecular Insight into 24-epibrassinolide mediated Cr (VI)-Toxicity tolerance in pepper plants. *Environmental Pollution*, 306, 119375. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119375>
- Mustafa, A., Zulfiqar, U., Mumtaz, M. Z., Radziemska, M., Haider, F. U., Holatko, J., Hammershmidt, T., Naveed, M., Ali, H., Kintl, A., Saeed, Q., Kucerik, J., and Brtnicky, M., 2023. Nickel (Ni) phytotoxicity and detoxification mechanisms: A review. *Chemosphere*, 138574. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138574>
- Nabaei, M., and Amooaghaie, R., 2020. Melatonin and nitric oxide enhance cadmium tolerance and phytoremediation efficiency in *Catharanthus*

- roseus* (L.) G. Don. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 6981–6994. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07283-4>
- Nabi, A., Parwez, R., Aftab, T., Khan, M., and Naeem, M., 2021. Triacetonol protects *Mentha arvensis* L. from nickel-instigated repercussions by escalating antioxidant machinery, photosynthetic efficiency and maintaining leaf ultrastructure and root morphology. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40(4), 1594-1612. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10208-y>
- Nachana'a Timothy, E. T. W., 2019. *Environmental pollution by heavy metal: an overview*. *Chemistry*, 3(2), 72-82. <https://doi.org/10.11648/j.ijec.20190302.14>
- Naheed, R., Zahid, M., Aqeel, M., Maqsood, M. F., Kanwal, H., Khalid, N., Hashem, M., Alamri, S., and Noman, A., 2022. Mediation of growth and metabolism of *Pisum sativum* in salt stress potentially be credited to thiamine. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 22(3), 2897-2910. <https://doi.org/10.1007/s42729-022-00854-4>
- Najafi-Kakavand, S., Karimi, N., Ghasempour, H. R., Raza, A., Chaichi, M., and Modarresi, M., 2022. Role of Jasmonic and Salicylic Acid on Enzymatic Changes in the Root of Two *Alyssum inflatum* Náyr. Populations Exposed to Nickel Toxicity. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-18. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10648-8>
- Nakano, Y., and Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant & Cell Physiology*, 22(5), 867-880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
- Narayanasamy, S., Sundaram, V., Sundaram, T., and Vo, D. V. N., 2022. Biosorptive ascendancy of plant based biosorbents in removing hexavalent chromium from aqueous solutions—Insights into isotherm and kinetic studies. *Environmental Research*, 210, 112902. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.112902>
- Nie, J., Pan, Y., Shi, J., Guo, Y., Yan, Z., Duan, X., and Xu, M., 2015. A Comparative Study on the Uptake and Toxicity of Nickel Added in the Form of Different Salts to Maize Seedlings. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(12), 15075–15087. <https://doi.org/10.3390/ijerph121214972>
- Nowicka, B., 2022. Heavy metal-induced stress in eukaryotic algae—mechanisms of heavy metal toxicity and tolerance with particular emphasis on oxidative stress in exposed cells and the role of antioxidant response. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(12), 16860-16911. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-18419-w>
- Oukarroum, A., Bussotti, F., Goltsev, V., and Kalaji, H. M., 2015. Correlation between reactive oxygen species production and photochemistry of photosystems I and II in *Lemnagibba* L. plants under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 109, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.08.005>

- Pal, P., Kumar, A., and Ansari, M. I., 2023. Role of nitric oxide in regulation of biotic and abiotic stresses tolerance in plants. M.I.R., Khan, N., Iqbal, P., Poór and A., Ferrante (Ed.), *Nitric Oxide in Developing Plant Stress Resilience* (s. 135-155). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91209-9.00008-7>
- Panda, S. K., Choudhury, S., and Patra, H. K., 2016. Heavy-Metal-Induced Oxidative Stress in Plants: Physiological and Molecular Perspectives. N., Tuteja and S.S., Gill (Ed.), *Abiotic Stress Response in Plants* (s. 221-236). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527694570.ch11>
- Pandey, A. K., and Gautam, A., 2020. Stress responsive gene regulation in relation to hydrogen sulfide in plants under abiotic stress. *Physiologia Plantarum*, 168(2), 511-525. <https://doi.org/10.1111/pp1.13064>
- Pandian, S., Rakkammal, K., Rathinapriya, P., Rency, A. S., Satish, L., and Ramesh, M., 2020. Physiological and biochemical changes in sorghum under combined heavy metal stress: An adaptive defence against oxidative stress. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101830. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101830>
- Parveen, A., Hussain, I., Rasheed, R., Mahmood, S., and Wahid, A., 2018. Potential of thiourea in modifying membrane stability, osmoprotectants, vitamins and antioxidants levels under cadmium stress in maize. *International Journal of Agriculture and Biology*, 20(12), 2862-2870. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0848>
- Patade, V. Y., Nikalje, G. C., and Srivastava, S., 2020. Role of thiourea in mitigating different environmental stresses in plants. A., Roychoudhury and D.K., Tripathi (Ed.), *Protective chemical agents in the amelioration of plant abiotic stress: biochemical and molecular perspectives* (s. 467-482). John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119552154.ch23>
- Perveen, A., Wahid, A., Mahmood, S., Hussain, I., and Rasheed, R., 2015. Possible mechanism of medium-supplemented thiourea in improving growth, gas exchange, and photosynthetic pigments in cadmium-stressed maize (*Zea mays*). *Brazilian Journal of Botany*, 38, 71-79. <https://doi.org/10.1007/s40415-014-0124-8>
- Poursattari, R., and Hadi, H., 2022. Lead phytoremediation, distribution, and toxicity in rapeseed (*Brassica napus* L.): The role of single and combined use of plant growth regulators and chelators. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 22(2), 1700-1717. <https://doi.org/10.1007/s42729-022-00765-4>
- Prasad, S. M., Dwivedi, R., and Zeeshan, M., 2005. Growth, photosynthetic electron transport, and antioxidant responses of young soybean seedlings to simultaneous exposure of nickel and UV-B stress. *Photosynthetica*, 43, 177-185. <https://doi.org/10.1007/s11099-005-0031-0>
- Pujari, M., and Kapoor, D., 2021. Heavy metals in the ecosystem: Sources and their effects. V., Kumar, A., Sharma and A., Cerdà (Ed.), *Heavy metals in the environment* (s. 1-7). Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821656-9.00001-8>

- Qin, C., Lian, H., Alqahtani, F. M., and Ahanger, M. A., 2024. Chromium mediated damaging effects on growth, nitrogen metabolism and chlorophyll synthesis in tomato can be alleviated by foliar application of melatonin and jasmonic acid priming. *Scientia Horticulturae*, 323, 112494. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112494>
- Qin, C., Shen, J., and Ahanger, M. A., 2022. Supplementation of nitric oxide and spermidine alleviates the nickel stress-induced damage to growth, chlorophyll metabolism, and photosynthesis by upregulating ascorbate–glutathione and glyoxalase cycle functioning in tomato. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1039480. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1039480>
- Rahim, W., Khan, M., Al Azzawi, T. N. I., Pande, A., Methela, N. J., Ali, S., Imran, M., Lee, D. S., Lee, G. M., Mun, B. G., Moon, Y. S., Lee, I. J., and Yun, B. W., 2022. Exogenously Applied Sodium Nitroprusside Mitigates Lead Toxicity in Rice by Regulating Antioxidants and Metal Stress-Related Transcripts. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 9729. <https://doi.org/10.3390/ijms23179729>
- Raychaudhuri, S. S., Pramanick, P., Talukder, P., and Basak, A., 2021. Polyamines, metallothioneins, and phytochelatins—Natural defense of plants to mitigate heavy metals. *Studies in Natural Products Chemistry*, 69, 227-261. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819487-4.00006-9>
- Rezayian, M., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H., 2019. Oxidative damage and antioxidative system in algae. *Toxicology Reports*, 6, 1309-1313. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.10.001>
- Rizwan, M., Imtiaz, M., Dai, Z., Mehmood, S., Adeel, M., Liu, J., and Tu, S., 2017. Nickel stressed responses of rice in Ni subcellular distribution, antioxidant production, and osmolyte accumulation. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 20587-20598. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9665-2>
- Rizwan, M., Mostofa, M. G., Ahmad, M. Z., Imtiaz, M., Mehmood, S., Adeel, M., Dai, Z., Li, Z., Aziz, O., Zhang, Y., and TU, S., 2018. Nitric oxide induces rice tolerance to excessive nickel by regulating nickel uptake, reactive oxygen species detoxification and defense-related gene expression. *Chemosphere*, 191, 23-35. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.068>
- Rizwan, M., Mostofa, M. G., Ahmad, M. Z., Zhou, Y., Adeel, M., Mehmood, S., Ahmad, M. A., Javed, R., Imtiaz, M., AZIZ, O., Ikram, M., Tu, S., and Liu, Y., 2019. Hydrogen sulfide enhances rice tolerance to nickel through the prevention of chloroplast damage and the improvement of nitrogen metabolism under excessive nickel. *Plant Physiology and Biochemistry*, 138, 100-111. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.02.023>
- Rizwan, M., Usman, K., Alsafran, M., Jabri, H. A., Samreen, T., Saleem, M. H., and Tu, S., 2022. Nickel toxicity interferes with NO₃⁻/NH₄⁺ uptake and nitrogen

- metabolic enzyme activity in rice (*Oryza sativa* L.). *Plants*, 11(11), 1401. <https://doi.org/10.3390/plants11111401>
- Rodriguez, E., Santos, C., Azevedo, R., Moutinho-Pereira, J., Correia, C., and Dias, M. C., 2012. Chromium (VI) induces toxicity at different photosynthetic levels in pea. *Plant Physiology and Biochemistry*, 53, 94-100. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.01.013>
- Rohatgi, S., Jain, R., Mathur, S., Singh, D., and Ranjan, R., 2023. Cross Talk of Biostimulants with Other Signaling Molecules Under Abiotic Stress. M., Hasanuzzaman (Ed.), *Climate-Resilient Agriculture* (s. 295-317). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-031-37428-9_14
- Sahu, M. P., 2017. Thiourea: a potential bioregulator for alleviating abiotic stresses. P., Mínhas, J., Rane and R., Pasala (Ed.), *Abiotic Stress Management for Resilient Agriculture* (s. 261-274). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5744-1_11
- Saito, A., Saito, M., Ichikawa, Y., Yoshiba, M., Tadano, T., Miwa, E., and Higuchi, K., 2010. Difference in the distribution and speciation of cellular nickel between nickel-tolerant and non-tolerant *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2 cells. *Plant, Cell & Environment*, 33(2), 174–187. <https://doi.org/10.1111/j.13653040.2009.02068.x>
- Saleem, S., Mushtaq, N. U., Rasool, A., Shah, W. H., Tahir, I., and Rehman, R. U., 2023. Plant nutrition and soil fertility: physiological and molecular avenues for crop improvement. A., Tariq and K.R., Hakeem (Ed.), *Sustainable Plant Nutrition* (s. 23-49). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18675-2.00009-2>
- Sanaullah, T., Wahid, A., SADIA, B., HANIF, A., MAQBOOL, N., ARSHAD, T., and Kabir, Z., 2016. Exogenous application of thiourea ameliorates salt stress effects by alleviation of oxidative damage in hybrid maize. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 6, 220-231. <https://doi.org/10.17265/2161-6256/2016.04.002>
- Sangwan, P., Kumar, V., and Joshi, U. N., 2014. Effect of chromium (VI) toxicity on enzymes of nitrogen metabolism in clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba* L.). *Enzyme Research*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/784036>
- Sanjari, S., Keramat, B., Nadernejad, N., and Mozafari, H., 2019. Ameliorative effects of 24-epibrassinolide and thiamine on excess cadmium-induced oxidative stress in Canola (*Brassica napus* L.) plants. *Journal of Plant Interactions*, 14(1), 359-368. <https://doi.org/10.1080/17429145.2019.1637952>
- Saraiva, M. P., Maia, C. F., Batista, B. L., and Lobato, A. D. S., 2023. Ionic homeostasis and redox metabolism upregulated by 24-epibrassinolide are crucial for mitigating nickel excess in soybean plants, enhancing photosystem II efficiency and biomass. *Plant Biology*, 25(2), 343-355. <https://doi.org/10.1111/plb.13496>

- Saud, S., Wang, D., Fahad, S., Javed, T., Jaremko, M., Abdelsalam, N. R., and Ghareeb, R. Y., 2022. The impact of chromium ion stress on plant growth, developmental physiology, and molecular regulation. *Frontiers in Plant Science*, 13, 994785. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.994785>
- Sayyadi, G., Niknezhad, Y., and Fallah, H., 2022. Sodium nitroprusside ameliorates lead toxicity in rice (*Oryza sativa* L.) by modulating the antioxidant scavenging system, nitrogen metabolism, lead sequestration mechanism, and proline metabolism. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23913-w>
- Sethi, S., 2023. Phytochelatins: Heavy Metal Detoxifiers in Plants. M.P., Shah (Ed.), *Advanced and Innovative Approaches of Environmental Biotechnology in Industrial Wastewater Treatment* (s. 8-16). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-99-2598-8_16
- Shahid, M. A., Balal, R. M., Khan, N., Zotarelli, L., Liu, G., Ghazanfar, M. U., Rathinasabapathi, B., Mattson, N. S., Martínez-Nicolas J. J., and Garcia-Sanchez, F., 2018. Ploidy level of citrus rootstocks affects the carbon and nitrogen metabolism in the leaves of Chromium-stressed Kinnow mandarin plants. *Environmental and Experimental Botany*, 149, 70-80. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.02.010>
- Shahid, M., Khalid, S., Abbas, G., Shahid, N., Nadeem, M., Sabir, M., Aslam, M., and Dumat, C., 2015. Heavy metal stress and crop productivity. H.K., Rehman (Ed.) *Crop Production and global Environmental Issues* (s. 1-25). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23162-4_1
- Shahid, M., Shamshad, S., Rafiq, M., Khalid, S., Bibi, I., Niaz, N. K., Dumat C., and Rashid, M. I., 2017. Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system: A review. *Chemosphere*, 178, 513-533. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.074>
- Shamsi, M. H., and Kraatz, H. B., 2013. Interactions of metal ions with DNA and some applications. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 23, 4-23. <https://doi.org/10.1007/s10904-012-9694-8>
- Sharma, A., Kapoor, D., Wang, J., Shahzad, B., Kumar, V., Bali, A. S., Jasrotia, S., Zheng, B., Yuan, H., and Yan, D., 2020. Chromium bioaccumulation and its impacts on plants: an overview. *Plants*, 9(1), 100. <https://doi.org/10.3390/plants9010100>
- Shetty, K. Curtis, O. F., Levin, R. E., Witkowsky, R., and Ang, W., 1995. Prevention of Vitrification Associated with in vitro Shoot Culture of Oregano. (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* spp. *Journal of Plant Physiology*, 147(3-4), 447-451. [http://dx.doi.org/10.1016%2FS0176-1617\(11\)82181-4](http://dx.doi.org/10.1016%2FS0176-1617(11)82181-4)
- Shukla, A., Pathak, S.K., Singh, S., and Srivastava, S., 2023. Application of Thiourea Ameliorates Stress and Reduces Accumulation of Arsenic in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Plants Grown in Contaminated Field. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10799-8>

- Siddiqui, M. H., Al-Whaibi, M. H., Ali, H. M., Sakran, A. M., Basalah, M. O., and Alkhaishany, M. Y., 2013. Mitigation of nickel stress by the exogenous application of salicylic acid and nitric oxide in wheat. *Australian Journal of Crop Science*, 7(11), 1780-1788.
- Singh, D., Sharma, N. L., Singh, D., Siddiqui, M. H., Taunk, J., Sarkar, S. K., Rathore, A., Singh, C. K., Al-Amri, A. A., Alansi, S., Ali, H. M., and Rahman, M. A., 2023a. Exogenous hydrogen sulfide alleviates chromium toxicity by modulating chromium, nutrients and reactive oxygen species accumulation, and antioxidant defence system in mungbean (*Vigna radiata* L.) seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 200, 107767. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107767>
- Singh, P., Saini, N., Bhola, L., Mishra, P., and Aamir, M. (2023b). Crosstalk of biostimulants with other signaling molecules under metal stress. G.S., Singh, T., Narendra, K., Nafees and G., Ritu (Ed.), *Biostimulants in Alleviation of Metal Toxicity in Plants* (s. 469-509). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99600-6.00022-0>
- Singh, R., Gautam, N., Mishra, A., and Gupta, R., 2011. Heavy metals and living systems: An overview. *Indian Journal of Pharmacology*, 43(3), 246–253. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.81505>
- Singh, S. K., Husain, T., Suhel, M., Prasad, S. M., and Singh, V. P., 2022. Hydrogen sulphide ameliorates hexavalent chromium toxicity in two cereal crops: Role of antioxidant enzymes and proline metabolism. *Plant Biology*, 24(4), 636-641. <https://doi.org/10.1111/plb.13413>
- Singh, V., Singh, N., Verma, M., Kamal, R., Tiwari, R., Sanjay Chivate, M., Rai, S.N., Kumar, A., Singh, A., Singh, M.P., Vamanu, E., and Mishra, V., 2022. Hexavalent-chromium-induced oxidative stress and the protective role of antioxidants against cellular toxicity. *Antioxidants*, 11(12), 2375. <https://doi.org/10.3390/antiox11122375>
- Soares, C., Carvalho, M. E., Azevedo, R. A., and Fidalgo, F., 2019. Plants facing oxidative challenges—A little help from the antioxidant networks. *Environmental and Experimental Botany*, 161, 4-25. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.12.009>
- Soares, C., DE Sousa, A., Pinto, A., Azenha, M., Teixeira, J., Azevedo, R. A., Fidalgo, F., 2016. Effect of 24-epibrassinolide on ROS content, antioxidant system, lipid peroxidation and Ni uptake in *Solanum nigrum* L. under Ni stress. *Environmental and Experimental Botany*, 122, 115-125. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.09.010>
- Soliman, M., Alhaithloul, H. A., Hakeem, K. R., Alharbi, B. M., El-Esawi, M., and Elkelish, A., 2019. Exogenous nitric oxide mitigates nickel-induced oxidative damage in eggplant by upregulating antioxidants, osmolyte metabolism, and glyoxalase systems. *Plants*, 8(12), 562. <https://doi.org/10.3390/plants8120562>
- Subki, A., Abidin, A. A. Z., and Yusof, Z. N. B., 2018. The role of thiamine in plants

- and current perspectives in crop improvement. *B Group Vitamins-Current Uses and Perspectives*, 5(3), 33-44. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79350>
- Subrahmanyam, D., 2008. Effects of chromium toxicity on leaf photosynthetic characteristics and oxidative changes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Photosynthetica*, 46(3), 339-345. <https://doi.org/10.1007/s11099-008-0062-4>
- Sun, C., Gao, L., Xu, L., Zheng, Q., Sun, S., Liu, X., Zhang, Z., Tian, Z., Dai, T., and Sun, J., 2023a. Melatonin alleviates chromium toxicity by altering chromium subcellular distribution and enhancing antioxidant metabolism in wheat seedlings. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(17), 50743-50758. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-25903-y>
- Sun, S., Liu, A., Li, Z., Guo, T., Chen, S., and Ahammed, G. J., 2023b. Anthocyanin synthesis is critical for melatonin-induced chromium stress tolerance in tomato. *Journal of Hazardous Materials*, 453, 131456. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131456>
- Sytar, O., Ghosh, S., MALIŃSKA, H., Zivcak, M., and Brestic, M., 2021. Physiological and molecular mechanisms of metal accumulation in hyperaccumulator plants. *Physiologia Plantarum*, 173(1), 148-166. <https://doi.org/10.1111/ppl.13285>
- Talukdar, D., 2016. Exogenous thiourea modulates antioxidant defense and glyoxalase systems in lentil genotypes under arsenic stress. *Journal of Plant Stress Physiology*, 2, 9-21. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133482>
- Tang, M., Yue, J., Huang, Z., Hu, Y., Li, Z., Luo, D., Cao, S., Zhang, H., Pan, J., Wu, X., Wu, Q., and Chen, P., 2022. Physiological and DNA methylation analysis provides epigenetic insights into chromium tolerance in kenaf. *Environmental and Experimental Botany*, 194, 104684. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104684>
- Tiwari, S., Patel, A., and Prasad, S. M., 2020. Phytohormone up-regulates the biochemical constituent, exopolysaccharide and nitrogen metabolism in paddy-field cyanobacteria exposed to chromium stress. *BMC Microbiology*, 20(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01799-3>
- Ulhassan, Z., Khan, I., Hussain, M., Khan, A. R., Hamid, Y., Hussain, S., Allakhverdiev, S.I., and Zhou, W., 2022. Efficacy of metallic nanoparticles in attenuating the accumulation and toxicity of chromium in plants: Current knowledge and future perspectives. *Environmental Pollution*, 315, 120390. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120390>
- Umar, I., Ahmed, S., Yasin, N. A., Wahid, A., Alamri, S., Hamid, Y., and Sardar, R., 2023. Role of exogenously applied triacontanol in amelioration of chromium stress in *Pisum sativum* by enhanced nutrition orchestration, growth and proline content. *South African Journal of Botany*, 162, 96-107. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.09.002>

- Upadhyay, M. K., Majumdar, A., Srivastava, A. K., Bose, S., Suprasanna, P., and Srivastava, S., 2022. Antioxidant enzymes and transporter genes mediate arsenic stress reduction in rice (*Oryza sativa* L.) upon thiourea supplementation. *Chemosphere*, 292, 133482. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133482>
- Valivand, M., Amooaghaie, R., and Ahadi, A., 2019. Interplay between hydrogen sulfide and calcium/calmodulin enhances systemic acquired acclimation and antioxidative defense against nickel toxicity in zucchini. *Environmental and Experimental Botany*, 158, 40-50. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.11.006>
- Valivand, M., and Amooaghaie, R., 2021. Sodium hydrosulfide modulates membrane integrity, cation homeostasis, and accumulation of phenolics and osmolytes in Zucchini under nickel stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40, 313-328. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10101-8>
- Van der Pas, L., and Ingle, R. A., 2019. Towards an understanding of the molecular basis of nickel hyperaccumulation in plants. *Plants*, 8(1), 11. <https://doi.org/10.3390/plants8010011>
- Verma, N., Parihar, P., Singh, R., Prasad, S. M., and Pandey, A., 2022. Salicylic acid induced signaling against nickel-induced toxicity: Responses of growth, exopolysaccharides, photosystem II photochemistry, nitrogen metabolism status and antioxidant system of *Anabaena* sp. PCC 7120. *South African Journal of Botany*, 151, 185-199. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.09.026>
- Vuolo, M. M., Lima, V. S., and Junior, M. R. M., 2019. Phenolic compounds: Structure, classification, and antioxidant power. S.M., Rubi (Ed.), *Bioactive Compounds* (s. 33-50). Woodhead Publishing, Sawston. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5>
- Wakeel, A., Xu, M., and Gan, Y., 2020. Chromium-induced reactive oxygen species accumulation by altering the enzymatic antioxidant system and associated cytotoxic, genotoxic, ultrastructural, and photosynthetic changes in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 728. <https://doi.org/10.3390/ijms21030728>
- Wang, S. H., Zhang, H., Jiang, S. J., Zhang, L., He, Q. Y., and He, H. Q., 2010. Effects of the nitric oxide donor sodium nitroprusside on antioxidant enzymes in wheat seedling roots under nickel stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 57, 833-839. <https://doi.org/10.1134/S1021443710060129>
- Wang, Y., Yu, Q., Li, Y., Li, J., Chen, J., Liu, Z., Huang, J., Al-Harbi, M. S., Ali, E.F., and Eissa, M. A., 2021. Mechanisms of nitric oxide in the regulation of chilling stress tolerance in *Camellia sinensis*. *Horticulturae*, 7(10), 410. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7100410>
- Wang, Z., Luo, P., Zha, X., Xu, C., Kang, S., Zhou, M., Nover, D., and Wang, Y., 2022. Overview assessment of risk evaluation and treatment technologies for heavy metal pollution of water and soil. *Journal of Cleaner Production*, 379,

134043. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.134043>

- Wani, K. I., Naeem, M., and Aftab, T., 2022. Chromium in plant-soil nexus: Speciation, uptake, transport and sustainable remediation techniques. *Environmental Pollution*, 315, 120350. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120350>
- Waqas, M. A., Kaya, C., Riaz, A., Farooq, M., Nawaz, I., Wilkes, A., and Li, Y., 2019. Potential mechanisms of abiotic stress tolerance in crop plants induced by thiourea. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1336. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01336>
- Wei, L., Zhang, J., Wei, S., Hu, D., Liu, Y., Feng, L., Li, C., Qi, N., Wang, C., and Liao, W., 2022. Nitric Oxide Enhanced Salt Stress Tolerance in Tomato Seedlings, Involving Phytohormone Equilibrium and Photosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4539. <https://doi.org/10.3390/ijms23094539>
- Weisany, W., Sohrabi, Y., Heidari, G., Siosemardeh, A., and GHASSEMI-GOLEZANI, K., 2012. Changes in antioxidant enzymes activity and plant performance by salinity stress and zinc application in soybean (*Glycine max* L.). *Plant Omics*, 5, 60-67.
- Witkowska, D., Słowik, J., and Chilicka, K., 2021. Heavy metals and human health: Possible exposure pathways and the competition for protein binding sites. *Molecules*, 26(19), 6060. <https://doi.org/10.3390/molecules26196060>
- World Health Organization., 2020. Chromium in Drinking-water (No. WHO/HEP/ECH/WSH/2020.3). World Health Organization.
- Xalxo, R., and Keshavkant, S., 2019. Melatonin, glutathione and thiourea attenuates lead and acid rain-induced deleterious responses by regulating gene expression of antioxidants in *Trigonella foenum graecum* L. *Chemosphere*, 221, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.029>
- Yadav, P., and Srivastava, S., 2021. Effect of thiourea application on root, old leaf and young leaf of two contrasting rice varieties (*Oryza sativa* L.) grown in arsenic contaminated soil. *Environmental Technology & Innovation*, 21, 101368. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101368>
- Yan, A., Wang, Y., Tan, S. N., Mohd Yusof, M. L., Ghosh, S., and Chen, Z., 2020. Phytoremediation: a promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land. *Frontiers in Plant Science*, 11, 359. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00359>
- Yang, S., Ulhassan, Z., Shah, A. M., Khan, A. R., Azhar, W., Hamid, Y., Hussain, S., Sheteiwy, M. S., Salam, A., and Zhou, W., 2021. Salicylic acid underpins silicon in ameliorating chromium toxicity in rice by modulating antioxidant defense, ion homeostasis and cellular ultrastructure. *Plant Physiology and Biochemistry*, 166, 1001-1013. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.07.013>

- Yang, X., Ren, J., Yang, W., Xue, J., Gao, Z., and Yang, Z., 2023. Hydrogen sulfide alleviates chromium toxicity by promoting chromium sequestration and re-establishing redox homeostasis in *Zea mays* L. *Environmental Pollution*, 332, 121958. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121958>
- Zaheer, I. E., Ali, S., Saleem, M. H., Imran, M., Alnusairi, G. S., Alharbi, B. M., Riaz, M., Abbas, Z., Rizwan, M., and Soliman, M. H., 2020. Role of iron–lysine on morpho-physiological traits and combating chromium toxicity in rapeseed (*Brassica napus* L.) plants irrigated with different levels of tannery wastewater. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 70-84. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.07.034>
- Zahid, G., Iftikhar, S., Shimira, F., Ahmad, H. M., and Kaçar, Y. A., 2023. An overview and recent progress of plant growth regulators (PGRs) in the mitigation of abiotic stresses in fruits: A review. *Scientia Horticulturae*, 309, 111621. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111621>
- Zaid, A., Mohammad, F., and Fariduddin, Q., 2020. Plant growth regulators improve growth, photosynthesis, mineral nutrient and antioxidant system under cadmium stress in menthol mint (*Mentha arvensis* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26, 25-39. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00715-y>
- Zhang, X., Chen, J., Liu, X., Gao, M., Chen, X., and Huang, C., (2019). Nickel uptake and distribution in *Agropyron cristatum* L. in the presence of pyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 174, 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.132>
- Zhao, H., Jin, Q., Wang, Y., Chu, L., Li, X., and Xu, Y., 2016. Effects of nitric oxide on alleviating cadmium stress in *Typha angustifolia*. *Plant Growth Regulation*, 78(2), 243-251. <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0089-z>
- Zheng, J., Xie, X., Li, C., Wang, H., Yu, Y., and Huang, B., 2023. Regulation mechanism of plant response to heavy metal stress mediated by endophytic fungi. *International Journal of Phytoremediation*, 1-18. <https://doi.org/10.1080/15226514.2023.2176466>