



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ARSENİK VE KURŞUN STRESLERİNİN
Lemna trisulca BİTKİLERİNDEKİ BÜYÜME,
SU İÇERİĞİ VE ANTIOKSİDAN ENZİM
SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

GÖKSU ERDOĞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Temmuz-2025
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Göksu ERDOĞAN tarafından hazırlanan “**Arsenik ve kurşun streslerinin *Lemna trisulca* bitkilerindeki büyüme, su içeriği ve antioksidan enzim sistemi üzerine etkileri**” adlı tez çalışması 24/07/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Evren YILDIZTUGAY

.....

Danışman

Prof. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAĞI

.....

Üye

Doç. Dr. Ali Tefik UNCU

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun 11/07/2025 gün ve 13 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Havvanur UÇBEYİAY
FBE Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

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

DECLARATION PAGE

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

Göksu ERDOĞAN

24.07.2025

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ARSENİK VE KURŞUN STRESLERİNİN *Lemna trisulca* BİTKİLERİNDEKİ BÜYÜME, SU İÇERİĞİ VE ANTİOKSİDAN ENZİM SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Göksu ERDOĞAN

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

Danışman: Prof. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI

2025, 68 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI
Prof. Dr. Evren YILDIZTUGAY
Doç. Dr. Ali Tefvik UNCU

Lemnaceae, dünya çapında tatlı su ekosistemlerinde yaygın olarak bulunan küçük su bitkileridir. En sık karşılaşılan türler arasında su ekosistemlerinde önemli bir rol oynayan *Lemna trisulca* (Su mercimeği) bulunur. Su mercimekleri hızlı büyüme hızlarıyla karakterize edilirler, bu da onları ekolojik, genetik, fizyolojik, biyokimyasal ve biyoteknolojik çalışmalar için popüler bir seçim haline getirir. Ekolojik önemlerine rağmen, birleşik çevresel faktörlerin su mercimeği fizyolojisi üzerindeki etkileri, özellikle metal toksisitesinin eş zamanlı etkisi açısından yeterince araştırılmamıştır. Tezimizde sodyum arsenat (As, 100 µM Na₂HAsO₄) ve kurşun nitrat (Pb, 100 µM Pb(NO₃)₂) uygulanan *Lemna trisulca* bitkilerinin su içeriği, antioksidan sistemi ve lipid peroksidasyonu araştırılmıştır. Bağlı su içeriği (RWC), stres uygulaması altında azalma göstermiştir. As veya Pb uygulamaları prolin miktarında azalmaya neden olmuştur. Hem tek başına hem de birlikte uygulanan As ve Pb uygulamalarında SOD aktivitesi artmıştır. En yüksek SOD artışı As gruplarındadır. H₂O₂'yi süpüren CAT aktivitesi As ve Pb uygulamalarından sonra artma göstermiştir. CAT2 bant yoğunluğu bu gruplarda dikkat çekicidir. Elektroforetik olarak yapılan analizde POX, 2 bant göstermiş olup total POX aktivitesi artmıştır. As veya Pb uygulanan bitkilerin yapraklarında CAT ve POX ve streslerin kombine olarak uygulanan gruplarında ise POX ile süpürülmeye çalışılmıştır. Bu antioksidan sistemdeki artışa rağmen, enzim aktivitesi H₂O₂ süpürmede yetersiz olup As, Pb ve As+Pb gruplarında H₂O₂ artışları izlenmiştir. Bu analiz sonuna paralel olarak lipid peroksidasyon düzeyinde (TBARS miktarı) stres gruplarında artma izlenmiştir. Bu analizlerde elde edilen sonuçlar göstermiştir ki, arsenik ve kurşun toksitesi *Lemna trisulca* bitkilerinde hem su içeriğinde bozulmalara neden olmuş hem de yetersiz antioksidan sistem sebebiyle lipid peroksidasyon ile sonuçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Abiyotik stres, antioksidan, arsenik, kurşun, *Lemna trisulca*, ROS

ABSTRACT

MS THESIS

THE EFFECTS OF ARSENIC AND LEAD STRESSES ON THE GROWTH, WATER CONTENT AND ANTIOXIDANT ENZYME SYSTEM IN *Lemna trisolca* PLANTS

Göksu ERDOĞAN

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ INSTITUTE OF SCIENCE
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

Advisor: Prof. Dr. Ceyda OZFIDAN KONAKCI

2025, 68 Pages

Jury

Prof. Dr. Ceyda OZFIDAN KONAKCI

Prof. Dr. Evren YILDIZTUGAY

Assoc. Prof. Dr. Ali Tefvik UNCU

Lemnaceae are small aquatic plants that are widespread in freshwater ecosystems worldwide. The most frequently encountered species include *Lemna trisolca* (Duckweed), which plays an important role in aquatic ecosystems. Duckweeds are characterized by their rapid growth rate, which makes them a popular choice for ecological, genetic, physiological, biochemical and biotechnological studies. Despite their ecological importance, the effects of combined environmental factors on duckweed physiology have not been sufficiently investigated, especially in terms of the simultaneous effect of metal toxicity. In our thesis, water content, antioxidant system and lipid peroxidation of *Lemna trisolca* plants treated with sodium arsenate (As, 100 µM Na₂HAsO₄) and lead nitrate (Pb, 100 µM Pb (NO₃)₂) were investigated. Relative water content (RWC) decreased under stress treatment. As or Pb applications caused a decrease in proline content. SOD activity increased in both As and Pb applications applied alone and together. The highest SOD increase was under As groups. H₂O₂ scavenging CAT activity increased after As and Pb applications. CAT2 band intensity was remarkable in these groups. In the electrophoretic analysis, POX showed two bands and total POX activity increased. In the leaves of plants applied with As or Pb, CAT and POX scavenged H₂O₂ and POX was attempted in the groups applied with combined stresses. Despite the increase in this antioxidant system, enzyme activity was insufficient in H₂O₂ scavenging and H₂O₂ increases were observed in As, Pb and As+Pb groups. Parallel to the end of this analysis, an increase in lipid peroxidation level (TBARS content) was observed in the stress groups. The results obtained in these analyses showed that arsenic and lead toxicity caused both deterioration in water content in *Lemna trisolca* plants and resulted in lipid peroxidation due to insufficient antioxidant system.

Keywords: Abiotic stress, antioxidant, arsenic, lead, *Lemna trisolca*, ROS

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans eğitimim süresince her koşulda yanımda olan, bilgi ve tecrübesiyle desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında laboratuvar olanaklarını sağlayan ve laboratuvar çalışmalarımda her daim yardımını esirgemeyen kıymetli hocam Prof. Dr. Evren YILDIZTUGAY'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimimin stresli dönemlerinde her zaman yanımda olan, manevi desteğiyle güç veren sevgili ablam Kamile SARIAYDIN'a; hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle her daim arkamda duran, sevgileriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan kıymetli annem Durdu ERDOĞAN ve babam İbrahim ERDOĞAN'a; özellikle bu zorlu yüksek lisans sürecinde en büyük destekçilerimden biri olan canım kardeşim Mehmet Kadir ERDOĞAN'a; neşesiyle her zaman yüzümü güldüren biricik yeğenim Ravza SARIAYDIN'a ve her koşulda yanımda olduğunu hissettiren değerli arkadaşım Rûveyda BAYRAKÇIOĞLU'na sonsuz sevgi ve minnetlerimi sunarım.

Göksu ERDOĞAN
KONYA-2025

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	2
2.1. Ağır Metaller.....	4
2.2. Bitkilerde Stres	8
2.3. Bitkilerde Stres Yanıtları	9
2.3.1. Bitkilerdeki reaktif oksijen türleri.....	10
2.4. Oksidatif stresle oluşan hasara karşı savunma mekanizmaları	11
2.5. Bitkilerde enzimatik olmayan antioksidanlar	17
2.6. Bitkilerde enzimatik antioksidanlar	18
2.6.1. Süperoksit dismutaz (SOD)	18
2.6.2. Askorbat peroksidaz (APX).....	20
2.6.3. Katalaz (CAT).....	20
2.6.4. Glutatyon redüktaz (GR)	21
2.6.5. Glutatyon peroksidaz (GPx)	23
2.6.6. Dehidroaskorbat redüktaz (DHAR)	23
2.6.7. Monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR).....	23
2.6.8. Glualikol peroksidaz (GPX)	24
2.6.9. Peroksidaz (POX)	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM	25
3.1. Bitki materyali ve denemelerin kurulması	25
3.2. Deneme dizaynında yer alan gruplar	26
3.3. Bağıl su miktarı (RWC)	27
3.4. Antioksidan enzim/izozim aktiviteleri	27
3.4.1. Süperoksit dismutaz (SOD) izozim/enzim aktivitesi.....	28
3.4.2. Katalaz (CAT) izozim/enzim aktivitesi	28
3.4.3. Peroksidaz (POX) izozim/enzim aktivitesi.....	28
3.5. Bazı reaktif oksijen türlerinin (ROS) saptanması	28

3.5.1. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarı.....	28
3.6. Lipit peroksidasyonu.....	29
3.7. Prolin miktarı	29
3.8. Total protein miktarı	29
3.9. İstatistiksel Analizler	30
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	31
4.1. Arsenik ve/veya Kurşun Toksikitesine Maruz Bırakılan <i>Lemna Trisulca</i> Bitkilerinin Bağlı Su Miktarı	31
4.2. Arsenik ve/veya Kurşun Toksikitesine Maruz Bırakılan <i>Lemna Trisulca</i> Bitkilerinin Bazı Antioksidan Aktiviteleri.....	33
4.2.1. Arsenik ve/veya Kurşun Toksikitesine Maruz Bırakılan <i>Lemna Trisulca</i> Bitkilerinin SOD Enzim/İzozim Aktivitesi.....	33
4.2.2. Arsenik ve/veya Kurşun Toksikitesine Maruz Bırakılan <i>Lemna Trisulca</i> Bitkilerinin CAT Enzim/İzozim Aktivitesi.....	36
4.2.3. Arsenik ve/veya Kurşun Toksikitesine Maruz Bırakılan <i>Lemna Trisulca</i> Bitkilerinin POX Enzim/İzozim Aktivitesi.....	38
4.3. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Miktarının İzlenmesi	40
4.3.1. Arsenik ve/veya Kurşun Toksikitesine Maruz Bırakılan <i>Lemna Trisulca</i> Bitkilerinin H ₂ O ₂ Miktarı.....	40
4.4. Lipit Peroksidasyonun İzlenmesi	42
4.4.1. Arsenik ve/veya Kurşun Toksikitesine Maruz Bırakılan <i>Lemna Trisulca</i> Bitkilerinin TBARS (Tiobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri) Miktarı	42
4.5. Arsenik ve/veya Kurşun Toksikitesine Maruz Bırakılan <i>Lemna Trisulca</i> Bitkilerinin Prolin Miktarı	43
4.6. Arsenik ve/veya Kurşun Toksikitesine Maruz Bırakılan <i>Lemna Trisulca</i> Bitkilerinin Protein Miktarı	45
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	47
5.1 Sonuçlar	47
5.2 Öneriler	50
6. KAYNAKLAR	51

KISALTMALAR

APX	Askorbat peroksidaz
As	Arsenik
AsA	Askorbat
CAT	Katalaz
ETC	Elektron taşıma sistemi
GPX	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutayon
GSSG	Yükseltgenmiş glutayon
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
MDA	Malondialdehit
MDHAR	Monodehidroaskorbat radikalleri
mM	Milimolar
MPa	Megapaskal
O ₂ ^{•-}	Süperoksit anyon radikali
OH [•]	Hidroksil Radikali
Pb	Kurşun
POX	Peroksidaz
PSI	Fotosistem I
PSII	Fotosistem II
ROS	Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)
SOD	Süperoksit dismutaz
TBARS	Tiyobarbuturik asit reaktif bileşikler
µM	Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Lemna trisulca</i>	3
Şekil 2.2. Ağır metal toksisitesine bağlı ROS oluşumunun dört yolu.....	7
Şekil 2.3. Kurşunun topraktan bitki sistemine alınma mekanizması	8
Şekil 2.4.ROS'un aşırı üretiminin hücresel makineyi etkileyen çeşitli oksidatif hasarlara nasıl yol açtığını göstermektedir. Ayrıca, çeşitli ROS detoksifikasyon mekanizmaları da gösterilmektedir.....	14
Şekil 2.5. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar	16
Şekil 2.6. Bitki Hücresinde SOD Enzimlerinin Lokalizasyonu	19
Şekil 2.7. Bitki GR'sinde abiyotik stresin kontrolünü gösteren diyagram	22
Şekil 4.1.100 µM Na ₂ HAsO ₄ ve 100 µM Pb (NO ₃) ₂ stresi altında yetiştirilen <i>Lemna trisulca</i> bitkilerinin bağıl su miktarı (RWC).....	31
Şekil 4.2. 100 µM Na ₂ HAsO ₄ ve 100 µM Pb (NO ₃) ₂ stresi altında yetiştirilen <i>Lemna trisulca</i> bitkilerinin süperoksit dismutaz (SOD) enzim/izozim aktiviteleri.....	34
Şekil 4.3. 100 µM Na ₂ HAsO ₄ ve 100 µM Pb (NO ₃) ₂ stresi altında yetiştirilen <i>Lemna trisulca</i> bitkilerinin katalaz (CAT) enzim/izozim aktiviteleri.....	37
Şekil 4.4. 100 µM Na ₂ HAsO ₄ ve 100 µM Pb (NO ₃) ₂ stresi altında yetiştirilen <i>Lemna trisulca</i> bitkilerinin peroksidaz (POX) enzim/izozim aktiviteleri.....	39
Şekil 4.5. 100 µM Na ₂ HAsO ₄ ve 100 µM Pb (NO ₃) ₂ stresi altında yetiştirilen <i>Lemna trisulca</i> bitkilerinin hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarı.....	41
Şekil 4.6. 100 µM Na ₂ HAsO ₄ ve 100 µM Pb (NO ₃) ₂ stresi altında yetiştirilen <i>Lemna trisulca</i> bitkilerinin lipid peroksidasyon (TBARS miktarı) düzeyi.....	42
Şekil 4.7. 100 µM Na ₂ HAsO ₄ ve 100 µM Pb (NO ₃) ₂ stresi altında yetiştirilen <i>Lemna trisulca</i> bitkilerinin prolin (Pro) miktarı.....	43
Şekil 4.8. 100 µM Na ₂ HAsO ₄ ve 100 µM Pb (NO ₃) ₂ stresi altında yetiştirilen <i>Lemna trisulca</i> bitkilerinin protein miktarı.....	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Tezimizde kullandığımız uygulama gruplarının kısaltmaları ve tanımlamalar.....	26
--	----

1. GİRİŞ

Canlılar değişen çevre şartları nedeniyle farklı olumsuz faktörlerle karşı karşıya kalırlar ve bu durum canlıların büyüme, gelişme ve üremelerini etkileyebilir. Bu olumsuz faktörler canlı ya da cansız kaynaklı olabilir ve bu faktörlere stres adı verilir. Bu streslerden biri de ağır metal stresidir. Ağır metallerin çeşitli metabolik süreçlerde optimum konsantrasyonlarda mevcut olduklarında bitki büyümesinde olumlu bir rol oynadıkları bilinmektedir. Temel elementlere ek olarak, arsenik, kadmiyum, krom, cıva ve kurşun gibi çeşitli temel olmayan toksik ağır metaller biyosferdeki yüksek kalıcılıkları nedeniyle bitkiler ve insanlar da dahil olmak üzere tüm yaşam formları için en tehlikeli olanlardır. Ağır metal toksisitesi bitkilerde fiziksel ve biyolojik parametreleri etkileyerek bitkilerin büyümesinde gecikmeye yol açar (Khan ve ark., 2023). Çalışmalar aşırı düzeyde ağır metallerle maruz kalmanın ROS üretimini uyardığını böylece antioksidan enzimlerin aktivitelerini engellediğini ve bunun sonucunda savunma sistemlerinin bozulmasına neden olduğunu göstermektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, bitkilerin, doğrudan iç ve dış uyaranlara yanıt veren doğal bir savunma kaynağı olarak çok sayıda ince ayarlı sinyalleme ağı aracılığıyla ağır metal toksisitelerine karşılık verdiğini de göstermiştir (Moeen-ud-din ve Yang, 2023).

Ağır metal stresini anlamak ve soruna çözüm bulmak için çok sayıda bitki ile çalışılmıştır bu bitkilerden biri olan su bitkileri (makrofit), biyokütlenin önemli bir bileşeni ve trofik zincirin temeli olması nedeniyle ekosistemlerde büyük öneme sahiptir. Suyla doğrudan temas nedeniyle, su bitkileri eser metaller gibi kirleticileri alma kapasitesi yüksektir. Literatür, küçük sucul makrofitlerin eser metal alımına yönelik yeteneklerini ve kirleticilerin kirli su ile toprak sistemlerinden uzaklaştırılmasına yönelik uygunluklarını başarıyla göstermektedir. Bu bitkiler arasında Arales takımının Lemnaceae familyasından *Lemna trisulca* (su mercimeği) sıradan türler için toksik konsantrasyonlardaki kirleticileri çıkarma, biriktirme veya parçalama; hızlı büyüme ve yüksek biyokütle verimine sahip olma gibi özelliklerinden dolayı çalışmalar için tercih edilmektedir (Polechońska ve ark., 2022).

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Su bitkileri, su ortamının birincil üreticileri ve besin zincirinin ilk halkasıdır. Su mercimekleri tatlı suda yaşarlar. Bitkiler suyun yüzeyinde yer alırlar. Bu bitkiler su yüzeyini örtü gibi kaplarlar ve tatlı sularda yaygın olarak bulunurlar. Su mercimekleri, uzunlukları 1 ila 5 mm arasında değişen (*Lemna trisulca* 6 ila 10 mm boyuta ulaşır) en minyatür otsu bitkilerden bazılarıdır. Tek ayırt edilebilir organları küçülmüş çiçekler ve kökler olan, tallus bitkilerinin organizasyonuna basitleştirilmiş bir gövdeye sahip bitkilerdir. Su yüzeyinde serbestçe yüzen, hayatta kalma organelleri tamamen suya batmış ve elverişsiz mevsimlerde dibe çöken hidrofiter olarak sınıflandırılırlar. Lemnoideae alt familyasının türlerini barındıran su mercimekleri, çiçekli bitkilerin arasındaki en küçük ve en basit gruptur. Su mercimeği: Monokotiledon sınıfı, Aracidae alt sınıfı, Arales takımı, Araceae familyası içinde bir alt familyadır. Lemnoideae alt familyasının *Landoltia*, *Wolffiella*, *Spirodela*, *Wolffia* ve *Lemna*, olmak üzere 5 cinsinde şimdiye kadar tespit edilmiş 37 türü vardır. Ülkemizde de birçok sulak alanda bulmak mümkündür. Ülkemiz bu alt familyanın 2 cinsini ve 5 türünü bulundurur. Monokotiledon C3 bitki grubunda yer alan su mercimeği, temel bitki fonksiyonlarının saptanmasında model bitki olarak kullanılabilir. Su mercimeği ince yapraklara bağlı basit kök yapılarına sahiptir. Bitki üzerinde yaprak gibi hareket eden, %92-94 su içeren ve yaşam döngüsü boyunca çoğalan yapraklara sahiptir. Tek evcikli bitkilerdir, nadiren iki evcikli yapılarda bulunurlar. Periantsız tek cinsiyetli çiçekler bulundurur. Çiçek yapıları bir kılıfla çevrili iki erkek ve bir dişi çiçekten oluşur. Su mercimeği uygun çevre koşulları altında eşeysiz olarak da hızla çoğalır. Vejetatif üreme tomurcuklanma ile gerçekleşir. İlkbahar ve yaz aylarında yapraklarını tomurcuklandırarak vejetatif olarak çoğalır, kışın sıcaklıklar düştüğünde veya sonbaharda besin sıkıntısı yaşandığında ise uyku evresi olan turionlar oluşur (Coşkun ve ark., 2018). Bu bitkiler sorun yaratabilecek mineralleri absorbe eder ve atık suların arındırılmasını sağlar. Bazı *Lemna* türleri, ağır metaller ve metaloidler gibi çeşitli kirleticileri sudan arındırma potansiyelleri nedeniyle su ortamlarında önemli bir konuma sahiptir. Ayrıca su mercimeğinin ağır metalleri biriktirebilme özelliği fitoremediasyon bakımından önemlidir. Su mercimeği hızlı büyüme oranına sahip bitkilerdir. Büyüme hızları diğer damarlı bitkilerin iki katıdır. İki katına ulaşma süreleri 48-96 saattir.

Su mercimeği, karbonhidrat ve protein içeren yüksek biyoktle potansiyeline sahip bir bitkidir. Su mercimeğini kümes canlıları, balıklar ve diğer canlılar gıda olarak kullanır. Protein içeriği yönünden soya bitkisinden sonraki ikinci bitki türüdür. Bazı su mercimeği türleri insan tüketimi için de kullanılmaktadır. Su mercimeği, doymuş yağ asidi, tekli/çoklu doymamış yağ asidi içeriği yönünden de insan beslenmesinde besin değerini artırabilir. Su mercimeğinin diğer enerji bitkilerine kıyasla daha yüksek verimliliğe sahip olduğu görülmüştür. Su mercimeği örnekleri de yüksek miktarda nişasta içerir. Son alışmalar su mercimeğinin biyoetanol üretiminde önemli bir ürün olduğunu ve yüksek miktarda nişasta içerdiği için alternatif bir kaynak olabileceğini göstermiştir. Su mercimeğinin biyoktlesi yüksek oranda fermente şeker bulundurduğu için biyoyakıt üretiminde önemli yerdedir. Bu bitkilerin kullanılması biyoetanol üretiminde maliyetleri düşürebilir (Coşkun ve ark., 2018).

Lemna trisulca'nın fazla bulunmasının nedenleri ekolojik esneklikleri, kısa yaşam döngüleri ve hızlı remeleridir. Ayrıca, doğal rakiplerinin olmaması ve gelişimleri için elverişli iklim koşulları ve yayılmalarının basitliğidir. Gr çiçeklenmeleri, su yüzeyinin %100'ne kadarını kaplayan kalın bir yeşil matın gelişmesine neden olabilir, ışığın su derinliklerine erişimini keser ve genellikle su altındaki bitkilerin geri çekilmesine neden olur. Birçok çalışmada su mercimeği biyoktlesindeki seçilmiş elementleri bağlayarak su ktlelerini arıtma potansiyelini doğrulamaktadır. Su mercimekleri hızlı büyüdükleri ve kültürde tutulmaları kolay oldukları için fizyolojik ve eko-toksikoloji çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Rozman ve ark., 2022). Bu nedenlerden dolayı tez çalışmamızda bitki materyali olarak *Lemna trisulca* seçilmiştir.



şekil 4.1. *Lemna trisulca*'nın genel görünümü

2.1. Ağır Metaller

Ağır metaller, işlenebilirlik, iletkenlik, katyon kararlılığı ve ligand özgüllüğü gibi metalik özellikler gösteren elementlerdir. Nispeten yüksek yoğunluk ve 20'den büyük bir atom numarasına sahip yüksek bağıl atom ağırlığı ile karakterize edilirler. Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, V ve Zn gibi bazı ağır metaller organizmalar tarafından çok az miktarda gereklidir. Ancak bu elementlerin aşırı miktarları organizmalar için zararlı hale gelebilir. Pb, Cd, Hg ve As (bir metaloit ancak genellikle ağır metal olarak anılır) gibi diğer ağır metaller organizmalar üzerinde herhangi bir yararlı etkiye sahip değildir ve bu nedenle bitkiler ve hayvanlar için çok zararlı oldukları için "ana tehditler" olarak kabul edilirler. Metaller, ayrı varlıklar olarak veya diğer toprak bileşenleriyle kombinasyon halinde bulunur. Bu bileşenler, inorganik katıların yüzeylerine tutunmuş değiştirilebilir iyonlar, değiştirilemeyen iyonlar, karbonatlar ve fosfatlar gibi çözünmeyen inorganik metal bileşikleri, toprak çözeltilisindeki çözünür metal bileşiği veya serbest metal iyonları, organik malzemelerin metal kompleksi ve silikat minerallerine bağlı metalleri içerebilir. Silikat minerallerine bağlı metaller, arka plan toprak metal konsantrasyonunu temsil eder ve ayrı varlıklar olarak var olan veya diğer 4 bileşende yüksek konsantrasyonda bulunan metallerle karşılaştırıldığında kirlenme/kirlilik sorunlarına neden olmazlar (Chibuike ve Obiora, 2014).

Tarım topraklarında ağır metal kirliliğinin giderek yaygınlaşması hem çevre hem de insan sağlığı için önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Endüstriyel emisyonlar ve uygunsuz atık bertarafı gibi antropojenik faaliyetler, bitkiler tarafından emilebilen ve sonrasında besin zincirine girebilen ağır metallerin toprakta birikmesine yol açmıştır. Bitkilerin ağır metalleri tolere etme veya biriktirme mekanizmalarını anlamak, sürdürülebilir tarımsal uygulamaları geliştirmek için çok önemlidir. Bitkiler ağır metal stresine, oksidatif strese ve hücrel hasara neden olabilen reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi de dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmalar yoluyla yanıt verir. Ağır metal toleransı ile ilişkili moleküler belirteçleri belirlemek, dirençli çeşitler geliştirmeyi amaçlayan ıslah programları için önemlidir (Mesci ve Çatal, 2025).

Tarımsal bir bakış açısından ağır metaller iki ayrı gruba ayrılabilir. Arsenik (As), kadmiyum (Cd), kurşun (Pb) ve cıva (Hg) gibi elementler bitkiler için ne elzemdir ne de enzim kofaktörleri olarak gereklidir. Bu toksik ağır metallerin düşük eşik değerleri vardır ve toksik ağır metaller olarak kabul edilirler. Öte yandan çinko (Zn), molibden (Mo), bor (B), nikel (Ni), demir (Fe) ve bakır (Cu) gibi elementler, bitkiler tarafından optimum

fizyolojik işleyiş ve büyüme için az miktarda gereklidir. Ancak bu elementler öngörülen dozlarını aştıklarında toksik hale gelirler. Ağır metaller, jeolojik süreçler veya tarımsal uygulamalar, madencilik ve eritme gibi insan faaliyetleri yoluyla ekilebilir topraklar aracılığıyla insan besin zincirine girebilir (Moulick ve ark., 2024).

Araştırmalar, ağır metal maruziyetinin bitkilerde oksidatif strese neden olduğunu ve bunun da reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna yol açtığını göstermiştir. APX ve CAT gibi antioksidan genlerin ifadesi, arsenik ve kurşun gibi ağır metallere yanıt olarak önemli ölçüde artış göstererek düzenlenir (Mesci ve Çatal, 2025).

Arsenik (As) doğal olarak dünyanın kabuğunda bulunur ve insan faaliyetleri yoluyla çevreye dağılır. Arsenik, metal ve ametal arasında bir metaloiddir ve farklı kimyasal formlara sahiptir. Doğada hem organik hem de inorganik olarak birbirinden farklı arsenat, arsenit, arsenik ve arsin olarak dört oksidasyon formuna sahiptir. Doğada genellikle arsenit ve arsenat inorganik form olarak ve metillenmiş türevi olan monometilarsenik asit (MMA) ve dimetilarsinik asit (DMA) organik formlarıdır. Esas olarak As'nin bitki büyümesini ve üretkenliği etkileyen fizyolojik ve morfolojik bozukluklara neden olan çeşitli metabolik süreçleri engellediği böylece kök büyümesinin inhibisyonuna ve hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca As, bitkinin fizyolojik ve metabolik düzeyinde etkileri olan oksidatif stres durumu yaratır (Castillo, 2022).

Arsenik formları biyotik ve abiyotik süreçlerle birbirine dönüştürülebilir. Arsenat ve arsenit, doğal çevrede karşılaşılan iki ana inorganik arsenik formu olarak kabul edilir. Kötü yönetildiğinde, arsenik ile kirlenmiş ortamlardaki tarımsal uygulamalar insan sağlığı için önemli bir tehdit oluşturabilir. İçme suyunun arsenikle kirlenmesi, Asya'nın belirli bölgelerinde milyonlarca insanda zararlı sağlık etkilerine neden olmaktadır. Arsenik toksisitesi, 21. yüzyılda önemli zorluklar ortaya çıkaran küresel bir sağlık ve çevre krizidir. Güçlü bir kanserojen olan arsenik, çeşitli insan organlarında kansere neden olur ve bitkileri ciddi şekilde etkileyerek ekosistemleri ve besin zincirlerini bozar. Çevrede kalıcılığı ve ürünler aracılığıyla topraktan insanlara kolayca aktarılması halk sağlığını daha da tehlikeye atar. Arsenik kaynaklı fitotoksisiteyi yönetmek ve bitkilerde biyolojik birikimini azaltmak için kullanılan geleneksel yöntemler, yüksek maliyetler, verimsizlik ve eksik uzaklaştırma gibi sınırlamalarla karşı karşıyadır (Karimi ve ark., 2025).

Bitkilerde arsenik alımı, öncelikle arseniğin bitkinin sitoplazmasına hareketini kolaylaştıran belirli hücre zarı taşıyıcılarına bağlıdır. Arsenik alımında rol oynayan

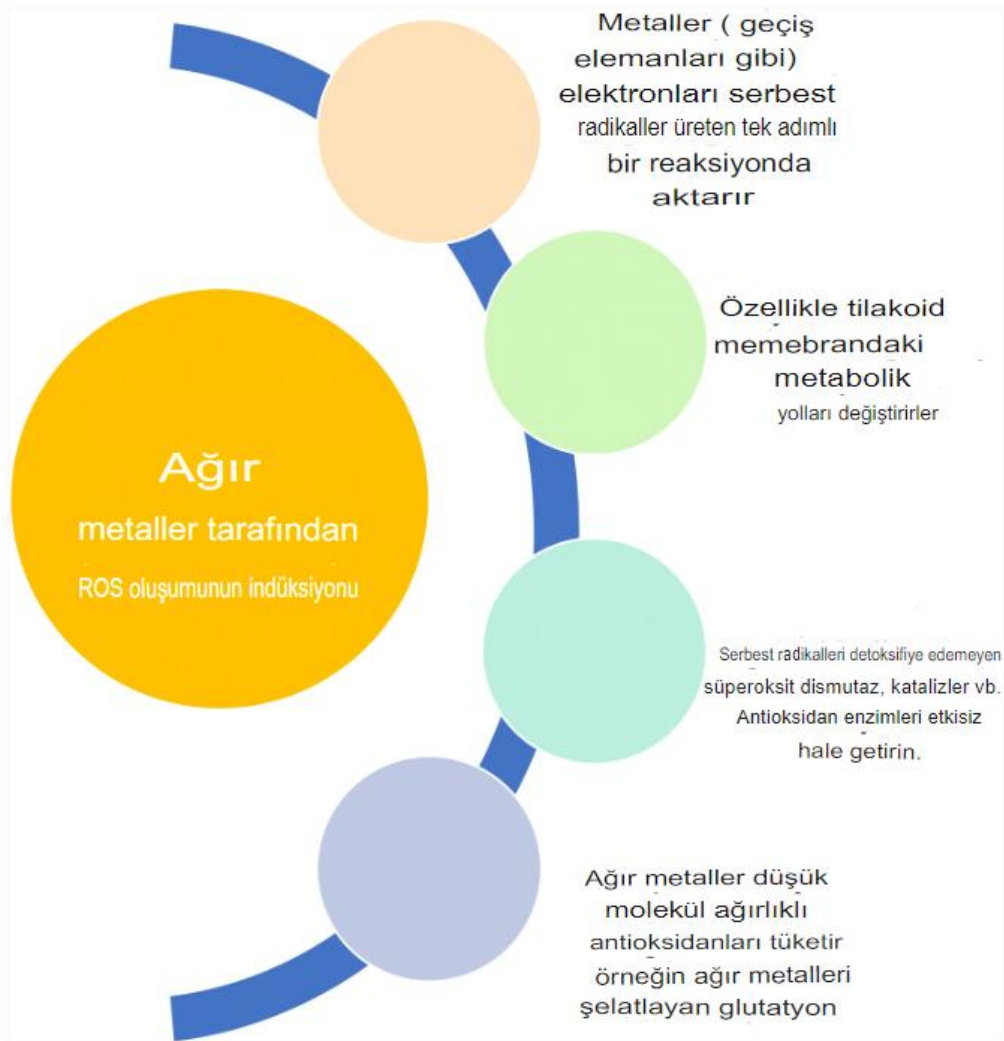
taşıyıcılar, temel besin emiliminden sorumlu olanlara benzeyen genler tarafından kodlanır ve bu da yanlışlıkla arsenik alımına yol açar. Önceki mekanizmalardan geçtikten sonra, birincil kök hücreleri hala yüksek oranda arsenik içerdiğinde, bitkiler çeşitli tipte taşıyıcılar kullanarak arseniğin köklerden ksilem ve floem yoluyla sürgün dokularına hareketini kolaylaştırabilir; bu işleme uzun mesafeli translokasyon denir. Dahası, bitkiler arseniği farklı türlere de dönüştürebilir ve daha sonra vakuol-membran taşıyıcılarının yardımıyla vakuollerde depolayabilir; bu mekanizmaya kısa mesafeli translokasyon denir. Uzun ve kısa translokasyon mekanizmaları tanınmasına rağmen, her iki taşıma mekanizmasındaki kritik adımlar hala belirsizliğini korumaktadır.(Rodriguez, 2024)

Arsenik, bitkilerin iyonik homeostazını ve fotosentetik verimliliğini olumsuz etkiler. Klorofil içeriğini azaltır; fotosistem I, fotosistem II, ışık toplayan kompleks II'ye zarar verir ve Kalvin döngüsünün temel enzimlerinin etkinliğini azaltır. Bitkiler ayrıca reaktif oksijen türlerinin ve reaktif nitrojen türlerinin birikmesiyle ortaya çıkan nitro-oksidatif stres de yaşarlar. Arsenik kaynaklı oksidatif stresin bir sonucu olarak, membran bozulması, elektrolit sızıntısı ve lipid peroksidasyonu meydana gelir ve bu da fotosentetik pigmentlerin yapısını ve işlevini önemli ölçüde etkiler. Membran hasarı, bitkilerin besinleri emme yeteneğini etkiler ve bitki içindeki translokasyon stoma iletkenliğini ve terlemeyi bozar. Arsenik nihayetinde büyümeyi kısıtlar ve bunun sonucunda biyokütle azalır, kökler kısalır ve boy kısalır. Ayrıca kloroz, kuru yapraklar, azalmış üreme kapasitesi ve verim, kök bozulması ve genel olarak üretkenlikte düşüşe neden olur (Zaidi, 2024).

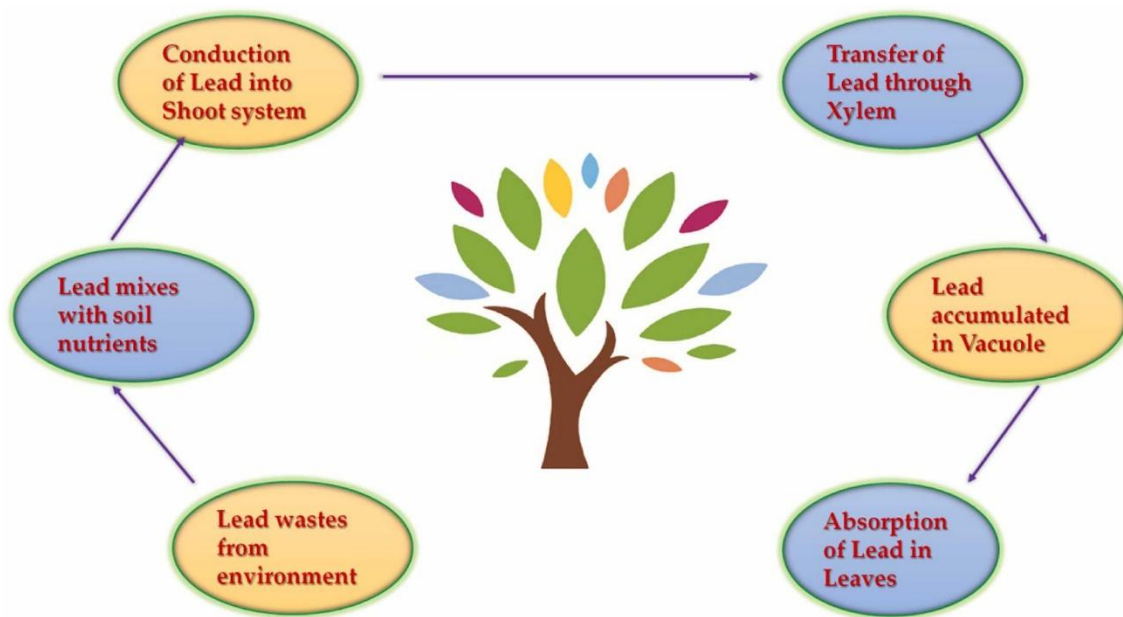
Kurşun (Pb), mavimsi gümüş renkli metalik bir elementtir. Kurşun, yeryüzünde bol miktarda bulunan, kullanışlı ve oldukça yaygın olan en eski elementlerden biridir. Saf kurşun çok nadirdir. Genellikle oksitler, sülfürler, asetatlar, kloratlar ve klorit formlarında, diğer cevherler ve minerallerle karışık olarak bulunur. Kurşun metalinin çevreye salınması insan faaliyetleri sonucunda gerçekleşir. Kurşunlu benzin, aküler, boyalar, pestisitler, mineral atıklar, fosil yakıtlar, elektronik atıklar kurşun kirliliğine neden olmaktadır. Kurşun elementi çok düşük konsantrasyonlarda bile toksik etkiye sahip olabilir. Kurşun elementi toksik miktarlara ulaştığında bitkileri anatomik ve fizyolojik olarak olumsuz etkiler. Aşırı kurşun bitkinin kök gelişimini azaltır, topraktan su ve mineral alımını engeller. Kurşunun bitkiler üzerindeki etkilerini araştırmak için birçok çalışma yapılmıştır.

Kurşun uygulanan bitkilerde enzim aktivitesi bozulur, çimlenme, klorofilin sentezi ve fide gelişimine ait süreçler de enzimler nedeniyle aksar (Ortakçı, 2020).

Kurşunun topraktan yer üstü dokulara taşınması kökler tarafından emilimle başlar. Kökler tarafından kurşun iyonlarının alınması, adsorpsiyon kapasitesi, organik içerik, redoks potansiyeli ve pH gibi toprak faktörlerinden etkilenen karmaşık bir süreçtir. Kök sistemi tarafından emildikten sonra kurşun, çoğu kurşun iyonunun hücreler arası boşluğa bırakıldığı simplastik yolu takip ederek ksilemden geçer. Bu hücreler arası kurşun birikintileri daha sonra Ca^{+2} iyon kanalları aracılığıyla hücre içinde hareket eder. Kurşun hücre içi ortama ulaştığında, ağır metal tepkilerinde görev alan mitogenle aktive olan protein kinazlar aktive olur ve strese yanıt veren transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile sonuçlanan bir sinyalleme kaskadı başlatır. Ağır metallerin fitotoksik etkileri, reseptörler ağır metal stresi tarafından aktive edildiğinde reaktif oksijen türleri (ROS) üretebilir. Süperoksit dismutaz, tioredoksin, glutatyon S-transferaz ve peroksidaz gibi antioksidan enzimler ve askorbik asit, glutatyon ve α -tokoferol gibi antioksidan moleküller ROS'u toksik olmayan ürünlere dönüştürür (Ahmed ve ark., 2023).



Şekil 4.2. Ağır metal toksisitesine bağlı ROS oluşumunun dört yolu (Ghori ve ark., 2019)



Şekil 4.3. Kurşunun topraktan bitki sistemine alınma mekanizması (Collin ve ark., 2022)

2.2. Bitkilerde Stres

Dünya uç noktalarla karşı karşıya olduğundan biyotik, abiyotik ve iklim değişikliği zorlukları çok yaygın hale gelmekte ve bitkilerin normal büyümesinde ve işleyişinde engellere neden olmaktadır. Bu koşullar bitki sağlığını bozarak kloroz, nekroz, yaprak solması, bodur boy, fotosentetik pigmentlerin kaybı, engellenmiş kök ve sürgün gelişimi ve erken yaşlanma gibi semptomlara yol açmaktadır. Bitkiler, hayvanların aksine, kaçamayan ve dolayısıyla yaşam alanlarındaki farklı stres faktörlerine maruz kalan hareketsiz canlılardır. Hayvanların aksine, bitkilerin çeşitli biyotik ve abiyotik koşulların bozucu etkilerine karşı kendilerini koruyacak karmaşık bir bağışıklık sistemleri yoktur; bunun yerine, savunma mekanizmaları olarak işlev gören çeşitli stres koşullarına uyum sağlamak için çeşitli başa çıkma yöntemleri geliştirmişlerdir. Bitkiler, yaşam alanlarında kendilerini korumak için farklı fitohormonlardan oluşan bir ağ kullanır ve olumsuz koşullarda uyum sağlama ve hayatta kalma yeteneklerini garanti eder. Biyotik stres faktörlerinin istilasısı, bitki bağışıklığını zayıflatarak bitki hastalıklarının gelişmesine yol açar, sonuçta ürün veriminin azalmasına, hasat öncesi kayba ve hasat sonrası neden olur. Bu biyotik stresler patojenler, yabancı otlar ve otçul beslenen canlılardır (Chakraborty ve ark., 2025). Abiyotik stresler, bitki büyümesini ve gelişimini olumsuz yönde etkileyen önemli bir faktördür. Bu stresler, bitkilerde morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişikliklere yol açan bir dizi zararlı etkiye neden olur.

Bitkiler abiyotik streslere maruz kaldığında, savunma mekanizmaları, esas olarak stresle ilişkili hormonlar, örneğin absisik asit (ABA), reaktif oksijen türleri (ROS), poliaminler ve fitokromlar olmak üzere sinyal moleküllerini içeren karmaşık bir düzenleyici ağ içinde düzenlenir. Bu abiyotik stresler kuraklık, tuzluluk, ağır metaller, sıcaklık değişimleri, ultraviyole radyasyon, ozon stresidir (Pinski ve ark., 2025).

Bitkiler tarafından alınabilen ağır metaller, toprak çözeltisinde çözünür bileşenler olarak bulunan veya kök salgıları tarafından kolayca çözünenlerdir. Bitkiler büyümeleri ve bakımları için belirli ağır metallere ihtiyaç duysa da bu metallerin aşırı miktarları bitkiler için toksik hale gelebilir. Bitkilerin temel metalleri biriktirme yeteneği, diğer temel olmayan metalleri de edinmelerini sağlar. Metaller parçalanmadığından, bitki içindeki konsantrasyonlar optimum seviyeleri aştığında, bitkiyi hem doğrudan hem de dolaylı olarak olumsuz etkilerler.

Yüksek metal konsantrasyonunun neden olduğu doğrudan toksik etkilerden bazıları, sitoplazmik enzimlerin inhibisyonu ve oksidatif stres nedeniyle hücre yapılarına verilen zarardır. Dolaylı toksik etkiye bir örnek, bitkilerin katyon değişim bölgelerindeki temel besin maddelerinin değiştirilmesidir. Ayrıca, ağır metallerin toprak mikroorganizmalarının büyümesi ve aktiviteleri üzerindeki olumsuz etkisi, bitkilerin büyümesini dolaylı olarak da etkileyebilir. Örneğin, yüksek metal konsantrasyonu nedeniyle yararlı toprak mikroorganizmalarının sayısındaki azalma, organik madde ayrışmasında azalmaya ve bunun sonucunda toprak besin maddelerinde düşüşe yol açabilir. Bitki metabolizması için yararlı enzim aktiviteleri de ağır metalin toprak mikroorganizmalarının aktivitelerine müdahalesi nedeniyle engellenebilir. Bu toksik etkiler (hem doğrudan hem de dolaylı) bitki büyümesinde düşüşe yol açar ve bu da bazen bitkinin ölümüyle sonuçlanır. Ağır metal toksisitesinin bitki büyümesi üzerindeki etkisi, süreçte yer alan belirli ağır metale göre değişir. Bitki büyümesinde herhangi bir yararlı rol oynamayan Pb, Cd, Hg ve As gibi metaller için, büyüme ortamında bu metallerin çok düşük konsantrasyonlarında bile olumsuz etkiler kaydedilmiştir (Chibuike ve Obiora, 2014).

2.3. Bitkilerde Stres Yanıtları

Mitokondrideki solunum reaksiyonları ile oksijen kullanılır, ATP üretilir ve bu durum bitkide ve hayvanda benzerdir. Oksijen üretme potansiyeli fotosentez ile gerçekleşir ve yüksek oksijen ile başa çıkabilir. Bitkilerde, oksijen konsantrasyonu yeşil

yapraklarda kökler gibi yeşil olmayan bölümlere göre 2.5 kat daha yüksektir. Bitkilerin hem yeşil hem de yeşil olmayan kısımlarındaki oksijen seviyeleri, hayvan hücrelerinde tipik olarak bulunanlardan önemli ölçüde daha yüksektir. Ancak, abiyotik stres sırasında, bitki dokuları genellikle oksijen bulunabilirliğinde önemli değişiklikler yaşar ve bu da çevrelerinde oldukça hipoksik durumlara yol açar (Naik ve Naik, 2025).

2.3.1. Bitkilerdeki Reaktif Oksijen Türleri

Moleküler oksijen (O_2) bir elektron alarak spin sınırlayıcı niteliği yok olabilir. Bu elektron, bitki hücrelerinde ETC sırasında veya NADPH oksidaz enzimiyle katalizlenen reaksiyon ile hedefe ulaştırılmayan elektrondur. Oksijen bir elektron aldığı anda, süperoksit radikali veya süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) meydana gelir.

Hidrojen peroksit, bitki hücrelerinde fizyolojik işlevleri olan en kararlı ROS türlerindedir. Hidrojen peroksit, paylaşılmamış elektronları olmayan zayıf asidik bir bileşiktir. Bitki hücrelerinde diğer hidrojen peroksitin kaynakları apoplasttaki NADPH oksidazlar (NOX) ve peroksidazlardır (POX). Bitki hücrelerde süperoksit anyon radikalinin oluştuğu bölgeler, hidrojen peroksit oluşumunun kökeni olarak kabul edilir.

Hidroksil radikali, oksidatif stres sırasında lipid peroksidasyonundan ve nükleik asitler ile proteinlerin oksidatif hasarından en çok sorumlu olan reaktif oksijen türüdür. Bu radikalın, programlanmış hücre ölümü ve oksidatif stres sinyali ile bağlantılı olduğu rapor edilmiştir. Bu radikal, bitkiler strese maruz bırakıldıktan sonra oluşur ve kalsiyum ve potasyum kanallarını aktive eder, kalsiyumun hücreye girmesine ve potasyumun çıkışına neden olur.

Kloroplastlardaki PSII'nin reaksiyon merkezinin ışığı absorpsiyonu sonucu oksijenin aktivasyonu, oldukça reaktif bir singlet oksijen radikalini oluşturur. Singlet oksijen, reaksiyon merkezindeki β -karoten ve flavonoidler yardımıyla detoksifiye edilebilir. Bitkilerde, singlet oksijen üretimi abiyotik stres koşulları altında, özellikle de foto-oksidatif stres altında artabilir. Sonuç olarak oksidatif hasar oluşur ve programlı hücre ölümü başlar.

2.4. Oksidatif stresle oluşan hasara karşı savunma mekanizmaları

Oksidatif stres, protein, nükleik asit ve lipidler gibi makromoleküller üzerinde geri dönüşümlü/dönüşümsüz değişikliklere neden olur. Bunlar arasında en tehlikeli olanlardan lipid oksidasyonu/peroksidasyonu bir takım reaksiyon sonucunda farklı radikallerin oluşmasını uyarır. Lipid peroksidasyonu üç aşamalı bir süreçtir: başlama, yayılma ve sonlanma. Lipid peroksidasyonunun başlama aşaması, hidroksil, alkoksil, peroksil radikalleri ve peroksinitrit aracılığıyla lipid molekülünden bir hidrojen atomunun çıkarılmasıyla başlatılmış olur. Bu reaksiyonda H_2O_2 ve süperoksit radikalleri etkin değildir. Metilen ($-CH_2-$) grubundaki hidrojen atomu uzaklaştırılır ve sonuç olarak karbon merkezli bir lipid radikali ($-CH_2-$ veya L.) oluşur. Fosfolipitler radikallere ve peroksidasyona karşı duyarlıdır. L. oksijeni aktive ederek lipid peroksil radikali ($LOO\cdot$) oluşturur. Bu radikal komşu yağ asidinden bir hidrojen atomu alarak lipid hidroperoksit ($LOOH$) ve diğer bir lipid radikalini (L.) oluşturur. Böylece yayılma süreci başlar. $LOOH$, indirgenmiş demir veya bakır gibi geçiş metalleri ile indirgeyici bölünmeye uğrar. Sonuçta lipid alkoksil radikali (LO) oluşturulabilir. Bu radikal oldukça reaktif bileşiktir. Lipid peroksidasyonunun önemli mekanizması da PSII reaksiyon merkezinde çift bağların singlet oksijen ile doğrudan reaksiyonu sonucu $LOOH$ oluşumudur. Şiddetli lipid peroksidasyonu membranlarda hasara, seçici geçirgenliğin zayıflamasına, organellerin parçalanmasına ve DNA, RNA ve proteinlerin işlev kaybına neden olur.

Reaktif oksijen türleri proteinojenik amino asitleri oksitleyebilir. Proteinlerin yapısındaki bu tür değişiklikler, proteinlerce gerçekleştirilen metabolik, yapısal, düzenleyici ve taşıma görevlerinin bozulmasına neden olur. Protein oksidasyonu toksik ürünlerin oluşumuna ve nihayetinde hücre ölümüne yol açabilir. 4-hidroksinonenal ve malondialdehit gibi peroksidasyon ürünleri, bazı amino asitlerle reaksiyona girer ve bu molekülleri okside edebilir. Proteinlerde oksidasyonun neden olduğu hasarın çoğunun geri döndürülemez olduğu düşünülmektedir. Kükürt içeren amino asitlerin oksidasyonu düzenleyici bir role sahiptir. Sisteinin ROS ile reaksiyonunun geri dönüşümlüdür ve bu amino asidin tamamen oksitlenmemiş olmasıyla ilgilidir. Proteinlerin yapısındaki farklı amino asitlerin oksidasyonu da farklı işlevsel sonuçlar doğurur. Bazı durumlarda metiyonin, proteinin yapısındaki diğer amino asitlerin oksidasyonunu önleyebilir. Sisteinin oksidasyonu çok önemli düzenleyici sonuçlara neden olur.

Karbonilasyonun gerçekleşmesi için metiyonin ve sistein üzerindeki oksidasyonundan daha fazla enerji gerektirir. Ayrıca karbonilasyon fazla sayıda amino asidi etkiler ve proteinlerin yapısı ve fonksiyonu üzerinde olumsuz etkiler oluşturur.

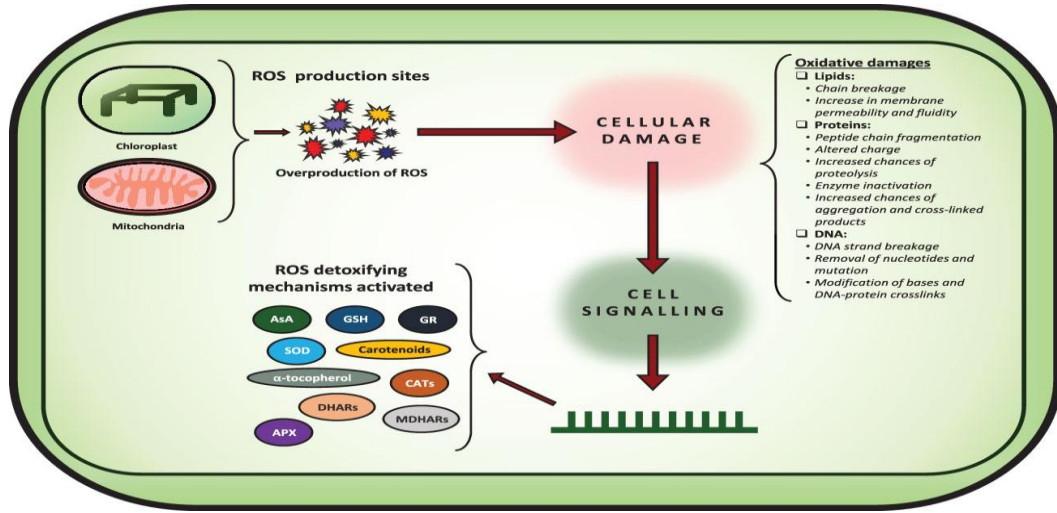
Karbonilasyon genellikle reaktif ketonların ve aldehitlerin oluşumuyla sonuçlanır. Lizin, arginin, prolin ve treonin yan zincirlerinde oluşan oksidasyonlar birincil protein karbonilasyon reaksiyonları olarak rapor edilir. İkincil protein karbonilasyon reaksiyonları lipid peroksidasyonu sırasında oluşan aldehitlerin eklenmesiyle ortaya çıkar. Protein yapısında, moleküller arası kovalent çapraz bağlanmasında veya protein yıkımında önemli sonuçlara neden olur. Bu değişiklikler proteinlerin fizyolojik ve enzimatik aktivitelerini engeller. Birçok stres faktörü bitkilerde protein karbonilasyonuna yol açar.

Karbonhidratlar bitkilerde en fazla bulunan bileşiklerdir. Karbonhidratların oksidasyonu bitkiler için tehlikelidir. Hidroksil radikallerinin ksiloglukanlar ve pektinler ile enzimatik olmayan bir şekilde reaksiyona girer, onları ayrıştırır ve membran yumuşamasına neden olur. Bu durum bitkilerde hücre büyümesi ve meyve olgunlaşması için önemlidir. Bununla birlikte, stres koşulları altında ve katalitik bakır ya da demir aktiviteleri arttığında, olumsuz fizyolojik sonuçlar oluşabilir.

DNA hasarı, canlı tohum zararından ve zirai açıdan önemli bitkilerin ölümünden sorumlu tutulabilir. Bu hasarlar üç grupta incelenir: yanlış baz eşleşmeleri, çift sarmal kırılmaları ve bazlardaki kimyasal değişiklikler. Hidroksil radikalleri, nükleotid bazlarına çift bağ ekleyerek ve hem 2-deoksiribozun her bir C-H bağından ve timin metil grubundan bir hidrojen atomu çıkararak nükleik asitlerde hasara neden olur. Bitkiler DNA hasarının onarılmasını sağlayan sistem ile molekülün hasarlı kısmının doğrudan onarımı ya da baz ve nükleotid değişimi sağlar. Sitozol ve organellerdeki antioksidan savunmalar da bu korumada önemli bir rol oynar (Doğru, 2020).

Bitkilerin arsenik ve kurşun stresi altında aşırı reaktif oksijen türleri (ROS) üretmeye teşvik edilmesi mümkündür, özellikle H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ ve hidroksil serbest radikali ($\cdot OH$). Aslında, ROS biyolojik homeostazı korumak ve hücre sinyallemesini kolaylaştırmak için gereklidir ve bitkilerde üretimi ve temizlenmesi normal koşullar altında titizlikle dengelenir. Aerobik metabolizmadaki önemli rollerine rağmen, ROS seviyeleri dengenin bozulması nedeniyle arsenik ve kurşun stresi altında yine de aşırı hale gelebilir. Bir kez yukarı düzenlenen ROS bitki hücrelerinin antioksidan tepkisini aştığında, protein deformasyonu, DNA hasarı ve membran lipid peroksidasyonu gibi oksidatif hasar ortaya çıkacak ve sonuçta hücre ölümüne neden olacak ve bitki

büyümesini engelleyerek bitki verimini azaltacaktır (Xie ve ark., 2025). Normalde, ROS bir bitkinin metabolik süreci tarafından üretilir ve bitki metabolik yolunu aktive etme işlevi görür. Ancak ROS üretimi, mitokondri, peroksizomlar ve kloroplastlar dahil olmak üzere çeşitli hücre bölmelerinde çevresel stres sırasında artar. Daha yüksek ROS konsantrasyonu bitkilerde oksidatif strese neden olur ve bu da oksidatif bozunma ve hücre zarları (lipit peroksidasyonu) yoluyla nükleik asitler, proteinler ve lipitler gibi makromoleküllere zarar verir. Bitkiler, aşırı ROS birikiminin olumsuz etkilerinden korunmak için güçlü ROS temizleme mekanizmalarına sahiptir. Olumsuz koşullarda bozulan çeşitli hücre metabolik yollar arasındaki doğru dengeyi korumak için ROS, birbirleriyle ve diğer hücre metabolik sistemleriyle etkileşime giren temel sinyal molekülleridir. Bu nedenle, ROS'un kendisi bitkiler üzerinde olumlu veya olumsuz bir etkiye sahip olup olmadığını belirlemez; bunun yerine, hücreler içindeki konsantrasyonları belirler (Naik ve Naik, 2025). Hem normal hem de stresli koşullar altında ROS, hücre duvarı, mitokondri, kloroplastlar, plazma zarları, peroksizomlar ve endoplazmik retikulum dahil olmak üzere bir dizi hücre yapısında ortaya çıkabilir. Işık varlığında peroksizomlar ve kloroplastlar ROS üretiminin ana yerleridir; ışık yokluğunda ise mitokondriler ana yerlerdir. Hücre içi sinyalleme kaskadlarındaki habercilerden biri olarak, stoma kapanması, gravitropizm, programlanmış hücre ölümü ve hem abiyotik hem de biyotik stres varlığında ortaya çıkması dahil olmak üzere çok sayıda bitki tepkisi ROS ile ilişkilendirilmiştir. ROS ayrıca transkripsiyon faktörleri, protein fosfatazlar ve protein kinazlar gibi birçok diğer sinyalleme molekülünün aktivitesini ve bu moleküllerin birbirleriyle nasıl etkileşime girdiğini ve tepkiyle ortaya çıkan aşağı akışı nasıl kontrol ettiğini etkileyebilir. ROS'un oluşumu ve uzaklaştırılması arasındaki denge, ROS sinyal havuzunun miktarını, gücünü ve hacmini belirler (Molina-Moya ve ark., 2025).

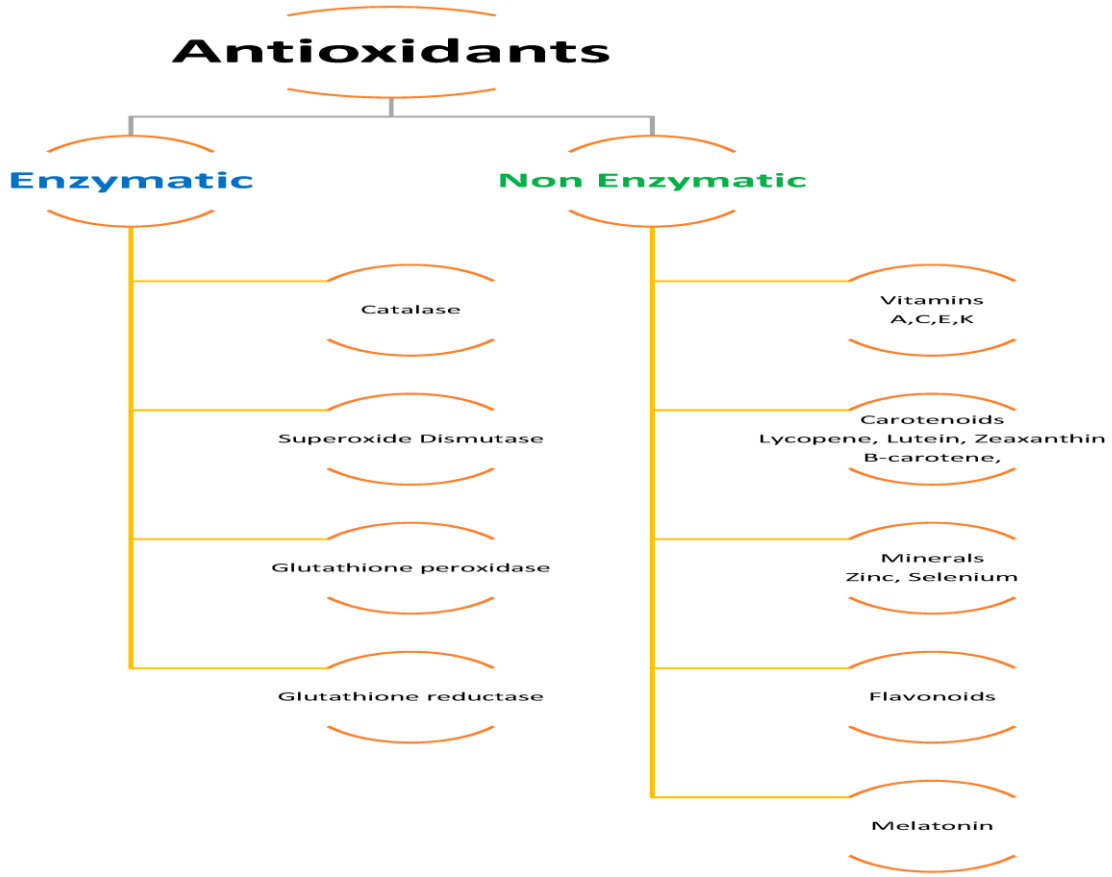


Şekil 4.4. ROS'un aşırı üretiminin hücresel makineyi etkileyen çeşitli oksidatif hasarlara nasıl yol açtığını göstermektedir. Ayrıca, çeşitli ROS detoksifikasyon mekanizmaları da gösterilmektedir (Mishra ve ark., 2023)

Fotosentez ve solunum sırasında indirgeyici eşdeğerlerin veya elektronların üretimi veya iletimi her zaman kloroplast, mitokondri ve peroksizomlar boyunca ROS üretimiyle sonuçlanır. Elektron taşıma zinciri (ETC) bileşenlerinin yetersiz performansı nedeniyle, ROS üretimi stresli durumlarda ağırlaşır. ROS, çevredeki biyotik ve abiyotik değişikliklere yanıt olarak sinyal yollarıyla bütünleşip bunları başlatmanın yanı sıra, organellerden fotosentetik ve metabolik ETC'lerin aktivitesi ve redoks durumu hakkında veri aktarabilir. $^1\text{O}_2$, O_2^- ve H_2O_2 , belirlenmiş sinyal rollerine sahip ROS'lardır (Moulick ve ark., 2024). Oksidoredüktazların, özellikle plazma membranındaki NADPH oksidazın varlığı, bitkilerde ROS oluşumunun başlıca kaynağıdır. NADPH'den elektronu kabul eder ve çeşitli biyolojik süreçlerin yanı sıra sinyal iletimi için de sorumlu olan apoplastik bölgedeki süperoksit radikallerinin üretimini uyarır. Elektronların NADPH'den O_2 'ye transferi için gerekli temel enzimler, böylece süperoksit radikalinin oluşumunu ve ardından H_2O_2 'ye dismutasyonunu uyarır. CDPK'lar NADPH oksidazların yukarı akışında yer aldığından, ağır metal stresini algılayarak fosforilasyonlarına neden olurlar. Bu, daha sonra apoplastik süperoksidin yükselmesine ve aşağı akış sinyalizasyonu için MAPK kaskadı aktivasyonuna yol açar. Bitkiler, ROS'u temizlemek için hem enzimatik hem de enzimatik olmayan bileşenleri içeren gelişmiş bir antioksidatif savunma sistemine sahiptir. Kloroplastlar, mitokondriler ve peroksizomlar gibi bitki hücrelerindeki farklı organeller, farklı ROS üreten ve temizleyen sistemlere sahiptir. Farklı hücresel bölmelerin ROS temizleme süreçleri koordinelidir. Potansiyel olarak zararlı oksijen metabolitleri normal ayarlarda düşük bir seviyede üretilir ve ROS üretimi ile söndürme

arasında optimum bir denge vardır. Bu sistemler birlikte hücreleri oksidatif stresten korur. Enzimatik olmayan antioksidanlar, çoklu doymamış lipit asil gruplarıyla etkileşime girmek için hücresel metabolik işlevleri değiştirerek çalışır ve böylece zararları stabilize eder. Bu, fotosentez ve solunumdan üretilen ROS'a karşı koruma sağlar ve diğer antioksidanlarla birlikte çalışır. Bunlar arasında, lipit peroksidasyonu en fazla hasara neden olur ve potansiyel olarak biyomembran bozulmasına yol açar. Zarlardaki çoklu doymamış yağ asidi parçalanmasının bir yan ürünü olan malondialdehit, oksidatif stresin bir göstergesi olarak kullanılır. Özellikle, bitkiler ağır metal stresi sırasında düşük moleküler ağırlıklı tiyoller üreterek toksik metallere güçlü bir bağlantı kurar.

ROS, biyomoleküllerle reaksiyona girerek oksidatif hasara neden olduğundan kloroplast fonksiyonları için elverişsizdir. Kloroplastlar, hasarı önlemek için ROS temizleme sistemlerine sahiptir. ROS temizleme sistemlerine ek olarak, kloroplastlar, uzun ömürlü redoks aktif bileşiklerin görünümünü azaltan, uyarılma enerjisinin (NPQ) fotokimyasal olmayan söndürülmesi, döngüsel elektron akışı ve plastid terminal oksidaz (PTOX) aracılı klororespirasyon gibi yollara sahiptir. Çevresel stres faktörleri (yüksek ışık, element fazlalığı, yüksek veya düşük sıcaklık) kloroplastlarda ROS üretimini artırır ve ROS temizleme ile ROS üretimi arasındaki dengeyi değiştirir. ROS üretimi ve temizleme arasındaki dengesizlikler, askorbat, glutatyon ve tiyol içeren bileşikler gibi indirgenmiş ve oksitlenmiş antioksidan formlarının seviyelerindeki bir değişiklik yoluyla hücrenin redoks durumunda değişikliklere neden olur. Antioksidanların redoks seviyelerindeki değişiklikler, antioksidanların gen ifadesinde değişikliklere neden olan ROS işleme ve sinyal araçları olarak hareket ettiği reaksiyonları tetikler. Özellikle, Mehler reaksiyonunda ROS oluşumu, askorbat ve indirgenmiş glutatyon (GSH) bağlı ışık sinyalini başlatır (Mansoor ve ark., 2023).



Şekil 4.5. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar (Mansoor ve ark., 2023)

Bitkiler, antioksidan üretimi ve stres tepkisi yollarının aktivasyonu da dahil olmak üzere oksidatif stresle başa çıkmak için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir. WRKY ve NAC dahil olmak üzere çeşitli transkripsiyon faktörleri, ROS sinyalleşmesinin ve stres tepkisi yollarının temel düzenleyicileri olarak tanımlanmıştır. Çalışmalar ayrıca, DNA metilasyonu ve histon asetilasyonu gibi epigenetik modifikasyonların strese duyarlı genlerin ifadesini düzenleyebileceğini ve bitki stres toleransını artırabileceğini göstermiştir. Bitkiler, fazla ROS'u temizlemelerine yardımcı olan ve böylece ROS homeostazında önemli bir rol oynayan çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlarla donatılmıştır. Bitkilerdeki antioksidan enzimler arasında süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPX), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon S-transferaz (GST) bulunur. Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında glutatyon, askorbat, tokoferoller, karotenoidler ve flavonoidler bulunur. Alternatif olarak, elektronların oksijene sızmasını önleyebilen alternatif oksidaz (AOX) enzimlerinin manipülasyonu yoluyla aşırı ROS üretimi önlenir.

2.5. Bitkilerde enzimatik olmayan antioksidanlar

Enzimatik olmayan antioksidanlar, askorbik asit ve glutatyon gibi suda çözümlü antioksidanlar ve tokoferoller ve β -karotenler gibi lipofilik antioksidanlar olarak daha fazla kategorize edilen düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerden oluşur. Askorbik asit, üzerinde en çok çalışılan antioksidanlardan biridir ve çoğu bitki hücre tipinde, organelinde ve apoplastında bulunur. Mitokondri, askorbat (AsA) sentezi için birincil bölgedir ve askorbat, proton-elektrokimyasal gradyanlar veya kolaylaştırılmış difüzyon yoluyla diğer hücre bölmelere taşınır. AsA'nın serbest radikalleri temizlediği ve abiyotik stresin neden olduğu oksidatif hasarı önlediği ve bitkilerde büyüme, metabolizma ve farklılaşmanın düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir. Askorbat-glutatyon (AsA-GSH) döngüsünde, iki AsA molekülü askorbat peroksidaz (APX) tarafından hidrojen peroksidi suya indirgemek için kullanılır ve monodehidroaskorbat (MDHA) (kısa ömürlü bir radikal) üretilir. MDHA ayrıca dehidroaskorbata (DHA) ve AsA'ya orantısız bir şekilde dönüşebilir. Ayrıca, AsA doğrudan oksijenin serbest radikallerini temizleyerek membran koruması sağlar ve tokoferol'ü tokoferoksil radikalinden yeniden üretir. Tokoferoller, yük transfer mekanizmasıyla singlet oksijeni söndürme konusunda benzersiz bir yeteneğe sahiptir. Dört izomerden (α , β , γ ve δ) biyolojik olarak en aktif olanı α izomeridir. Kloroplast zarlarında en bol bulunan antioksidanlardan biridir ve bitkileri foto-oksidatif hasara karşı koruduğu bilinmektedir. Tokoferol konsantrasyonu kuraklık stresi ve yüksek ışık stresi altında artar ve bitkileri oksidatif hasara karşı korur. α -tokoferollerin, lipid oto-oksidasyonunda zincir yayılma adımını önlediği ve çeşitli ROS ve lipid oksidasyon ürünlerini etkili bir şekilde temizleyip söndürdüğü, membranları stabilize ettiği ve sinyal iletimini düzenlediği bilinmektedir.

Bir tripeptit olan glutatyon, öncelikle indirgenmiş formda (GSH) bulunur ve konsantrasyonu diğer organellere kıyasla kloroplastlarda (1-4 mM) en yüksektir. AsA-GSH döngüsü yoluyla başka bir güçlü antioksidan olan askorbik asidi yenileme yeteneğine sahiptir. Karotenoidler ve tokoferoller gibi izoprenoidler, fotokorunmada ve kadmiyum stresine yanıtta önemli bir rol oynar. Karotenoidler, konjuge çift bağ yapısının varlığı nedeniyle eşleşmemiş elektronları delokalize etme yeteneğine sahiptir. Bozunmadan kaynaklanan singlet oksijenin söndürülmesinden sorumludurlar ve peroksi (ROO⁻), hidroksil ([•]OH) ve süperoksit radikalleri (O₂^{-•}) gibi serbest radikallerle kimyasal olarak reaksiyona girdikleri bilinmektedir. Yaygın olarak bulunan bir diğer antioksidan olan polifenollerin serbest radikal temizleme aktivitesine sahip olduğu bilinmektedir.

Fenolik bileşikler peroksi radikalleriyle reaksiyona girerek oldukça kararlı ve tepkisiz olan fenoksi radikal ara ürünleri oluştururlar. Bunlar, serbest radikal zincirlerinin sonlandırıcıları ve redoks aktif metallerin şelatlayıcıları olarak işlev görürler.

Askorbik asit (AsA), kararlılığı ve elektron verme yeteneği sayesinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) zararlı etkilerine etkili bir şekilde karşı koyan güçlü bir enzimatik olmayan antioksidandır. Fitohormonların sentezi ve alfa tokoferolün rejenerasyonu dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde önemli bir rol oynar. Askorbik asit, hidroksil ve süperoksit radikallerinin yanı sıra tokoferol radikallerini nötralize ederek detoksifikasyon sağlar. Glutasyon (GSH), AsA-GSH döngüsünde hayati öneme sahiptir, çeşitli serbest radikalleri temizler ve hücrel redoks dengesini korur. Düşük moleküler ağırlıklı tiyoller arasında glutasyon ve sistein özellikle etkilidir. Glutasyon, nikel ve kadmiyum gibi metallerin detoksifikasyonuna önemli ölçüde katkıda bulunur ve metal bağlayıcı özelliklere sahip peptitler olan fitokelatin üretimi için bir substrat görevi görür.

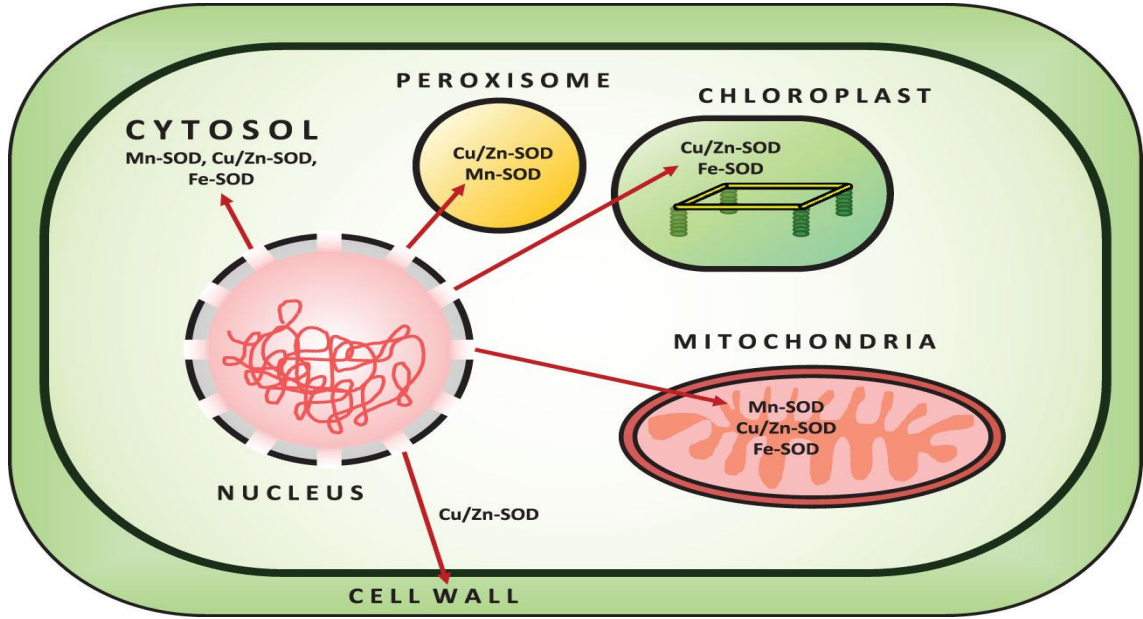
Flavonoidler ve polifenoller gibi çeşitli fenolik bileşikler antioksidan özellikleriyle bilinir. Ağır metal stresi, fenilalanin amonyak-liyaz yolu (PAL) ve tirozin amonyak-liyaz (TAL) enzimlerinin aktivitesinde artışa ve fenolik bileşiklerin birikiminde artışa neden olur. Bir biyostimülan, bitki büyüme düzenleyicisi ve antioksidan olan melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin), bitkinin ağır metal stresine karşı dayanıklılığını artırır. Bunu, redoks dengesini, besin seviyelerini, ozmotik dengeyi ve metabolik süreçleri iyileştirerek başarır. Haricen uygulandığında melatonin, koruyucu gen ifadesini artırarak ağır metal toksisitesine karşı koyar, bu da artan antioksidan etkilere ve metal bağlama özelliklerine yol açar.(Mansoor ve ark., 2023)

2.6. Bitkilerde enzimatik antioksidanlar

2.6.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

SOD bir metaloenzimdir ve bir bitki hücresinin ROS toksisitesine karşı antioksidan savunma sisteminin en etkili bileşenlerinden biridir. SOD'lar bitki savunma mekanizmasının önemli bir bileşeni oldukları için abiyotik strese karşı ilk savunma hattıdır. Stres nedeniyle ROS ve reaksiyon ürünleri artar ve O₂'nin bozulması SOD'lar tarafından hidrojen peroksit (H₂O₂) ve oksijene (O₂) katalize edilir. Tüm SOD'ların çeşitli ROS'lerin doğrudan veya dolaylı metabolizması üzerindeki etkisi doğrulanmıştır.

$O_2^{\cdot-}$ 'nin O_2 ve H_2O_2 'ye dönüşümünü katalizler. SOD, aktif bölgede metal kofaktörlerin (Cu/Zn, Mn ve Fe) varlığına göre üç izoenzime ayrılır. Tüm oksijen metabolize eden hücreler ve tüm hücre altı bölmelerin (kloroplastlar, mitokondriler, çekirdekler, peroksizomlar, sitoplazma ve apoplastlar gibi) SOD içerdiği varsayılır. Bitkilerdeki lokalizasyonuna, yapısına ve işlevlerine dayanarak, SOD üç izoenzime sınıflandırılabilir: Cu/Zn-SOD, Mn-SOD ve Fe-SOD.



Şekil 4.6. Bitki hücresinde SOD Enzimlerinin Lokalizasyonu (Mishra ve ark., 2023)

Cu/Zn-SOD sitozolde, kloroplastlarda ve peroksizomlarda bulunmaktadır. Mn-SOD öncelikle mitokondrilerde, ayrıca peroksizomlarda ve apoplastlarda bulunur. Fe-SOD öncelikle kloroplastlarda ve daha az oranda peroksizomlarda ve apoplastlarda bulunur. Aktif bölgede (Ni-SOD) bulunan dördüncü bir SOD izoenzimi grubu olan Ni (II/III) de keşfedilmiştir. Bununla birlikte, tüm SOD izoformları (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD) nükleer kodludur ve gerektiğinde NH_2 -terminal hedefleme dizileri aracılığıyla organel konumlarına taşınır. Fe-SOD'lar homodimerik ve tetramerik formlarda bulunur. KCN'ye dirençlidirler ancak H_2O_2 'ye dirençli değildirler. Benzer şekilde, Mn-SOD homodimerik ve homotetrameriktir ve hem KCN'ye hem de H_2O_2 'ye dirençlidir, oysa Cu/Zn-SOD her iki inhibitör tarafından da aktive edilir. Ayrıca, absisik asit gibi hormonlar ve melatonin gibi çok işlevli sinyal molekülleri, diğer antioksidan enzimler gibi gen ifadesi yoluyla SOD aktivitesini düzenler.

2.6.2. Askorbat peroksidaz (APX)

Askorbat peroksidaz, H_2O_2 varlığında çok çeşitli organik bileşiklerin oksidasyonunu katalize eden hem-içeren bir peroksidazdır. APX, yüksek bitkilerde, klorofitlerde, kırmızı alglerde ve protist alevinin üyelerinde bulunur ve büyüme düzenlemesinde önemli bir rol oynar. Genomik ve cDNA APX dizileri çok çeşitli bitkilerde keşfedilmiştir ve APX'in bitkisel alanda bulunduğunu göstermektedir. Bu organizmalarda, küçük gen aileleri bu enzimi kodlar. APX'in farklı izoformları hücre içindeki hücre altı lokalizasyonuna göre kategorilere ayrılır. Membran bağlı izoformlar mikro cisimlerde (peroksizom ve glioksizom dahil) ve kloroplast tilakoidlerde bulunurken, çözümlü izoformlar sitozolde, mitokondride ve kloroplast stromasında bulunur. İzoenzimin hücre altı lokalizasyonu, proteinin N ve C-terminal bölgelerindeki organel-spesifik hedefleme peptitlerinin ve transmembran alanlarının varlığıyla belirlenir.

2.6.3. Katalaz (CAT)

Katalazlar, hidrojen peroksidi su ve oksijene dönüştüren tetramerik hem içeren enzimlerdir ve çoğunlukla peroksisomlarda bulunur. Katalaz izoenzim formları, hint yağı bitkisinde iki ve *Arabidopsis*'te altı olmak üzere birçok bitkide bulunur ve H_2O_2 'yi doğrudan parçalayabilir veya metanol, etanol, formaldehit ve formik asit gibi substratları oksitleyebilir. Bitki katalazları yapılarına göre üç gruba ayrılır: sınıf 1 katalazlar fotosentez yapan dokularda bulunur ve fotorespirasyon ile üretilen H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasında rol oynar; diğer sınıf katalaz iletim dokularında bulunur ve lignifikasyonda rol oynar; son sınıf katalaz tohumlarda ve genç bitkilerde bulunur ve aktiviteleri glioksilat döngüsünde glioksizomlarda yağ asidi bozulmasıyla üretilen fazla H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasıyla bağlantılıdır. Katalazlar, H_2O_2 'yi doğrudan bozabilen ve stres sırasında ROS detoksifikasyonu için gerekli olan birincil temizleyici enzimlerdir. Bu ayrıca stres sırasında peroksizomların çoğalması ve muhtemelen sitozolden yayılan H_2O_2 'nin temizlenmesine yardımcı olmasıyla da ilgilidir. Artan katalaz aktivitesinin, zararlı H_2O_2 seviyelerini düşürerek doku metabolik hasarının üstesinden gelmeye yardımcı olabilecek adaptif bir özellik olduğu düşünülmektedir. Bu organellerde, 200 mM NaCl konsantrasyonu katalaz aktivitesinde bir azalmaya neden olmuştur. Pamuk katalazının sense cDNA'sı ile transgenik tütünde artan katalitik aktivitenin

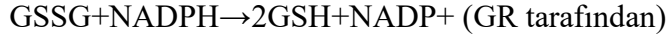
fotorespiratuvar kaybı azalttığı gösterilmiştir, ancak antisens yapılar katalaz özgül aktivitesini azaltarak CO₂ telafi noktasında orantılı bir artışa neden olmuştur.

2.6.4. Glutatyon redüktaz (GR)

Glutatyon redüktaz (GR), NADPH'yi indirgeyici olarak kullanarak glutatyon disülfürün (GSSG) indirgenmiş sülfhidril formuna (GSH) indirgenmesini katalize etmeye yardımcı olan bir flavoprotein oksidoredüktazdır. Oluşan indirgenmiş GSH daha sonra monodehidroaskorbat (MDHA) ve dehidroaskorbik asit (DHA) kullanılarak askorbik asidin (AsA) rejenerasyonu için kullanılır ve böylece GSH, GSSG'ye dönüştürülür. GR'nin, bitkinin maruz kaldığı çeşitli abiyotik stres koşulları tarafından üretilen reaktif oksijen metabolitlerine karşı bitki savunmasında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. GR, glutatyon disülfürde bir disülfür bağı oluşumunu katalize ederek nispeten yüksek bir hücrel GSH/GSSG oranını etkili bir şekilde korur. Bu enzim ağırlıklı olarak kloroplastın stromasında yer alır, ancak izomerleri mitokondri, sitozol ve peroksizomlarda da bulunabilir. Enzim, moleküler kütlesi 100 ila 150 kDa arasında değişen flavin adenin dinükleotidinin (FAD) bir homodimeridir. GSSG'nin bağlandığı FAD bağlanma alanı ile NADPH bağlanma alanı arasında aktif bir bölge bulunur. FAD'nin her bir monomerinde, sadece GSSG'nin alt birimler arasında bağlanmasına yardımcı olmakla kalmayıp aynı zamanda her bir alt birimin FAD bölgelerini zıt katalitik bölgeye yakınlaştıran ek bir arayüz bölgesi vardır. Tiyollerin yokluğunda glutatyon redüktazın tetramerler oluşturma eğiliminde olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, oluşan GSH, GR'nin homodimerik konfigürasyonunda kalmasına yardımcı olur (Mishra ve ark., 2023).

Glutatyon redüktaz, gerekli substratın mevcudiyetine bağlı olan redoks dönüşüm reaksiyonlarına (GSSG'den GSH'ye ve GSH'den GSSG'ye) uğrar. GSH'ye indirgenen her bir GSSG molü için GR bir mol NADPH gerektirir. GR'nin katalitik mekanizmasının iki fazı vardır. Birinci faz, flavin kısmının NADPH tarafından indirgenmesini içerir. GR, indirgeyici NADPH tarafından sağlanan 2 elektronu böler ve elektronları birer birer GSSG'nin iki kükürt atomuna verir.

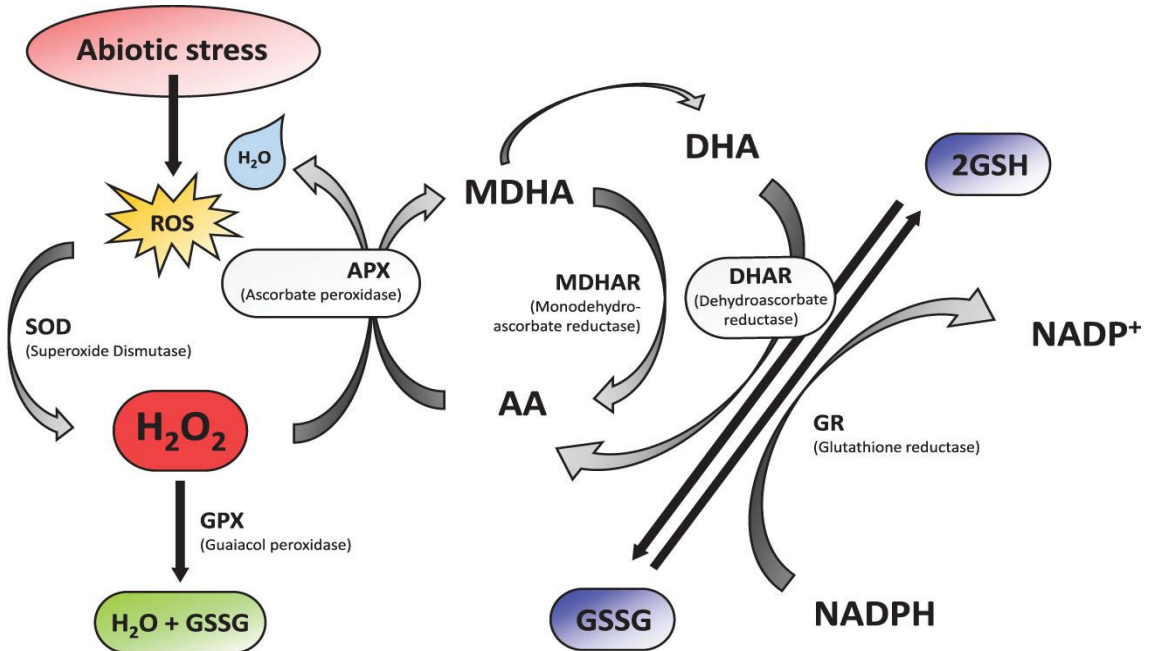
İkinci faz, ortaya çıkan ditiolün GSSG ile reaksiyona girdiği ve enzimin aktif bölgesinde 2 GSH'ye indirgendiği oksidasyonu içerir. Tam reaksiyon şu şekilde gösterilebilir:



GR, GSH/GSSG oranını düzenlemeye yardımcı olur ve GSH'yi guaiakol peroksidaz (GPX) ve dehidroaskorbat redüktaza (DHAR) sağlar. GPX, H₂O ve GSSG oluşturmak için GSH'yi H₂O ile birleştirerek suyun uzaklaştırılmasına yardımcı olurken, DHAR, AA ve GSSG oluşturmak için GSH'yi kullanarak DHA'yı azaltır.



GR, Halliwell-Asada (AsA-GSH) yolunun son hız sınırlayıcı adımını katalize eder ve bu nedenle bitkilerde ROS detoksifikasyonu ve abiyotik stres toleransı ile bağlantılıdır. Hücrelerin içindeki AsA ve GSH azaltılmış havuzlarının korunması, ROS temizleme yolları ve normal fizyolojik aktivitelerin gerçekleştirilmesi için hayati önem taşır. GSSG'yi GSH'ye dönüştürerek GR, bu dengeyi korumaya yardımcı olur ve böylece bitkilerde stres toleransı sağlar. Ek olarak, artan GR aktivite seviyeleri NADP⁺ /NADPH oranının artmasına yardımcı olur. Böylece, fotosentetik ETC'den elektronları kabul etmek için NADP⁺'nin mevcudiyeti sağlanır ve böylece ROS türlerinin oluşumu en aza indirilir. Bu nedenle, GR'nin transgenik bitkilerde uygulanması, bitkide ROS kaynaklı oksidatif stresi büyük ölçüde azaltabilir ve daha iyi bitki gelişimini sağlayabilir.



Şekil 47. Bitkide glutatyon askorbat döngüsünde abiyotik stresin kontrolünü gösteren diyagram (Mishra ve ark., 2023)

2.6.5. Glutasyon peroksidaz (GPx)

Glutasyon peroksidazlar, H_2O_2 ve sitotoksik hidroperoksitlerin alkollere indirgenmesini katalize eden çoklu izozim ailesidir. Bu nedenle, H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasına ek olarak, GPx'ler lipid ürünlerini detoksifiye etmeye de hizmet eder. Peroksidasyon ROS aktivitesi nedeniyle meydana gelir. Bitkilerde GPx'ler üç tipte sınıflandırılır: selenyum bağımlı GPx, selenyum bağımlı olmayan fosfolipid hidroperoksit GPx (PHGPX) ve GPx aktivitesi sergileyen glutasyon transferazlar (GST): GPx ve GST enzimleri alt birimleri, aktif bölgedeki selenyumun bağlanma yapısı ve katalitik mekanizmaları bakımından farklılık gösterir. GPx'in katalitik reaksiyonu için substrat, organik bir peroksit olan H_2O_2 veya ROOH'dir. GPx peroksitleri suya (veya alkole) ayırırken aynı zamanda GSH'yi de okside eder. GPx, bir substrat olarak H_2O_2 için katalaz ile rekabet eder ve düşük seviyelerde oksidatif strese karşı ana koruma kaynağıdır.

2.6.6. Dehidroaskorbat redüktaz (DHAR)

Bir elektron vericisi olarak indirgenmiş glutasyon (GSH) kullanarak dehidroaskorbatı (DHA) AsA'ya indirger. Hem simplast hem de apoplasttaki AsA havuzu büyüklüğünün düzenlenmesi kritiktir, böylece bitki hücrelerinin redoks durumu ana hatlarıyla belirlenebilir. DHAR tohumlarda, köklerde ve yeşil sürgünlerde bol miktarda bulunur. DHAR aktivitesi çeşitli bitkilerin dokularında da rapor edilmiştir.

2.6.7. Monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR)

MDHAR, indirgeyici ajan olarak NADPH kullanarak kısa ömürlü Monodehidroaskorbattan (MDHA) dönüştürerek hücrel AsA havuzunun nihai olarak yenilenmesinden sorumludur. AsA'yı yeniden oluşturduğu için APX ile peroksizomlara ve mitokondriye lokalize olur. APX, H_2O_2 'yi temizler ve bu süreçte AsA'yı okside eder. MDHAR kloroplast, mitokondri, peroksizom, sitozol ve glioksizomlarda bulunur ve çeşitli izozimlere sahiptir. MDAR izoformlarının kloroplastlarda, sitozolde, peroksizomlarda ve mitokondride bulunduğu bildirilmiştir.

2.6.8. Glualikol peroksidaz (GPX)

Hem normal metabolizma hem de stres sırasında fazla H₂O₂'yi gideren 40-50 kDa monomerlerden oluşan hem içeren bir enzimdir. Lignin biyosentezinde hayati bir rol oynar ve indol asetik asidi (IAA) parçalayarak ve ayrıca H₂O₂ kullanarak biyotik strese karşı savunma yapar. Elektron donörü olarak pyragallol gibi aromatik bileşikleri tercih eder. GPX, hücre duvarında (sitozol, vakuol) aktif olduğu için H₂O₂'nin giderilmesinde anahtar bir enzim olarak kabul edilir. (Doğru, 2020).

2.6.9. Peroksidaz (POX)

Peroksidazlar polisakkaritlerin bağlanmasında, indol-3-asetik asit oksidasyonunda, ektensin monomerlerinin bağlanmasında, lignifikasyonda, yaralanmaların onarımında, fenol oksidasyonunda, patojenlere karşı korunmada ve hücre uzamasının kontrolünde görev almaktadırlar. Peroksidazlar oldukça katalitik olmalarına rağmen, çok az spesifikliğe sahiptirler ve birçok izoenzime sahiptirler. Bu özellikler, peroksidazın bitkilerdeki işlevini tam olarak belirlemeyi zorlaştırır. Bu enzim bitki gelişiminde ve çevreye adaptasyonda rol oynar.

POX, stres altında ROS üretimini azaltan önemli enzimlerden biridir. POX'lar, hücre duvarına bağlı, zarla çevrili, çözünür bir formda yayılan monomerik hemoproteinlerdir (Saddique ve ark., 2018).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki materyali ve denemelerin kurulması

Tez çalışmamda bitki materyali olarak *Lemna trisulca* (su mercimeği) kullanılmıştır. Bu bitki 2023 yılında Konya, Beyşehir/Eflatunpınar civarında bulunan göletten Prof. Dr. Evren YILDIZTUGAY tarafından toplanmıştır. Tezin giriş kısmında da bahsettiğimiz gibi ekolojik değeri ve toksik elementleri biriktirebilme özelliğinden dolayı bu materyal seçilmiştir. Bitki örnekleri toplanırken numunelerin bazıları yaygın herbaryum tekniklerine göre preslenerek kurutulmuş ve türün teşhisi yüksek lisansını bitki sistematiği ve taksonomisi üzerine yapan Prof. Dr. Evren YILDIZTUGAY tarafından “Flora of Turkey and the East Aegan Islands” adlı eserin 8. cildi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gerekli temizleme ve sterilizasyon işlemlerinin ardından yarım kuvvet Hoagland içeren saksılarda kültüre alınmıştır. Saksı içerisindeki hoagland çözeltisi hava motoru ve hava taşları ile havalandırılmış olup beş günde bir çözelti yenilenmiştir. Bitkiler büyüme ve gelişme süresince %50 nem, 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta, $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ile 10000 Lüks ışık yoğunluğu olacak şekilde iklimlendirme odasında kontrollü koşullarda su kültürü ortamında yetiştirilmiştir (Yildiztugay ve ark., 2023). Bitkilerin büyüüleceği iklimlendirme odasının gerekli ısı, nem, ışık, havalandırma ve sterilizasyon kontrolleri periyodik olarak yapılmıştır. Ön denemelerle uygulanacak olan sodyum arsenat (As , $100 \mu\text{M Na}_2\text{HAsO}_4$) ve kurşun nitrat (Pb , $100 \mu\text{M Pb}(\text{NO}_3)_2$) konsantrasyonu belirlenmiştir. Deneme öncesinde yapılan makale taramalarından (Duman ve ark., 2010; Verma ve Suthar, 2015; Sasmaz ve ark., 2015; Jayasri ve Suthindhiran, 2017; Mohamed ve ark., 2021) arsenik ve kurşun uygulama miktarları hakkında bilgi edinildi. Belirlenen miktarlarda arsenik ve kurşun nitrat, *Lemna trisulca* fidelerinin yetiştirildiği su kültürüne eklenerek uygulanmıştır. Fenotipik toksisite etkileri de gözlenerek belirlenecek olan 168 saat uygulama süresi olarak seçilmiş ve bitkiler hasat edilmiştir. Hasat edilen örnekler analizlere kadar -80°C 'de saklanmıştır.

3.2. Deneme dizaynında yer alan gruplar

Yüksek lisans tezimizde *Lemna trisulca* bitkilerinin arsenik ve kurşun uygulamalarına verdikleri tepkileri ve bu iki stres faktörü arasındaki savunma cevapları arasındaki farklılıkları belirlemeye çalıştık. Bu amaçla stres uygulanan gruplar ile karşılaştırma yapabileceğimiz ve herhangi bir stres faktörü uygulamadığımız kontrol grubu yapılmıştır. Sadece arsenik veya sadece kurşun stres uygulaması yaptığımız gruplarımız sırasıyla As ve Pb olarak gösterilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesinde bu gruplarımızı kontrol grubu ile karşılaştırarak analiz yorumlamasını yapmaya çalıştık. Ayrıca stres faktörlerinin ekosistem içerisinde ayrı ayrı bulunmayıp birden fazla stres faktörünün aynı anda bitkiler üzerinde etki mekanizmalarını uyardığı düşünüldüğünde diğer bir grubumuz da hem arsenik hem de kurşun stresinin birlikte uygulandığı As+Pb grubumuzu da uygulama grubu olarak seçtik. Bu bahsettiğimiz uygulamaya grupları Çizelge 3.1’de de verilmiştir.

Çizelge 3. 1. Tezimizde kullandığımız uygulama gruplarının kısaltmaları ve tanımlamaları

Grup	Grup açıklaması
Kontrol	Kontrol grubu, herhangi bir uygulama yapılmamış grup
As	Kontrol koşulları altında sadece 100 µM Na ₂ HAsO ₄ uygulaması yapılan grup
Pb	Kontrol koşulları altında sadece 100 µM Pb (NO ₃) ₂ uygulaması yapılan grup
As+Pb	Kontrol koşulları altında hem 100 µM Na ₂ HAsO ₄ hem de 100 µM Pb (NO ₃) ₂ uygulamaları birlikte yapılan grup

Tezimizin amaç kısmında belirttiğimiz gibi arsenik ve/veya kurşun streslerini uyguladığımız *Lemna trisulca* bitkilerinin cevap mekanizması, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler analizlerle gösterilmeye çalışılmıştır.

Fizyolojik analizler;

- Bağlı su içeriği (RWC)
- Biyokimyasal parametreler,
- ROS miktarı (H₂O₂ miktarı)

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

3.3. Bağlı su miktarı (RWC)

Yaprak örneklerinin yaş ağırlıkları tartılmış ve -YA- olarak ifade edilmiştir. Uygulama gruplarına ait örneklerden 5 tekrar seçilmiştir. Turgorlu ağırlıkları belirlemek için 50 ml deiyonize su içerisinde örnekler 20 dakika kadar bekletilmiş ve sonrasında ağırlıkları ölçülmüştür. Bu değer formülde TA olarak ifade edilmiştir. Formülde kullanılmak üzere yaş ağırlıklarının yanı sıra turgorlu ağırlıkları da ölçülmüştür. Bu amaçla 50 ml deiyonize su içerisinde yaklaşık 20 dakika bekletilmiş ve ağırlıkları tartılarak değer TA olarak kaydedilmiştir. Bağlı su miktarını belirlerken gerekli olan kuru ağırlık (KA) değerine de örneklerin 70°C etüvde üç gün süresince tutulması ve sonrasında tartılması ile ulaşılmıştır. Bağlı su miktarının belirlenmesinde Smart ve Bingham (1974) tarafından gösterilen formül kullanılmıştır. Bu formül aşağıda verilmiştir.

$$\text{RWC (\%)} = [(YA - KA) / (TA - KA)] \times 100$$

3.4. Antioksidan enzim/izozim aktiviteleri

Lemna trisulca bitki yaprak örneklerinde antioksidan sistem için spektrofotometrik ve elektroforetik analizleri yapabilmek için homojenizasyon aşaması tamamlanmıştır. Bu nedenle hazırlanan homojenizasyon tamponuna 50 mM Na-fosfat tamponu (pH 7.8), 1 mM EDTA ve polyvinylpolyprolidone (PVPP) eklenmiştir. Her bir gruptan 0.5 g yaprak örnekleri kullanılmıştır. Soğutulmuş havan içerisine eklenen yaprak örnekleri bu tampon ile ezilmiş ve santrifüjde yarım saat boyunca 14000 g'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı alınmış ve enzim/izozim analizlerinde kullanılmıştır.

3.4.1. Süperoksit dismutaz (SOD) izozim/enzim aktivitesi

SOD izozim analizleri poliakrilamid jelde ve Laemmli (1970) tarafından verilen protokol izlenmiştir. Örnekleme sonrasındaki yapraklar, 9 mM Tris HCl (pH 6.8) ve %13.6 gliserol ile homojenize edilmiş ve süzüntü 5 dakika boyunca 14.000 g'de santrifüj edilmiştir. Jel sisteminde her bir kuyucuğa eşit miktarda enzim örneği koyabilmek için grupların santrifüj sonrası süpernatantına spektrofotometrik olarak protein analizi yapılmıştır. Protein miktarı belirlenmesi için bovin serum albüminin (BSA) standart olarak kullanılmıştır (Bradford, 1976). Protein miktarına bağlı olarak her bir gruptan eşit miktarda protein (40 µg) yüklemesi yapılarak SOD izozim tayini yapılmıştır. İzozimlerin bant yoğunluklarının hesaplanmasında Bio-1D yazılım programı kullanılmıştır. Örneklerin total SOD enzim aktivite tayinleri ise Beauchamp ve Fridovich (1971) tarafından metoda göre tamamlanmıştır.

3.4.2. Katalaz (CAT) izozim/enzim aktivitesi

Örneklerin CAT aktivitesine ait izozim belirlenmesinde Woodbury ve ark., (1971) tarafından metot kullanılmıştır. SOD izozimlerinde olduğu gibi her bir gruptan 40 mg protein olacak şekilde kuyucuklara pipetleme yapılmıştır. Total CAT enzim aktivitesinde spektrofotometrik olarak Bergmeyer (1970) tarafından verilen yöntemle tamamlanmıştır.

3.4.3. Peroksidaz (POX) izozim/enzim aktivitesi

Dikey elektroforez sistemlerinde Seevers ve ark., (1971) tarafından verilen metoda göre total peroksidaz (POX) izozim belirlemesi yapılmıştır. Total POX aktivitesinde ise Herzog ve Fahimi (1973) tarafından verilen metot prosedürü izlenmiştir. Spektrofotometrik olarak 465 nm'de değişimine bağlı olarak aktivite hesaplaması yapılmıştır.

3.5. Bazı reaktif oksijen türlerinin (ROS) saptanması

3.5.1. Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarı

Liu ve ark., (2010) tarafından gösterilen metot kullanılarak uygulama gruplarındaki hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarı belirlenmiştir. Yaprak örnekleri homojenizasyon sonrasında elde edilen süpernatanta titantum tetraklorid içeren solüsyon ilave edilmiştir. 16000 g'da santrifüj öncesinde amonyum hidroksit eklenmiş ve süzütünün pellet kısmı aseton ile yıkanmıştır. Sonrasında pellet H_2SO_4 solüsyonuyla çözülmüştür ve oluşan solüsyonun 410 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Standart olarak bilinen H_2O_2 miktarları hazırlanmış ve standarta göre örneklerin H_2O_2 miktarı hesaplanmıştır.

3.6. Lipit peroksidasyonu

Tiobarbitürik asit reaktif maddelerin (TBARS) ölçümü örneklerdeki lipid peroksidasyon düzeyini belirlemektedir. TBARS analizi Rao ve Sresty (2000) tarafından gösterilen yöntem temel alınarak yapılmış ve örnekler tiokloroasetik asitle (TCA) homojenize edilmiştir. Karışım santrifüj sonrasında süpernatanta 2-tiobarbitürik asit (TBA) ve trikloroasetik asit (TCA) konulmuştur. Karışım tüplere eklenerek 30 dakika sıcak su banyosu yapılmıştır. Spektrofotometrede 532 nm ve 600 nm'de absorbans ölçümleriyle miktar tayini yapılmıştır.

3.7. Prolin miktarı

Prolin miktarı Bates ve ark., (1973) tarafından verilen yöntemle göre yapılmıştır. Yaprak örneklerine sülfosalisilik asit eklenmiş ve homojenizasyon yapılmıştır. Sonrasında karışıma ninhidrin ve glasiyal asetik asit eklenerek sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Soğutularak tolüen eklenmiş ve üst bölgedeki sıvının 520 nm'de absorbansı ölçülmüştür.

3.8. Total protein miktarı

Tezimizde elektroforetik ve spektrofotometrik olarak yapılan analizlerde kullanmak üzere protein miktar tayini Bradford (1976) tarafından gösterilen metota göre yapılmıştır. Spektrofotometrik olarak 595 nm'de absorbansı kaydedilmiştir.

3.9. İstatistiksel Analizler

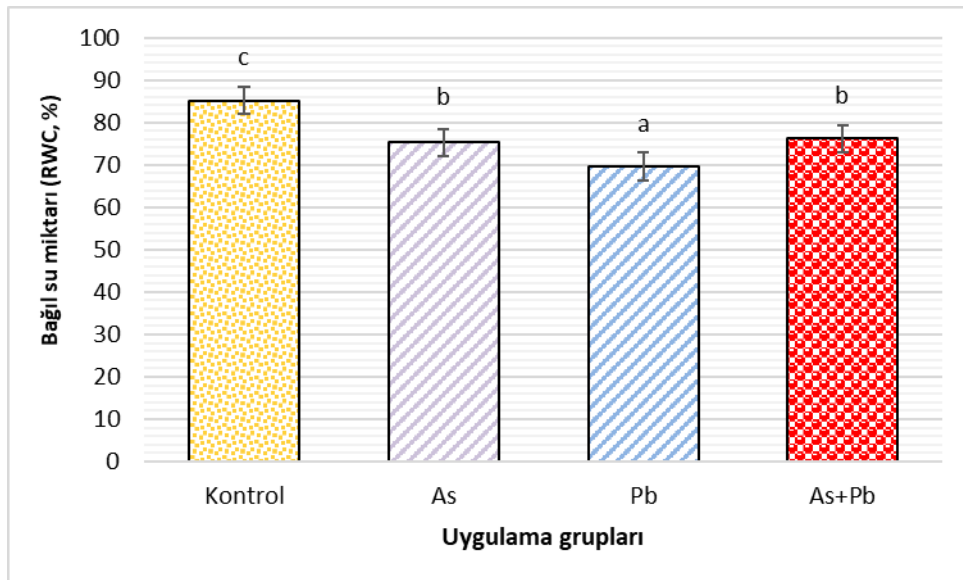
Örnekleme sonrasında yapılan analizlerden elde edilen beş farklı sonuç kullanılmıştır. Bulgular one-way ANOVA analiziyle (tek yönlü varyans analizi) yorumlanmıştır. Uygulama grupları arasındaki karşılaştırma TUKEY post-test (SPSS yazılımı, versiyon 28.0) ile yapılmıştır. Karşılaştırma sonunda değer $P < 0.05$ ise gruplar arasındaki değişimde istatistiksel olarak farklı olarak yorumu yapılmıştır. Tezimizde grafik olarak verilen tüm sonuçlarımızdaki hata çubukları standart hata temel alınarak yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Tez çalışmasında *Lemna trisulca* bitkilerinin arsenik ve kurşun streslerine olan yanıtları incelenmiştir ve bu amaç ile fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler analizlerle değerlendirme yapılmıştır.

4.1. Arsenik ve/veya Kurşun Toksitesine Maruz Bırakılan *Lemna Trisulca* Bitkilerinin Bağlı Su Miktarı

Arsenik ve/veya kurşun stresine maruz bırakılan *Lemna trisulca* bitkilerinin su ilişkilerini gösteren parametrelerden biri olan bağlı su miktarı (RWC) değişimleri Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. 100 μM Na_2HAsO_4 ve 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ stresi altında yetiştirilen *Lemna trisulca* bitkilerinin bağlı su miktarı (RWC)

Bağlı su miktarında *Lemna trisulca* bitkilerine uygulanan arsenik ve kurşun stresleriyle birlikte azalmalar izlenmiştir. Aynı şekilde tek başına uygulanan stres grubu gibi iki stresinde birlikte uygulanması durumunda RWC değerlerinde azalmalar saptanmıştır. Kontrol grubuna göre bu azalmaların oranı, Pb uygulanan *Lemna trisulca* bitkilerinde daha fazla (%18) olduğu görülmüştür.

As toksisitesi (50 mg/kg) *Glycine max*'ta bitki boyunu (%27) ve yaprak alanını (%54) önemli ölçüde azaltmış ve ayrıca yaprak orta damarının genişliğini etkilemiştir

(Fatima ve ark., 2021). As toksisitesi altında *Spinacia oleracea*'da kök/sürgün uzunluğu, taze ve kuru kütle, yaprak sayısı ve yaprak alanında benzer önemli azalmalar bildirilmiştir (Saleem ve ark., 2023). *G. max*'ta yanal kök gelişimi azalmış ve As uygulaması nedeniyle kök kararması meydana gelmiştir (Yadav ve ark., 2021). As stresi, *Raphanus sativus* L.'de gösterildiği gibi, oksidatif strese karşı duyarlılığı artırarak bitki büyümesini ve biyokütlesini tehlikeye atmaktadır, yüksek malondialdehit (MDA) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) seviyeleri büyüme ve verimlilikte %50 azalmaya neden olmuştur (Bhardwaj ve ark., 2023). As'a maruz kalmanın ardından, kök sistemindeki değişiklikler nedeniyle değişen su alımı ve taşınması nedeniyle transpirasyon süreçleri de engellenmektedir (Chandrakar ve ark., 2017). *G. max* bitkilerinin hem As(V) hem de As (III)'e maruz kalması, kontrolle karşılaştırıldığında daha düşük transpirasyon oranlarına yol açtığı bildirilmiştir. Bu, sonuç olarak bitki boyunca su akışını ilerleten hidrostatik kuvveti azaltır ve suyun emilim hızını düşürür (Vezza ve ark., 2021). Arsenik uygulaması, *Cicer arietinum* bitkisinde görüldüğü gibi, hücre turgorunda bir düşüşe neden olmuştur ve bu da gevşek bir şekilde organize olmuş ve bozulmuş hücrelerle sonuçlanmıştır (Yadav ve ark., 2021). As'ye maruz kalmanın ardından, *O. sativa* köklerinin kortikal hücreleri önemli plazmoliz sergilemiştir (Piacentini ve ark., 2023). Arsenik toksisitesi, su ve mineral alınımında bir dengesizlik oluşturarak Mn, P, Fe, N ve Cu dahil olmak üzere temel besin maddelerinin alınımının azalmasına yol açar; bu da sonuç olarak ürünün besin kalitesini, verimliliğini ve mineral bileşimini düşürmektedir (Khan ve ark., 2022).

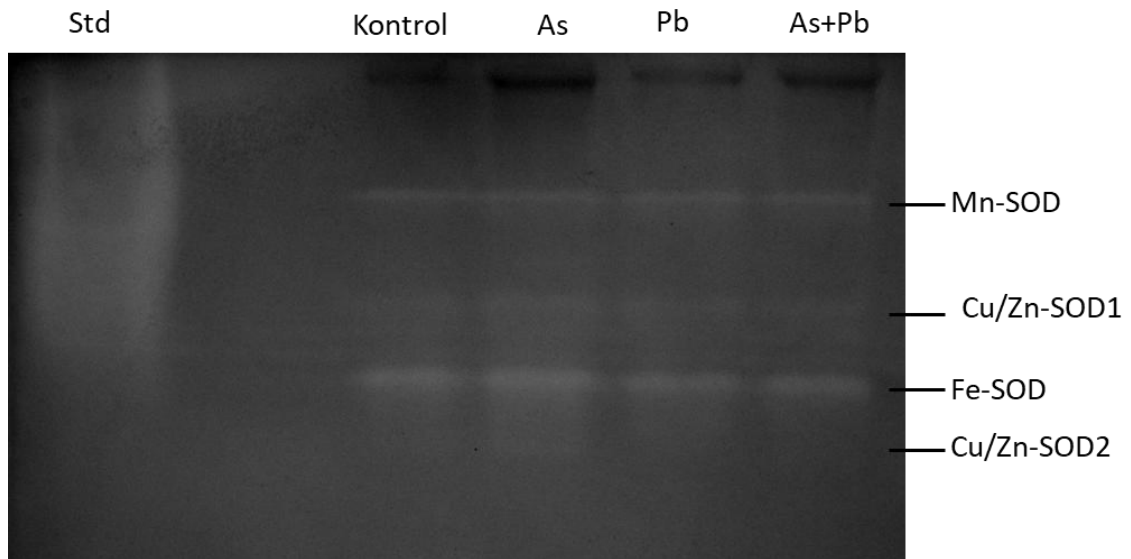
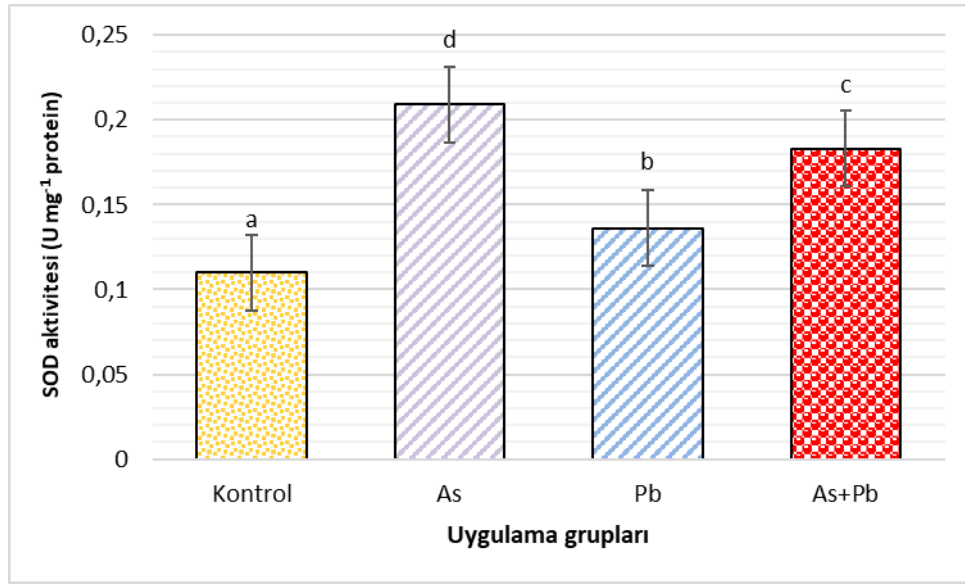
Arsenik gibi kurşun nitrat uygulaması da hücre sel su miktarında olumsuz etkilere neden olur. Pb suyun kökten sürgüne alınmasını fiziksel olarak engellemekte, bu da fotosentez oranıyla ilişkili olarak ifade edilmektedir. Özellikle su içeriğinin, CO₂ emiliminin ve hücre turgoru ve hücre esnekliğinin korunması yeteneğinin azalmasıyla ilişkilidir (Azmat ve ark., 2009).

Stresin oluşturduğu *Lemna trisulca* yapraklarının RWC değerlerinde izlediğimiz azalmaları diğer çalışmalarla da desteklemekteyiz. RWC'deki sonuçların, *L. trisulca* bitkilerinde strese bağlı gözlenen bağlı büyüme miktarındaki azalmalarla da ilişkili olduğunu söyleyebiliriz. Kurşun nitrat uyguladığımız *Lemna trisulca* bitkilerinin RWC'sinin daha fazla etkilendiğini ifade edebiliriz.

4.2. Arsenik ve/veya Kurşun Toksitesine Maruz Bırakılan *Lemna Trisulca* Bitkilerinin Bazı Antioksidan Aktiviteleri

4.2.1. Arsenik ve/veya kurşun toksitesine maruz bırakılan *Lemna trisulca* bitkilerinin SOD enzim/izozim aktivitesi

Arsenik ve/veya kurşun stresine maruz bırakılan *Lemna trisulca* bitkilerinin antioksidan savunma sistemi içerisinde yer alan enzimlerden biri olan süperoksit dismutaz (SOD) enzimine ait total aktivitesi ve elektroforetik olarak izozim analizi Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. 100 μM Na_2HAsO_4 ve 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ stresi altında yetiştirilen *Lemna trisulca* bitkilerinin süperoksit dismutaz (SOD) enzim/izozim aktiviteleri

Lemna trisulca bitkilerine uygulanan arsenik ve kurşun toksitesi sonrasında SOD enziminin total SOD aktivitesinde artışlar gözlenmiştir. Total SOD aktivitesinde izlenen en yüksek artış As uygulamasında olup oranı %90 civarındadır. Ayrıca SOD artışları özellikle As ve As+Pb gruplarında dikkat çekicidir. Total aktivitesine paralel olarak densiyometrik olarak SOD izozimlerinin de benzer değişim gösterdiğini görmekteyiz. Native-page analizine göre *Lemna trisulca* uygulama gruplarında toplam 4 SOD izozimi göstermiştir. Bunlardan bir tane Mn-SOD, iki tane Cu/Zn-SOD (Cu/Zn-SOD1 ve Cu/Zn-SOD2) ve bir tane Fe-SOD izozimin varlığı saptanmıştır. Total aktiviteye benzer olarak

tüm SOD izozimlerinde stres uygulamasına bağlı artışlar izlenmiştir. İzozim bantları arasında Fe-SOD'un stres uygulama gruplarındaki değişimi oldukça belirgindir.

Ağır metal/metaloid iyonları bitkiye girdiğinde, etkilenen bitki ikinci savunma hattına, yani tolerans mekanizmasına geçer. Bunlar arasında ligandlar tarafından hücre içi metal şelasyonu, ardından vakuollere metal sekestrasyonu ve enzim ve enzim dışı bazı antioksidanların sentezi ve aktivasyonu yer alır (Yan ve ark., 2020).

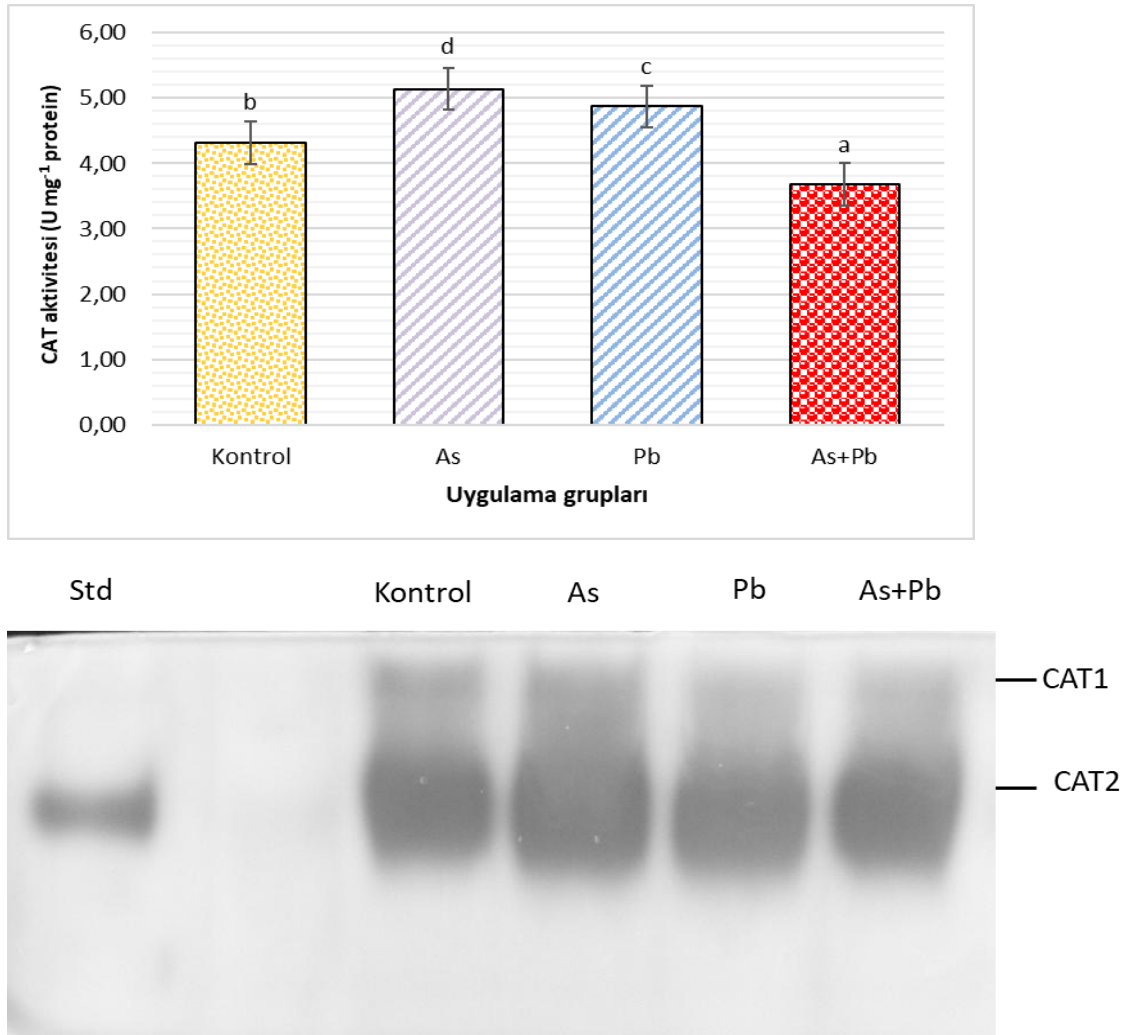
Bitkilerde arsenik toksisitesi öncelikle artan oksidatif strese bağlıdır; bu nedenle bitkiler oksidatif strese yanıt olarak daha fazla miktarda antioksidan üretmektedir (Solórzano ve ark., 2020). Antioksidanlar ROS'u etkili bir şekilde elimine etmektedir (Arif ve ark., 2020). ROS'u ortadan kaldıran enzimlerden olan SOD, CAT, APX, MDHAR, DHAR, GR, GST, GPX ve POX, bitkilerin As ve diğer abiyotik streslere karşı tepkisinde rol oynamaktadır (Nahar ve ark., 2022). Bitkilerin aktif oksijen serbest radikallerine karşı ilk savunma hattı, süperoksit anyon radikalini ($O_2^{\bullet-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştüren SOD'dur. H_2O_2 daha sonra CAT, APX ve POX tarafından suya dönüştürülür (Li ve ark., 2019). Askorbat-glutatyon döngüsünün önemli bir bileşeni olan APX, ROS'u temizlemede önemli bir rol oynamaktadır (Imahori, 2014). Askorbat elektron vericisi olarak görev yapar. Askorbat-GSH döngüsü, çeşitli bitki organellerinden ROS'un uzaklaştırılmasına katkıda bulunur (Arif ve ark., 2020). Araştırmacılar, bitkinin As'a karşı direncini artırmak için antioksidan savunma sistemi bileşenlerini aşırı ifade etmişlerdir (Pandey ve ark., 2023). Sekiz gen APX'i kodlar: ikisi sitozolde (APX1 ve APX2), ikisi peroksizomlarda (APX3 ve APX4), ikisi mitokondride (APX5 ve APX6) ve ikisi kloroplastlarda (OsAPX7 ve OsAPX8). Sitozolik APX geninin susturulması GSH ve AsA içeriklerini artırır ve ROS sinyallemesini değiştirir. Benzer şekilde, sekiz gen olası SOD'ların üretimiyle ilişkilidir: cCuZn-SOD1 ve cCuZn-SOD2 (sitozol gen), pCuZn-SOD (plastid gen), Mn-SOD1, FeSOD2 ve FeSOD3. Bitkilerde detoksifikasyon, ksenobiyotik kimyasalları vakuollere konjuge etmek ve hapsedmek için çeşitli enzimler kullanır. As'ye maruz kalma, *A. thaliana*'da glutatyon S-transferazı (GST'ler) kodlayan 14 genin ifadesinin yukarı düzenlendiğini göstermiştir.

As ya da Pb stresine maruz kalan bazı bitkilerde örneğin, fıstıkta (Bianucci ve ark., 2017), buğdayda (Sharma ve ark., 2017), mısırda (Anjum ve ark., 2016), Hint hardalında (*Brassica juncea* L.) (Pandey ve ark., 2016), pirinçte (Asgher ve ark., 2021, Mostofa ve ark., 2021) SOD'un artan aktivitesi bildirilmiştir. Benzer olarak, tezimizde hem As hem de Pb uygulamaları birlikte ya da tek başına uygulandığında SOD aktivitesini artırarak süperoksit anyon radikalinin süpürülmesine yardımcı olmuştur.

Diğer yandan bu enzim aktivitesi ile H₂O₂ oluşumu artmıştır. Oluşan H₂O₂ diğer antioksidan enzimlerce ortadan kaldırılmaya çalışılmıştır. Stresle birlikte *Lemna trisulca* bitkilerinin Mn-SOD ve Fe-SOD izozim bant yoğunlarındaki artışın göstergesi olarak bitkilerin kloroplast ve mitokondrilerinin streslerden etkilendiğini söyleyebiliriz.

4.2.2. Arsenik ve/veya kurşun toksitesine maruz bırakılan *Lemna trisulca* bitkilerinin CAT enzim/izozim aktivitesi

Arsenik ve/veya kurşun stresine maruz bırakılan *Lemna trisulca* bitkilerinin antioksidan savunma sistemi içerisinde yer alan enzimlerden biri olan katalaz (CAT) enzimine ait total aktivitesi ve elektroforetik olarak izozim analizi Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. 100 μM Na_2HAsO_4 ve 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ stresi altında yetiştirilen *Lemna trisulca* bitkilerinin katalaz (CAT) enzim/izozim aktiviteleri

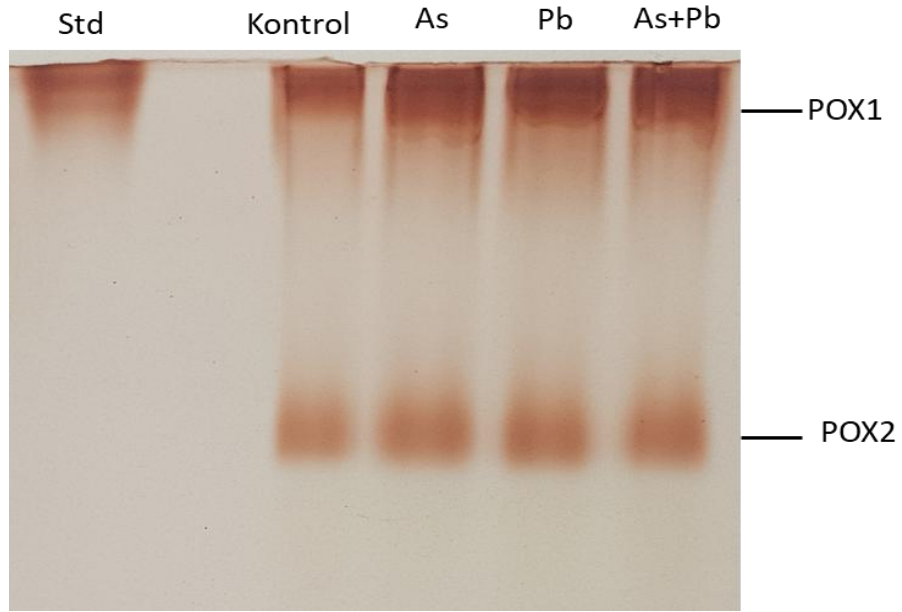
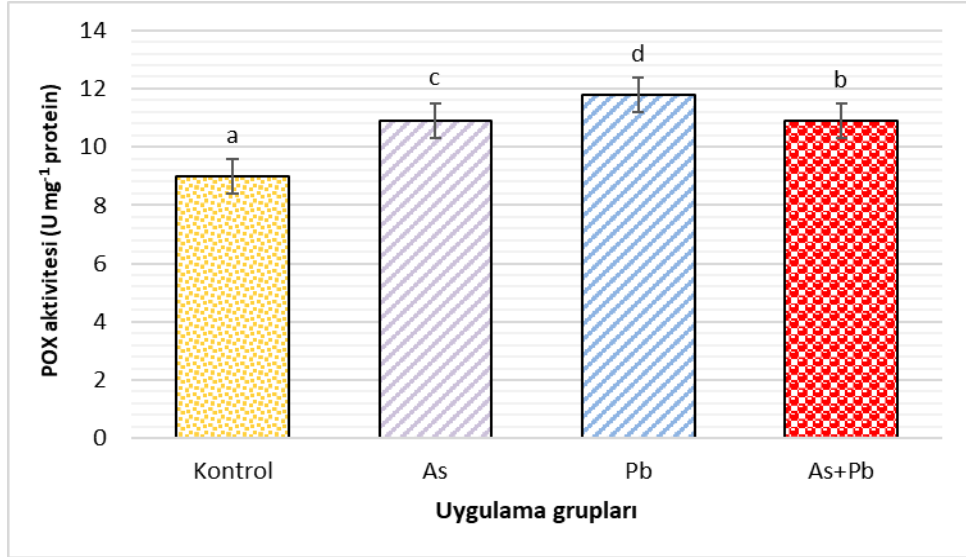
Uygulama süresince As veya Pb toksisitesine maruz kalan *Lemna trisulca* bitkilerinin CAT aktivitesi artış göstermiştir. Artışın oranı As uygulanan bitkilerin yapraklarında daha fazla olup %19 civarında artış vardır. Bu durum hem CAT1 hem de CAT2 izozimlerinde izlenen bant yoğunlukları ile de desteklenmektedir. Pb stresine bağlı CAT aktivitesindeki artış ise özellikle CAT bant yoğunluğu ile uyumludur. Diğer yandan, iki stresinde birlikte uygulandığı grupta ise (As+Pb) CAT aktivitesinde kontrol grubuna göre bir azalma saptanmıştır. CAT aktivitesi, muhtemelen H_2O_2 'in veya zehirli ROS türevlerinin aşırı üretiminin zararlı etkileri nedeniyle, As+ Pb gruplarında azalma göstermiş olabilir.

Kurşun gibi ağır metallere maruz kalan bitkilerde CAT enzimatik aktivitesinin artışı rapor edilmiştir (Malar ve ark., 2014). Katalaz, ROS toksisitesini nötralize eden ve bitki hücrelerindeki H_2O_2 içeriğini azaltan enzimlerden birisidir. CAT, H_2O_2 'yi su ve

oksijene dönüştürür ve bitkinin çevresel streslere adaptasyonunda önemli roller oynar. Ağır metal stresi ile aşırı ROS üretiminin, muhtemelen heme grubuna bağlı enzimi etkisizleştirerek, daha yüksek ağır metal konsantrasyonlarında CAT aktivitesini etkisiz hale getirmesi muhtemeldir. Yüksek kurşun konsantrasyonlarında, hücrede H₂O₂ ve diğer serbest radikaller artar, metabolizmayı inhibe eder ve CAT aktivitesini azaltır (Du ve ark., 2008). Hem yaprak hem de kök dokularında, kurşun uygulamasıyla CAT aktivitesi ve CAT gen ifadesi önce artış sonrasında ise azalma göstermiştir. Bu durum çalışmamızda As+Pb uygulama gruplarındaki gözlenen CAT aktivitesindeki azalma ile uyumludur. Yüksek kurşun konsantrasyonlarında CAT aktivitesinin azalması muhtemelen enzim sentezinin azalmasından veya enzim alt birim bileşimindeki değişiklikten veya peroksisom proteazların aktivasyonundan kaynaklanmaktadır. CAT Fe içerir ve Kurşun Fe'yi azaltır, bu da CAT enzimatik aktivitesinin azalmasına neden olur (Rebecca ve Geoffrey, 2017).

4.2.3. Arsenik ve/veya kurşun toksitesine maruz bırakılan *Lemna trisulca* bitkilerinin POX enzim/izozim aktivitesi

Arsenik ve/veya kurşun stresine maruz bırakılan *Lemna trisulca* bitkilerinin antioksidan savunma sistemi içerisinde yer alan enzimlerden biri olan peroksidaz (POX) enzimine ait total aktivitesi ve elektroforetik olarak izozim analizi Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. 100 μM Na_2HAsO_4 ve 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ stresi altında yetiştirilen *Lemna trisulca* bitkilerinin peroksidaz (POX) enzim/izozim aktiviteleri

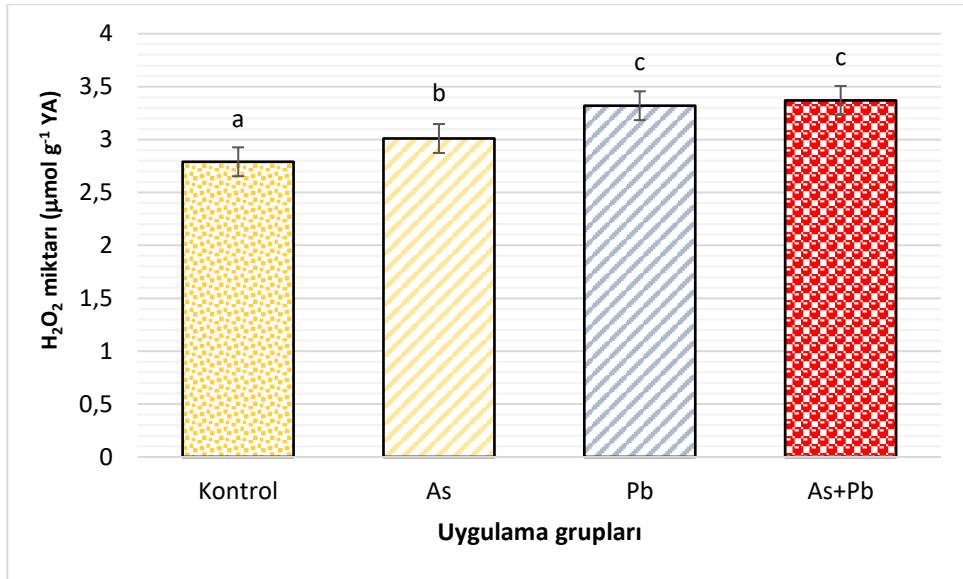
Spektrofotomerik analizlere göre *Lemna trisulca* bitkilerine uygulanan As veya Pb uygulamaları POX aktivitesinde artışa neden olmuştur. Bu artış bu iki stresin aynı zamanda uygulamasıyla da (As+Pb) gösterilmiştir. Densiyometrik analizlere bakıldığında ise uygulama süresince *Lemna trisulca* bitkilerinin POX izozimlerinde iki bant (POX1 ve POX2) izlenmiştir. Total POX aktivitesine paralel olarak native-page analizinde POX1 ve POX2 bant yoğunluklarında strese bağlı olarak artışlar gözlenmiştir.

Peroksidaz, stres altında aktif oksijen türlerinin ortadan kaldırılmasında rol oynayan temel enzimlerden biridir. POX katalizi H_2O_2 , substratın bağımlı oksidasyonudur. Peroksidaz, CAT'dan daha yüksek bir H_2O_2 afinitesine sahiptir. Çok sayıda çalışma, oksin katabolizması, lignifikasyon, suberizasyon, yara iyileşmesi ve H_2O_2 ile çeşitli indirgeyici maddeler arasında oksidoredüksiyonu katalize eden biyotik ve abiyotik streslere karşı savunma reaksiyonları gibi bitki gelişiminin çeşitli süreçlerinde rol oynadıklarını kanıtlamıştır (Lukacova ve ark., 2021). Arttırılmış POX aktivite seviyelerinin, bitkinin şiddetli Pb ağır metal stresine adaptasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir ve POX aktivitesinin uyarılmasının, 1000 mg/L Pb iyonlarının varlığında büyümek için su sümbülü bitkilerinde aşırı H_2O_2 içeriği detoksifikasyonunda yer alması muhtemeldir (Malar ve ark., 2016). Pb stresi, su sümbülü bitkilerinde artan POX aktivitesiyle sonuçlanmıştır. Bu ayrıca, su sümbülü bitkilerinin ağır metal kurşun stresinden kaynaklanan hasardan daha etkili bir şekilde kaçındığını göstermiştir. POX'un, bitki hücrelerinde artan ağır metal dozları tarafından uyarılan reaktif ara oksijen formlarının ve peroksi radikallerinin etkili söndürücüleri olarak işlev görebileceği bildirilmiştir (Radotic ve ark., 2000). POX, lignanlar gibi hücre duvarı bileşenleri üretmek üzere polimerize edilen fenoksi bileşikleri üretmek için H_2O_2 tüketir (Hu ve ark., 2012). POX üzerine elde ettiğimiz sonuçlar, ağır metal uygulamalarına karşı savunmada antioksidan savunma sistemlerinin etkin rol aldığına dair raporlarla uyumludur (Piotrowska ve ark., 2009). Tezimizde ilginç olarak kombine olarak uygulanan As ve Pb streslerinde azalan CAT aktivitesi, POX olmak üzere diğer bir H_2O_2 parçalayıcı antioksidan enzimin artan aktivitesiyle telafi edilmiş olabilir.

4.3. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Miktarının İzlenmesi

4.3.1. Arsenik ve/veya kurşun toksitesine maruz bırakılan *Lemna trisulca* bitkilerinin H_2O_2 miktarı

Arsenik ve/veya kurşun stresine maruz bırakılan *Lemna trisulca* bitkilerinin hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarına ait analizi Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.5. 100 µM Na₂HAsO₄ ve 100 µM Pb (NO₃)₂ stresi altında yetiştirilen *Lemma trisulca* bitkilerinin hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarı

Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarı As veya Pb uygulanan gruplarda kontrole göre artmıştır. Bu gruplardaki artışın oranı sırasıyla %8 ve %19 şeklindedir. Ayrıca streslerin birlikte uygulandığı grupta ise (As+Pb) H₂O₂ artışı izlenmiştir.

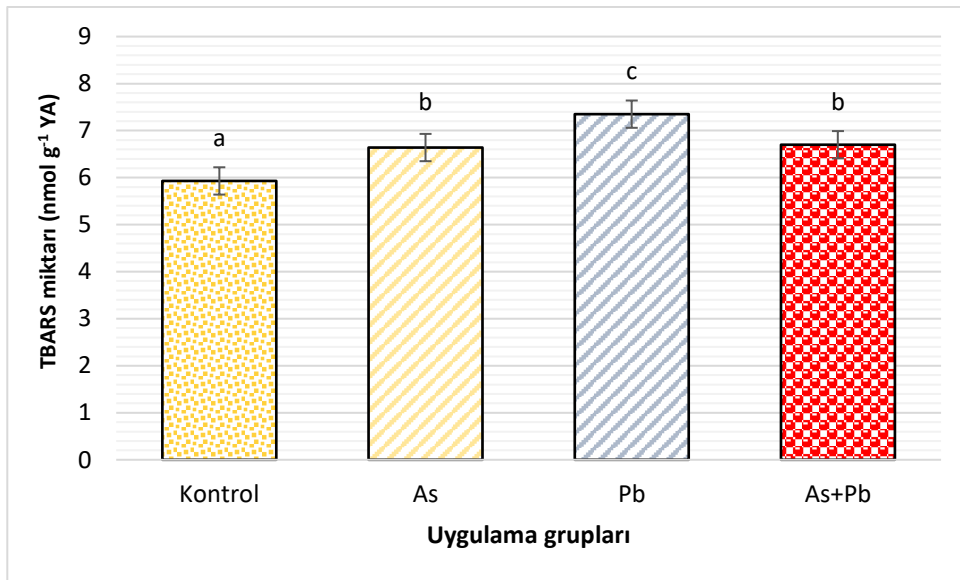
Arsenik ya da kurşun uygulamasıyla indüklenen ROS oluşumundan sorumlu mekanizmalar şunlar olabilir: (i) Mitokondri: Elektron taşıma zincirindeki mitokondriyal kompleksler I ve III, O₂⁻ üretiminde sorumludur. Arsenik, süksinik dehidrogenaz aktivitesini inhibe ederek ve oksidatif fosforilasyonu O₂⁻ üretimiyle ayırarak mitokondriyal toksisite gösterir; bu da diğer ROS formlarının ortaya çıkmasına neden olur. (ii) Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NAD(P)H) oksidaz (NOX): NOX, arseniğe yanıt olarak ROS oluşumunda rol oynayan bir membran ilişkili enzimdir (Corsini ve ark., 1999). Ayrıca H₂O₂ birikimindeki artışın nedeni kurşun ya da arsenik uygulamasına bağlı olarak artan SOD aktivitesi de olabilmektedir. Oluşan H₂O₂ miktarının fazla olması toksik etkilere neden olacağından bu molekülün ortadan kaldırılması gerekmektedir. Bu durumda CAT, POX ya da askorbat peroksidazlarca bu süreç devam etmektedir. Malar ve ark., (2016) yapılan çalışmada Pb stresi altındaki bitkileri H₂O₂'nin zararlı etkilerinden korumak için farklı antioksidan enzimlerin indüklenmesi gerektiği ve CAT, APX ve POX'un aktivitelerinin Pb maruziyetinden sonra su sümbülü bitkilerinde arttığı raporlanmıştır. Çalışmamızda ise stres altında artan SOD aktivitesiyle oluşan H₂O₂ streslerin tek başına uygulamasında CAT ve POX

aktiviteleriyle, kombinasyonlu uygulama gruplarında ise (As+Pb) sadece POX aktivitesiyle ortadan kaldırılmaya çalışılmıştır. Ancak hem H₂O₂ hem de lipid peroksidasyon sonuçları göstermiştir ki, bu iki stres *Lemna trisulca* bitkilerinde ROS birikimine neden olmuştur.

4.4. Lipit Peroksidasyonun İzlenmesi

4.4.1. Arsenik ve/veya kurşun toksitesine maruz bırakılan *Lemna trisulca* bitkilerinin TBARS (Tiobarbitürik asit reaktif maddeleri) miktarı

Arsenik ve/veya kurşun stresine maruz bırakılan *Lemna trisulca* bitkilerinin lipid peroksidasyon durumunu gösteren TBARS birikimine ait spektrofotometrik analizi Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



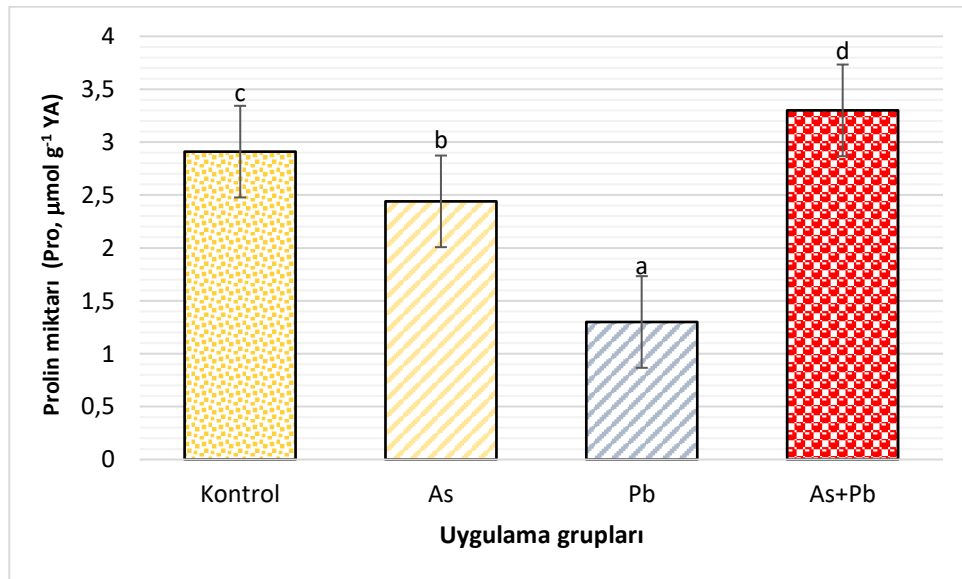
Şekil 4.6. 100 µM Na₂HAsO₄ ve 100 µM Pb (NO₃)₂ stresi altında yetiştirilen *Lemna trisulca* bitkilerinin lipid peroksidasyon (TBARS miktarı) düzeyi

Arsenik ve kurşun uygulamaları *Lemna trisulca* bitkilerinde lipid peroksidasyon düzeylerini artırmıştır. Bu ifadeye TBARS analizi sonucunda elde ettiğimiz verilerden ulaşılmaktadır. Kontrol grubuna göre en yüksek TBARS birikimi Pb uygulanan bitki yapraklarında 1.2 katlık artışla izlenmiştir. Aynı şekilde stres uygulamalarının birlikte yapılması durumunda (As+Pb) TBARS birikimi artarak yapraklarda lipid peroksidasyonuna neden olmuştur.

Lipid peroksidasyonu oksidatif stresin göstergesi olarak kabul edilir, zararlı çoklu doymamış yağ asit kalıntılarının oksidatif bozunmasını içerir (Girroti, 1990). Hem arsenik hem de kurşun stresi lipid peroksidasyonunu tetikler, doymuş yağ asitlerinin seviyesini düşürür ve bitkideki zararlı doymamış yağ asitlerinin içeriğini artırır (Halliwell ve Gutteridge, 2015). ROS'lar altında incelenen serbest radikaller, membran lipitlerinin çoklu doymamış yağ asidi bileşenlerine saldırır ve membran yapısını ve işlevini değiştiren bir oto-katalitik süreç olan lipid peroksidasyonunu başlatır. Dokulardaki tiyobarbiturik asit reaktif maddelerin (TBARS) seviyesinin ölçülmesi, lipid peroksidasyonunun bir endeksi olarak yaygın olarak kullanılır (Shah ve ark., 2022). Bu analiz stres göstergesi olup tek başına stresin yorumlanmasında kullanılamaz. Strese maruz kalan bitkilerin cevap mekanizma olarak gösterdiği büyüme, su miktarı, su ilişkileri, osmoregülasyon veya antioksidan savunma sistemi birlikte değerlendirilip sonuca ulaşılabilir.

4.5. Arsenik ve/veya kurşun toksitesine maruz bırakılan *Lemna trisulca* bitkilerinin prolin miktarı

Arsenik ve/veya kurşun stresine maruz bırakılan *Lemna trisulca* bitkilerinin osmoregülasyonda yer alan prolin (Pro) birikimine ait spektrofotometrik analizi Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. 100 μM Na_2HAsO_4 ve 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ stresi altında yetiştirilen *Lemna trisulca* bitkilerinin prolin (Pro) miktarı

Lemna trisulca bitkileri arsenik ve kurşun stresi altında yetiştirildiklerinde prolin miktarını önemli düzeyde azaltmışlardır. Bu azalma, Pb toksitesi uygulanan bitkilerde 2.2 oranında en fazla azalma ile kaydedilmiştir. İlginç olarak stres uygulamalarının tek başına Pro miktarında uyardıkları bu değişim As+Pb gruplarında gözlenmemiştir. Stresler birlikte uygulandığı takdirde Pro miktarındaki artış uyarılabilmiştir. Bu gruplarda kombine stres uygulamasına bağlı olarak prolin birikiminde %13 oranında artış izlenmiştir.

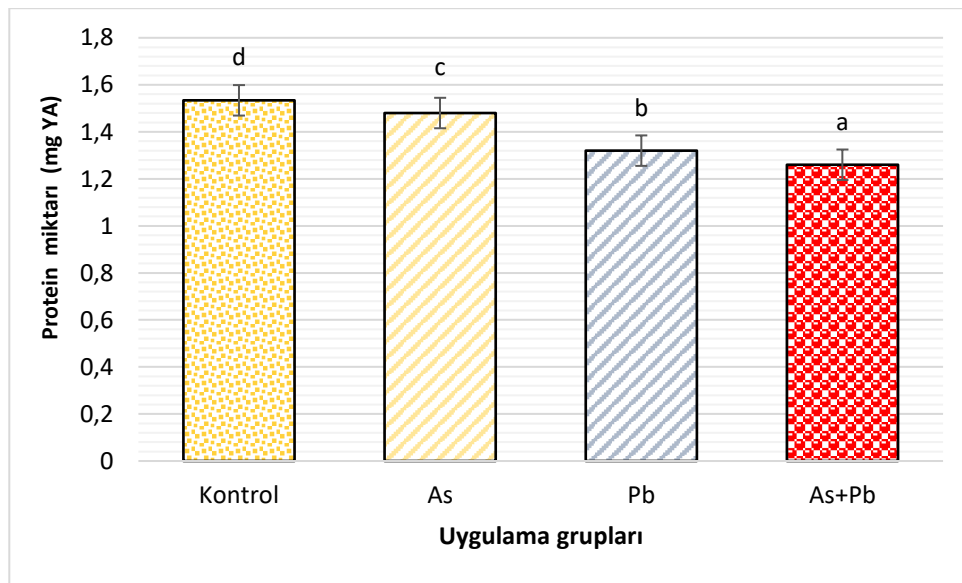
Farklı ROS'ların üretimi ve temizlenmesi arasındaki dengesizlik, oksidatif stres olarak bilinen fizyolojik bir durumdur (Anjum ve ark., 2023). Bitkiler abiyotik stres yaşadıklarında, çözünür şekerler ve proteinler, toplam fenolikler ve prolin gibi ozmolitler, bitki dokusu içindeki ozmotik potansiyeli yönetir (Anjum ve ark., 2016). Stres sırasında hücrelerde ozmolit birikimi, hücresel turgoru korunurken bitkilerin ozmotik ayarlama yoluyla suyu emmesini sağlar (Hosseinifard ve ark., 2022). Prolin, redoks dengesindeki ani değişikliklere karşı hassas olan nadir ancak çok yönlü bir proteinojenik amino asittir. Prolinin birikimi çevresel stresin bir belirteci olarak tanımlanmıştır ve ozmotik düzenleyici olarak koruyucu bir rol oynadığına inanılmaktadır. Bitkiler ozmotik yaralanma yaşadıklarında, tipik olarak serbest prolin seviyelerinde artış gösterirler. Prolinin bir temizleyici veya reaktif oksijen türlerinin bir ozmoliti olarak kullanıldığı ve bitkinin strese karşı savunmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir (Reddy ve ark., 2005). Arsenik stresi sıklıkla artan prolin içeriğine eşlik eder (Mahajan ve ark., 2023). Prolin, hidrojen bağlarına bağlanarak protein stabilitesini artırabilir ve membran bütünlüğünü koruyabilir. Prolin ayrıca hücreleri su emme kapasitelerini artırarak ve enzimlerin aktivasyonunu artırarak korur (Hosseinifard ve ark., 2022). Betainler de ozmoprotektan olarak da işlev görür; ancak ozmotik basıncı ayarlama da diğer ozmolitlerden daha az kritik olabilir (Veza ve ark., 2018). Toplam çözünür şekerler, membran bütünlüğünü koruyarak ve protein agregasyonunu ve denatürasyonunu önleyerek güçlü bir ozmolit gibi davranır (Arif ve ark., 2020). Strese maruz kalmayan mısır bitkileriyle karşılaştırıldığında, As stresi sırasında içsel ozmolit seviyelerinde önemli bir artış kaydedilmiştir (Atif ve Perveen, 2021). As stresi altındaki mısır çeşitleri üzerinde yapılan bir başka çalışma, prolin, toplam fenolikler ve toplam çözünür şekerler gibi ozmolitlerin sentezi ve birikiminin As stresinin ilerlemesiyle önemli ölçüde arttığını ortaya koymuştur (Anjum ve ark., 2016). İndüklenen As stresine ilişkin son veriler, artan ozmolit birikiminin *T. aestivum* fidelerinde As(V) toleransını destekleyen çeşitli faktörler arasında olduğunu göstermektedir (Alamri ve ark., 2022). Arsenik stresi yanı sıra, kurşun

uygulamasına maruz kalan bitkilerde de prolin artışı saptanmış ve koruyuculuk rolleri gösterilmiştir (Reddy ve ark., 2024).

Tezimizde Pro analizi sonucunda ulaştığımız değerler, yorumlandığında stresin etkisiyle Pro birikiminde ya da sentez basamaklarında olumsuz bir etkilene söz konusu olabilir. Diğer yandan As+Pb grubunda gözlenen Pro miktarındaki artışa rağmen koruma etkisi tam olarak izlenememiştir. Bu durum, Pro miktarındaki bu artışa rağmen bu grubun RWC değerlerinde raporladığımız düşüşler nedeniyle söylenebilir.

4.6. Arsenik ve/veya kurşun toksitesine maruz bırakılan *Lemna trisulca* bitkilerinin protein miktarı

Arsenik ve/veya kurşun stresine maruz bırakılan *Lemna trisulca* bitkilerinin protein miktarına ait sonuçları Şekil 4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. 100 μM Na_2HAsO_4 ve 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ stresi altında yetiştirilen *Lemna trisulca* bitkilerinin protein miktarı

Kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda As, Pb ya da As+Pb uygulamaları, *Lemna trisulca* yapraklarındaki total protein miktarında azalmalara neden olmuştur. Bu azalma oranı As+Pb grubunda maksimum düzeydedir ve oranı da 1.2 katlık azalmadır.

Arsenik uygulamaları, proteinlerdeki tiyol ve sülfidril gruplarıyla kompleks oluşturur ve bunların aktivitesini inhibe eder, böylece membran bozulmasına ve hücre ölümüne yol açar (Hu ve ark., 2020). Bu etkileşim, bitkiler tarafından As'nin

bölmelendirme ve fitoşelasyon mekanizmalarında olduğu gibi pozitif olabilir (Farooq ve ark., 2021) veya amino asitleri öncül olarak içeren bitkilerin metabolik ve fizyolojik süreçlerini, yani esas olarak protein sentezini negatif yönde etkilemesi olabilir. Bunun sonucunda hücre total düzeyde protein miktarında azalışlar gözlenir. Bu durum çalışmamızda kaydettiğimiz protein miktarındaki düşüşler ile uyumludur. Sonuç olarak iki stresin birlikte uygulandığı bitkilerde proteinlerin olumsuz yönde etkilendiğini söyleyebiliriz.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Günümüzde, yüksek Arsenik (As) konsantrasyonlarına sahip alanların varlığı, yakınlardaki yerleşim alanlarının maruz kalması nedeniyle küresel bir çevre kirliliği sorunu olarak kabul edilmektedir (Sun ve ark., 2020). Ekosistemdeki As kirliliği, As üreten antropojenik faaliyetlerin (kentleşme ve sanayileşme) yanı sıra doğal faaliyetlerden (volkanik patlama ve arsenik içeren tortuların aşınması) kaynaklanmaktadır (Al-Makishah ve ark., 2020). Her iki aktivite de su katmanlarının ve yeraltı sularının kirlenmesine neden olmuştur ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 2003 yılında belirlenen maksimum limitleri (10 µg As/L sudaki) aşmıştır. Tarımsal sulamada kullanılan bu ağır metalin bulunması, bitkilerde emilimi nedeniyle dünya çapında halk arasında toprak-bitki sistemi konusunda artan bir endişe yaratmıştır. Bitkilerde As alımını, bitkilerde belirgin yapısal ve fiziko-biyokimyasal değişikliklere neden olur ve bunun sonucunda büyüme ve gelişme ciddi şekilde bozulur (Singh ve ark., 2021). Toprak veya sudaki yüksek arsenik seviyeleri, fotosentetik pigmentler de dahil olmak üzere çeşitli bitki biyomolekülleri için oldukça bozucu görünmektedir ve dolayısıyla fotokimyasal verimliliği ve fotosentez hızını zararlı şekilde etkilemektedir, bu nedenle bu fizyolojik süreçler bitkilerdeki arsenik stresinin hassas göstergeleri olarak düşünülmektedir (Dolui ve ark., 2021).

Topraktaki yüksek ağır metal konsantrasyonları, özellikle kurşun (Pb) tahıllardaki tahıl kalitesini düzenleyen biyokimyasal ve fizyolojik süreçleri olumsuz etkiler. Gıda zinciri yoluyla istenen miktardan fazla Pb alımı, bireyleri kronik sağlık sorunlarına yatkın hale getirebileceğinden insanlar için büyük bir endişe kaynağıdır. Bitki sistemlerinde, yüksek Pb konsantrasyonları elektron taşıma zinciri, hücresel organel bütünlüğü, membran stabilite indeksi, PSII bağlantısı, mineral metabolizması, oksijen üreten kompleks ve enzimatik aktivite gibi birkaç önemli metabolik süreci bozabilir (Aslam ve ark., 2021). Arsenik stresinde olduğu gibi, kurşun toksisitesine karşı oluşan oksidatif hasar mekanizmaları *Arabidopsis thaliana* (Corpas ve Barroso, 2017), *Spinacia oleracea* (Khan ve ark., 2016), *Amaranthus viridis* ve *Portulaca oleracea* (Javed ve ark., 2017), *Triticum aestivum* ve metal içeren türler *Zygophyllum fabago* (Alamri ve ark., 2018) gibi bazı bitkilerde araştırılmıştır. Pb bitki metabolizması için gerekli bir element olmasa da bitki hücrelerinin içine girdiğinde su ve mineral durumunda, fotosentezde (kloroplast

yapısı, pigmentler, enzimler ve fotosentezin ışık bağımlı/bağımsız reaksiyonları) ve redoks homeostazında değişiklikler dahil olmak üzere çok çeşitli olumsuz etkilere neden olur (Zhou ve ark., 2018). Redoks homeostazı, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi hücrelerin nötralize edemeyeceği seviyelere ulaştığında kaybolur ve sonuçta lipitlerin, nükleik asitlerin ve proteinlerin kontrolsüz oksidasyonu meydana gelir.

Her iki stres koşuluna maruz kalan bitkilerde su kanallarının bozulmasına ve bitki için gerekli elementlerin alınımının bozulmasına neden olur (Banerjee ve Roychoudhury, 2022). Oksidatif stres kaynaklı membran bozuklukları nedeniyle esansiyel elektrolitlerin sızmasının artması, dengesiz ozmolarite ve doku nekrozuna yol açan önemli bir etkendir (Mushtaq ve ark., 2022). Bu ifade, As ya da Pb uyguladığımız *Lemna trisulca* bitkilerinin RWC değerlerinde izlenen sonuçları desteklemektedir. *L. trisulca* bitkilerinde bu streslere bağlı olarak suyun ve bazı önemli moleküllerin (klorofil gibi) yapısında bulunan elementlerin alınımının azalması nedeniyle fotosentez devamında büyüme özelliklerinde azalmalar oluşturmuş olabilir. Stres altında büyüme parametrelerindeki azalma içsel oluşturulan protein sentezindeki bozulmalarla da açıklanabilir. Tezimizde gözlenen As ve/veya Pb uygulaması sonunda *L. trisulca* bitkilerinin yapraklarındaki protein azalmaları, sentez basamağındaki enzim ya da enzime ait gen ifadelerinin bozulması sonucu olabilir. Suyun sınırlandırıldığı durumlarda bitkiler için önemli bir adaptasyon mekanizması da osmoregülasyondur. Bu koruyucu yolağın faktörlerinden birisi de prolin dir. As veya Pb streslerin tek başına uygulanması *L. trisulca* bitkilerinin yapraklarında prolin azalmasına neden olmuştur. Bu etkinin bir devamı olarak da stres uygulanan gruplarda RWC değerlerinin azalması açıklanabilir.

Arsenik- veya kurşun-kaynaklı oksidatif stres, bitkilerde maruziyet sonrasında izlenen ortak bir sonuçtur. Çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan bileşenlerden oluşan bitkilerde etkili bir antioksidan savunma sistemi tarafından düzenlenir (Wang ve ark., 2021). Antioksidanlar aşırı ROS üretimini sınırlar ve sıklıkla bu savunma sistemleri ROS üretim bölgelerinin yakınında bulunarak üretim bölgelerinin ötesinde oksidatif hasarı önler (Bhat ve ark., 2020). Prolin, glisin betain vb. gibi önemli ozmoprotektanların sentezinin, As toksisitesinin neden olduğu da dahil olmak üzere abiyotik stres kaynaklı oksidatif hasarı azaltmada aktif rol oynadığı bilinmektedir. Radikallere karşı ilk oluşan savunma basamağı SOD olup (Hasanuzzaman ve ark., 2020). çalışmamızda As ya da Pb stresine karşı oluşan savunmada aktifleşmiştir. SOD aktivitesi sonucunda süperoksit anyon radikali ortadan kaldırılmış ve reaksiyon sonunda H_2O_2 oluşturulmuştur. Stres kaynaklı ya da bu reaksiyon sonucu oluşan H_2O_2 ise diğer enzimlerce elimine edilmeye

çalışılmıştır. Bu amaçla As veya Pb uygulanan bitkilerin yapraklarında CAT ve POX ve streslerin kombine olarak uygulanan gruplarında ise POX ile süpürülmeye çalışılmıştır. Bu enzimlerin dışında yine H₂O₂ süpürülmesinde etkili olan APX, GR, MDHAR ve DHAR gibi (AsA-GSH döngüsü elemanları) enzim aktiviteleri sadece As stresi altında aktifleşmiştir (Yayınlanmamış data). Tüm bu antioksidanların aktivitesine rağmen stres uygulanan *T. trisulca* yapraklarında H₂O₂ miktarının artışı izlenmiştir. Bu sonuç stres altında enzim sisteminin yetersiz kaldığı ya da SOD aktivitesinin dışında da stres altında H₂O₂ kaynaklarının varlığı (NADPH oksidaz, aminoksidaz gibi) ile açıklanabilir.

Birikimi artan ROS üretimi DNA, protein ve lipidlerin yıkımına yol açar. Arsenik ve kurşun toksitesi, H₂O₂ ve malondialdehit birikimini artırabilir. As- ya da Pb-kaynaklı lipid peroksidasyonunun üretimi, hücresel ortamdaki redoks dengesizliğinin düzeyinin ROS kaynaklı toksisite bitkiler için hayati bir faktör olabileceğini göstermektedir. As ve/veya Pb uygulaması yapılan *L. trisulca* yapraklarındaki TBARS artışı, hücre zarlarındaki peroksidasyonun düzeyinin artışına işaret etmektedir.

5.2 Öneriler

Lemnaceae familyasına ait üyelerden olan *Lemna trisulca* (Su mercimeği), sucul ortamlardan ağır metallerin potansiyel bir temizleyicisi olarak rapor edilmiştir ve atık su yenileme sistemlerinde kullanılmaktadır. Su mercimeği besinleri veya kirleticileri geri kazanma veya çıkarma yeteneğine sahiptir ve atık suların biyolojik olarak iyileştirilmesi için mükemmel bir adaydır. Bu tür bitkiler çok hızlı büyür, atık su besinlerini kullanır ve ayrıca yan ürün olarak maliyet açısından uygun protein açısından zengin biyokütle üretir. Su ya da kara ekosistemi içerisinde gerek doğal gerekse insan kaynaklı ağır metal birikimi sıklıkla karşılanmakta ve bunun yıkıcı etkileri bulunmaktadır. Fitoremediasyon, metallerle kirlenmiş toprak ve suyun iyileştirilmesi için yeni ve çok başarılı bir yaklaşımdır. Ancak, ağır metallerle kirlenmiş toprakların fitoremediasyonu, toprakların standart sağlıklı durumlarına geri döndürülmesi için yıllar alabilir. Hiper-akümülatörler, sıg toprak yüzeylerinden ve sudan önemli miktarda kirletici madde çıkarma yeteneğine sahiptir. Sıklıkla karşılaşılan arsenik ve kurşun gibi iki önemli stres faktörüne karşı *Lemna trisulca*'nın tolerans ve biriktirme cevapları değerlidir. Bu konu üzerine araştırmaların bu bitki için ağır metallerin taşınma, biriktirme ve atılma mekanizmalarının detaylandırılması ve özellikle moleküler düzeyde cevapların incelenmesi önemlidir.

6. KAYNAKLAR

- Ahmed, S., Ahmad, M., Sardar, R., & Ismail, M. A. (2023). Triaccontanol priming as a smart strategy to attenuate lead toxicity in *Brassica oleracea L.* *International Journal of Phytoremediation*, 25(9), 1173-1188.
- Alamri, S., Siddiqui, M. H., Mukherjee, S., Kumar, R., Kalaji, H. M., Irfan, M., ... & Rajput, V. D. (2022). Molybdenum-induced endogenous nitric oxide (NO) signaling coordinately enhances resilience through chlorophyll metabolism, osmolyte accumulation and antioxidant system in arsenate stressed-wheat (*Triticum aestivum L.*) seedlings. *Environmental Pollution*, 292, 118268.
- Al-Makishah, N. H., Taleb, M. A., & Barakat, M. A. (2020). Arsenic bioaccumulation in arsenic-contaminated soil: a review. *Chemical Papers*, 74(9), 2743-2757.
- Anjum, S. A., Tanveer, M., Hussain, S., Shahzad, B., Ashraf, U., Fahad, S., ... & Tung, S. A. (2016). Osmoregulation and antioxidant production in maize under combined cadmium and arsenic stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(12), 11864-11875.
- Arif, Y., Singh, P., Siddiqui, H., Bajguz, A., & Hayat, S. (2020). Salinity induced physiological and biochemical changes in plants: An omic approach towards salt stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 156, 64-77.
- Asgher, M., Ahmed, S., Sehar, Z., Gautam, H., Gandhi, S. G., & Khan, N. A. (2021). Hydrogen peroxide modulates activity and expression of antioxidant enzymes and protects photosynthetic activity from arsenic damage in rice (*Oryza sativa L.*). *Journal of Hazardous Materials*, 401, 123365.
- Atif, M., & Perveen, S. (2021). Comparison of alteration in growth, physiological and biochemical attributes of ten maize (*Zea mays L.*) varieties under arsenic stress: susceptibility and tolerance. *Polish Journal of Environmental Studies*, 30(6).
- Azmat, R., Haider, S., & Riaz, M. (2009). An inverse relation between Pb²⁺ and Ca²⁺ ions accumulation in Phaseolus mungo and Lens culinaris under Pb stress. *Pak. J. Bot*, 41(5), 2289-2295.
- Banerjee, A., & Roychoudhury, A. (2022). Explicating the cross-talks between nanoparticles, signaling pathways and nutrient homeostasis during environmental stresses and xenobiotic toxicity for sustainable cultivation of cereals. *Chemosphere*, 286, 131827.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. A., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39(1), 205-207.
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 44(1), 276-287.

- Bhardwaj, S., Verma, T., Raza, A., & 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* (0031-9457), 92(3).
- Bianucci, E., Furlan, A., del Carmen Tordable, M., Hernández, L. E., Carpena-Ruiz, R. O., & Castro, S. (2017). Antioxidant responses of peanut roots exposed to realistic groundwater doses of arsenate: Identification of glutathione S-transferase as a suitable biomarker for metalloid toxicity. *Chemosphere*, 181, 551-561.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Castillo -Martínez, J. I., Saldaña-Robles, A., & Ozuna, C. (2022). Arsenic stress in plants: A metabolomic perspective. *Plant Stress*, 3, 100055.
- Chakraborty, R., Rehman, R. U., Siddiqui, M. W., Liu, H., & Seth, C. S. (2025). Phytohormones: Heart of plants' signaling network under biotic, abiotic, and climate change stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109839.
- Chandrakar, V., Yadu, B., Meena, R. K., Dubey, A., & Keshavkant, S. (2017). Arsenic-induced genotoxic responses and their amelioration by diphenylene iodonium, 24-epibrassinolide and proline in Glycine max L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 112, 74-86.
- Chibuike, G. U., & Obiora, S. C. (2014). Heavy metal polluted soils: effect on plants and bioremediation methods. *Applied and environmental soil science*, 2014(1), 752708.
- Collin, S., Baskar, A., Geevarghese, D. M., Ali, M. N. V. S., Bahubali, P., Choudhary, R., ... & Swamiappan, S. (2022). Bioaccumulation of lead (Pb) and its effects in plants: A review. *Journal of Hazardous Materials Letters*, 3, 100064.
- Corsini, E., Asti, L., Viviani, B., Marinovich, M., & Galli, C. L. (1999). Sodium arsenate induces overproduction of interleukin-1 α in murine keratinocytes: role of mitochondria. *Journal of investigative dermatology*, 113(5), 760-765.
- Coşkun, Ö. F., Aydın, D., Akıska, S., Özel, H. B., & Varol, T. (2018). Türkiye'de yayılış gösteren sumercimeğigil üyelerinin belirlenmesi. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 20(1), 145-151.
- Doğru, A. (2020). Bitkilerde aktif oksijen türleri ve oksidatif stres. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 3(2), 205-226.
- Dolui, D., Hasanuzzaman, M., Saha, I., Ghosh, A., & Adak, M. K. (2022). Amelioration of sodium and arsenic toxicity in *Salvinia natans* L. with 2, 4-D priming through physiological responses. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(6), 9232-9247.

- Du, Y. Y., Wang, P. C., Chen, J., & Song, C. P. (2008). Comprehensive functional analysis of the catalase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(10), 1318-1326.
- Farooq, M. A., Hong, Z., Islam, F., Noor, Y., Hannan, F., Zhang, Y., ... & Song, W. (2021). Comprehensive proteomic analysis of arsenic induced toxicity reveals the mechanism of multilevel coordination of efficient defense and energy metabolism in two *Brassica napus* cultivars. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111744.
- Fatima, A., Kataria, S., Prajapati, R., Jain, M., Agrawal, A. K., Singh, B., ... & Gadre, R. (2021). Magnetopriming effects on arsenic stress-induced morphological and physiological variations in soybean involving synchrotron imaging. *Physiologia Plantarum*, 173(1), 88-99.
- Ghori, N. H., Ghori, T., Hayat, M. Q., Imadi, S. R., Gul, A., Altay, V., & Ozturk, M. (2019). Heavy metal stress and responses in plants. *International journal of environmental science and technology*, 16(3), 1807-1828.
- Girotti, A. W. (1990). Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. *Photochemistry and photobiology*, 51(4), 497-509.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). Free radicals in biology and medicine: *Oxford University Press*.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Mahmud, J. A., ... & 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.
- Herzog, V., & Fahimi, H. D. (1973). A new sensitive colorimetric assay for peroxidase using 3, 3'-diaminobenzidine as hydrogen donor. *Analytical biochemistry*, 55(2), 554-562.
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for the growing plants without soil. 347. *California Agricultural Experimental Station* 347:1-32
- Hosseinfard, M., Stefaniak, S., Ghorbani Javid, M., Soltani, E., Wojtyła, Ł., & Garnczarska, M. (2022). Contribution of exogenous proline to abiotic stresses tolerance in plants: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 5186.
- Hu, R., Sun, K., Su, X., Pan, Y. X., Zhang, Y. F., & Wang, X. P. (2012). Physiological responses and tolerance mechanisms to Pb in two xerophiles: *Salsola passerina* Bunge and *Chenopodium album* L. *Journal of Hazardous Materials*, 205, 131-138.
- Imahori, Y. (2014). Role of ascorbate peroxidase in postharvest treatments of horticultural crops. In *Oxidative damage to plants* (pp. 425-451). Academic Press.

- Karimi, N., Pakdel, H., Sourji, Z., Norouzi, L., Rizwan, M., & Yong, J. W. H. (2025). Effects of phytostabilized zinc sulfide nanocomposites on growth and arsenic accumulation in wheat (*Triticum aestivum L.*) under arsenic stress. *Plant stress*, 100886.
- Khan, M., Ahmed, S., Yasin, N. A., Sardar, R., Hussaan, M., Gaafar, A. R. Z., & Haider, F. U. (2023). 28-homobrassinolide primed seed improved lead stress tolerance in *Brassica rapa L.* through modulation of physio-biochemical attributes and nutrient uptake. *Plants*, 12(20), 3528.
- Khan, Z., Thounaojam, T. C., & Upadhyaya, H. (2022). Arsenic stress in rice (*Oryza sativa*) and its amelioration approaches. *Plant Stress*, 4, 100076.
- Koch, R. E., & Hill, G. E. (2017). An assessment of techniques to manipulate oxidative stress in animals. *Functional Ecology*, 31(1), 9-21.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685.
- Li, J., Zhao, Q., Xue, B., Wu, H., Song, G., & Zhang, X. (2019). Arsenic and nutrient absorption characteristics and antioxidant response in different leaves of two ryegrass (*Lolium perenne*) species under arsenic stress. *PLoS One*, 14(11), e0225373.
- Malar, S., Shivendra Vikram, S., JC Favas, P., & Perumal, V. (2014). Lead heavy metal toxicity induced changes on growth and antioxidative enzymes level in water hyacinths [*Eichhornia crassipes (Mart.)*]. *Botanical studies*, 55(1), 54.
- Mandal, P. (2017). An insight of environmental contamination of arsenic on animal health. *Emerging contaminants*, 3(1), 17-22.
- Mansoor, S., Ali, A., Kour, N., Bornhorst, J., AlHarbi, K., Rinklebe, J., ... & Chung, Y. S. (2023). Heavy metal induced oxidative stress mitigation and ROS scavenging in plants. *Plants*, 12(16), 3003.
- Mesci, S., & Çatal, M. İ. (2025). Effects of nickel sulphate and lead acetate trihydrate on heavy metal stress-related gene activities in forage pea (*Pisum sativum ssp. arvense L.*) in Türkiye. *Frontiers in Plant Science*, 16, 1549488.
- Mishra, N., Jiang, C., Chen, L., Paul, A., Chatterjee, A., & Shen, G. (2023). Achieving abiotic stress tolerance in plants through antioxidative defense mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1110622.
- Molina-Moya, E., Rodríguez-González, A., Peláez-Vico, M. A., Sandalio, L. M., & Romero-Puertas, M. C. (2025). Peroxisomal-dependent signalling and dynamics modulate plant stress responses: reactive oxygen and nitrogen species as key molecules. *Journal of Experimental Botany*, eraf072.

- Mostofa, M. G., Rahman, M. M., Nguyen, K. H., Li, W., Watanabe, Y., Tran, C. D., ... & Tran, L. S. P. (2021). Strigolactones regulate arsenate uptake, vacuolar-sequestration and antioxidant defense responses to resist arsenic toxicity in rice roots. *Journal of hazardous materials*, 415, 125589.
- Moullick, D., Santra, S. C., Majumdar, A., Das, A., Chowardhara, B., Saha, B., ... & Hossain, A. (2025). Efficacy of Seed Priming Technology in Ameliorating Metals and Metalloids Toxicity in Crops: Prospective and Issues. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 263(1), 1.
- Mushtaq, N., Wang, Y., Fan, J., Li, Y., & Ding, J. (2022). Down-regulation of cytokinin receptor gene SIHK2 improves plant tolerance to drought, heat, and combined stresses in tomato. *Plants*, 11(2), 154.
- Nahar, K., Rhaman, M. S., Parvin, K., Bardhan, K., Marques, D. N., García-Caparrós, P., & Hasanuzzaman, M. (2022). Arsenic-induced oxidative stress and antioxidant defense in plants. *Stresses*, 2(2), 179-209.
- Naik, M., & Naik, Z. A. (2025). Enhancing plant resilience: mechanisms and genetic strategies for detoxification of Reactive oxygen species. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 1-7.
- Ortakçı, G. (2020). Elâzığ (Maden)'da işletmesi devam eden ve Amasya (Gümüşhacıköy)'da işletmesi bitmiş olan maden sahalarındaki bazı bitkilerde ağır metal bioakümülyasyonları (*Master's thesis, Amasya University*).
- Pandey, C., Khan, E., Panthri, M., Tripathi, R. D., & Gupta, M. (2016). Impact of silicon on Indian mustard (*Brassica juncea L.*) root traits by regulating growth parameters, cellular antioxidants and stress modulators under arsenic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 104, 216-225.
- Pandey, S., Rai, R., & Rai, L. C. (2023). Biochemical and molecular basis of arsenic toxicity and tolerance in microbes and plants. In *Handbook of arsenic toxicology* (pp. 709-759). *Academic Press*.
- Pinski, A., Mehdi, S. M. M., & Betekhtin, A. (2025). Molecular mechanisms underlying abiotic stress responses in buckwheat. *Plant Science*, 112526.
- Piotrowska, A., Bajguz, A., Godlewska-Żyłkiewicz, B., Czerpak, R., & Kamińska, M. (2009). Jasmonic acid as modulator of lead toxicity in aquatic plant *Wolffia arrhiza* (*Lemnaceae*). *Environmental and Experimental Botany*, 66(3), 507-513.
- Polechońska, L., Szczęśniak, E., & Klink, A. (2022). Comparative analysis of trace and macro-element bioaccumulation in four free-floating macrophytes in area contaminated by copper smelter. *International Journal of Phytoremediation*, 24(3), 324-333.
- Radotić, K., Dučić, T., & Mutavdžić, D. (2000). Changes in peroxidase activity and isoenzymes in spruce needles after exposure to different concentrations of cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, 44(2), 105-113.

- Reddy, A. M., Kumar, S. G., Jyothsnakumari, G., Thimmanaik, S., & Sudhakar, C. (2005). Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) and bengalgram (*Cicer arietinum* L.). *Chemosphere*, 60(1), 97-104.
- Rodriguez- Gracia, C., Lopez-Ortiz, C., Flores-Iga, G., Ibarra-Munoz, L., Nimmakayala, P., Reddy, U. K., & Balagurusamy, N. (2024). From genes to ecosystems: Decoding plant tolerance mechanisms to arsenic stress. *Heliyon*, 10(7).
- Rozman, U., Kokalj, A. J., Dolar, A., Drobne, D., & Kalčíková, G. (2022). Long-term interactions between microplastics and floating macrophyte *Lemna minor*: The potential for phytoremediation of microplastics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 831, 154866.
- Saddique, M., Kamran, M., & Shahbaz, M. (2018). Differential responses of plants to biotic stress and the role of metabolites. In *Plant metabolites and regulation under environmental stress* (pp. 69-87). Academic Press.
- Saleem, K., Asghar, M. A., Javed, H. H., Raza, A., Seleiman, M. F., Ullah, A., ... & Yong, J. W. H. (2023). Alleviation of arsenic toxicity-induced oxidative stress in lemon grass by methyl jasmonate. *South African Journal of Botany*, 160, 547-559.
- Seevers, P. M., Daly, J. M., & Catedral, F. F. (1971). The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust disease. *Plant physiology*, 48(3), 353-360.
- Shah, A. A., Riaz, L., Siddiqui, M. H., Nazar, R., Ahmed, S., Yasin, N. A., ... & Chaudhry, O. (2022). Spermine-mediated polyamine metabolism enhances arsenic-stress tolerance in *Phaseolus vulgaris* by expression of zinc-finger proteins related genes and modulation of mineral nutrient homeostasis and antioxidative system. *Environmental Pollution*, 300, 118941.
- Solórzano, E., Corpas, F. J., González-Gordo, S., & Palma, J. M. (2020). Reactive oxygen species (ROS) metabolism and nitric oxide (NO) content in roots and shoots of rice (*Oryza sativa* L.) plants under arsenic-induced stress. *Agronomy*, 10(7), 1014.
- Sun, X., Kong, T., Xu, R., Li, B., & Sun, W. (2020). Comparative characterization of microbial communities that inhabit arsenic-rich and antimony-rich contaminated sites: Responses to two different contamination conditions. *Environmental Pollution*, 260, 114052.
- Veza, M. E., Alemano, S., Agostini, E., & Talano, M. A. (2022). Arsenic toxicity in soybean plants: impact on chlorophyll fluorescence, mineral nutrition and phytohormones. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(7), 2719-2731.
- Veza, M. E., Llanes, A., Travaglia, C., Agostini, E., & Talano, M. A. (2018). Arsenic stress effects on root water absorption in soybean plants: Physiological and morphological aspects. *Plant Physiology and Biochemistry*, 123, 8-17.

- Wang, H., Cui, S., Wu, D., Yang, X., Wang, H., & Wang, Z. (2021). Effects of kinetin on arsenic speciation and antioxidative enzymes in fronds of the arsenic hyperaccumulator *Pteris cretica* var. *nervosa* and non-hyperaccumulator *Pteris ensiformis*. *Environmental and experimental botany*, 191, 104622.
- Xie, M., Li, F., Li, Y., Qian, K., Liang, Y., Lei, B., ... & Xiao, Y. (2025). Iron-doped carbon dots nanozyme scavenged reactive oxygen species system for inhibiting effectively the uptake of arsenic in lettuce. *Chemical Engineering Journal*, 506, 159956.
- Yadav, P., Srivastava, S., Patil, T., Raghuvanshi, R., Srivastava, A. K., & Suprasanna, P. (2021). Tracking the time-dependent and tissue-specific processes of arsenic accumulation and stress responses in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Hazardous Materials*, 406, 124307.
- Yan, A., Wang, Y., Tan, S. N., Mohd Yusof, M. L., Ghosh, S., & Chen, Z. (2020). Phytoremediation: a promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land. *Frontiers in plant science*, 11, 513099.
- Yang, S., & Wang, J. (2023). Auxin homeostasis in plant responses to heavy metal stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 205, 108210.
- Zaidi, S., Hayat, S., & Pichtel, J. (2024). Arsenic-induced plant stress: Mitigation strategies and omics approaches to alleviate toxicity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 213, 108811.