

Arsenik, Kurşun ve Kadmiyum Stresi Altında Arpa Bitkisinde Bazı Biyokimyasal Değişiklikler

Filiz SANAL^{1*}

Hülya YILDIR²

^{1,2} Trakya Üniversitesi, Biyoloji Bölümü Edirne/ TÜRKİYE

¹<https://orcid.org/0000-0002-5830-4811>

²<https://orcid.org/0009-0008-0580-3677>

*Corresponding author (Sorumlu Yazar): filizsanal@trakya.edu.tr

Received (Geliş tarihi): 31.05.2024

Accepted (Kabul tarihi): 11.11.2024

ÖZ: Bu çalışmada ağır metal stresi karşısında bitkilerin tohum çimlenme yüzdeleri, kök gövde uzunlukları, kuru ve yaş ağırlık gibi fizyolojik parametrelerin yanında, stres karşısında primer cevaplarından olan antioksidan enzimlerin gen ekspresyon seviyeleri, lipid peroksidasyonu seviyeleri ve total protein içerikleri incelenerek kısa süreli ağır metal stresinin etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. 15 µM, 30 µM ve 60 µM konsantrasyonlarda karışım halinde ağır metal uygulaması (arsenik, kurşun ve kadmiyum) konsantrasyon artışı ile ilişkili bir şekilde çimlenme oranında azalmaya sebep olmuştur. Kök ve gövde uzunlukları yüksek dozda (60 µM) kontrole göre azalmıştır. Birinci günde 60 µM doz kök ve gövde uzunluklarını arttırmış ($p<0,05$), beşinci günde gövde uzunlukları 15 µM 'lık konsantrasyon da artarken ($p<0,05$), 30 µM ve 60 µM lık konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı bir değişiklik olmamıştır ($p>0,05$). Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak MDA seviyeleri birinci ve beşinci günde anlamlı şekilde artmıştır ($p<0,05$). Doza bağlı olarak kök ve gövdedeki protein miktarları anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0,05$). Ağır metal stresine birincil cevap olarak antioksidan enzimlerin (Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ve Glutatyon sentetaz (GS)) ekspresyon seviyelerinde anlamlı değişiklikler gözlenmiştir. Konsantrasyona bağlı olarak bitkideki ağır metal birikiminin arttığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Arpa, ağır metal stresi, antioksidant enzimler.

Some Biochemical Changes in Barley Plants Under Arsenic, Lead, and Cadmium Stress

ABSTRACT: In this study, the effects of short-term heavy metal stress were evaluated by examining the gene expression levels of antioxidant enzymes, lipid peroxidation levels, and total protein contents, which are among the primary responses to stress. In addition, physiological parameters such as seed germination percentages, root stem lengths, dry and fresh weight of plants against heavy metal stress were assessed. Application of heavy metals (arsenic, lead, and cadmium) in mixture at concentrations of 15 µM, 30 µM, and 60 µM caused a decrease in germination rate in association with the increase in concentration. Root and stem lengths decreased at high dose (60 µM) compared to the control. On the first day, 60 µM dose increased root and stem lengths ($p<0.05$), while on the fifth day, stem lengths increased at 15 µM concentration ($p<0.05$). However, there were no significant changes compared to the control at 30 µM and 60 µM concentrations ($p>0.05$). As an indicator of lipid peroxidation, MDA levels increased significantly on the first and fifth days ($p<0.05$). Depending on the dose, protein amounts in the root and stem decreased significantly ($p<0.05$). Significant changes were observed in the expression levels of antioxidant enzymes [Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione synthetase (GS)] as a primary response to heavy metal stress. It was determined that heavy metal accumulation in the plant increased depending on concentration.

Keywords: Barley, heavy metal stress, antioxidant enzymes.

GİRİŞ

İnsan ve hayvan beslenmesinin ana maddelerinden biri olan tahıllar, aynı zamanda birçok endüstriyel ürün için de hammadde olarak kullanılmaktadır. Tahıllar yüksek protein içeriği sebebiyle en çok tüketilen besin kaynakları arasında yer almaktadır. Bu nedenle tahıl üretimi tüm dünyada yaygın olarak yapılmaktadır. Arpa bitkisi insan tarafından ilk kültüre alınan bitkilerden birisidir. Başlangıçta beslenme amacı ile

yetiştirilirken, günümüzde hayvan beslenmesinde yem olarak ve bira üretiminde kullanılmak üzere maltlık olarak endüstriyel ölçekte yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bitkiler büyümek ve gelişmek için ekolojik şartların optimum olmasına ihtiyaç duyarlar. Çevresel şartlarda bir değişim olduğu zaman metabolizmalarını bu şartlara uyum sağlayacak şekilde değiştirebilirler. Ancak bu tolerans sınırlarının aşan beklenmedik

koşullara maruz kaldıklarında, bitki gelişimi ve verimliliği etkilenir. Bitkileri strese sokan çeşitli çevresel faktörler vardır. Bunlardan bazıları tarımda kullanılan çeşitli pestisitler, herbisitler ve suni gübreler gibi maddeler madencilik, kentsel ve endüstriyel atıklar, ve trafikle birlikte açığa çıkan egzoz gazlarının içeriği ile ekosisteme verilen yoğun miktardaki ağır metallerdir (Garellick ve ark., 2008). Ekosistemdeki ağır metal kirliliği özellikle de ekonomik olarak önemli olan tahıllarda ağır metallere kaynaklanan bir strese neden olmakta, ürün ve verim kalitesini etkilemektedir (Rasheed ve ark., 2023).

Arsenik (As) kanserojen bir metaloid olup ekosistem içinde organik ve inorganik şekilde yaygın olarak görülür. Organizmalar için çevresel bir tehdittir (Zhang ve ark., 2021). İnorganik arsenik yeraltında arsenat (As V) ve arsenit (As III) şeklinde bulunur. Arsenat (As V) bitkilerde fosfat metabolizmasını etkiler, As(III) enzim/proteinlerin tiol gruplarına kolayca bağlanabilir. Her iki As türü de taşımada farklılık gösterir ve bitkilere toksisiteye neden olabilir; As (III) bitkiler için As (V)' den daha tehlikeli olarak kabul edilir (Ali ve ark., 2021). ROS (Reaktif Oksijen Türleri) genel olarak bitkilerde As (V), As (III)'ü oluşturacak şekilde indirgenmeye maruz kaldığında üretilir; bu süreci, ROS üretimine katkıda bulunan As'ın metilasyonu izler. Artan ROS üretimi, DNA, protein ve lipidlerin yok olmasına yol açar. Arsenik, bitki hücresinde antioksidan dengesi bozan H₂O₂ ve MDA miktarlarında artışa sebep olabilir (Zulfiqar ve Ashraf, 2022).

Tarım ve endüstrideki gelişmeler, tarımsal topraklarda daha yüksek bir Cd (Kadmiyum) konsantrasyonuna sebep olmuştur. Cd ile kirlenmiş toprakta yetişen bitkilerde Cd birikmesi, bu bitkileri tüketen hayvanlar ve insan sağlığı için ciddi problemler oluşturmaktadır. Cd'un bitkilerde kloroza yol açtığı, bitki büyümesini engellediği ve bitki nekrozuna yol açtığı bildirilmiştir (Haider ve ark., 2021). Cd toksisitesi, karbon fiksasyonunu engellemekte ve klorofil içeriğini ve fotosentetik aktiviteyi azaltmaktadır (Saoudi ve ark.,2024). Toprakta bitkiler Cd' a maruz kaldığında, yapraklarda nispi nem içeriği, stoma iletkenliği ve terleme en aza inmekte ve bitkiler ozmotik strese girmektedir ve böylece bitkilerde fizyolojik hasar meydana gelmektedir (Adil ve ark., 2020).

Pb (Kurşun), arsenikten sonra ikinci en tehlikeli ağır metal (HM) kirleticisidir (Mfarrej ve ark., 2024). Yüksek dozlarda Pb'a maruz kalmak su, besin ve bitki ilişkilerini bozarak bitkilerde oksidatif hasara yol açar. Ayrıca hücre zarının geçirgenliğini bozar ve fotosentez ve solunum süreçlerinde biyokimyasal ve fizyolojik bozulmalara neden olur. Bu toksisite sebebi ile ROS oluşumunu tetikler ve biyolojik makro moleküllere zarar verir. Membranlarda lipid peroksidasyonuna sebep olur. Pb toksisitesi, H₂O₂ dahil olmak üzere ROS gelişimini hızlandırır ve bu da ikincil oksidatif strese neden olarak büyümenin erken aşamalarında inhibisyona yol açar (Haider ve ark., 2021).

Tüm bu veriler dikkate alındığında birçok tarım alanında bilinçsiz bir şekilde ve yaygın olarak pestisit ve herbisit kullanıldığı için ve sulama sularına karışan sanayi atıklarının da arsenik, kadmiyum ve kurşun bileşikleri içerebileceği göz önüne alınarak çalışma planlanmıştır. Bu çalışmada ağır metal stresi karşısında bitkilerin tohum çimlenme yüzdeleri, kök gövde uzunlukları, kuru ve yaş ağırlık gibi fizyolojik parametrelerin yanında, stres karşısında primer cevaplarından olan antioksidan enzimlerin gen ekspresyon seviyeleri, lipid peroksidasyonu seviyeleri ve total protein içerikleri incelenerek kısa süreli ağır metal stresinin etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bitkilerin yetiştirilmesi ve ağır metal uygulanması

Araştırmada Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsünde adaptasyon çalışmalarından sonra geliştirilen *Hordeum vulgare* L. (Hasat) arpa tohumları kullanılmıştır. Deneye dâhil edilen tüm tohumlar çimlendirilmeden önce %1,5'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 10 dk süre ile yüzey sterilizasyonu uygulanmıştır. Sterilizasyondan sonra tohumlar birkaç kez distile su ile yıkanmıştır. Çimlendirmenin gerçekleştirileceği petri kapları 1 saat boyunca 120 °C de pastör fırınında sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra tohumlar her petriye kurutma kâğıtları arasına 25 adet tohum yerleştirilerek bitki büyütme kabininde 20 °C de fotoperiyot uygulanarak çimlenmeye bırakılmıştır (Şekil 1). Ağır metal uygulaması için taze hazırlanmış farklı konsantrasyonlarda (15 µM, 30 µM ve 60 µM) (As, Pb ve Cd) ağır metal içeren karışım ile (10 ml) sulama yapılmış ve kontrol grubu distile su ile sulanmıştır.



Şekil 1. Bitki büyütme kabininde petri plakları.
Figure 1. Petri plates in the plant growth chamber.

Tohum çimlenmesine ağır metal karışımının etkisi

Çimlenme üzerine ağır metal etkisini belirlemek için petri plaklarındaki tohumlar farklı konsantrasyonlarda taze hazırlanmış (As, Pb, Cd) ağır metal içeren solüsyonlar ile sulanmıştır. Kontrol grubu için distile su ile sulama yapılmış ve tüm gruplar karanlıkta 20° C’ de inkübasyona bırakılmıştır. Çimlenme sürecinde 4.

Gün sonunda plumula ve radikula uzunlukları ölçülmüştür. 2-5 mm’ den uzun olanlar çimlenmiş olarak kabul edilmiş ve çimlenen tohum sayısı belirlenmiştir. Çimlenme yüzdeleri kontrol grubundaki tohum sayısı baz alınarak hesaplanmıştır.

Kök ve gövde uzunluklarına ve taze ve kuru ağırlıklar üzerine ağır metal karışımının etkileri

Bu çalışma için ağır metal uygulanmadan önce, arpa tohumları 10 gün boyunca distile su ile sulanarak büyütülmüş 10 günlük büyütmeyi takiben metal iyonları içeren solüsyonlarla sulamaya devam edilmiş ve 1.ve 5 günlerde örnekler alınmıştır (Şekil 1, 2, 3).

1. gün kontrol grubu: Sulama distile su ile yapıldı.

1. gün deney grubu: 15, 30 ve 60 μM ağır metal içeren (As, Pb ve Cd) karışımı uygulanmıştır. Kök ve gövdeler 1. günün sonunda alınmıştır.



a b c d

Şekil 2: Kontrol grubu ve 15,30 ve 60 μM ağır metal karışımı uygulanmış tohumlar 1. gün sonu. a) Kontrol 1. gün grubu b) Deney 1. Gün (15 μM metal karışımı) c) Deney 1. Gün (30 μM metal karışımı) d) Deney 1. Gün (60 μM metal karışımı).

Figure 2: 1st day result of control group and 15, 30 and 60 μM heavy metal mixture treated seeds a) Control day 1 group b) Experimental day 1 (15 μM metal mixture) c) Experimental day 1 (30 μM metal mixture) d) Experimental day 1 (60 μM metal mixture).



a b c d

Şekil 3: Kontrol grubu ve 15, 30 ve 60 μM ağır metal karışımı uygulanmış tohumlar 5. gün sonu. a) Kontrol 5. gün grubu b) Deney 5. Gün (15 μM metal karışımı) c) Deney 5. Gün (30 μM metal karışımı) d) Deney 5. Gün (60 μM metal karışımı).

Figure 3: Control group and 15, 30 and 60 μM heavy metal mixture treated seeds at the end of day 5. a) Control day 5 group b) Experimental day 5 (15 μM metal mixture) c) Experimental day 5 (30 μM metal mixture) d) Experimental day 5 (60 μM metal mixture).

Taze- kuru ağırlıkları ve kök, gövde uzunluklarını belirlemek için en uzun kök ve gövde seçilerek ölçülmüş, uzunluklar kaydedilmiştir. Köklerin hipokotilden kök saçağı ve gövdesi kesildikten sonra hassas terazi kullanılarak taze ağırlıkları bulunmuştur. Kuru ağırlıkları ölçülmek için önce kök ve gövdeler etüvde 80°C’de kurutulmuştur (24 saat) ve kök ve gövdelerin kuru ağırlıkları belirlenmiştir.

Lipit peroksidasyonunun ölçülmesi

Thiobarbutirik asit (TBA) yöntemi kök ve gövde örneklerindeki lipid peroksidasyonunu belirlemek için kullanılmıştır. Bu yöntemde MDA ölçümü yapılmıştır (Sun ve ark., 2008). Çimlenen tohumlardan taze olarak kök ve gövde örnekleri 0,5 g tartılarak dondurulmuştur (80°C). Dondurulmuş örnekler %10’ luk Trikloroasetik asit içinde (TCA) hazırlanmış olan %0,25’lik TBA’ da cam homojenizatör kullanılarak homojenize edilmiş ve 95°C’de 30 dk. kaynatılmıştır. Ardından hızla soğutularak ve 10 dk santrifüj edilmiştir (10.000 x g). Elde edilen süpernatantın absorbanları 532 ve 600 nm’ de ölçülmüştür. Lipid peroksidasyonunu hesaplamak için $\epsilon = 1,55 \text{ mM cm}^{-1}$ kullanılmıştır.

Bitki dokularındaki protein miktarlarına ağır metallerin etkisi

Farklı konsantrasyonlarda ağır metal karışımı uygulanmış ve çimlenmeye bırakılmış kontrol ve deney gruplarının kök ve gövdelerindeki protein tayini gerçekleştirilmiştir (Sanal ve ark., 2014). Protein tayini için Lowry yöntemi kullanılmıştır (Lowry ve ark., 1951).

Antioksidan enzimlerin gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi

Tüm deney gruplarından elde edilen enzimlerin ekspresyon analizleri için 0,2 gr taze örnekler uygun tamponda sıvı azot ve boncuklar kullanılarak homojenize edilmiş ve total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonunda Total RNA PureLink® RNA Mini Kit (Life Sciences)

kullanılmıştır. Örneklerden izole edilen RNA miktarları Qubit® Fluorometer (Invitrogen) ile belirlenmiş ve PCR şartları Step 1: 25°C, 10 dk; Step 2: 37 °C, 120 dk; Step 3: 85 °C, 5 dk olacak şekilde High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) kullanılarak programlanmıştır. cDNA sentezi yapıldıktan sonra elde edilen cDNA’lar -20 C’de saklanmıştır. Her bir enzim için uygun primerler seçilerek enzimlerin gen ifadelerindeki değişiklikler RT-PCR ile belirlenmiştir. Her bir enzim ve düzeltme faktörü olarak housekeeping gen GAPDH için kullanılan primerler çizelgede verilmiştir. (Çizelge 1). Elde edilen syber green mix, cDNA ve primerler için PCR program: 1 döngü 2 dakika 50°C ve 10 dakika 95°C, ardından 40 döngü denaturasyon (95°C 15 s) ve annelling ve uzatma (60°C’ de 1 dakika olacak şekilde uygulanmıştır. Gen ekspresyonlarındaki farklar $\Delta\Delta\text{Ct}$ metodu kullanılarak karşılaştırılmıştır. Kalibrasyon eğrisi için ve düzeltme faktörü için GAPDH gen ekspresyonları kullanılmıştır.

Ağır metal birikiminin belirlenmesi

Çimlendirilen bitki örneklerinden 0,5 g alınmış deiyonize su ile yıkanarak ve fazla suyu emdirildikten sonra taze ağırlıkları kaydedilmiştir. Her gruba ait örnekler nitrik asit solüsyonuna (%65) konularak, toplamda 10 ml’ye tamamlanmıştır. Elde edilen bu solüsyon mikrodalga yakma sisteminde protokole göre yakılarak homojenize edilmiştir (CEM Mars 6) (Power: 1030-1800, sıcaklık:180, Ramp Time 20.00-25.00, Hold Time: 10: 00). Protokol sonunda elde edilen örnekten 1 ml alınarak nitrik asid (%2) ile seyreltilmiş ve Agilent 7700 x ICP-MS’de bitki dokularında birikmiş olan metal miktarları belirlenmiştir. Deney 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

İstatistik

İstatistiksel analizler SPSS kullanılarak yapılmış ve tanımlayıcı istatistikler aritmetik ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 1. Antioksidan enzim genleri için kullanılan primerler.

Table 1. Primers used for antioxidant enzyme genes.

| Antioksidan enzim genleri Antioxidant enzyme genes | Forward primer | Reverse Primer |
|-------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| SOD | F (5'-GTTCCGGTGACAACACCAATG-3') | R(5'-GGAGTCGGTGATGTTGACCT-3') |
| CAT | F(5'-TACGAGCAGGCCAAGAAGTT-3') | R(5'-ACCTTGTACGGGCAGTTCAC-3') |
| GS | F (5'-TGGGACCAGCAAGTAAAACC-3') | R(5'-TCGCGAATG TAGAACTCGTG-3') |
| GAPDH | F (5'- TTGGTATCGTGGAAGGACTCA-3') | R (5'- TGTCATCATATTTGGCAGGTTT-3') |

BULGULAR VE TARTIŞMA

Tohum çimlenmesi üzerine etki

Petri plaklarına 25 adet tohum yerleştirilmiştir. Arsenik, kurşun ve kadmiyum içeren karışımlar uygulanmış tohumlar 20° C’ de karanlıkta çimlendirilmiştir. Kontrol grubunda ise distile su kullanılmıştır. 4. Günün sonunda çimlenen tohumların 2 mm den uzun olan radikula ve plumulaları üzerinden çimlenen tohum sayısı belirlenmiş, kontrol plaklarındaki sayı baz alınarak çimlenme yüzdeleri hesaplanmıştır.

Ağır metal uygulanan tüm deney gruplarında konsantrasyon artışı ile ilişkili olarak çimlenme yüzdelerinde anlamlı azalma olduğu görülmüştür. ($p<0,05$) (Çizelge 2).

Ağır metal karışımının kök, gövde taze ve kuru ağırlıklara etkisi

Ağır metal uygulanan gruplarda 1. günde kök ağırlıklarında anlamlı değişiklikler gözlenmiştir. 15 μM ’ lık ağır metal uygulamasında ağırlıklarda azalma, 30 μM ve 60 μM konsantrasyonlarda artış olduğu gözlenmiştir. Gövde örneklerinde ise taze ve kuru ağırlıklar açısından değerlendirildiğinde kontrole göre 15 μM konsantrasyonda ağırlıklarda azalma izlenirken 30 μM ve 60 μM ağır metal karışımı uygulanan gruplarda artma olduğu gözlenmiştir. Kök ve gövdede 1. günde kontrol ile karşılaştırıldığında taze ve kuru ağırlıklardaki değişim benzerlik göstermektedir.

Taze ağırlıklar da ise 5. günde 15 μM ve 30 μM ’ lık konsantrasyonlar da artmış, 60 μM konsantrasyonda azalış olarak gözlenmiş, 15 μM konsantrasyonda kuru ağırlıklar kontrole göre aynı kalırken, 30 μM konsantrasyonda kuru ağırlıklarda artış, 60 μM da ise azalış tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 3).

Çizelge 2: Arsenik, kurşun ve kadmiyum ‘un tohum çimlenmesi üzerine etkisi.

Table 2: Effect of arsenic, lead and cadmium on seed germination.

| (As,Pb,Cd) Karışımın konsantrasyonu (μM) (As,Pb,Cd) Concentration of the mixture (μM) | 1. gün çimlenme yüzdesi (%) First day germination percentage (%) | 5. gün çimlenme yüzdesi (%) Fifth day germination percentage (%) |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Kontrol | 93,3±5,47 | 91,1±1,55 |
| 15 μM metal karışımı | 83,53±4,99 | 89,93±4,73 |
| 30 μM metal karışımı | 86,63±2,63 | 89,63±4,60 |
| 60 μM metal karışımı | 89,96±7,17 | 89,96±5,41 |

Çizelge 3. Ağır metal karışımının kök, gövde taze ve kuru ağırlıklara etkisi.

Table 3. Effect of heavy metal mixture on root, stem fresh and dry weights.

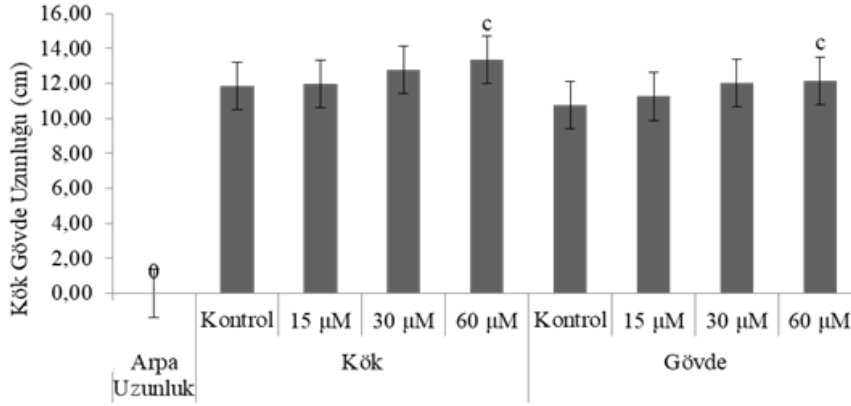
| (As,Pb,Cd) karışımının konsantrasyonu (μM) (As,Pb,Cd) Concentration of the mixture (μM) | Arpa kök/barley root 1.gün/first day | | Arpa kök/barley root 5. gün/fifth day | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| | Kök taze ağırlık Root fresh weight (g) | Kök kuru ağırlık Root dry weight (g) | Kök taze ağırlık Root fresh weight (g) | Kök kuru ağırlık Root dry weight (g) |
| Kontrol | 1,865±0,113 | 0,076±0,018 | 2,550±0,10 | 0,092±0,010 |
| 15 μM | 1,602±0,091 | 0,130±0,020 | 1,7980±0,15 | 0,097±0,021 |
| 30 μM | 2,052±0,123 | 0,121±0,004 | 1,598±0,065 | 0,099±0,006 |
| 60 μM | 2,558±0,021 | 0,109±0,032 | 1,186±0,136 | 0,089±0,025 |
| (As,Pb,Cd) karışımının konsantrasyonu (μM) (As,Pb,Cd) Concentration of the mixture (μM) | Gövde/Stem 1. Gün/first day | | Gövde/Stem 5. gün/fifth day | |
| | Gövde taze ağırlık Stem fresh weight (g) | Gövde kuru ağırlık Stem dry weight (g) | Gövde taze ağırlık Stem fresh weight (g) | Gövde kuru ağırlık Stem dry weight (g) |
| Kontrol | 2,235±0,127 | 0,175±0,009 | 1,445±0,095 | 0,190±0,060 |
| 15 μM | 1,662±0,190 | 0,130±0,054 | 2,678±0,042 | 0,196±0,034 |
| 30 μM | 2,638±0,065 | 0,208±0,009 | 2,884±0,120 | 0,208 ±0,010 |
| 60 μM | 2,558±0,021 | 1,967±0,043 | 2,440±0,205 | 0,178±0,028 |

Ağır metal karışımının kök gövde uzunluklarına etkisi

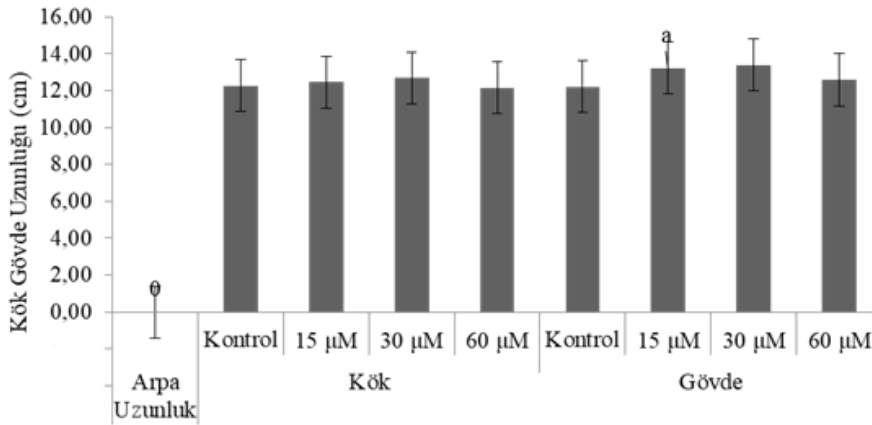
Belirlenen süre sonunda kök gövde uzunlukları ölçüldüğünde, 1. gün de kök ve gövde uzunlukları kontrole göre 15 μM ve 30 μM 'lık dozlarda uzunluklarda anlamlı bir değişiklik tespit edilememiştir ($p>0,05$). 60 μM 'lık konsantrasyonda kontrol grubuna

göre kök ve gövde uzunluklarında bir artış gözlenmiştir. ($p<0,05$)(Şekil 4).

5. gün sonunda ise 15 μM ve 30 μM 'lık düşük dozlarda kök uzunluklarında anlamlı olmayan bir artışa ($p>0,05$), 60 μM konsantrasyonda ise yine anlamlı olmayan bir azalmaya rastlanmıştır ($p>0,05$) (Şekil 5).



Şekil 4. 1.gün kök ve gövde uzunluklarının kontrole göre değişimi. c: 60 μM kontrol grubu ile karşılaştırma, $p<0,05$
Figure 4. Change in root and stem lengths on the 1st day compared to the control. c: comparison with 60 μM control group, $p<0,05$



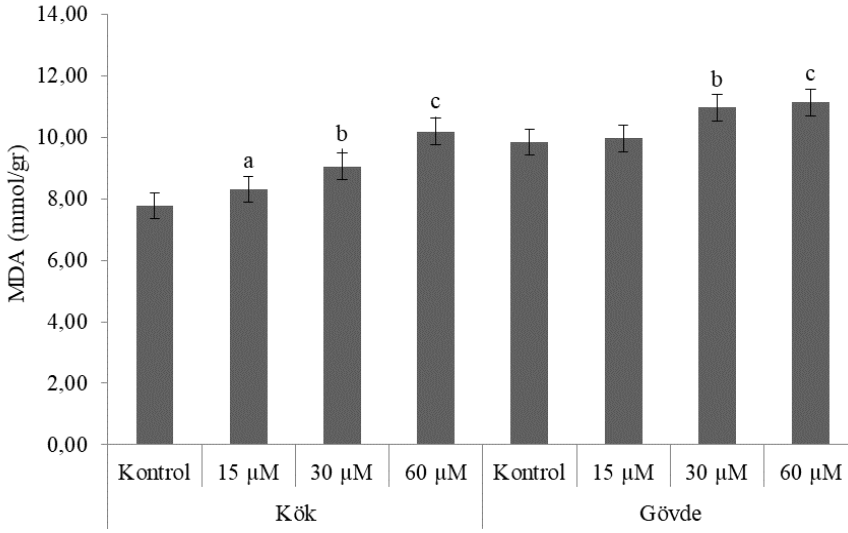
Şekil 5. 5.gün kök ve gövde uzunluklarının kontrole göre değişimi. a: 15 μM kontrol grubu ile karşılaştırma, $p<0,05$
Figure 5. Change in root and stem lengths on the 5th day compared to the control. a: Comparison with 15 μM control group, $p<0,05$

Lipid peroksidasyonunun ölçülmesi

Çalışılan tüm konsantrasyonlarda köklerde kontrol grubu 1. gün sonunda deney grupları ile karşılaştırıldığında MDA miktarlarında anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0,05$). Gövde ve kontrol grubu örneklerinin MDA seviyeleri karşılaştırıldığında ise 15 μM konsantrasyonda anlamlı bir değişiklik meydana

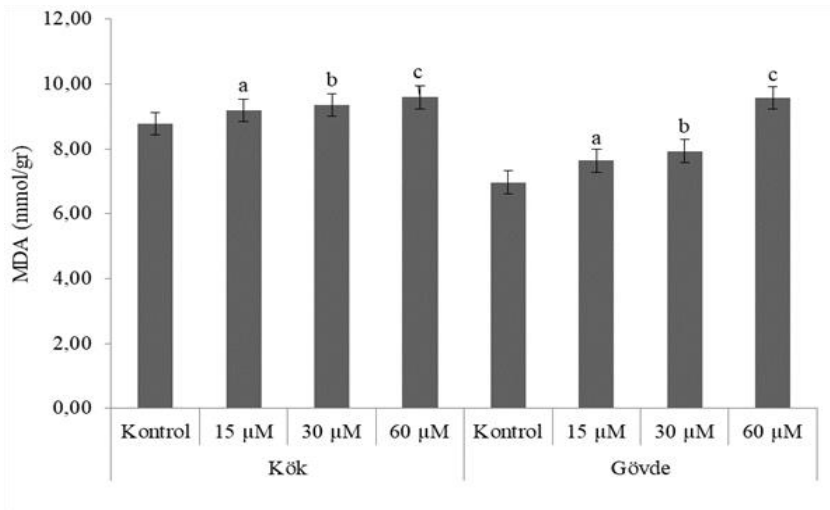
gelmezken ($p>0,05$), 30 μM ve 60 μM da artış gözlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 6).

5. günde kök örneklerinde kontrole göre ağır metale maruz kalan gruplardaki MDA seviyesi artmış ($p<0,05$), gövde örneklerinde de benzer şekilde anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 7).



Şekil 6. 1. gün kök ve gövde MDA içeriği. a: 15 μM kontrol grubu ile karşılaştırma, $p<0,05$ b: 30 μM kontrol grubu ile karşılaştırma, $p<0,05$ c: 60 μM kontrol grubu ile karşılaştırma, $p<0,05$.

Figure 6. Root and stem MDA content on Day 1. a: Comparison with 15 μM control group, $p<0,05$ b: Comparison with 30 μM control group, $p<0,05$ c: Comparison with 60 μM control group, $p<0,05$.



Şekil 7. 5. gün kök ve gövde MDA içeriği a: 15 μM kontrol ile karşılaştırma $p<0,05$ b: 30 μM kontrol ile karşılaştırma $p<0,05$ c: 60 μM kontrol ile karşılaştırma $p<0,05$

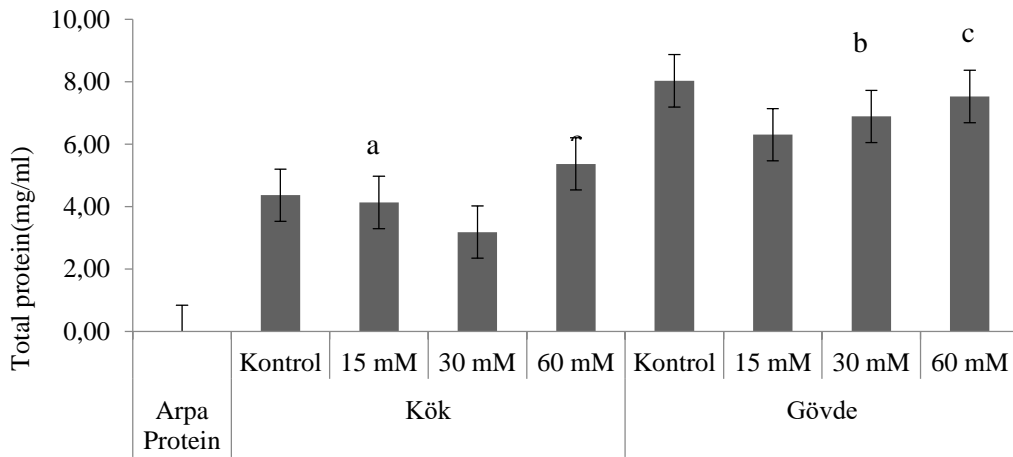
Figure 7. Root and stem MDA content on day 5. a: Comparison with 15 μM control group $p<0,05$ b: Comparison with 30 μM control group $p<0,05$ c: Comparison with 60 μM control group $p<0,05$

Bitki dokularındaki protein miktarlarına ağır metal karışımının etkisi

Kök örneklerinde 1.günde kontrol ile karşılaştırıldığında 15 μM 'lık uygulamada total protein içeriği azalma göstermiştir ($p < 0,05$). 30 μM konsantrasyonda gözlenen değişikliğin anlamlı olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). 60 μM uygulamada köklerde total protein içeriğinde kontrole göre artış belirlenmiştir ($p < 0,05$). Gövde örneklerinde 15 μM 'lık konsantrasyonda protein içeriğinde bir düşme gözlenmiş, ancak anlamlı bulunamamıştır ($p > 0,05$).

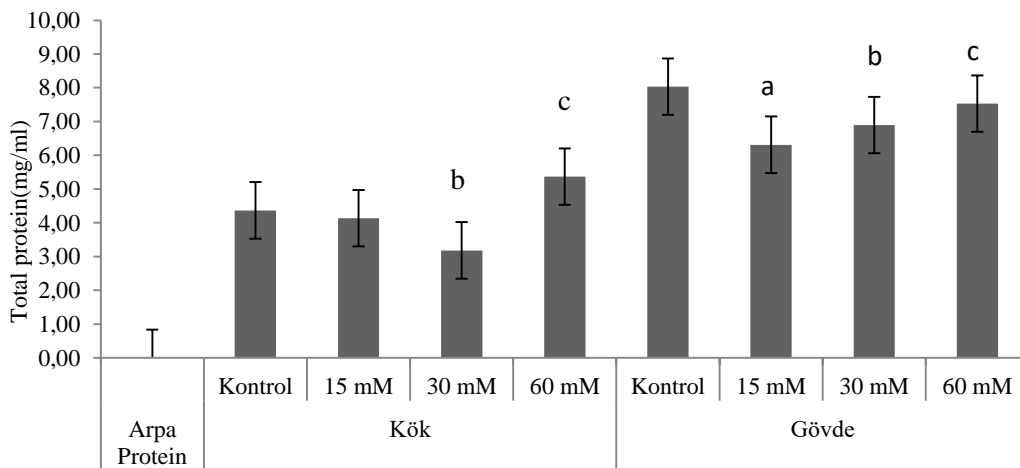
30 μM ve 60 μM ağır metal karışımına maruz kalan gruplarda ise bir artış tespit edilmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 8).

5. gün sonunda yapılan ölçümlerde kök protein içeriklerinde 15 μM konsantrasyonda bir değişiklik tespit edilemezken ($p > 0,05$), 30 μM 'lık uygulamada protein miktarında azalma gözlenmiştir ($p < 0,05$). 60 μM 'lık doza maruz kalan örneklerde protein miktarları kontrol ile kıyaslandığında artış göstermiştir ($p < 0,05$). Buna karşılık incelenen tüm dozlarda gövde örneklerinde protein miktarları kontrole göre düşmüştür ($p < 0,05$)(Şekil 9).



Şekil 8. 1.gün de kök ve gövde total protein içerikleri. a: 15 μM kontrol ile karşılaştırma, $p < 0,05$ b: 30 μM kontrol ile karşılaştırma, $p < 0,05$ c: 60 μM kontrol ile karşılaştırma, $p < 0,05$.

Figure 8. Root and stem total protein contents on day 1. a: Comparison with 15 μM control, $p < 0,05$ b: Comparison with 30 μM control, $p < 0,05$ c: Comparison with 60 μM control, $p < 0,05$.



Şekil 9. 5.Günde kök ve gövde total protein içerikleri. a: 15 μM kontrol ile karşılaştırma, $p < 0,05$ b: 30 μM kontrol ile karşılaştırma, $p < 0,05$ c: 60 μM kontrol ile karşılaştırma, $p < 0,05$.

Figure 9. Root and stem total protein contents on day 5 a: Comparison with 15 μM control, $p < 0,05$ b: Comparison with 30 μM control, $p < 0,05$ c: Comparison with 60 μM control, $p < 0,05$.

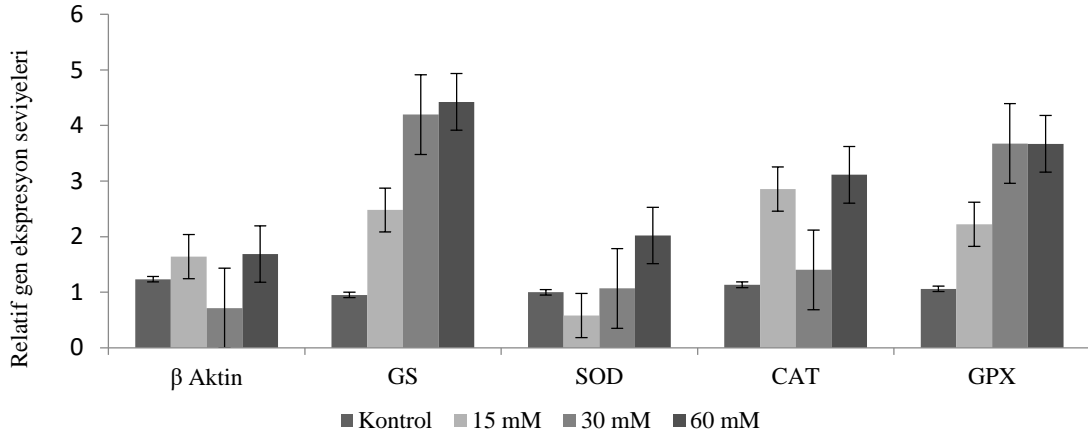
Antioksidan enzimlerin gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi

As, Cd ve Pb'a maruz kalma ile ilişkili olarak meydana gelen metal stresi sebebi ile bitkilerin birincil cevaplarından birisi bazı antioksidan enzimlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimlerdir. Bu değişimler referans gen olarak seçilen β aktin geni seviyeleri ile karşılaştırılarak incelenmiştir.

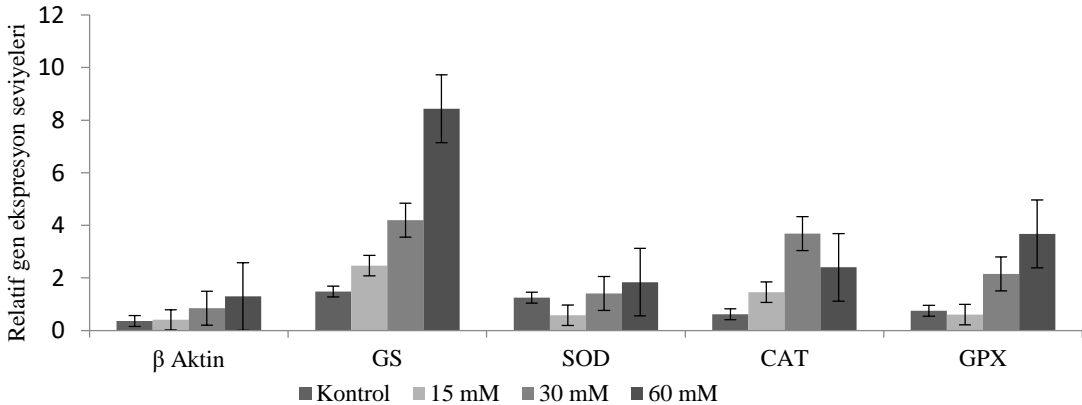
Referans geni olarak seçtiğimiz β Aktin genin ifade seviyeleri 1. gün sonunda kontrol grubundaki gen ifade seviyeleri ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmanın sonuçlarına göre 30 μ M'lık ağır metal karışımı ile muameleden sonra gen ifade seviyeleri azalma gösterirken, 30 ve 60 mM konsantrasyonlarda artmıştır. GS enziminin gen ifade seviyelerinin ise tüm deney

gruplarında artış gösterdiği, SOD enziminin gen ifadesinin 15 μ M'lık ağır metal uygulamasında azaldığı, diğer iki dozda artış gösterdiği tespit edilmiştir. Yine benzer şekilde antioksidan savunmanın önemli enzimlerinden CAT ve GPX enzimlerinin gen ifade seviyeleri kontrole göre belirgin şekilde artmıştır ($p < 0,05$) (Şekil 10).

β Aktin seviyeleri ile kıyaslandığında 5. günün sonunda GS enziminin gen ifadesi kontrole göre artarken, SOD enziminin gen ifadesi 15 μ M uygulama dozunda azalış, diğer iki dozda ise artış şeklinde gözlenmiştir. CAT enzimi açısından değerlendirme yaptığımızda ise gen ifadesinin bütün gruplarda arttığı, GPX enziminin gen ifade seviyelerinin ise 15 μ M konsantrasyonda azaldığı, 30 ve 60 μ M lık konsantrasyonlarda arttığı tespit edilmiştir. (Şekil 11).



Şekil 10. 1.gün antioksidan enzimlerin gen ekspresyon seviyeleri.
Figure 10: Gene expression levels of antioxidant enzymes on day 1.



Şekil 11. 5.gün antioksidan enzimlerin gen ekspresyon seviyeleri.
Figure 11: Gene expression levels of antioxidant enzymes on day 5.

Bitki örneklerinde ağır metal tayini

Her iki deney grubunda da kontrol grubu karşılaştırıldığında As, Cd ve Pb'un bitki kök dokularında konsantrasyon artışı ile ilişkili olarak biriktiği tespit edilmiştir. 60 µM 'lık konsantrasyonda dokulardaki birikim yüksek olarak gözlenmiştir (Çizelge 4 ve 5).

Çevre kirliliğinde büyük öneme sahip olan ağır metaller bitkilerde fizyolojik, makroskopik, mikroskopik değişikliklere sebep olmaktadır. Bitkiler insan beslenmesinin temel gıdalarından birisi olduğu için ağır metallerin gıdalardaki varlığı insanlığı tehdit etmektedir. Su ve gıdalarda toksik maddelerin varlığı istenmemektedir. Yapılan araştırmalar sıfır ağır metal olmasının mümkün olamayacağını ve özellikle ağır metallerin birçok şekilde gıdalarımıza dahil olabildiğini göstermektedir. Ağır metallerin insanların besinlerine bulaşabilir olması ciddi bir sağlık sorunu olarak görülmektedir.

Tarımda verimi artışı sağlamak oldukça önemlidir. Bunun için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

Gübreleme ve arıtma çamurlarının kullanımı bu yöntemlerden biridir. Ancak verimi arttırmak adına fosfat içeriği yüksek gübre kullanımı ve endüstriyel kaynaklı arıtma ile elde edilen çamurlarının ağır metal içermelerinden dolayı tüm dünyada tarım toprakları ağır metal kirliliği ile karşı karşıyadır. Bu ağır metaller içinde Cd birçok ağır metale göre topraktan bitkiye geçişi daha fazla olabilen bir ağır metaldir. Bu nedenle besin zincirine katılımı daha yüksek oranda gerçekleşmektedir. İnsan vücudunda bulunan Cd'un % 42'si tahıllar aracılığı ile beslenme sürecinde sisteme dahil olmaktadır (Bitarishvili ve ark., 2023).

Diğer ülkelerde olduğu gibi özellikle ülkemizde maltlık olarak ve hayvan yemi endüstrisi için yetiştirilen arpada ağır metaller maruz kalmakta ve bunun sonucu olarak bitkinin verimi ve elde edilen ürünün kalitesini etkilemektedir (Sharma ve ark., 2023). Tohumların çimlenme aşamaları bitkiler için hassas bir dönemdir. Savunma mekanizmaları henüz tam olarak gelişmemiştir.

Çizelge 4. 1.gün ağır metal birikimi (ppb).
Table 4. 1st day heavy metal accumulation (ppb).

| | Kontrol | Control 1.Gün First day | 15 µM 1. Gün First day | 30 µM 1.Gün First day | 60 µM 1.Gün First day |
|----|---------|----------------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| As | | 0,104±0,040 | 0,28±0,112 | 0,286±0,032 | 1,381±0,202 |
| Cd | | 0,039±0,005 | 0,177±0,081 | 0,195±0,012 | 1,065±0,293 |
| Pb | | 0,428±0,007 | 0,524±0,014 | 0,61±0,032 | 1,647±0,425 |

Çizelge 5. 5.gün ağır metal birikimi (ppb).
Table 5. 5th day heavy metal accumulation (ppb).

| | Kontrol | Control 5.Gün Fifth day | 15 µM 5.Gün Fifth day | 30µM 5.Gün Fifth day | 60µM 5.Gün Fifth day |
|----|---------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| As | | 0,126±0,018 | 0,366±0,003 | 0,983±0,115 | 1,859±0,551 |
| Cd | | 0,098±0,017 | 0,354±0,034 | 1,024±0,400 | 2,38±0,251 |
| Pb | | 0,856±0,087 | 1,162±0,072 | 1,975±0,272 | 3,066±0,672 |

Bu süreçte ağır metale maruz kalmak bitki gelişimi için bir risk oluşturmaktadır (Bitarishvili ve ark., 2023). Bu nedenle toksisite çalışmalarında toksisitenin seviyesi değerlendirilirken bu aşamanın incelenmesi önemlidir (Liu ve ark., 2005).

Arpanın çimlenme sürecinin değerlendirildiği bu çalışmada uygulanan farklı dozlardaki ağır metal uygulamasının konsantrasyon artışı ile ilişkili olarak tohumlarda çimlenme yüzdesini düşürdüğü gözlenmiştir. Benzer şekilde arpa bitkisi ile yapılan bir çalışmada kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında As uygulanan bitkilerde sürgün uzunluğunda, kök uzunluğunda, sürgün taze ağırlığında, kök taze ağırlığında ve sürgün kuru ağırlığında önemli bir azalma görüldüğü bildirilmiştir (Nazir ve ark., 2022).

Güncel araştırma sonuçları, Pb stresinin arpa bitkilerinin verim özelliklerini ve tane kalite karakteristiklerini önemli ölçüde ($p < 0,05$) azalttığını ortaya koymuştur (Islam ve ark.,2021; Sharma ve ark.,2024). Çalışmamız bulunan sonuçlarla uyumludur. Kök ve gövde uzunlukları kontrol grubu ile kıyaslandığında sadece 60 μM doz uygulanan grupta artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p < 0,05$). 5 günlük muamelenin sonunda 15 μM ve 30 μM doz uygulanan gruplarda, uzunlukların kontrole göre artmış olduğu, 60 μM 'lık konsantrasyonda uzunluklarda gözlenen azalmanın anlamlı olmadığı görülmüş ve gövde uzunluklarındaki kıyaslamada 15 μM 'lık konsantrasyonda anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Xiaoyung (2023), kurşun ve kadmiyum toksisitesini araştırdığı bir çalışmada kurşun ve kadmiyumun kök gövde uzunluklarını önemli ölçüde etkilediğini bildirmiştir. Benzer şekilde Sharma ve ark. (2024) kurşun toksisitesinden arpa kök sürgün uzunluklarının kötü şekilde etkilendiğini gözlemlenmişlerdir.

Abdullah ve ark. (2024), kurşuna maruz kalmanın köklerde büyüme ve gelişmesinin azalması, cüceleşme ve kloroz ile sonuçlandığını bildirmişlerdir. Çalışmamız sırasında gözlemlerimize dayanarak, konsantrasyon ile ilişkili bir şekilde arpa bitkisinde yapraklarda ve köklerde lokal kahverengileşmeler ve kloroz tespit edilmiştir.

Lipid peroksidasyon seviyelerinin saptanmasında stres indikatörü olarak kabul edilen MDA miktarının ölçülmesi sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. (Taulavuori ve ark., 2001; Bagues ve ark., 2024). 1.

günde çalışmamızda ağır metale maruz kalan bütün gruplarda arpa köklerinde MDA miktarında bir artış gözlenmiştir ($p < 0,05$). Gövde örneklerinde düşük konsantrasyonda (15 μM) anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, 30 μM ve 60 μM ağır metal uygulanmalarında bir artış tespit edilmiştir ($p < 0,05$). 5.gün sonunda ise kök ve gövde örneklerinde MDA miktarları tüm dozlarda yükselme göstermiştir ($p < 0,05$). Al- Ghzawi ve ark. (2019), arpada artan konsantrasyona bağlı olarak MDA seviyelerinin anlamlı şekilde arttırdığını tespit etmişlerdir. Benzer şekilde Mfarrej ve ark. (2024), artan konsantrasyonlarda kurşun muamelesine maruz kalmış arpa örnekleri ile yaptıkları çalışmada uygulanan kurşun artışı ile birlikte MDA miktarının arttığını belirtmişlerdir. Navapour ve ark. (2020) tarafından buğdayda farklı Pb konsantrasyonlarının lipid peroksidasyonuna sebep olduğu ve malondialdehit seviyelerinin konsantrasyon ve süreye bağlı olarak arttığı bildirilmiştir. Uyguladığımız ağır metal karışımı (As, Pb ve Cd) arpa bitkisinde oksidatif stres oluşturmuştur. Bunun en önemli kanıtı olarak da lipid peroksidasyonunun bir işareti olan MDA miktarlarında bir artışın meydana gelmiş olması gösterilebilir. Bitki hücreleri ağır metal toksisitesine maruz kaldığında ferritinler, metalotiyoneinler (MT'ler) ve fitokelatınler (PC) ve ilgili peptitler gibi detoksifikasyona katılır. Bu sistemler aşırı yüklendiğinde, mevcut metal toksisitesinin üstesinden gelmek için oksidatif stres savunma mekanizmaları devreye girer. Çalışmamızda ağır metal toksisitesinde kök ve gövdenin protein içeriklerinde doza bağlı artışlar gözlenmiştir. Pb stresinin, oksidatif hasardan sorumlu olan bitkilerde mevcut proteinlerin konsantrasyonunu azalttığı bildirilmiştir. Azalma, Pb detoksifikasyonu için mevcut proteinlerin kullanımının artmasından kaynaklanmıştır. Sharma ve ark. (2024) kurşun toksisitesi çalışmalarında arpa tanelerindeki toplam çözümlü proteininin, Pb stresi altında azaldığını göstermiştir. Sanal ark. (2014) arpa tohumuyla gerçekleştirdikleri çalışmalarda (0.5- 16 mM) doz aralığında arsenik uygulamalarında köklerde total protein miktarlarının azaldığını tespit etmişlerdir. Metal toksisitesi, maruz kalan bitki kök ve gövdelerinde metale maruz kalma altında stres proteinlerinin indüklenmesine neden olur. Cd stresine maruz bırakılan iki arpa genotipinde anti-oksidatif enzimle ilişkili genlerin ifadesini arttığı bildirilmiştir (Kanwal ve ark., 2024). Bu stres proteinlerinin

muhtemelen GSH (glutasyon) ve PC biyosentezinde yer alan çeşitli antioksidan enzimleri ve diğer enzimleri ve ayrıca bazı ısı şoku proteinlerini içerdiği ifade edilmektedir (Öztetik, 2016).

Çalıştığımız tüm gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ağır metallerin konsantrasyon ile ilişkili olarak kök ve gövde dokularında artarak biriktiği gözlenmiştir. Çalışmamızla benzer şekilde Haddad ve ark. (2023) arpada uzun vadede metal birikiminin arttığı, arpanın vejetatif kısımlarındaki Pb, Krom (Cr) ve Cd konsantrasyonu, sulama suyunda artan metal uygulamasıyla birlikte artan bir eğilim gösterdiğini ifade etmişlerdir. Tüm bunlara dayanılarak yaygın ve aynı zamanda bilinçsiz bir şekilde tarım ilacı kullanımı ülkemizde de mevcut olduğundan ve sulama amaçlı kullanılan sulara birlikte karışan As, Cd ve Pb sanayi atıklarının da bulunabileceğinden, bitkilerin birincil cevaplarından olan antioksidan enzim seviyelerinde bir takım değişimler olabileceği göz önüne alınarak bazı enzimlerin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir.

Antioksidan enzimlerin gen ifade seviyeleri değerlendirildiğinde GS enziminin gen ifadesinin 1 günün sonunda bütün deney gruplarda kontrole göre arttığı, SOD enziminin ifadesinde 15 µM'lık konsantrasyonda azalma gözlenirken diğer iki dozda bir artış izlendiği tespit edilmiştir. Ağır metal iyonu uygulanan tüm gruplarda CAT ve GPX enzimlerinin gen ifadeleri artmıştır. GS ve CAT enzimlerinin gen ifade seviyeleri 5.günün sonunda kontrol grubuna göre artma gösterirken SOD ve GPX enzimlerinde 15 µM dozda ifade seviyelerinde bir düşme, diğer iki dozda artma izlenmiştir. SOD, GS, GPX ve CAT gen ifade seviyeleri 15 µM'lık dozda azalmakla birlikte, doza ve uygulama süresine bağlı olarak savunma sisteminin harekete geçtiğini gösterir biçimde artmıştır. Benzer sonuçların *L. esculentum* (domates), *Morus alba* L. (dut) ve *Cicer arietinum* L. (nohut) gibi bitkilerde gerçekleştirilen stres çalışmalarında SOD enziminin aktivitesinde de gözlemlendiği bildirilmiştir. (Harinasut ve

ark., 2003). SOD enzimi kodlayan genlerin ifade seviyelerinin araştırıldığı bir çok çalışmada çeşitli stres koşullarına maruz bırakılan farklı bitki türlerinde bu enzimin gen ifadesinde değişikliklerin olduğu bu değişikliklerin ise stres ile baş etmede bitkiye yardımcı olduğu bildirilmiştir (Aydın ve ark., 2012; Kanwal ve ark., 2024). Yine bir çok çalışmada farklı bitkilerde katalaz genlerinin strese bağlı olarak ifade düzeylerinin arttığı ifade edilmiştir. (Millar ve ark., 2003; Bitarishvili ve ark.,2023; Direk ve ark., 2024; Sharma ve ark., 2024). Sonuç olarak çalışmamızda da ağır metale uygulamasının bitkiler için en savunmasız olduğu ifade edilen çimlenme periyodunda bitki gelişimini olumsuz etkilediği tespit edilmiştir.

Endüstrileşmenin bu kadar hızlı olduğu bir dönemde tüm toplumlarda, kentleşme ile birlikte endüstriyel ve kentsel atıklar artmakta, tarım ilacı ve gübrenin bilinçsiz kullanımı içeriklerindeki zararlı etkileri olan ağır metallerin sulardaki ve topraktaki seviyelerini hızla kabul edilebilir değerlerin üzerine çıkarmaktadır. Bir çok bitki türü ile yapılan çalışmalarda ağır metallere maruz kalmanın oksidan stresin birincil cevabı olan antioksidan enzimlerin aktivitelerinde değişikliklere sebep olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda bitkilerin antioksidan savunmasında da aktif görev aldığı bilinen bazı enzimlerin gen ifade seviyelerindeki değişikliklerin gözlenmesi literatürdeki aynı enzimlerin aktivitelerindeki değişimleri ile de uyumlu olduğundan, çalışmada elde ettiğimiz bulguların ileriki çalışmalarda bitkilerin çimlenme periyodunda ağır metale maruz kaldığı zaman savunma mekanizmalarının ayrıntılı analizlerinde araştırmacılara önemli katkılar sunacağını düşünmekteyiz.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Hülya Yıldır'ın tez çalışmasının bir kısmı olup, Trakya Üniversitesi Bilimsel araştırmalar Birimi TÜBAP tarafından 2015-38 No'lu proje ile desteklenmiştir.

LİTERATÜR LİSTESİ

- Adil, M. F., S. Sehar, G. Chen, Z. H. Chen, G. Jilani, A. N. Chaudhry, and I. H. Shamsi. 2020. Cadmium-zinc cross-talk delineates toxicity tolerance in rice via differential genes expression and physiological/ultrastructural adjustments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 190: 110076.
- Al-Ghzawi, A.L.A., W. Al Khateeb, A. Rjoub, A.R.M. Al-Tawaha, I. Musallam, K.O. Al Sane. 2019. Lead toxicity affects growth and biochemical content in various genotypes of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 25(1):55-61
- Ali, W., H. Zhang, M. Junaid, K. Mao, N. Xu, C., Chang, ... and Z. Yang. 2021. Insights into the mechanisms of arsenic-selenium interactions and the associated toxicity in plants, animals, and humans: A critical review. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* 51(7): 704-750.
- Aydin, S.S., E. Gökçe, İ. Büyük, and S. Aras. 2012. Characterization of stress induced by copper and zinc on cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings by means of molecular and population parameters. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 746 (1): 49-55
- Bagues, M., M. Neji, N. Karbout, F. Boussora, T. Triki, F. Guasmi, K. Nagaz. 2024. Mitigating Salinity Stress in Barley (*Hordeum vulgare* L.) through Biochar and NPK Fertilizers: Impacts on Physio-Biochemical Behavior and Grain Yield. *Agronomy* 14: 317.
- Bitarishvili, S., A. Dikarev, E. Kazakova, E. Bondarenko, A. Prazyan, E. Makarenko, D. Babina, M. Podobed, S. Geras'kin. 2023. Growth, antioxidant system, and phytohormonal status of barley cultivars contrasting in cadmium tolerance. *Environmental Science and Pollution Research* 30: 59749-59764.
- Direk, A., B. Arikan-Abdulveli, C. Ozfidan-Konakci, E. Yildiztugay, and A. Uysal. 2024. Effects of *Bacillus cereus* on physiological and biochemical characteristics of wheat under arsenic and cadmium stress: a biological agent to reduce heavy metal stress. *Plant Stress* 12:100458.
- Eren, A. ve H. Dağhan. 2024. Transgenik (p-cV-ChMTIIGFP) Tütün Bitkisinin Kurşun Fitoekstraksiyon Kapasitesinin Belirlenmesi ve Kurşunun Besin Elementi Alımına Etkisi. *MAS Journal of Applied Sciences* 9(3):690-699.
- Garellick, H., H. Jones, A. Dybowska, and E. Valsami-Jones. 2008. Arsenic pollution sources. 197:17-60.
- Haddad, M., D. Nassar, M. Shtaya. 2023. Heavy metals accumulation in soil and uptake by barley (*Hordeum vulgare*) irrigated with contaminated water. *Scientific Reports* 13: 4121.
- Haider, F. U., C. Liqun, J. A. Coulter, S. A. Cheema, J. Wu, R. Zhang, ... M. and Farooq. 2021. Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies. *Ecotoxicology and Environmental safety* 211: 111887
- Harinasut, P., D. Poonsopa, K. Roengmongkol, R. Charoensataporn. 2003. Salinity effects on antioxidant enzymes in mulberry cultivar. *Science Asia* 29: 109-113.
- Islam, S., Z.A. Parrey, S.H. Shah, F. Mohammad. 2021. Glycine betaine mediated changes in growth, photosynthetic efficiency, antioxidant system, yield and quality of mustard. *Scientia Horticulturae* 285: 110170.
- Kanwal, F., A. Riaz, A. Khan, S. Ali, and G. Zhang. 2024. Manganese enhances cadmium tolerance in barley through mediating chloroplast integrity, antioxidant system, and HvNRAMP expression. *Journal of Hazardous Materials*, 135777.
- Liu, X., S. Zhang, X. Shan, Y.-G. Zhu. 2005. Toxicity of arsenate and arsenite on germination, seedling growth and amyolytic activity of wheat. *Chemosphere* 61: 293-301.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1): 265-275.
- Mfarrej, M. F. B., S. Javed, R. Almeer, R. Alsaidalani, M. Kamel, M. H. Saleem and S. Ali. 2024. Phosphorus sources enhance barley growth and mitigate lead stress via antioxidant responses, proline metabolism, and gene expression. *South African Journal of Botany* 174: 138-151.
- Millar, A.H., V. Mittova, G. Kiddle, J.L. Heazlewood, C.G. Bartoli, F.L. Theodoulou, C.H. Foyer. 2003. Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiol.* 133: 443-447.
- Navabpour, S., A. Yamchi, S. Bagherikia, H. Kafi. 2020. Lead-induced oxidative stress and role of antioxidant defense in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants* 26: 793-802.
- Nazir, M.M., Q. Li, M. Noman, Z. Ulhassan, S. Ali, T. Ahmed, F. Zeng, G. Zhang. 2022. Calcium oxide nanoparticles have the role of alleviating arsenic toxicity of barley. *Frontiers in Plant Science* 13: 843795.
- Öztetik, E. 2016. Biochemical and physiological responses of metal toxicity in some barley and wheat varieties from Central Anatolia. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma* 9: 12-25.
- Rasheed, A., A. A. Khan, M. Nawaz, A. Mahmood, U. Arif, M. U. Hassan, ... and S. Fahad. 2023. Development of Aluminium (Al)-tolerant soybean using molecular tools: limitations and future directions. *Journal of Plant Growth Regulation* 42(12): 7403-7417.
- Sanal, F., G. Şeren, U. Güner. 2014. Effects of arsenate and arsenite on germination and some physiological attributes of barley *Hordeum vulgare* L. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 92: 483-489.
- Saoudi, W., H. Boubakri, W. Taamalli, A. Debez, and C. Abdelly. 2024. Differential reduction in cadmium accumulation in barley under cadmium-salt co-exposure involves specific HMA genes and antioxidative responses. *Environmental and Experimental Botany* 225: 105852.
- Sharma, J., S. Kumar, V. Kumar, P. Singh, P. Khyalia, S. Verma, S. Saini, A. Sharma. 2023. Foliar application of glycine betaine to ameliorate lead toxicity in barley plants by modulating antioxidant enzyme activity and biochemical parameters. *Environmental Research Communications*.

- Sharma, J., S. Kumar, N. Kumar, N. Yadav, P. Khyalia, A. Sharma. 2024. Evaluation of yield and quality attributes of barley cultivars with foliar spray of glycine betaine under lead toxicity. *Cereal Research Communications*, 1-10.
- Sun, Y., Z. Li, B. Guo, G. Chu, C. Wei, Y. Liang. 2008. Arsenic mitigates cadmium toxicity in rice seedlings. *Environ. and Experimental Botany* 64: 264-270.
- Taulavuori, E., E.K. Hellström, K. Taulavuori, K. Laine. 2001. Comparison of two methods used to analyse lipid peroxidation from *Vaccinium myrtillus* (L.) during snow removal, reacclimation and cold acclimation. *Journal of Experimental Botany* 52: 2375-2380.
- Xiaojun, Y. 2023. Effects of Exogenous Pb and As on Growth Quality and Pb and As Accumulation of Highland Barley. *Journal of Agriculture* 13: 25.
- Zhang, J., A. Hamza, Z. Xie, S. Hussain, M. Brestic, M. A. Tahir,... and S. Shabala. 2021. Arsenic transport and interaction with plant metabolism: Clues for improving agricultural productivity and food safety. *Environ. Pollut.* 290: 117987.
- Zulfiqar, F., and M. Ashraf. 2022. Antioxidants as modulators of arsenic-induced oxidative stress tolerance in plants: An overview. *Journal of Hazardous Materials* 427: 127891.