



T.C.

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİMDALI

**KADMİYUM STRESİNE MARUZ BIRAKILAN SOYA FASULYESİ
[*Glycine max* (L.) MERRILL] FİDELERİNDE 24-
EPIBRASSİNOLİD'İN BÜYÜME VE ANTİOKSİDAN SİSTEM
ÜZERİNE ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FURKAN DEMİREL

Tez Danışmanı

DOÇ. DR. YONCA SURGUN ACAR

ÇANAKKALE – 2023



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİMDALI

KADMIYUM STRESİNE MARUZ BIRAKILAN SOYA FASULYESİ [*Glycine Max* (L.) MERRİLL] FİDELERİNDE 24-EPİBRASSİNOLİD'İN BÜYÜME VE ANTİOKSİDAN SİSTEM ÜZERİNE ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FURKAN DEMİREL

Tez Danışmanı

DOÇ. DR. YONCA SURGUN ACAR

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: FYL-2022-3785

ÇANAKKALE – 2023



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



Furkan Demirel tarafından Doç. Dr. Yonca SURGUN ACAR yönetiminde hazırlanan ve **20/06/2023** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Kadmiyum Stresine Maruz Bırakılan Soya Fasulyesi [*Glycine max* (L.) Merrill] Fidelerinde 24-Epibrassinolid’in Büyüme ve Antioksidan Sistem Üzerine Etkileri**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Tarımsal Biyoteknoloji Anabilimdalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Prof. Dr. İskender TIRYAKI

.....

Prof. Dr. Metin TUNA

.....

Doç. Dr. Yonca SURGUN ACAR

.....

(Danışman)

Tez No :

Tez Savunma Tarihi : 20/06/2023

Enstitü Müdürü

.././2023

ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Furkan DEMİREL

29/05/2023

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleŐtirilmesinde, çalıŐmam boyunca bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Doç. Dr. Yonca SURGUN ACAR'a, çalışma sũresince yardım ve desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. İŐkender TİRYAKİ ve labaratuvar ekibine, Dr. Uęur SARI'ya, Prof. Dr. Kemal Melih TAŞKIN'a, tũm zorlukları benimle gũęũsleyen Sevilay BARUT, Fatih DAVA, Nazan BEHCAN, Meryem Melisa KAR ve Arda KAYMAZ'a hayatımın her evresinde bana destek olan değerli aileme sonsuz teŐekkũrlerimi sunarım.

Furkan DEMİREL
anakkale, 29/05/2023

ÖZET

KADMIYUM STRESİNE MARUZ BIRAKILAN SOYA FASULYESİ FİDELERİNDE 24-EPİBRASSİNOLİD'İN BÜYÜME VE ANTIOKSİDAN SİSTEM ÜZERİNE ETKİLERİ

Furkan DEMİREL

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilimdalı Tezi

Danışman: Doç. Dr. Yonca SURGUN ACAR

20/06/2023, 69

Ağır metaller bitkiler üzerinde negatif etkilere sahiptir. Bu metallere karşı bitki savunma sisteminin yanı sıra bu sisteme destek sağlayacak hormonların kullanımı son yıllarda artış göstermektedir. Önemli bir hormon grubu olan brassinosteroid (BR)'ler bitki büyüme ve gelişiminde önemli roller oynamakla birlikte, çevresel stresler karşısında da bitki toleransını arttırmaktadır. Bu çalışmada, küresel ölçekte en fazla ekimi yapılan dördüncü kültür bitkisi olan soya fasulyesi [*Glycine max* (L.) Merrill] fidelerinin yapraklarında toksik ve toprakta varlığı giderek artan kadmiyum (Cd) ağır metalinin meydana getirdiği strese karşı BR hormon grubundan olan, 24-Epibrassinolid (EBL)'in etkileri moleküler ve fizyolojik düzeyde araştırılmıştır. Yapılan çalışmada, soya fasulyesi fideleri 10 gün boyunca hidroponik sistemde 20 ve 40 mg L⁻¹ içeren kadmiyuma maruz bırakılmış ve 2 gün aralıklarla yapraklara spreyleme yöntemi ile EBL (1 µM) uygulanmıştır. Soya fasulyesi fidelerinde Cd konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak büyüme parametreleri (gövde ve kök yaş ve kuru ağırlıkları, kök ve gövde uzunlukları) ve pigment içeriğinde azalma tespit edilirken, yaprak dokusunda Cd miktarında artış belirlenmiştir. Kadmiyum ile birlikte yapılan EBL uygulamaları gövde yaş ve kuru ağırlığı, gövde uzunluğu ve pigment seviyesinde kontrole göre artış meydana getirmiştir. Kadmiyum uygulamaları antioksidan enzimlerin (SOD, CAT, APX ve POD) aktivitelerinde artmaya neden olurken, 20 mg L⁻¹ Cd ile birlikte yapılan EBL uygulamaları kontrole ve tek başına yapılan 20 mg L⁻¹ Cd uygulamasına kıyasla enzim aktivitelerin daha da artmasına neden olmuştur. Hidrojen peroksit ve malondialdehit (MDA) seviyesi Cd uygulamaları ile artarken, Cd ve EBL'nin

kombine uygulaması söz konusu stres indikatörlerinin azalmasına neden olmuştur. Kadmiyum stresi altında EBL uygulaması soya fasulyesi yapraklarında prolin, toplam fenolik ve flavonoid içeriklerinin kontrol ve Cd uygulamalarına kıyasla daha fazla artmasına neden olmuştur. Kadmiyum stresine maruz bırakılan fidelerin yapraklarında antioksidan sistem ile ilgili bazı genlerin (*GmCSD5*, *GmFSD3*, *GmMSD1*, *GmCAT1*, *GmAPX1* ve *GmPOD*) ekspresyon seviyeleri üzerine EBL'nin etkileri araştırılmıştır. Kadmiyum ve EBL uygulamaları *GmCSD5* geni hariç ekspresyon seviyesi araştırılan genleri pozitif regüle etmiştir. Sonuçlar Cd stresi altında soya fasulyesi fidelerinin yapraklarında spreyleme yöntemi ile uygulanan EBL hormonunun antioksidan sistemi biyokimyasal ve moleküler düzeyde regüle ettiğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Soya fasulyesi, kadmiyum, 24-Epibrassinolid, antioksidan sistem, gen ekspresyonu

ABSTRACT

EFFECTS OF 24-EPIBRASSINOLIDE ON GROWTH AND ANTIOXIDANT SYSTEM IN SOYBEAN SEEDLES EXPOSED TO CADMIUM STRESS

Furkan DEMİREL

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Master of Science Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Yonca SURGUN ACAR

20/06/2023, 69

Heavy metals have negative effects on plants. In addition to the plant defense system against these metals, the use of hormones to support this system has increased in recent years. Brassinosteroids (BR), an important group of hormones, play important roles in plant growth and development, and increase plant tolerance against environmental stresses. In this study, the effects of 24-Epibrassinolide (EBL) which is a brassinosteroid hormone group against the stress caused by cadmium (Cd) heavy metal, which is significantly toxic in the leaves of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seedlings, which is the fourth crop plant globally, were investigated at the molecular and physiological levels. In the study, soybean seedlings were exposed to Cd containing 20 and 40 mg L⁻¹ in a hydroponic system for 10 days and the EBL (1 µM) was applied to the leaves by spraying method at 2-day intervals. Depending on the increase in Cd concentration in soybean seedlings, a decrease was detected in growth parameters (stem and root fresh and dry weights, root and stem lengths) and pigment contents, while an increase in the amount of Cd was determined in leaves. The EBL applications with Cd caused an increase in stem fresh and dry weight, stem length and pigment levels compared to the control. While Cd applications caused an increase in the activities of antioxidant enzymes (SOD, CAT, APX and POD), the EBL applications with 20 mg L⁻¹ Cd caused more increase in the activities compared to the control and 20 mg L⁻¹ Cd application alone. While hydrogen peroxide and malondialdehyde (MDA) levels increased with Cd applications, the combined application of Cd and EBL caused a decrease in the mentioned stress indicators. EBL application under Cd stress caused a higher increase

in proline, total phenolic and flavonoid contents in soybean leaves. The effects of the EBL on the expression levels of some genes related to the antioxidant system (*GmCSD5*, *GmFSD3*, *GmMSD1*, *GmCAT1*, *GmAPX1* and *GmPOD*) in the leaves of seedlings exposed to cadmium stress were investigated. Cadmium and EBL treatments positively regulated the genes whose expression level was investigated, except for the *GmCSD5* gene. As a result, the EBL hormone applied by spray method on the leaves of soybean seedlings under Cd stress regulated the antioxidant system at the biochemical and molecular levels.

Keywords: Soybean, cadmium, 24-Epibrassinolide, antioxidant system, gene expression



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ETİK BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

1.1. Soya Fasulyesi [<i>Glycine max</i> (L.) Merr.] ve Abiyotik Stres Faktörleri.....	3
1.2. Kadmiyumun Bitkiler Tarafından Alınımı ve Taşınımı.....	5
1.3. Kadmiyumun Bitkiler Üzerine Etkileri	7
1.4. Bitkilerde ROS Üretimi ve Antioksidan Sistem.....	8
1.4.1. Bitkilerde Reaktif Oksijen Türleri.....	9
1.4.2. Bitkilerde Enzimatik Antioksidanlar ve Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	12
1.5. Brassinosteroidlerin Kimyasal Yapıları.....	15
1.6. Brassinosteroidlerin Biyosentezi.....	16
1.7. Brassinosteroidlerde Sinyal İletimi.....	17
1.8. 24-Epibrassinolid'in Bitkilerde Abiyotik Stres Üzerine Etkileri.....	19

İKİNCİ BÖLÜM

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

21

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM		27
MATERYAL YÖNTEM		
3.1.	Bitki Materyali ve Uygulamalar.....	27
3.2	Yaprak Dokularında Kadmiyum Miktarının Belirlenmesi.....	28
3.3.	Büyüme Parametreleri.....	29
3.4.	Pigment Seviyelerinin Belirlenmesi.....	29
3.5.	Antioksidan Enzim Analizleri	29
3.6.	Hidrojen Peroksit ve Malondialdehit İçeriklerinin Tespiti.....	31
3.7.	Prolin Seviyesinin Belirlenmesi.....	32
3.8.	Toplam Fenolik ve Flavonoid Seviyesinin Tespiti.....	32
3.9.	Gen İfade Analizleri.....	33
3.10.	İstatiksel Analiz.....	36
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM		37
ARAŞTIRMA BULGULARI		
4.1.	Kadmiyum Konsantrasyonlarının Belirlenmesine İlişkin Yapılan Ön Deneme.....	37
4.2.	Kadmiyum Miktarı.....	38
4.3.	Fide Büyüme Parametreleri.....	38
4.4.	Toplam Klorofil ve Karotenoid.....	41
4.5.	Antioksidan Enzim Aktiviteleri.....	42
4.6.	H ₂ O ₂ ve MDA Seviyeleri.....	44
4.7.	Prolin Seviyesi.....	45
4.8.	Toplam Fenolik ve Flavonoid Seviyesi.....	46
4.9.	Gen İfade Analizleri.....	47
BEŞİNCİ BÖLÜM		52
SONUÇ ve ÖNERİLER		
KAYNAKÇA		54
ÖZGEÇMİŞ		I

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABA	Absisik asit
APX	Askorbat peroksidaz
As	Arsenik
BL	Brassinolid
BR	Brassinosteroid
CAT	Katalaz
Cd	Kadmiyum
CdCl ₂	Kadmiyum klorür
Co	Kobalt
Cr	Krom
Cu	Bakır
ddH ₂ O	Ultra saf su
EBL	24-Epibrassinolid
ET	Etilen
Fe	Demir
GPX	Guaiakol peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HBL	28-Homobrassinolid
Hg	Cıva
JA	Jasmonat
K	Potasyum
Mg	Magnezyum
Mn	Mangan
Na	Sodyum
Ni	Nikel
O ₂ ⁻	Süperoksit radikali
OH ⁻	Hidroksil radikali
Pb	Kurşun
POD	Peroksidaz
ROS	Reaktif oksijen türleri

SA	Salisilik asit
SOD	Süperoksit dismutaz
UV	Ultraviole
Zn	Çinko



TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	Hoagland besin ortamı	28
Tablo 2	Tez denemesinde kullanılan uygulama ve kısaltmalar	28
Tablo 3	Bradford analizi için BSA standartlarının hazırlanışı	30
Tablo 4	GPX enzim aktivitesi ölçümü için kullanılan solüsyonlar	31
Tablo 5	APX enzim aktivitesi ölçümü için kullanılan solüsyonlar	31
Tablo 6	Bitkilerden RNA izolasyonu için kullanılan protokolün basamakları	34
Tablo 7	Tez kapsamında ifade analizlerinde kullanılan genlere ait primer ileri (F) ve geri (R) sekansları, optimum çalışma sıcaklıkları ve referansları	35
Tablo 8	Soya fasulyesi fidelerinde kullanılan kadmiyum konsantrasyonlarının belirlenmesi dair ön deneme uygulamaları	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	Reaktif oksijen türlerinin oluşumu	9
Şekil 2	Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları sonucu hidroksil oluşumu	10
Şekil 3	Bitki hücrelerinde farklı organellerde bildirilen ana reaktif oksijen türleri (ROS) ve antioksidan sistemlerin bulunduğu hücre organelleri	11
Şekil 4	Bağlandığı metale ve hücre içi lokalizasyonlarına göre SOD izoenzimleri	12
Şekil 5	Başlıca aktif brassinosteroidler. Brassinolid (A), 28-Homobrassinolid (B) ve 24-Epibrassinolid (C)	16
Şekil 6	Brassinolidin biyosentez yolları	17
Şekil 7	Brassinosteroidlerde sinyal iletimi. Brassinosteroid yokluğunda (-BR) (A) ve Brassinostreoid varlığında (+BR) (B) sinyal iletim yolları	18
Şekil 8	Ekzojen uygulanan BR'nin ROS ve antioksidan sistem üzerine etkileri. Fidelerin yapraklarına spreyleme yöntemi ile uygulanan BR hormonu ROS üretiminin ve dolayısıyla lipid peroksidasyonunun azalmasına neden olurken, antioksidan sistemi güçlendirerek sekonder metabolizmanın ve glutatyon içeriğinin artmasını sağlamaktadır.	19
Şekil 9	SOD ve CAT enzim analizlerinde kullanılan Elisa kitleri	30
Şekil 10	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (RT-qPCR) hazırlanması sırasında kullanılan alet ve ekipmanlar	36
Şekil 11	Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi yapraklarında kadmiyum miktarı üzerine etkisi. K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L ⁻¹ Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L ⁻¹ Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış (P<0,05, ± standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir (n=3).	38

- Şekil 12** Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi fidelerinin gövde yaş (A) ve kuru ağırlıkları (B) üzerine etkisi. K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış (P<0,05, ± standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir (n=10-12). 39
- Şekil 13** Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi fidelerinin kök yaş (A) ve kuru ağırlıkları (B). K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış (P<0,05, ± standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir (n=10-12). 40
- Şekil 14** Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi fidelerinin gövde (A) ve kök uzunlukları (B). K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış (P<0,05, ± standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir (n=10-12). 41
- Şekil 15** Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi yapraklarında toplam klorofil (A) ve karotenoid (B) miktarları. K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış (P<0,05, ± standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir (n=3). 42
- Şekil 16** Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi yapraklarında SOD (A) ve CAT (B) enzim seviyeleri. K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış (P<0,05, ± standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir (n=3). 43
- Şekil 17** Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi yapraklarında APX (A) ve POD (B) enzim aktiviteleri. K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış (P<0,05, ± standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir (n=3). 44

- Şekil 18** Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi yapraklarında H_2O_2 (A) ve MDA (B) seviyeleri. K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış (P<0,05, ± standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir (n=3). 45
- Şekil 19** Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi yapraklarında prolin miktarı. K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış (P<0,05, ± standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir (n=3). 46
- Şekil 20** Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi yapraklarında toplam fenolik (A) ve toplam flavonoid içerikleri. K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış (P<0,05, ± standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir (n=3). 47
- Şekil 21** Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi yapraklarında SOD genlerinin ekspresyon seviyesi. *GmCSD5* (A), *GmMSD1* (B) ve *GmFSD3* (C) genlerinin ekspresyon seviyeleri. K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış (P<0,05, ± standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir (n=3). 48
- Şekil 22** Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi yapraklarında *GmCAT1* geninin ekspresyon seviyesi. K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış (P<0,05, ± standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir (n=3). 49
- Şekil 23** Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi yapraklarında *GmAPX1* geninin ekspresyon seviyesi. K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış (P<0,05, ± standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir (n=3). 50

Şekil 24

Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi yapraklarında *GmPOD* geninin ekspresyon seviyesi. K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış (P<0,05, ± standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir (n=3).



BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Yüksek verimi ve zengin besin içeriği nedeniyle soya fasulyesi [*Glycine max* (L.) Merrill] dünyadaki en önemli kültür bitkilerinden biridir (Liu vd., 2020). Orijini Çin olan soya fasulyesi, Asya, Orta Amerika, Güney Amerika, Avrupa ve Afrika olmak üzere dünyanın birçok bölgesine yayılmıştır (Güler, 2013). Soya fasulyesi dünyada en çok yetiştiriciliği yapılan baklagillerden biridir ve buğday (*Triticum aestivum* L.), mısır (*Zea mays* L.) ve çeltikten (*Oryza sativa* L.) sonra ekimi en fazla yapılan dördüncü bitki türüdür (Fried vd., 2019). Küresel ölçekte soya fasulyesi üretimi 339 milyon tondur (Neto vd., 2021). Dünyada soya fasulyesi üreticileri sırasıyla Amerika Birleşik Devletleri (%33), Brezilya (%32), Arjantin (%16), Çin ve Hindistan'dır (Ciampitti vd., 2018; Neto vd., 2021). Ülkemiz soya fasulyesi üretiminde 32. sırada olup, soya tarımına ilk kez 1. Dünya savaşı yıllarında başlanılmıştır (Artık, 1987). Türkiye'de 1961 yılında 4.600 hektar alanda 9.783 ton yapılan soya üretimi, 2020 yılında 35 bin hektar alanda 44.180 tona ulaşmıştır (FAO, 2022).

Topraktaki ağır metal kirliliği son yıllarda endişe verici derece artmış ve tüm canlılar için potansiyel bir risk haline gelmiştir. (Shanmugaraj vd., 2019). Ağır metal kirliliği, hızla büyüyen endüstriyel bölgeler, madencilik, endüstriyel atıkların bertaraf edilmemesi, tarımsal arazilerde tekrarlanan gübre ve pestisit uygulamaları, kompost gübreler ve atık su sulama uygulamaları neticesinde büyük oranda risk oluşturmaktadır. Fizyolojik koşullar altında ağır metaller, organizmalar için esansiyel ve esansiyel olmayan elementler olarak sınıflandırılmaktadır (Tchounwou vd., 2012). Bu sınıflandırma içerisinde çinko (Zn), bakır (Cu), kobalt (Co) ve manganez (Mn) gibi esansiyel metaller, redoks tepkimelerinde ve ligand etkileşimlerinde kofaktör olarak organizmaların fizyolojik süreçlerinde önemli rollere sahiptirler, ancak arsenik (As), kadmiyum (Cd), krom (Cr), kurşun (Pb), ve civa (Hg) ise esansiyel olmayıp reaktiviteleri nedeniyle enzimatik reaksiyonları olumsuz etkileyerek fizyolojik süreçlere müdahale edebilmektedirler (Dubey vd., 2018). Ağır metaller içerisinde Cd, atom ağırlığı 112,411 g olan, periyodik tablonun 12. grubuna ait bir geçiş elementidir ve doğada oldukça reaktif olmasını sağlayan +2 değerlik elektronuna sahiptir (Shahzad vd., 2018). Fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı Cd, kereste, paslanmaz çelik endüstrilerinde ve nikel (Ni)-Cd pil üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Dünya çapında yıllık kullanımı 30.000 ton olan Cd son derece zehirli bir element olmakla birlikte

bitkilerden besin zinciri yoluyla insan ve hayvanlar için de büyük bir risk oluşturmaktadır (Qin vd., 2020). Bitkiler yüksek konsantrasyonda ağır metale maruz kaldıklarında tolerans veya detoksifikasyon için çeşitli savunma yolları izlemektedir. İlk olarak, ağır metale maruz kalan bitkiler topraktan metal alınımını kısıtlayarak stresin başlamasını engellemek ve köke metal girişini önlemeye çalışmaktadır (Emamverdian vd., 2015). Bu savunma stratejisinin başarısız olması durumunda bitkiler ikinci adım olarak hücre içerisindeki bölmelerden (vakuol), prolin, organik asitler gibi çeşitli maddeleri serbest bırakarak metal iyonlarının hücre içerisinde kompleksleşmesini ve hücre duvarına bağlanmasını engellemeye çalışmaktadır. Tüm önlemlerin sonuçsuz kalması halinde bitkiler ağır metalin toksisitesi altında kalırsa antioksidan savunma mekanizmalarının aktivasyonunu gerçekleştirmektedir (Emamverdian vd., 2015).

Bitkilerde ağır metal stres toleransına karşı alternatif olarak bitki büyüme düzenleyicileri (hormon)'nin kullanımı son yıllarda büyük önem kazanmıştır (Bari ve Jones, 2008). Bitki hormonları bitkilerde büyüme ve gelişimi düzenlemede önemli roller oynamaktadır (Li vd., 2020). Bitkiler tarafından üretilen başlıca hormonlar; oksinler, gibberellinler, sitokininler, absisik asit (ABA), etilen (ET), salisilik asit (SA), jasmonatlar (JA), brassinosteroid (BR)'ler ve strigolaktonlardır (Verma vd., 2016). Brassinosteroidler metabolik ve fizyolojik süreçlerde etkili rollere sahip doğal ve biyolojik olarak parçalanabilen polihidroksillenmiş steroidlerdir (Li vd., 2020). Bitki büyüme ve gelişimini teşvik etme konusunda güçlü bir yeteneğe sahip olan BR'ler ve analoglarının, bitkilerde biyotik ve abiyotik stresler dahil olmak üzere çeşitli streslerin hafifletilmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. (Bhandari ve Nailwal, 2020). Hücre yüzeyinde bulunan lösin bakımından zengin reseptörlerce BR'nin algılanması bir dizi fosforilasyon ve defosforilasyon işlemlerini başlatmakta ve farklı fizyolojik mekanizmalarda karmaşık olan çok sayıda genin düzenlenmesine büyük katkı sağlamaktadır (Basit vd., 2021). Brassinosteroidler köklerden ağır metal alınımını azaltmakla birlikte ağır metal birikimi yoluyla indüklenen reaktif oksijen türlerinin (ROS) etkilerini hafifleten antioksidan enzimlerin etkinliğini arttırmaktadır (Basit vd., 2021).

Bu çalışmada, önemli bir kültür bitkisi olan soya fasulyesinde toprakta mevcudiyeti giderek artan Cd'nin etkilerinin yanı sıra aktif bir BR analogu olan 24-Epibrassinolid

hormonunun farklı Cd konsantrasyonları altında büyüme ve antioksidan sistem üzerine etkileri biyokimyasal ve moleküler düzeyde araştırılmıştır.

1.1. Soya Fasulyesi [*Glycine max* (L.) Merr.] ve Abiyotik Stres Faktörleri

Soya fasulyesi [*Glycine max* (L.) Merr.] *Magnoliopsida* (iki çenekli) sınıfının *Fabaceae* (baklagiller) familyasının *Faboideae* alt ailesinin *Glisin* cinsine ait tek yıllık bir sıcak iklim bitkisidir. Soya fasulyesi besin içeriği ve ekonomik değerinden dolayı benzersiz bir baklagil olup, altın fasulye ve mucize bitki olarak da adlandırılır. Tarihsel kayıtlara göre 5000 yıldır kullanılmakta olan soya fasulyesinin günümüzde küresel bir önemi bulunmaktadır (Ferguson ve Gresshoff, 2009; Bijarania vd., 2021).

Ülkemizde en çok Adana (%57,6) ve Mersin (%25,1) illerinde üretimi yapılan soya fasulyesi tüylü yaprakları ve baklalarıyla 1,5 metre uzunluğa kadar ulaşabilmektedir (Forde ve Lorenzo, 2001; Uçum, 2021). Olgunluk aşamasındaki soya fasulyesinin yaprakları oval mızrak şeklindedir ve hafif sarıya dönük yeşil bir renge sahiptir. Çeşidine bağlı olarak beyaz veya mor renkte çiçekleri bulunmaktadır. Soya fasulyesi baklaları 3-5 cm uzunlukta, 1 cm kalınlığında, içerisinde 2 ila 4 adet tohum bulunduran genellikle yeşil renkli meyvelerdir (Palomo vd., 2011). Yassı ya da yuvarlak şeklindeki tohumlar kahverengi tonlarındadır. Derinliği bir metreye kadar uzanabilen kök sisteminde, yan kökler ve ortalama 40-50 santimetre uzunluğunda ana kök bulunmaktadır. Çiçeklenme döneminden itibaren kazık ve saçak köklerde oluşmaya başlayan çok sayıda yumrular bulunmaktadır. Bu yumrular soya fasulyesinin ekimi sırasında kullanılan *Rhizobium* bakterileri (*Rhizobium japonicum*) ile havadaki azotu içerisinde depo ederek hem soya fasulyesi için hem de sonrasında ekilecek ürün için azot kaynağı oluşturmaktadır (Sulieman vd., 2022).

Protein, B vitamini, lipit ve temel elementler bakımından oldukça zengin bir bitki olması soya fasulyesini insanlar ve hayvanlar için önemli bir besin kaynağı haline getirmektedir (Švubová vd., 2021). Yüksek kalitede hayvan yemi olan soya fasulyesinin, endüstriyel olarak kullanımı da bulunmaktadır (Hymowitz ve Newell, 1981; Medic vd., 2014; Pagano ve Miransari, 2016). Birim alandan en çok protein alınan bitki olan soya fasulyesi batı kültüründe esas olarak soya küspesi ve tohum yağı şeklinde işlenmektedir. Asya kültürlerinde ise soya fasulyesinden süt, sos ve ezme gibi birçok gıda üretimi

yapılabilmektedir (Medic ve Hurburgh, 2014; Pagano ve Miransari, 2016). Hayvansal yağların üretiminin az olması ve maliyetinin fazla olması nedeniyle dünya yağ üretiminin %80-90'ı bitkilerden sağlanmaktadır (Meijaard vd., 2020). Soya fasulyesi bu konuda önemli bir yağlı tohum bitkisidir ve dünya çapında talep görmektedir (Randeniya ve De Groot, 2015). Soya fasulyesi yağı küresel çapta bitkisel yağ tüketiminin %28'ini karşılamaktadır (Silva vd., 2021). Soya yağı insan besini olarak lipid metabolizmasını düzenleyen yağ asitlerini içermesinden dolayı oldukça önemli bir besindir (Maheshwari ve Kovalchuk, 2016). Soya linolenik asit olarak adlandırılan omega-3, γ -linolenik olarak bilinen omega-6 ve oleik asit olarak bilinen omega-9 bakımından oldukça zengin bir bitkidir (Silva vd., 2021). Bununla birlikte, yağı alındıktan sonra bol miktarda protein içeren soya küspesi ise hayvan yemi olarak özellikle kanatlılarda kullanılmaktadır (Meijaard vd., 2020). Endüstriyel olarak soya; mürekkep, plastik, boya, böcek ilacı, tutkal ve sabun gibi ürünlerin yapımında da kullanılmaktadır (Maheshwari ve Kovalchuk, 2016).

Bitki büyümesi ve dağılımı çevre ile sınırlıdır. Herhangi bir çevresel faktör ideal durumdan farklı bir hale gelirse, bitki büyümesine sınırlayıcı faktör olarak isimlendirilmektedir. (Hasanuzzaman vd., 2016). Soya fasulyesi, çeşitli çevresel koşullar altında yetiştirilebilir bir bitki olmasına rağmen büyüme ve gelişimi sel, kuraklık, tuzluluk, yüksek sıcaklık ve ağır metal gibi çeşitli abiyotik stres faktörlerinden büyük ölçüde etkilenmektedir (Hossain vd., 2013; Hasanuzzaman vd., 2016). Tuz stresi altında soya fasulyesi fidelerinde ROS üretimi ve lipid peroksidasyonunda artış bildirilmiş, buna bağlı olarak oksidatif hasar meydana gelmiş ve antioksidan sistemin aktif olmasına neden olmuştur (Egbichi vd., 2013). Diğer bir çalışmada, tuz stresi soya fasulyesi fidelerinde potasyum (K) ve sodyum (Na) alımını etkilemiştir. Bu durum, Na/K oranını artırarak iyonik olarak toksisiteye sebep olmuştur (Simaei vd., 2012). Benzer şekilde kuraklık, çevresel sınırlayıcılar içerisinde ana faktör olarak kabul edilmektedir. Bitkilerde kuraklık stresi çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik etkilere neden olmakla birlikte çimlenme yüzdesi ve klorofil (a ve b) oranında azalmalara, lipid peroksidasyonuna, protein bozulmasına ve nükleik asit hasarına neden olan ROS üretiminin artışına neden olmaktadır (Fanaei vd., 2015). Bunlara ek olarak, fotosentezin tüm ana bileşenlerini bozarak artan karbonhidrat ve su dengesinin değişimiyle fotosentez mekanizmasının zarar görmesini sağlamaktadır. Soya fasulyesi tohumlarının çimlenmesi, özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde büyük ölçüde engellenmektedir (Barbosa vd., 2004). Soya fasulyesi için bir diğer stres çeşidi olan sel,

küresel çapta soya fasulyesinin verimini etkileyen en önemli ikinci strestir. Su baskını ya da taşkın gibi olaylarda öncelikle kök hasarları, nodül gelişiminde azalma, fotosentez ve karbon asimilasyonu neticesinde de kloroz ve bitki ölümü meydana gelmektedir (Chandra vd., 2022). Ayrıca, su basması soya fasulyesi tohumlarının çimlenmesinde de etkilidir (Chandra vd., 2022). Wu vd., (2017) 24 saat süreyle sel stresinin soya fasulyesi çimlenmesini %50 azalttığını belirtmiştir. Fazla su, oksijen yokluğu ile solunumu azaltarak toprak kaynaklı hastalıklara da sebep olmaktadır (Chandra vd., 2022). İklim değişiminin kaçınılmaz bir sonucu olan sıcaklık, her 10 yılda bir 0.3 °C artmaktadır. Artan sıcaklıkların soya fasulyesinde de olumsuz etkilere neden olacağı öngörülmektedir (Zhao vd., 2017). Yapılan çalışmalarda soya fasulyesinin kısa ya da uzun süreli ısıya maruz bırakılması sonucunda verim düşüşlerinin meydana geldiği bildirilmiştir (Hatfield ve Dold, 2019; Thomey vd., 2019).

Bitkiler tarafından yüksek miktarda toksik metal alımı bitki besin elementlerinin absorpsiyonunu, translokasyonunu ve fotosentetik süreçlerini bozarak bitkinin normal büyümesine zarar verebilecek bazı fizyolojik ve biyokimyasal reaksiyonlara neden olmaktadır. Soya fasulyesinin yaşam döngüsü boyunca metallere olumsuz etkilendiği ortaya koyulmuştur (Hasanuzzaman vd., 2016). Kadmiyum, Pb ve As streslerinin artan seviyelerinin çimlenme yüzdesini azalttığı ve metal konsantrasyonunun artmasıyla çimlenmeyi engellediği belirtilmiştir (Luan vd., 2008). Soya fasulyesinin genç yapraklarında koyu renkteki lekeler ve yaprak damarları arasındaki kloroz, ağır metaller ile kirlenmiş topraklarda gözlemlenmektedir. Köklerde ise nodülasyonda azalmayla birlikte azot fiksasyonu olumsuz etkilenmektedir. Sonuç olarak, soya fasulyesi üzerinde ağır metal stresi bodur büyüme ve verim düşüşü gibi önemli etkilere neden olmaktadır (Chmielowska-Bak vd., 2014).

1.2. Kadmiyumun Bitkiler Tarafından Alınımı ve Taşınımı

Son yıllarda farklı bitkilerde ağır metallerin topraktan alınması ve bitkinin çeşitli kısımlarına taşınması ile ilgili biyokimyasal, fizyolojik ve moleküler düzeylerde çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Dubey vd., 2018). Kadmiyum düşük konsantrasyonlarda dahi hem hayvanlar hem de bitkiler için potansiyel toksisitesinden dolayı endişe kaynağı haline gelmiştir (Shah vd., 2010). Ağırlıklı olarak fosfatlı gübrelerin kullanımı, endüstriyel

faaliyetler ve kanalizasyon çamuru uygulaması gibi faaliyetler yoluyla tarım topraklarına giren Cd, toprakta da son derece hareketli bir elementtir. Asidik topraklarda yetiştirilen bitkiler için oldukça erişilebilir halde toprağın üst kısmında toplanan Cd'nin bu özelliği, bitki tarafından alınmasına (Şekil 1) ve diğer bitki organlarına kolaylıkla taşınmasına olanak sağlamaktadır (Abbas vd., 2017; Ackova, 2018; Shanmugaraj vd., 2019). Bitki yapısı, yaşı ve kök yüzey alanı gibi özellikler bitkilerde metal alınımında veya birikiminde büyük etkilere sahiptir (El Rasafi vd., 2020). Bununla birlikte Cd toprak çözeltisinden bitki kökleri ile hem pasif taşıma (difüzyon) hem de aktif taşıma yoluyla alınabilmektedir (Gallego vd., 2012; Sebastian ve Prasad, 2018). Kadmiyum iyonları, Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} ve Zn^{2+} 'nin alınımında rol alan membran taşıyıcıları [membran taşıma proteinleri ve ATPaz (ATP Fosfohidrolaz)] aracılığıyla bitkinin kök hücrelerine girmektedir (DalCorso vd., 2008; Riaz vd., 2021). Çeltikte bugüne kadar dokuz ATPaz geni tespit edilmiştir. Bu genler arasında, *Oryza sativa heavy metal ATPase 2 (OsHMA2)*, plazma zarı üzerinde bulunur ve Cd ve Zn'nin taşınmasında rol oynamaktadır (Riaz vd., 2021). Metal taşıyıcı olarak, *Arabidopsis thaliana*'da bulunan *Arabidopsis thaliana iron uptake transporter 1 (AtIRT1)*, hücre membranına lokalize şekilde bulunan metal taşıyıcıdır (Qin vd., 2020). *AtIRT1*'in köke Fe alınımında birincil yol olarak tanımlanmasının yanı sıra önemli miktarda Cd'yi de taşıyabildiği Korshunova vd., (1999) tarafından yapılan çalışmada bildirilmiştir.

Kadmiyumun köke girişine dair bir diğer taşıma sistemi ise önemli bir metal taşıyıcı grubu olan ve *Arabidopsis*'te hem sürgün hem de köklerde sentezlenen ZIP (ZRT ve IRTlike protein) ailesidir (DalCorso vd., 2008). Sonuçlar, ZIP grubunun membran boyunca iki değerlikli katyonların taşınmasında yer aldıklarını göstermektedir. Bitkilerde topraktan kök hücrelerine Cd alınımında ve kökten sürgüne taşınımında rol aldığı öne sürülmüştür (Qin vd., 2020). Natural resistance-associated macrophage protein (NRAMP) metal taşıyıcı grup ise metal taşınmasında ve homeostazda yer alan bir diğer transmembran protein grubudur (Riaz vd., 2021). *Arabidopsis*'te NRAMP grubunun üç üyesi (*AtNRAMP1*, *AtNRAMP3* ve *AtNRAMP4*), Fe, Mn ve Cd alınımına aracılık etmektedir (Qin vd., 2020). Sonuç olarak, Cd çeşitli yollar aracılığıyla köke girer ve apoplastik veya simplastik yolla ksileme ulaşmaktadır (Riaz vd., 2021). Ksilem içerisinde Cd, bitkinin terleme neticesinde meydana getirdiği kuvvet ile sürgünlere doğru hareket etmektedir ve ksilem özsuyundan yapraklarda mezofil hücre boşluklarına taşınmaktadır. Ksilem özsuyunda Cd taşınması floem özsuyuna göre daha kolay gerçekleşmektedir. Bunun nedeni ksilem özsuyunun, 5-6 arasında değişen pH

değeri, kimyasal bileşimi ve organik bileşik konsantrasyonudur. Ksilem özsuyundaki sistein, fitoşelatinler, glutasyon ve diğer amino asitler Cd'nin kökten sürgüne taşınmasında önemli rol almaktadır (Welch ve Norvell, 1999). Örneğin, Senden vd. (1994), domateste yaptıkları çalışmada, Cd ile birlikte bitki köklerine sitrik asit verildiğinde Cd alınımının kökte 2 kat, köklerden sürgüne taşınımının ise 6-8 kat arttığını bildirmiştir.

1.3. Kadmiyumun Bitkiler Üzerine Etkileri

Kadmiyum maruziyeti bitkilerde kök dokusunu nekrotik, ayrışan ve müsilaçlı bir yapı haline getirmekte, böylece köklerin ve sürgünlerin uzama yeteneğini düşürerek yaprak kıvrılmasına ve kloroza neden olmaktadır. Toprak rizosferinde Cd'nin toksisitesi kökün kortikal hücre katmanlarında ve epidermin apikal bölgesinde anormal genişlemeye yol açmakta, yan köklerin oluşumunu engellemekte ve ana kökün sert, bükülmüş ve kahverengi olmasına neden olmaktadır. Ayrıca Cd toksisitesi, meristematik hücrelerin mitotik bölünmesini ve dolayısıyla kök uzunluğunun ve kuru biyokütlenin azaltarak kök çapının artmasına sebep olmaktadır (Haider vd., 2021). Kadmiyumun, baklagil bitkilerinde nodül oluşumunu azalttığı ve fonksiyonlarında bozulmalara neden olduğu da bildirilmiştir (Balestrasse vd., 2001; Ausili vd., 2010). Kadmiyum bitkiler için gerekli olmamasına rağmen bitki bünyesine kolayca alınmakla birlikte kloroplastlarda birçok metabolik aktiviteyi doğrudan veya dolaylı olarak etkilemektedir (Ekmekçi vd., 2008; He vd., 2017). Klorofil biyosentezi, fotokimyasal reaksiyonların işleyişi gibi olaylarda fotosentezin inhibisyonuna neden olmaktadır (Ekmekçi vd., 2008). Kadmiyum atomu katyon olduğu durumda bitkide klorofildeki merkez atom olan Mg ile yer değiştirebilmektedir ve Rubisco faaliyetini yüksek bitkilerde %40 oranında azaltmaktadır (Ekmekçi vd., 2008; Taiz, 2008). Sonuç olarak, yaprak üzerinde Cd stresinin tipik toksik belirtileri, bodurluk, kloroz, nekroz ve kurulamalardır (Ekmekçi vd., 2008).

Kadmiyum bitkilerde morfolojik ve fizyolojik etkilerin yanı sıra moleküler olarak da birçok değişikliğe neden olmaktadır. Kadmiyum toksisitesi, bitkilerde stresle ilgili proteinlerin ve sinyal moleküllerinin sentezini negatif yönde etkilemekle birlikte kromozomal anormalliklere de neden olmaktadır (El Rasafi vd., 2020). Kadmiyum ağır metali, protein oksidasyonu, enzim inhibisyonu ve hücre ölümüne de neden olmaktadır (Gill ve Tuteja, 2011). Bitkilerdeki fazla metal iyonlarının protein ve DNA'ya bağlanarak DNA

hasarına yol açtığı ortaya koyulmuştur (El Rasafi vd., 2020). Kadmiyumun bitkiler tarafından kolayca alınması gen modifikasyonu ve genom değişikliği dahil olmak üzere çeşitli olumsuz etkilere de neden olmaktadır (Gill, 2014). Bununla birlikte Cd, metal detoksifikasyon mekanizmalarıyla (fitoşelatinler ve metallothioneinler) ilgili gen ifadesinde de değişikliklere neden olmaktadır (El Rasafi vd., 2020). Shanmugaraj vd. (2012) farklı Cd konsantrasyonlarına (50, 100, 150 ve 200 μM) maruz kalan *Brassica juncea*'da fitoşelatin sentaz geninin ekspresyonunda artış gerçekleştiğini bildirmiştir. Diğer bir çalışmada ise 7 gün boyunca 100 μM CdCl_2 'ye maruz bırakılan arpada *rpl16*, *rpl23* ve *rpl12* gibi ribozomal protein genlerinin ve plastid NADH-plastokinon oksidoredüktazın alt birimi 1'i kodlayan *ndhA* geninin transkripsiyonlarında artış gözlenmiştir (Zaripova vd., 2011). Roy vd., (2016) ise Cd stresi altında *Sorghum bicolor* L. (Sorgum) kloroplast, mitokondri, çekirdek, ribozomlar ve sitoplazmada ifade edilen ve bitkide metabolizma, transkripsiyon ve translasyon mekanizmalarında önemli rollere sahip genlerin ekspresyonlarında değişim olduğu ortaya koyulmuştur. Bitkilerde Cd stresine verilen tepkilerin moleküler mekanizmasının incelenmesi, Cd'ye karşı savunma stratejilerinin anlaşılmasına da olanak sağlamaktadır (El Rasafi vd., 2020). Örneğin, Cd, mısır bitkisinde *ZmMPK3-1* ve *ZmMPK6-1* genlerini aktive ederek ROS üretimine neden olmaktadır (Liu vd., 2019). Bununla birlikte peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonunu da düzenlemektedir (Yue vd., 2016). Farklı bir çalışmada ise Cd'nin fotosentez ile ilgili genlerin (*psbA*, *psaB*, *rbcL*) ifade düzeyini etkilediği ve bitkilerde karbon fiksasyonunu engellediği yapılan araştırmalarda ortaya konulmuştur (Franic, 2018; Sebastian ve Prasad, 2019).

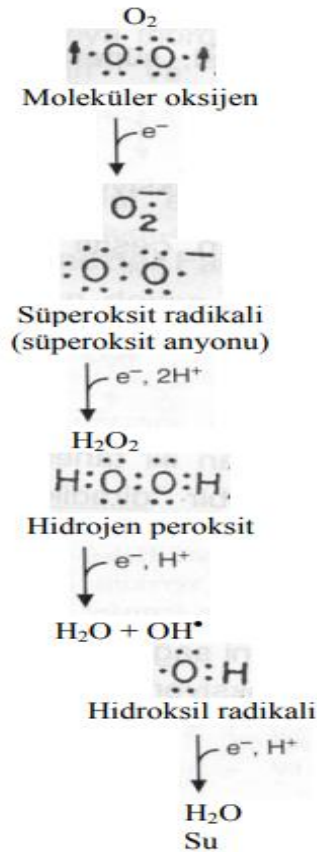
1.4. Bitkilerde ROS Üretimi ve Antioksidan Sistem

Abiyotik stres faktörlerindeki artış, bitkisel üretimde ve sürdürülebilirliğinde tehdit oluşturmaktadır. Bu nedenle abiyotik stres faktörlerinin ürün performansı üzerindeki etkisini ve bu faktörlerin bitkilerde etkilediği mekanizmaları anlamak oldukça önem arz etmektedir (Neeti vd., 2017). Bitkiler, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeydeki farklılaşmalarla, değişen çevreye uyum sağlamaya çalışmaktadır. Çeşitli abiyotik stresler, bitkilerde oldukça reaktif ve bitki hücrelerinde toksik olan ROS oluşumuna yol açmaktadır (Dumanović vd., 2021). Reaktif oksijen türleri, tuzluluk, UV radyasyon, ağır metaller, sıcaklık değişiklikleri, kuraklık, hava kirliliği, besin eksikliği gibi çeşitli abiyotik stres faktörlerinin bir sonucu olarak ortaya çıkar ve lipid peroksidasyonu yanı sıra DNA, pigment

ve enzimlerde hasar gibi birçok olaya sebep olan moleküllerdir (Neeti vd., 2017). Başlıca ROS, süperoksit radikalleri (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikalleri (OH^\bullet) ve singlet oksijen (1O_2)'dir (Bhattacharjee 2019; García-Caparrós vd., 2021).

1.4.1. Bitkilerde Reaktif Oksijen Türleri

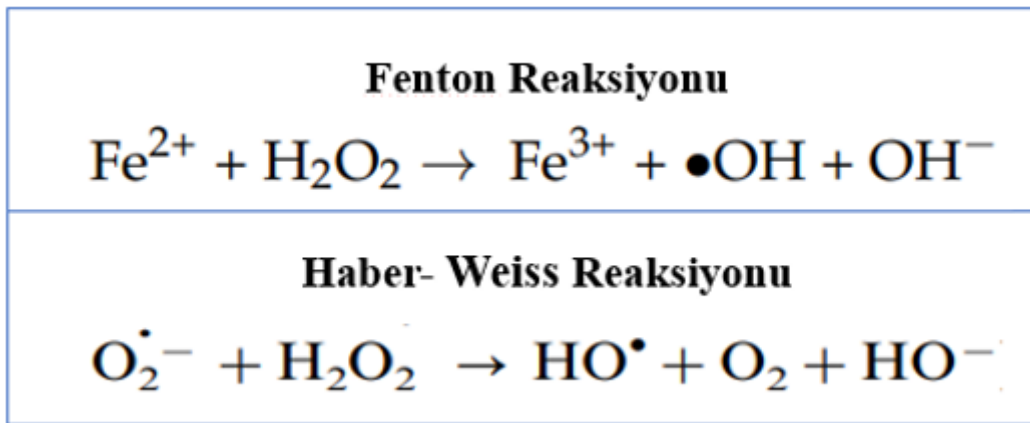
Süperoksit radikali (O_2^-) oksijenin (O_2) kısmen indirgenmesi veya enerjinin O_2 'ye aktarılmasının bir sonucu olarak kloroplastlarda sürekli olarak üretilmektedir. Stres altında ilk oluşturulan ROS'dur. Süperoksit radikali tek başına büyük bir hasara neden olmamakla birlikte daha reaktif olan OH^\bullet ve 1O_2 dönüşerek lipid peroksidasyonuna neden olabilmektedir (Şekil 1). Süperoksit radikali ile perhidroksi (HO_2) radikali birbirleriyle reaksiyona girdiğinde biri okside olur diğeri ise indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonu neticesinde moleküler oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir. Ek olarak, indirgenmiş geçiş metallere oto oksidasyonu süperoksit radikali meydana getirebilir. (Das ve Roychoudhury, 2014; García-Caparrós vd., 2021).



Şekil 1. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu (Anonim, 2023)

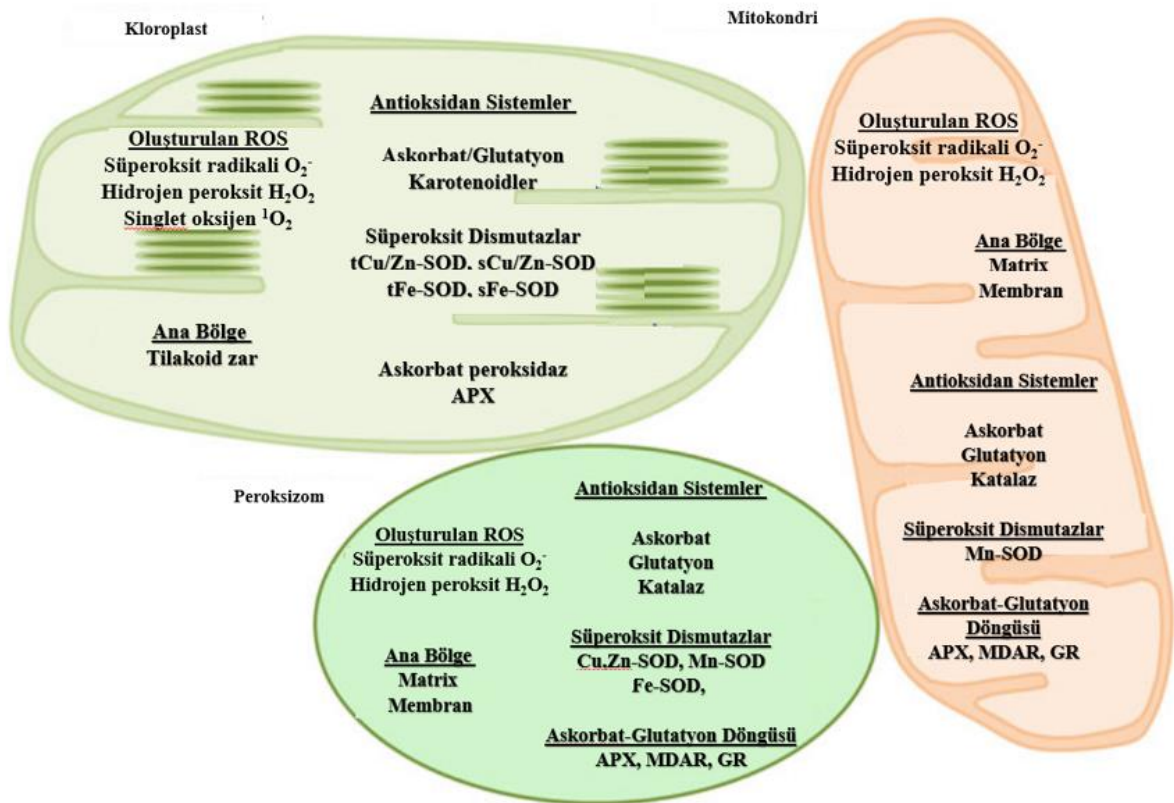
Bir diğerk reaktif oksijen türü olan hidrojen peroksit (H₂O₂) ‘in bitki hücrelerinde üretiminin başlıca kaynakları kloroplast, mitokondri, endoplazmik retikulum ve hücre zarıdır. Hidrojen peroksit (H₂O₂), süperoksitin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu, oluşan peroksitin iki proton (H⁺) ile birleşmesi neticesinde meydana gelir. Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri (ROS) kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu, süperoksit radikalinin (O₂⁻) varlığında ise Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici radikal olan hidroksil radikali (OH⁻)’ni oluşturmaktadır. Hidrojen peroksitin bitkilerde hem düşük hem de yüksek konsantrasyonu farklı etkilere neden olmaktadır. Düşük konsantrasyonlarda, fotosentez ve stoma hareketleri gibi fizyolojik süreçlerde düzenleyici görevi görmektedir. Yüksek konsantrasyonda ise apoptozdan sorumludur (Das ve Roychoudhury, 2014).

Hidroksil radikali (OH⁻), Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır (Şekil 2). Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize olması sonucunda da oluşabilmektedir. Hidroksil radikali (OH⁻) bilinen en reaktif ve toksik ROS’dur. Lipid peroksidasyonu ve protein yıkımıyla ve bu yapılardan proton koparıp yeni radikallerin oluşmasını sağlayarak hücrenel bileşenlere zarar verebilmektedir. Bu toksik radikali temizleyecek mevcut bir enzimatik sistem olmadığından, aşırı OH⁻ birikimi hücrenel ölümle sonuçlanmaktadır (Das ve Roychoudhury, 2014).



Şekil 2. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları sonucu hidroksil oluşumu (Zuorro vd., 2023)

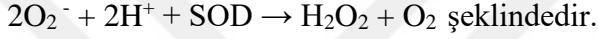
Bitki hücrelerinde, ROS'un zararlı etkilerinden kurtulma ve aynı zamanda çeşitli koşullar altında rollerini sınırlama konusunda genellikle ROS'un üretim bölgelerine yakın bölgelerde bulunan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemler bulunmaktadır (Şekil 4) (Gupta vd., 2018; Hussain vd., 2019). Farklı hücre içi bölgelerde lokalize şekilde bulunan enzimatik antioksidanlar, Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon peroksidaz (GPX) gibi enzimlerdir (Şekil 3). Ek olarak, bitkilerde enzimatik olmayan antioksidanlar ise askorbik asit (C vitamini), GSH, tokoferoller (E vitamini), prolin ve karotenler (provitamin A)'dir (Dumanović vd., 2021). Bu bileşikler birçok reaksiyon yoluyla ROS'un hücrede yol açtığı zararı önlemektedir (Das ve Roychoudhury, 2014).



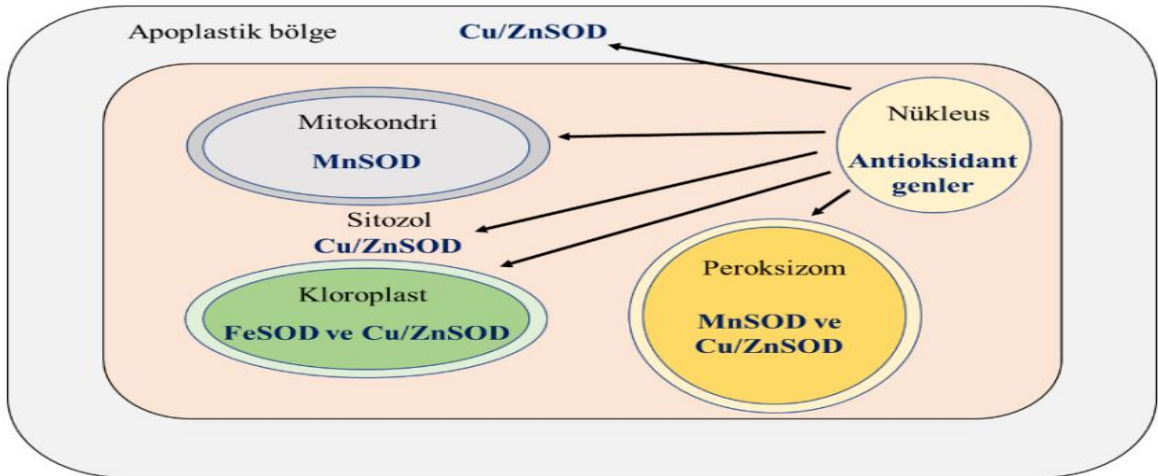
Şekil 3. Bitki hücrelerinde farklı organellerde bildirilen ana reaktif oksijen türleri (ROS) ve antioksidan sistemlerin bulunduğu hücre organelleri (Gupta vd., 2018)

1.4.2. Bitkilerde Enzimatik Antioksidanlar ve Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Süperoksit dismutaz (SOD), tüm aerobik organizmalarda bulunan bir enzimdir. Çevresel stresler altında, SOD, ROS kaynaklı hasarlara karşı ilk savunma hattını oluşturur ve bağlandığı metal iyonuna göre Mn-SOD, Fe-SOD ve Cu/Zn-SOD olmak üzere üç izozim olarak sınıflandırılmaktadır. Bu izozimler çeşitli hücre organellerinde [mitokondri (Mn-SOD), kloroplast (Fe-SOD ve Cu/Zn-SOD) ve peroksizom (Mn-SOD ve Cu/Zn-SOD)] lokalize şekilde bulunmaktadır (Şekil 4). Hidrojen peroksitin dismutasyonu ile O₂'nin açığa çıkmasını katalize etmektedir (Das ve Roychoudhury, 2014; Dumanović vd., 2021). Süperoksit dismutaz enziminin detoksifikasyon reaksiyonu;

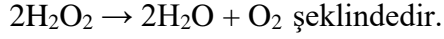


Soya fasulyesinde, *superoxide dismutase* (SOD) genlerine dair farklı dokularda 10 SOD izoenzimi bildirilmiştir (Wang vd., 2016). Bunlar, saplarda ve tohumlarda bir tane Mn-SOD izoenzimi, köklerde, yapraklarda, gövde ve tohumlarda dört Cu/Zn-SOD izoenzimi ve son olarak yapraklarda ise beş Fe-SOD izoenzimi şeklindedir (Wang vd., 2016). Bunlara ek olarak, Lu vd., (2020)'nin yaptıkları çalışmada, soya fasulyesinde potansiyel olarak toplam 13 SOD geni tespit etmişlerdir. Bu genlerin diğer yapılan çalışmalardaki gibi sınıflandırıldığında üç alt aileye ayrıldığı sonuca varılmıştır. Çalışmada tespit edilen soya fasulyesindeki SOD genleri; Mn-SOD (*GmMSD1-2*), Fe-SOD (*GmFSD1-5*), Cu-SOD (*GmCSD1-6*) olarak belirlenmiştir (Lu vd., 2020).



Şekil 4. Bağlandığı metale ve hücre içi lokalizasyonlarına göre SOD izoenzimleri (Doğru, 2019)

Katalaz (CAT), H₂O₂'nin O₂'ye dismutasyonunu katalize etmekten sorumlu bir enzimdir. Bununla birlikte angiospermilerin üç *CAT* genine sahip olduğu bildirilmiştir. Bu *CAT* genleri, *CAT1* polen ve tohumlarda, *CAT2* ağırlıklı olarak fotosentetik dokularda aynı zamanda köklerde ve tohumlarda *CAT3*'ün ise yapraklarda ve vasküler dokularda ifade edildiği bilinmektedir (Dumanović vd., 2021). Katalaz enziminin detoksifikasyon reaksiyonu;



Aleem vd., (2022a) soya fasulyesi üzerinde *catalse* (*CAT*) genlerinin tespiti ve sınıflandırılması için bir çalışma gerçekleştirmiştir. Bu çalışma neticesinde, soya fasulyesi genomunda 4 adet *CAT1* geni tanımlanmış ve bu genler filogenetik olarak 3 gruba ayrılmıştır. 1. grupta, 4.ve 6. kromozomlarda bulunan *GmCAT1*, 2. grupta, 17. kromozom üzerinde *GmCAT1* ve 3. grupta, 16. kromozom üzerindeki *GmCAT1* olarak bildirilmiştir.

Askorbat peroksidaz (APX), katalaz ağırlıklı olarak H₂O₂'yi peroksizomlarda temizlerken, APX sitozol ve kloroplastta aynı işlevi yerine getirir. Askorbat peroksidaz, H₂O₂ için CAT'dan daha iyi bir afiniteye sahip olduğundan, stres zamanlarında daha verimli bir H₂O₂ temizleyicisidir. İndirgeyici olarak askorbik asit (AA) kullanarak H₂O₂'yi H₂O ve dehidroaskorbat (DHA)'ya indirgemektedir (Hussain vd., 2019). Soya fasulyesinde *ascorbate proxidase* (*APX*) gen ailesi (*GmAPX1-4*) için yapılan filogenetik çalışmada, 5 gruba dağılan APX geni bildirilmiştir. Genler soya fasulyesi kromozomlarının 7 tanesinde gözlemlenmiştir. Bu kromozomlarda 1., 2., 4., 6. ve 14. kromozomlarda birer tane *GmAPX* geni, 11. kromozomda 4 ve 12. kromozomda 2 adet APX geni olmak üzere toplam 11 gen bildirilmiştir (Aleem vd., 2022a).

Guaiakol peroksidaz (GPX) enzimi membranları oksidatif strese karşı korumakta ve GSH varlığında fosfolipit hidroperoksitlerin rejenerasyonunu sağlamaktadır. Hem normal metabolizma hem de stres sırasında fazla H₂O₂'yi ortadan kaldıran bir enzimdir. Ligninin biyosentezinde hayati bir rol oynamakla birlikte IAA parçalayarak ve parçalamada H₂O₂ kullanarak biyotik strese karşı koruma sağlar. (Das ve Roychoudhury, 2014). Soya fasulyesinde, *glutathione peroxidase* (GPX) genlerinin (*GmGPX1-2*) filogenetik incelenmesinde buldukları yere göre genlerin 5 sınıfa ayrıldığı tespit edilmiştir. Birinci sınıfta kloroplastta bulunan 4 (*GmGPX1*) üye, ikinci sınıfta sitoplazmada bulunan 1 (*GmGPX2*) üye, üçüncü grupta sitoplazma 2 (*GmGPX*) üye, dördüncü grupta mitokondri ve

sitoplazmada bulunan 4 (*GmGPXI*) üye ve beşinci grupta peroksizomlarda bulunan 2 (*GmGPXI*) üye tespit edilmiştir (Aleem vd., 2022b).

Fenolik bileşikler arasında yer alan flavanoidler, tanninler, hidroksisinamat esterleri ve lignin bitkilerin yapısında bulunan çeşitli ikincil metabolitlerdir. Antioksidan özelliklerini iyi birer hidrojen veya elektron vericisi olmaları ve geçiş metalleri ile şelat oluşturmaları ile göstermektedir. Membranların akıcılığını azaltarak ve lipidlerin yer alış sırasını düzenleyerek serbest radikallerin hücreye difüzyonunu önleyerek peroksidasyon reaksiyonlarını önlemektedirler. Ek olarak, H₂O₂'nin temizlenmesi için gerekli olan reaksiyonlara da katılmaktadırlar (Kireççi, 2018). Bu bileşiklerden flavonoidler bitkiler aleminde yaygın olarak yapraklarda, çiçek organlarında ve polen tanelerinde bulunmaktadır. Flavonoidler yapılarına göre flavonoller, flavonlar, izoflavonlar ve antosiyaninler olmak üzere dört sınıfa ayrılır. Bitki üremesinde ve polenin çimlenmesinde, çiçeklerde, meyvelerde ve tohumlarda pigmentasyon sağlamada çeşitli rolleri bulunmaktadır (Das ve Roychoudhury, 2014). Aynı zamanda flavonoidler, sinyal molekülleri olarak oksidatif stres basamaklarına aracılık etmektedir. Son olarak flavonoidler, stresli koşullara maruz kalan bitki dokularında da ikincil antioksidan savunma sistemi görevi görmektedir (Kumar ve Pandey, 2013).

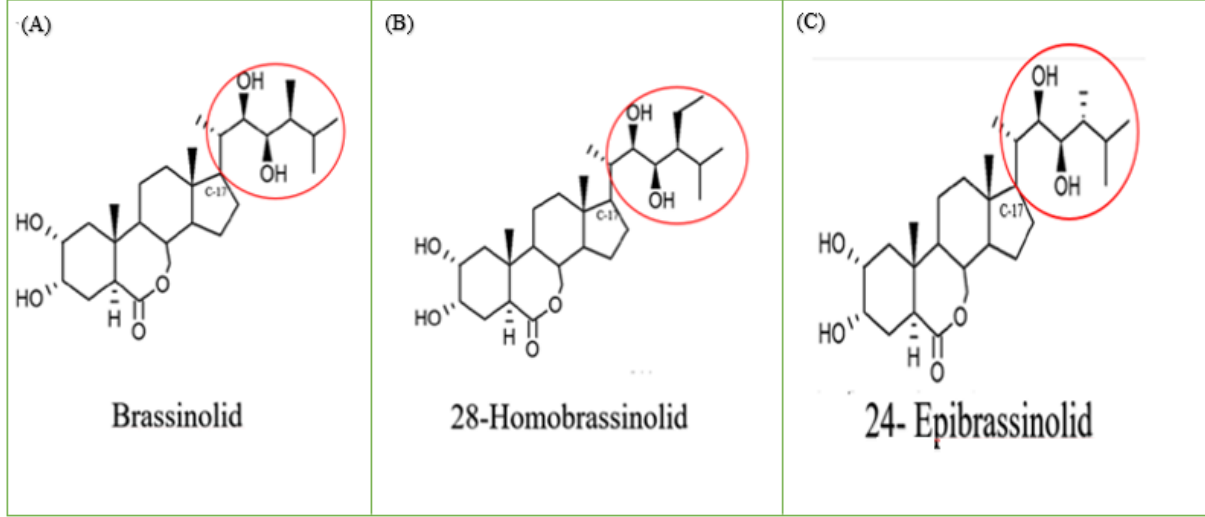
Bir ozmolit olan prolin aynı zamanda güçlü bir antioksidan olarak kabul edilmektedir. Farklı ROS üyelerinin zararlı etkilerine karşı koymak için enzimatik olmayan bir antioksidan olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Etkili bir OH⁻ ve ¹O₂ temizleyicisidir ve lipid peroksidasyonundan kaynaklanan hasarları engelleyebilmektedir (Das ve Roychoudhury, 2014). Mükemmel bir ozmolit olarak hareket etmesinin yanı sıra, prolin stres sırasında üç ana rol oynar. Stres altında prolin, metal şelatör, antioksidatif savunma molekülü ve sinyal molekülü görevi görmektedir. Bitkilerde, glutamat yolu ve orinitin yolu olmak üzere prolin iki yolla sentezlenir. Glutamat yolu, ozmotik stres sırasında büyük prolin birikiminden sorumludur. Prolin, ara madde Δ'-pirolin-5-karboksilat (P5C) aracılığıyla glutamatik asitten sentezlenir. Orinitin yolunda ise prolin, orinitin-δ-aminotransferaz tarafından P5C'ye transaminlenen ornitinden sentezlenebilir. Ornitin yolunun fide gelişimi sırasında ve bazı bitkilerde stres kaynaklı prolin birikimi için önemli olduğu öne sürülmüştür (Hayat vd., 2012).

1.5. Brassinosteroidlerin Kimyasal Yapıları

Brassinolid olarak isimlendirilen brassin bileşiği ilk olarak 1979 yılında 227 kg kolza poleninden 4 mg izole edilerek keşfedilmiş ve hayvanlardaki steroid hormonlarının yapısına benzerlik gösterdiği görülmüştür (Clouse, 2011). Bununla birlikte hormon olarak kabul edilmesi 1998'de, 13. Uluslararası Bitki Büyüme Maddeleri Toplantısında gerçekleşmiştir. (Li vd., 2020). Brassinosteroid (BR)'ler bitkilerde çeşitli gelişimsel ve fizyolojik olayların düzenlenmesinde rol almaktadır (Kagale vd., 2006). Düşük miktarlarda dahi etkili olabilen BR'ler, hücre bölünmesi, genişlemesi ve uzaması, hücre duvarı rejenerasyonu, tohum çimlenmesi, vasküler farklılaşma, ksilem farklılaşması, polen tüpü oluşumu, biyokütle ve verim artışı gibi büyüme ve gelişim süreçlerinin yanı sıra ROS'un detoksifikasyonunu uyarmada ve fotosentez verimliliğinin artırılmasında rol oynamaktadır (Surgun vd., 2012). Örneğin yapılan çalışmalarda, uygulanan EBL patates (*Solanum tuberosum*) yumrularında apikal meristemlerin büyümesini düzenlemiş (Meudt vd., 1983), *Petunia* hibridinin protoplastlarında hücre bölünmesi hızlandırmış (Oh ve Clouse, 1998) ve *Arabidopsis thaliana* yapraklarında hücre bölünmesini ve yaprak genişlemesini arttırmıştır (Zhiponova vd., 2012).

Bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan BR'ler, doğal olarak oluşan steroidal yapıya sahip hormon grubunu temsil etmektedir. Brassinosteroidler, 5 α -kolestanın türevleridir ve yapılarındaki değişkenlik, A ve B halkalarının yanı sıra C-17 yan zincirindeki değişiklikler nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Brassinosteroidler, tüm bitki organlarında bulunmalarına rağmen, maksimum konsantrasyonları tohumlarda ve polenlerde rapor edilirken en düşük konsantrasyon yaprak ve sürgünlerde tespit edilmiştir. Yapılarındaki karbon sayılarına bağlı olarak BR'ler C₂₇, C₂₈ ve C₂₉ gruplarına ayrılırlar ve şimdiye kadar tanımlanan toplam brassinosteroidlerin yaklaşık %40'ı C₂₈ gruplarına aittir (Bartwal ve Arora, 2020). C₂₇ grubu BR'ler C-24 konumunda herhangi bir alkil grubu bulundurmamaktadır ve kolestrolden türetilmektedirler. C₂₈ grubu C-24 konumunda α -metil, β -metil veya metilen içeren sırasıyla kampesterol, dihidrobrasikasterol veya 24-metilenkolesterolden türetilen BR'lerdir. Son olarak C₂₉ BR'leri ise, C-24'de etil veya α -etil grubuna sahiptir ve sitosterolden türetilmektedir (Kanwar vd., 2017). Brassinosteroid hormon grubu günümüze kadar alglerden angiospermelere kadar 100'den fazla bitki türünden izole edilmiştir. Tespit edilmiş 70'den fazla bileşiği bulunan BR'lerin en aktif olanları brassinolid (BL), 24-Epibrassinolid

(EBL) ve 28-Homobrassinolid (HBL) olarak bilinen analoglarıdır (Şekil 5)(Kanwar vd., 2017; Hussain vd., 2020).

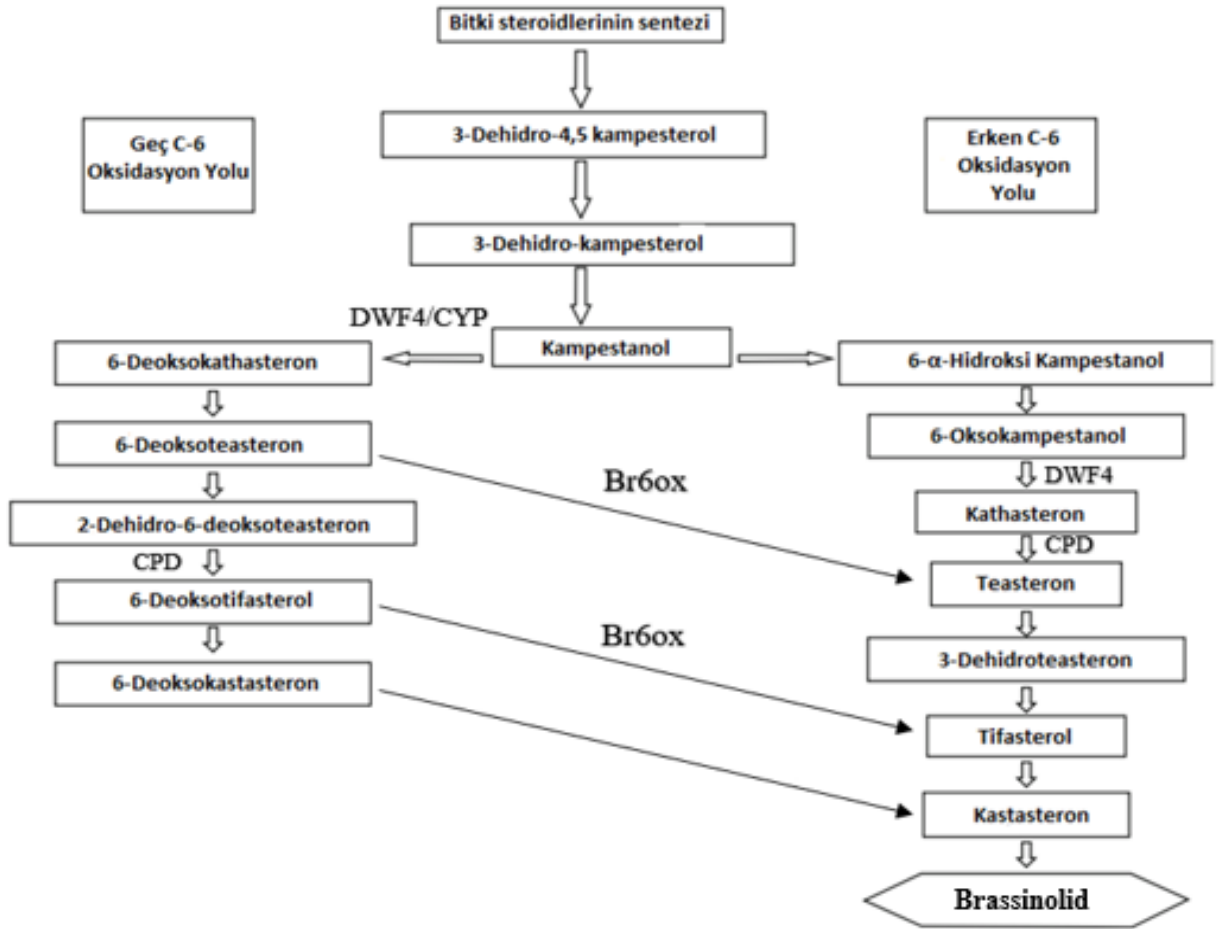


Şekil 5. Başlıca aktif brassinosteroidler. Brassinolid (A), 28-Homobrassinolid (B) ve 24-Epibrassinolid (C) (Anwar vd., 2018).

1.6. Brassinosteroidlerin Biyosentezi

Brassinosteroidlerin biyosentezine dair ilk çalışmalar çeltik, *Arabidopsis* spp. ve domates gibi bitkilerde gerçekleştirilmiştir (Divi ve Krishna, 2009). Brassinosteroidler hücre zarında yoğun şekilde bulunan kampesterol ve hücre membranında az miktarda bulunan kolesterolden de türevlenmektedir (Surgun vd., 2012). Bununla birlikte kampesterolün, en aktif BR olan BL'ye dönüşümü çeşitli türlerde incelenen bir dizi indirgeme, hidroksilasyon ve oksidasyon yoluyla gerçekleşmektedir (Clouse, 2011). Brassinosteroidlerin biyosentezi kampesterol tarafından başlatılır. Yapılan deneyler sonucu, kampesterolden kastasterona erken ve geç C-6 oksidasyon (kampesterol bağımlı yol) yolları ve erken C-22 ve C-23 hidroksilasyon (kampesterol bağımsız yol) yolları olarak adlandırılan paralel iki yolak ortaya koymuştur (Fujioka ve Yokota, 2003; Hu vd., 2021). Erken C-6 oksidasyon yolunda, kampestanol 6-Oksokampestanol dönüştürülür ve 6-Oksokampestanol daha sonra kathasterona dönüştürülür. Geç C-6 oksidasyon yolunda ise, kampestanol, kathasterona dönüştürülen 6-deoksokathasterona dönüştürülür (Hu vd., 2021). Bu yolakların son evrelerinde kastasteron B halkasının laktonizasyonu sonucunda brassinolid bileşiği meydana

gelmektedir (Şekil 6). C-6 oksidasyonunda BR6ox katalizör olarak görev almaktadır. Sentezdeki oksidasyon aşamaları sitokrom P450 monooksijenaz enzimlerince düzenlenmektedir. C-22 hidroksilasyonu P450 genlerinden DWF4, C-23 hidroksilasyon reaksiyonu ise CPD geni ile gerçekleşmektedir. Biyosentez esnasında izlenen bu iki yolak brassinolid sentezini kompleks hale getirmekle birlikte çeşitli stresler altında ve fizyolojik şartlarda avantaj sağlamaktadır (Divi ve Krishna, 2009).

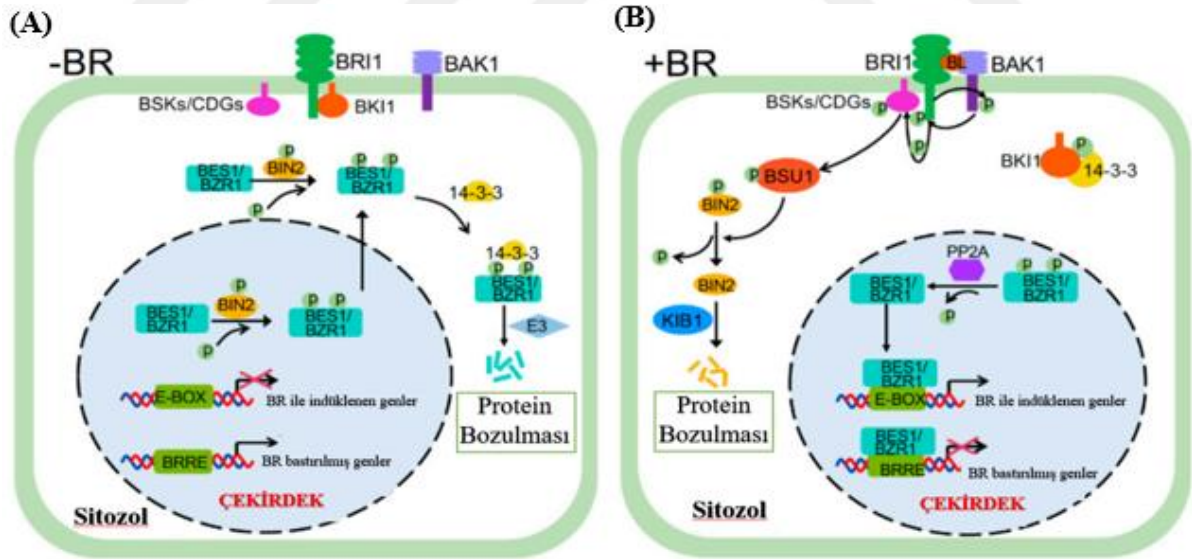


Şekil 6. Brassinolidin biyosentez yolları (Bartwal ve Arora, 2020)

1.7. Brassinosteroidlerde Sinyal İletimi

Brassinosteroidler, hücre zarında yer alan ve Brassinazole Resistant 1 (BZR1) ve BRI1-EMS Suppressor 1 (BES1) transkripsiyon faktörlerini uyaran lösün bakımından zengin kinaz reseptörü benzeri Brassinosteroid insensitive1 (BRI1) tarafından algılanır ve bağlanır

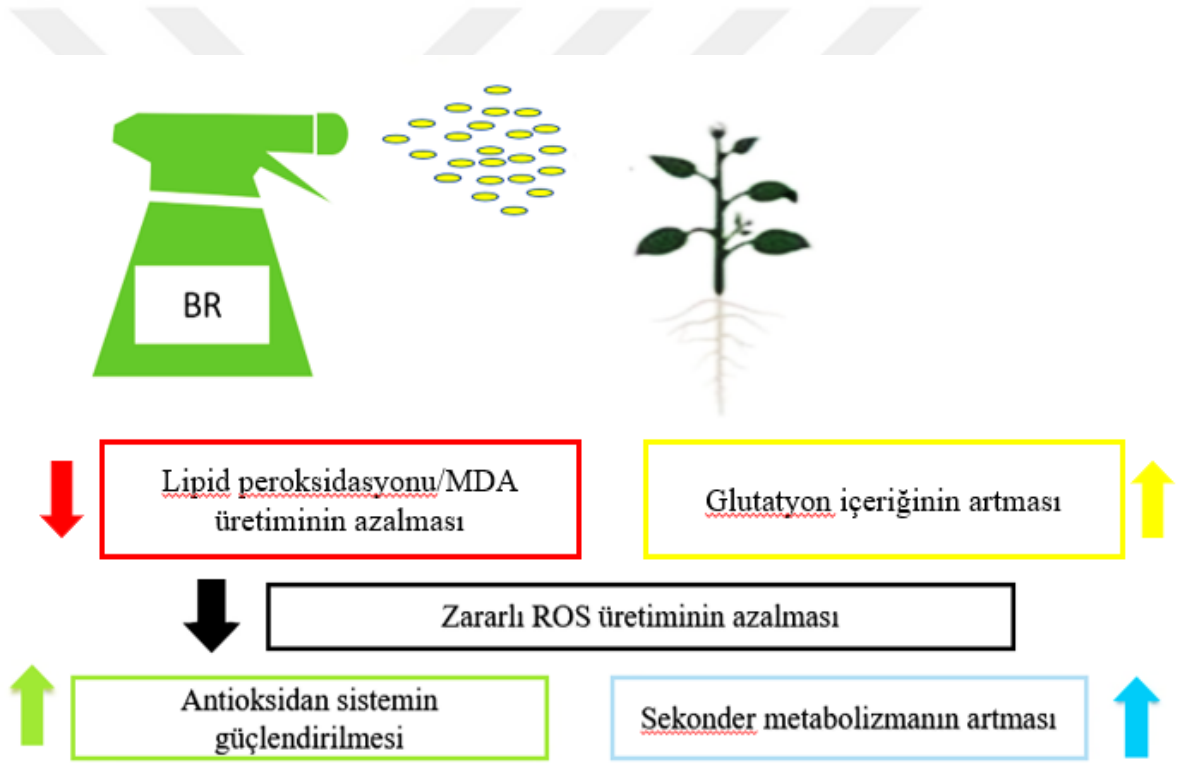
(Mao ve Li, 2020; Basit vd., 2021). Bu bağlanma BRI1 inhibitörü BKI1 Kinase İnhibitor1 (BK11)'i fosforile eder ve hücre zarından ayrılmasını indüklerken BRI1 ve BRI1-Associated Receptor Kinase 1 (BAK1)'in aktivasyonunu sağlar. BRI1, BR-Signaling Kinase 1 (BSK1) ve bunların homologlarından bazılarını fosforile ederek, BRI1 Supressor 1 (BSU1) ve BSU1-Like 1-3 (BSL1-3)'ü içeren bir protein fosfataz ailesi üyelerinin fosforilasyonuna ve ardından aktivasyonuna yol açar (Mao ve Li, 2020). Fosforile edilmiş BSU1 ve BSL'ler, Glycogen Synthase Kinase3 (GSK3) benzeri kinaz ailesinin bir üyesi olan Brassinosteroid Insensitive 2 (BIN2)'yi etkisiz hale getirir (Planas-Riverola vd., 2019; Mao ve Li, 2020). BIN2'nin inaktivasyonu ve bozulması, oldukça benzer iki BIN2 substratı olan BZR1 ve BES1, Protein Phosphatase 2A (PP2A) protein grubunun bazı üyeleri tarafından hızlıca defosforile edilir. Defosforile edilmiş BZR1 ve BES1, bitki büyümesi ve gelişimi için çok önemli olan binlerce BR'ye yanıt veren genin ekspresyonunu düzenlemek için BR-Response Element (BRRE) ve CANNTG (E-box) motifini içeren hedef promotörlerine bağlanır (Mao ve Li, 2020). Brassinosteroidler olmadığında, GSK3-benzeri kinaz BIN2, BZR1/BES1 proteinlerini fosforile eder ve onları inaktive ederek, 14-3-3 proteinlerine bağlanmalarını teşvik eder ve bozulmasına yol açar (Şekil 7) (Planas-Riverola vd., 2019).



Şekil 7. Brassinosteroidlerde sinyal iletimi. Brassinosteroid yokluğunda (-BR) (A) ve Brassinostreoid varlığında (+BR) (B) sinyal iletim yolları (Mao ve Li, 2020).

1.8. 24-Epibrassinolid'in Bitkilerde Abiyotik Stres Üzerine Etkileri

24-Epibrassinolid, bitkilerde gelişim süreçlerinde kritik rollere sahip, hücre bölünmesini ve uzamasını, gen ekspresyonunu ve vasküler farklılaşmayı düzenleyen biyolojik olarak aktif bir BR bileşiğidir (Anwar vd., 2018). Nishikawa vd., (1994) buğday ve salatalık bitkilerine kökten uyguladıkları radyoaktif işaretli EBL'nin uygulamadan hemen sonra sürgüne doğru hareket ettiğini kanıtlamışlardır. Yapılan çalışmalarda, EBL'nin ekzojen olarak bitkiye uygulanması neticesinde bitki büyümesine ve gelişmesine, meyve kalitesine, biyotik ve abiyotik stres toleransına olumlu katkılar sağladığı bildirilmiştir (Şekil 8) (Khalid ve Aftab, 2016; Ali vd., 2021).



Şekil 8. Ekzojen uygulanan BR'nin ROS ve antioksidan sistem üzerine etkileri (Hussain vd., 2020). Fidelerin yapraklarına spreyleme yöntemi ile uygulanan BR hormonu ROS üretiminin ve dolayısıyla lipid peroksidasyonunun azalmasına neden olurken, antioksidan sistemi güçlendirerek sekonder metabolizmanın ve glutasyon içeriğinin artmasını sağlamaktadır.

24-Epibrassinolid'in yüksek ve düşük sıcaklık stresi, tuzluluk, kuraklık ve ağır metal stresi altındaki bitkilerde stresin etkilerini hafifletici rollere sahip olduğu tespit edilmiştir (Shahzad vd., 2018). 24-Epibrassinolid hormonu domateste ısı şoku proteinlerinin üretimini artırarak yüksek sıcaklık altında stres direncini geliştirmiştir (Bhandari ve Nailwal, 2020). Benzer şekilde, *Zea mays* L. fidelerinde de EBL uygulamasının tuzluluk stresi altında oksidatif hasarın önlenmesi için ozmoprotektanlarda (prolin, glisin betain ve mannitol) artışa neden olduğu bildirilmiştir (Hu vd., 2021).

24-Epibrassinolid hormonu ağır metal stresi altında bitkilerde antioksidan sistemi düzenleyebilmektedir. Ekzojen olarak yapılan EBL uygulaması hücre geçirgenliğini, ağır metallerin alımını ve enzim aktiviteleri üzerine etki etmektedir (Shahzad vd., 2018). Yapılan bir çalışmada, turp (*Raphanus sativus* L.) fidelerinde EBL uygulamasının serbest prolin seviyesini artırarak Cd'nin toksik etkilerini iyileştirdiğini ve antioksidan enzim aktivitelerinin de EBL uygulamasına bağlı olarak kadmiyum stresi altındaki fidelerde arttığı rapor edilmiştir (Anuradha ve Rao, 2007). Kapoor vd. (2014), EBL uygulamasının turp fidelerinde Cd ve Hg stresi altında antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırdığını bildirmişlerdir. 24- Epibrassinolid'in ağır metallerle karşı toleransı arttırmaya yönelik mekanizmaları, çeşitli antioksidan savunma genlerinin [*GR*, *cAPX*, *CAT*, *MDAR* gibi genler] ekspresyon seviyelerindeki artıştan kaynaklanmaktadır. Bitkiler ağır metal stresine maruz kaldıklarında, NAM, ATAF1/2 ve CUC2 (NAC), miyeloblastoz (MYB), temel sarmal-ilmek-sarmal (bHLH) gibi farklı transkripsiyon faktörlerinin yardımıyla genom seviyesinde BR sinyal iletimi meydana getirmektedir (Bhandari ve Nailwal, 2020). Brassinosteroid sinyal yolunda yer alan transkripsiyon faktörleri BZR1 ve BES1, farklı genleri hedefleyerek bitki büyümesini ve stres tepkisini düzenlemektedir (Jia vd., 2021). Bu genlerin sentezlediği enzimler ile bitkide ağır metal stresine karşı tolerans artmaktadır (Bhandari ve Nailwal, 2020).

İKİNCİ BÖLÜM

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Soya fasulyesinde yapılan araştırmada Cd'nin antioksidan enzimler üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Soya fasulyesi fidelerine 48 saat farklı konsantrasyonlarda hidroponik ortamda Cd (0, 0.01, 0.5 mM) uygulamaları yapılmış ve kök ve yaprak dokularında glutatyon redüktaz (GR), SOD ve CAT enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Analizlerin sonucunda, SOD ve CAT enzim aktivitelerinde düşük konsantrasyonlarda yaprak dokularında önemli bir değişim gözlenmezken, GR ve CAT aktivitesinin 0.5 mM Cd uygulaması sonucu köklerde artış gösterdiği tespit edilmiştir (Ferreira vd., 2006).

Finger-Teixeira vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada 24 saat boyunca hidroponik ortamda uygulanan Cd'nin soya fasulyesinde kök büyümesi, hücre canlılığı, H₂O₂ seviyesi, fenilalanin amonyak liyaz (PAL) ve POD enzim aktiviteleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Kadmiyum stresi soya fasulyesinde kök uzunluğu, taze ve kuru ağırlıklarda azalmanın yanı sıra hücre canlılığında inhibisyona neden olmuştur. Ayrıca PAL aktivitesi, çözünür ve hücre duvarına bağlı POD aktiviteleri, H₂O₂ ve lignin içerikleri önemli ölçüde artmıştır. Çalışmanın sonucunda Cd'nin neden olduğu etkilerin, hücre duvarını katılaştıran ve kök büyümesini kısıtlayan ligninin monomeri olan monolignolün fazla üretiminden kaynaklanabileceği gösterilmiştir.

Kadmiyum kaynaklı oksidatif stres ve antioksidatif mekanizmanın araştırıldığı çalışmada soya fasulyesi tohumları 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca 50, 100 ve 200 mg L⁻¹ Cd konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Soya tohumlarında Cd birikimi uygulama süresi ve konsantrasyondaki artışa bağlı olarak artmıştır. 200 mg L⁻¹ Cd uygulaması 72 ve 96 saatlik maruziyetten sonra istatistiksel olarak GST aktivitesini arttırmıştır. Ayrıca yüksek konsantrasyonda Cd uygulaması (200 mg L⁻¹) MDA seviyesinde artışa neden olmuştur. Soya fasulyesi tohumlarındaki prolin içeriği ise uygulanan tüm konsantrasyonlarda artmıştır (Yang vd., 2012).

Soya fasulyesinin büyümesi ve nitrojen fiksasyonu üzerine Cd'nin etkisinin araştırıldığı çalışmada soya fasulyelerine 0, 4, 8 ve 16 mg kg⁻¹ konsantrasyonlarında Cd(NO₃)₂ uygulaması yapılmıştır. Bitkilerin sürgün ve kök uzunlukları, sürgün ve kök

biyokütlesi, nodül yoğunluğu ve Cd alımı 2., 4., 6., 8., 10. ve 12. haftalarda kaydedilmiştir. Uygulamada Cd konsantrasyonu ve uygulama zamanının artışına bağlı olarak nitrojen fiksasyonu olumsuz etkilenmiştir. Kök ve sürgün uzunluğunda maksimum azalma 10. haftada kaydedilirken, en yüksek Cd birikimi 16 mg kg^{-1} içeren uygulama sonucu tespit edilmiştir (Sheirdil, 2012).

Genç soya fasulyesi fidelerine iki farklı konsantrasyonda (10 ve 25 mg L^{-1}) Cd uygulanmış ve çeşitli sinyal iletim yollarında yer alan on dört genin ekspresyon seviyesi 3., 6. ve 24. saat sonunda belirlenmiştir. Çalışma sonucunda Cd'nin, ET ve poliamin metabolizmasında, nitrik oksit oluşumunda, MAPK yolları ve diğer genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde yer alan proteinleri kodlayan genlerin uyarılmasına neden olduğunu bildirilmiştir (Chmielowska-Bak vd., 2013).

Soya fasulyesine 10 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda uygulanan Cd (0 , 50 ve $100 \mu\text{M}$) büyümeyi engellemiş, klorofil içeriği, fotosentez hızı, stoma iletkenliği ve hücreler arası CO_2 konsantrasyonunu azaltmıştır. Köklerdeki Cd birikiminin gövde ve yapraklara kıyasla daha fazla olduğu belirtilmiştir (Xue vd., 2013).

Farklı bir araştırmada EBL'nin tuz stresi altında soya fasulyesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bitkilere 3 hafta boyunca 100 mM konsantrasyonda tuz stresi uygulanmış ve sonuç olarak büyüme, biyokütle verimi, pigment ve klorofil içeriklerinde azalma meydana geldiği rapor edilmiştir. 24-Epibrassinolid uygulaması (10^{-7} mM) soyada tuz stresinin meydana getirdiği bu etkileri hafifletmiştir. Tuz stresi ile artış gösteren SOD ve CAT enzim aktiviteleri ve prolin seviyesi, EBL uygulamaları sonucu daha da arttırmıştır. Tuz stresi bitkilerde, Ca, K ve P alımında bir azalma ile birlikte kök ve sürgünlerde Na alımını arttırmıştır. Bununla birlikte, EBL uygulaması Na birikimini azaltırken Ca, K, P alımını arttırmıştır (Alam vd., 2019).

Bitkilerde yüksek miktarda sudan kaynaklanan stres stomaların durumu ve gaz değişimini olumsuz etkilemekte, düşük besin alımı ve büyümede azalma gibi belirtilere neden olmaktadır. Pereira vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada EBL'nin soya fasulyesi bitkilerinde su birikiminden kaynaklanan hasara karşı etkileri, kök ve yaprak anatomisi, fotosentetik mekanizma ve biyokütle üzerinden değerlendirilmiştir. Soya fasulyelerine iki

su koşulu (kontrol ve su basması) ve üç farklı konsantrasyonda EBL (0, 5 ve 10 nM) uygulaması gerçekleştirilmiştir. Uygulama sonucunda su basması koşullarındaki soya fasulyesinde EBL'nin fotosistem II (PSII)'nin verimliliğini en üst düzeye çıkarttığı ve artan klorofil içeriği ve elektron taşıma hızına ek olarak stomalarda da daha yüksek yoğunluk ve indeks ile açıklanan gaz alışverişini geliştirdiği tespit edilmiştir. 24-Epibrassinolid uygulaması kök yapılarında, su birikmesinin vasküler silindirler ve metaksilem üzerindeki etkisini azaltarak, stresli bitkilerde bu yapıların onarımını ve işlevlerini ortaya koymuştur.

Yapılan araştırmada soya fasulyesine farklı konsantrasyonlarda brassinolid (BL) uygulamalarının tuz stresi (0, 32.40, 60.60, ve 86.30 mM) üzerine etkileri farklı gelişim dönemlerinde değerlendirilmiştir. Tohum, yaprak, gövde ve köklerde tespit edilen N, P, K, Ca ve Mg miktarlarının yanı sıra tohum proteini ve N konsantrasyonları tuz stresi ile önemli ölçüde azalmıştır. Bu eğilimler, fotosentetik pigmentlerde, yaprak stoma iletkenliğinde ve stres altındaki fidelerin yapraklarındaki nispi su içeriğinde önemli azalmalara bağlanmıştır. Tuzlulukla birlikte SOD ve POD aktivitesi önemli derecede artış göstermiştir. Brassinolidin yapraktan uygulanması önemli ölçüde fotosentetik özellikleri iyileştirmiş ve uygun K/Na⁺ oranını koruyarak oksidatif hasarı hafifletmiştir (Otie vd., 2021).

Yapılan çalışmada nikel (Ni) fazlalığının soya fasulyesindeki etkilerine karşı EBL'nin rolü araştırılmıştır. Bitkilere iki farklı konsantrasyonda Ni (0 ve 200 µM) ve/veya EBL (100 nM) uygulamaları yapılmıştır. Nikel fazlalığı kök ve yaprak yapılarına zarar vererek bu dokularda anatomik bozukluklara neden olmuştur. 24-Epibrassinolid uygulaması kök epidermisini kalınlaştırarak (%27) kökü Ni²⁺ iyonlarına karşı korumuştur. 24-Epibrassinolid uygulaması nikel maruz bırakılan bitkilerin yaprak dokularında palizat (%11) ve süngerimsi parankimada (%29) önemli artışlara neden olmuştur. Sonuç olarak 100 nM EBL uygulamasının soya fasulyesi bitkilerinde yaprak ve kök yapılarında Ni stresinin neden olduğu anatomik bozuklukları azalttığı ortaya koyulmuştur (Saraiva vd., 2021).

Kadmiyum ve BR'e maruz bırakılan 60 günlük *Brassica juncea* bitkilerinde büyüme, fotosentez, karbonik anhidraz, nitrat redüktaz ve antioksidan enzim aktivitelerindeki değişimler araştırılmıştır. Bir haftalık fidelere besin solüsyonu ile birlikte 50, 100 ve 150 µM Cd uygulaması yapılmıştır. Daha sonra fidelerin 30. gününde yapraklarına 0.01 µM HBL püskürtülmüştür. Tek başına Cd uygulaması yapılan bir haftalık bitkilerde büyümede,

karbonik anhidraz aktivitesinde, klorofil pigment seviyelerinde ve net fotosentetik oranda azalma tespit edilmiştir. Ayrıca hem yapraklarda hem de köklerde nitrat içeriği, nitrat redüktaz aktivitesi ve karbonhidrat seviyesi, Cd konsantrasyonu arttıkça azalmıştır. Kadmiyum tarafından oluşan toksik etki, yapraklara püskürtülen HBL ile hafifletilmiştir. Antioksidatif enzimler olan SOD, CAT ve POD aktiviteleri ve prolin içeriği Cd uygulaması sonucu kontrole göre artarken, HBL uygulaması enzim aktiviteleri ve prolin seviyesini daha da artmıştır (Hayat vd., 2007).

Diğer bir çalışmada HBL veya EBL uygulamalarının Cd stresi altında iki domates çeşidi (K-25 ve Sarvodya) üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada 0, 3, 6, 9 veya 12 mg kg⁻¹ konsantrasyonlarda Cd uygulamasına tabi tutulan domates çeşitlerinin yapraklarına 10⁻⁸ M konsantrasyonda HBL veya EBL püskürtülmüştür. Araştırma neticesinde fotosentetik parametrelerin, yaprak su potansiyelinin ve çeşitli enzimlerin (nitrat redüktaz ve karbonik anhidraz) aktivitesinin toprakta artan Cd konsantrasyonu ile K-25'te Sarvodya'dan daha az olmak üzere her iki çeşitte de önemli ölçüde azaldığını göstermiştir. Brassinosteroidlerin ekzojen uygulaması genel olarak her iki çeşitte de fotosentetik mekanizmaları ve antioksidan savunma sisteminin aktivitesini arttırmıştır (Hasan vd., 2011).

Farklı bir çalışmada, Cd'nin domateste (*Solanum lycopersicum*) meydana getirdiği olumsuz sonuçlara karşı EBL'nin etkileri araştırılmıştır. Çalışmada domates bitkilerine 3, 6, 9 veya 12 mg kg⁻¹ konsantrasyonlarda Cd uygulanmıştır. Kadmiyum uygulaması sonrası bitkilerde zayıf büyüme ve biyolojik verim rapor edilmiştir. Bununla birlikte EBL (10⁻⁸ M) uygulaması bitkilerde metalin sebep olduğu zararlı etkileri nötralize etmiştir (Hayat vd., 2012).

Yapılan çalışmada, bitki hormonlarının ağır metal stresine karşı etkilerini araştırmak için farklı konsantrasyonlarda kurşun (Pb) (0, 0.25, 0.5 ve 0.75 mM) uygulamalarına maruz bırakılan *Brassica juncea* L. fidelerine EBL (10⁻⁷ M) ve SA (1 mM) ayrı ayrı ve birlikte uygulanmıştır. Büyüme, pigment içeriği, antioksidan savunma tepkisi ve gen ekspresyonunun araştırıldığı çalışmada Pb toksisitesine yanıt olarak kök ve sürgün uzunluklarında, klorofil ve karotenoid içeriğinde azalma gözlenmiştir. Süperoksit dismutaz, CAT ve polifenol oksidaz (PPO) dahil olmak üzere diğer antioksidatif enzimlerin aktivitesi metal stresi altında artış göstermiştir. 24-Epibrassinolid ve SA uygulaması yapılmış fidelerde kök ve sürgün uzunluklarında, klorofil ve karotenoid içeriğinde iyileşme ile birlikte

EBL'nin uygulanmasıyla *CAT*, *POD*, *GR*, *DHAR* ve *GST* genlerinin ekspresyonunda artış tespit edilmiştir. Sonuç olarak EBL ve SA'nın birlikte uygulanmasının, ayrı ayrı uygulanmalarına kıyasla Pb stresini iyileştirmede daha etkili olduğu bildirilmiştir (Kohli vd., 2018).

Diğer bir çalışmada, EBL'nin *Arabidopsis thaliana*'da antioksidan sistem üzerine etkisi arsenat [As (V)] stresi altında araştırılmıştır. Uygulamada 8 haftalık bitkilere 100 ve 200 µM konsantrasyonlarda As (V) ve 1 µM EBL ayrı ayrı ve kombine olarak 24 saat boyunca uygulanmıştır. Uygulamada rozet yapraklarda As (V) etkisiyle antioksidan sistemdeki enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar ile birlikte SOD ve CAT izoformları, bazı ısı şoku proteinleri ve prolin sentez genlerinin ekspresyonu araştırılmıştır. Araştırma sonucunda As (V) stresi altında SOD ve CAT enzim aktivitelerinde, prolin ve toplam antioksidan seviyelerinde meydana gelen artışların EBL ile birlikte daha da arttığı tespit edilmiştir. Gen ekspresyonları incelendiğinde *CSD1*, *CSD2*, *FSD1*, *FSD2*, *MSD1* ve *CAT2* genlerinin transkript seviyeleri, kontrol ve tek başına stres uygulamalarına kıyasla EBL uygulaması sonucu daha fazla artmıştır. Mevcut çalışmada, EBL'nin *A. thaliana*'da As (V) stresine karşı biyokimyasal ve transkripsiyonel seviyelerde antioksidan savunma sistemi üzerindeki etkileri gösterilmiştir (Surgun-Acar ve Zemheri-Navruz, 2019).

Yapılan çalışmada EBL uygulamalarının Cd stresine maruz bırakılan salatalık (*Cucumis sativus* L.) bitkisinde etkileri araştırılmıştır. Uygulamada 5 mM EBL muamelesi yapılmış tohumlar 15 gün boyunca Cd içeren petrielerde büyütülmüştür. Kadmiyum kaynaklı, *C. sativus* fidelerinde MDA ve ROS'un aşırı üretimi nedeniyle oluşan oksidatif stres, fotosentetik pigment miktarı yanında morfolojik özellikleri de ciddi şekilde etkilemiştir. Fakat EBL salatalık yapraklarındaki Cd seviyesini azaltmıştır. 24-Epibrassinolid uygulaması, Cd stresli bitkilerin sürgün uzunluğunu, kök uzunluğunu ve biyokütle üretimini iyileştirmiştir. Ayrıca EBL, ET ve IAA hormonlarının sentezinin artmasını tetiklemiş ve *CS-ERS*, *CsAOX*, *CsACO1*, *CsACO2* dahil etilen reseptör genlerinin ekspresyon seviyesini de modüle etmiştir. Sonuç olarak EBL ile arttırılmış antioksidatif yeteneğin salatalık fidelerinde Cd toleransına katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Shah vd., 2019).

24-Epibrassinolid hormonunun bitkilerdeki mangan (Mn) stresine karşı etkisinin araştırıldığı çalışmada *Arabidopsis thaliana* bitkileri 24 saat farklı konsantrasyonlarda Mn

(0.5 ve 1.0 mM) ve/veya EBL'ye (1 μ M) maruz bırakılmıştır. Antioksidan sistemdeki değişiklikler ve strese bağlı gen ekspresyonları rozet yapraklarda tespit edilmiştir. Mangan uygulaması ile SOD ve CAT enzim aktivitelerinin artışı, EBL uygulamasıyla kontrol grubuna göre daha da artış göstermiştir. Hormon ve stresin kombine uygulanması sonucu antioksidan sistem ile ilgili bazı genlerin ifadelerinde artış tespit edilmiştir. Sonuç olarak EBL'nin antioksidan sistemi Mn stresi altındaki *A. thaliana* bitkisinde koordineli bir şekilde düzenlediği bildirilmiştir (Surgun-Acar ve Zemheri-Navruz, 2021).



ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali ve Uygulamalar

Tez çalışmasında kullanılan soya fasulyesi [*Glycine max* (L.) Merrill] cv. Lider çeşidine ait tohumlar ProGen Tohum A.Ş. (Antakya, Türkiye)'den temin edilmiştir. Soya fasulyesine uygulanacak olan iki farklı kadmiyum klorür (CdCl_2) konsantrasyonları ön deneme sonucu belirlenmiştir. Bu amaçla öncelikle soya fasulyesi tohumlarına sterilizasyon işlemi uygulanmıştır. Sterilizasyon işleminde soya fasulyesi tohumları önce %96'lık etanolde 2 dakika daha sonra %1'lik sodyum hipokloritte 2 dakika daha bekletilmiş ve sonra 3 kez distile su ile yıkanmıştır (Aserse vd., 2012). Sterilizasyonun ardından soya tohumları 10 cm çaplı petrielerde 0, 5, 10, 20, 40 ve 80 mg L^{-1} konsantrasyonlarda 5 ml CdCl_2 ile nemlendirilmiş filtre kağıtları arasında karanlıkta 22 ± 2 °C'de 5 gün süre ile inkübe edilmiştir. Her petride 5 tohum çimlendirilmiş olup, her uygulama için 10 petri kullanılmıştır. Sürenin sonunda uygulamalara ait petrielerde çimlenen tohumlarda kök uzunlukları tespit edilmiş ve sonuçlara göre kök büyümesinde % 50 inhibisyona neden olan konsantrasyon (40 mg L^{-1}) ile bu konsantrasyonun $\frac{1}{2}$ değeri (20 mg L^{-1}) uygulanacak CdCl_2 konsantrasyonları olarak belirlenmiştir. Ön denemenin ardından tez denemesine geçilmiş ve soya fasulyesi tohumları ön denemede uygulanan protokole göre tekrar steril edilmiş ve 5 gün süre ile çimlendirilmiştir. Çimlenmeyi takiben fideler $\frac{1}{4}$ Hoagland sıvı besin solüsyonu (Hoagland ve Arnon, 1938) (Tablo 1) içeren hidroponik kültür sistemine (Smeets vd., 2008) aktararak bitki büyütme odasına alınmıştır. Üç gün süre ile soya fasulyesi fidelerinin hidroponik sisteme adaptasyonu sağlanmıştır. Ardından fideler 20 veya 40 mg L^{-1} CdCl_2 içeren $\frac{1}{4}$ Hoagland sıvı besin ortamlarına aktarılmış ve aynı zamanda fidelerin yapraklarına spreyleme yöntemi ile 1 μM 24-Epibrassinolid (EBL, Sigma-Aldrich, E1641) uygulamaları yapılmıştır. Çalışmada kullanılan EBL konsantrasyonu daha önceki çalışmalara göre belirlenmiştir (Surgun vd., 2016). Kadmiyum klorür içeren besin ortamları her 48 saatte bir değiştirilmiş ve yapraklara aynı gün spreyleme yöntemi ile EBL uygulamaları yapılmıştır. Her fideye yaklaşık 1 ml EBL uygulaması yapılmıştır. Fidelere 10 gün boyunca CdCl_2 ve/veya EBL uygulamaları yapılmış ve son uygulamayı takiben 24 saat sonra büyüme parametreleri belirlenmiş ve yaprak örnekleri alınarak biyokimyasal ve moleküler analizlere kadar -80°C 'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 1

Hoagland besin ortamı

Hoagland Besin Ortamı (1 L)	Tam ortam	¼ ortam
0.05 M Monopotasyum fosfat (KH ₂ PO ₄)	1 ml	0,25 ml
0.1 M Potasyum nitrat (KNO ₃)	5 ml	1,25 ml
0,1 M Kalsiyum nitrat (Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O)	5 ml	1,25 ml
0,05 M Magnezyum Sülfat (MgSO ₄)	2 ml	0,5 ml
İz elementleri (B, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn)	0,5 g	0,125 g

Her uygulama için 3 hidroponik tank kullanılmış, her tankta ortalama 20 bitkinin yetiştirilmiştir. Fideler 22 ± 2 °C sıcaklık altında 16:8 saat fotoperiyodik döngüde (225 µmol m⁻² s⁻¹) bitki büyütme odasında büyütülmüştür. Denemede kullanılan uygulamalar ve kısaltmalar tablo 2 'de verilmiştir.

Tablo 2

Tez denemesinde kullanılan uygulama ve kısaltmalar

Uygulamalar	Kısaltmalar
Kontrol	K
24-Epibassinolid	EBL
Kadmiyum (20 mg L ⁻¹)	Cd (1)
Kadmiyum (40 mg L ⁻¹)	Cd (2)
Kadmiyum (20 mg L ⁻¹) + 24- Epibrassinolid	Cd (1) + EBL
Kadmiyum (40 mg L ⁻¹) + 24- Epibrassinolid	Cd (2) + EBL

3.2. Yaprak Dokularında Kadmiyum Miktarının Belirlenmesi

Uygulamalara ait yaprak örnekleri pastör fırınında 70 °C'de 48 saat süre ile bekletilmiştir. Ardından kuruyan yaprak örnekleri havan ve havaneli yardımıyla ezilmiştir. Toz haline gelen örnekler etiketlenerek 15 ml'lik tüplere aktarılmıştır. Yaprak örneklerindeki Cd miktarı Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Araştırma Laboratuvarları Uygulama ve Araştırma Merkezine bağlı Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde

asitle yaş yakma yöntemine göre mikrodalgada yakıldıktan sonra İndüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektrometresi (ICP-OES, Agilnet 5100, ABD) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Her uygulamaya ait 3 örnekte okuma yapılmıştır.

3.3. Büyüme Parametreleri

Uygulamaların ardından 10-12 fideye ait kök ve gövde kısımları ayrılarak yaş ağırlıkları tartılmış ve ardından 70°C'de 48 saat bekletildikten sonra kuru ağırlıkları tespit edilmiştir. Ayrıca fidelerin primer kök uzunlukları ve sürgün uzunlukları da belirlenmiştir.

3.4. Pigment Seviyelerinin Belirlenmesi

Toplam klorofil ve karotenoid seviyesinin belirlenmesi amacıyla yaprak örnekleri (0.3 g) 4 ml aseton (%80) ile homojenize edilmiş ve homojenatlar 6708 rpm 'de 4 °C'de 15 dakika santrifüjlenmiştir (Hettich, Universal 320R, Almanya). Örneklere ait süpernatantlar (0.2 ml) %80'lik aseton ile 2 ml'ye tamamlandıktan sonra absorbansları 470, 645 ve 663 nm'de spektrofotometrede (Thermo, Multiskan GO, Almanya) ölçülmüştür. Toplam klorofil ve karotenoidlerin konsantrasyonları Sumanta vd., (2014) formülü kullanılarak yapılmıştır.

3.5. Antioksidan Enzim Analizleri

Uygulamalara ait gerçek yaprak örnekleri (0.3 g) 3 ml 1 mM disodyum EDTA ve %2 PVP içeren soğuk fosfat tamponu (0.05 M, pH 7.0) içinde ezildikten sonra 11.337 rpm'de 15 dakika 4 °C'de santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatantlar, protein içeriği ve antioksidan enzim aktivitelerinin ölçülmesinde kullanılmıştır. Örneklerin protein içeriğinin belirlenmesinde Bradford (1976) yöntemi kullanılmıştır. Bradford reaktifi için 0,01 g Coomassie Brilliant Blue (G-250), 5 ml metanol içerisinde çözündürülmüş ve 15 ml fosforik asit ve 50 ml ddH₂O eklenmiştir. Hazırlanan çözelti filtre kâğıdı ile süzöldükten sonra üzerine 30 ml ddH₂O daha eklenerek reaktif hazır hale getirilmiştir. BSA standartları için stok solüsyonu 1 mg sığır serum albumin (BSA) 1 ml dH₂O içerisinde çözödürölerek hazırlanmıştır (Tablo 3). Bradford yönteminde protein miktarı bilinmeyen örneklerden 10 µl alınıp, üzerine 1990 µl bradford reaktiftten eklenmiş ve sığır serum albumini (BSA) içeren

standart tüpleri ile birlikte oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. Ardından tüm örneklerin ve standart tüplerinin spektrofotometrede 595 nm’de absorbansları ölçülmüştür.

Tablo 3

Bradford analizi için BSA standartlarının hazırlanışı

BSA stok (μ l)	Bradford reaktifi (μ l)
0	2000
5	1995
10	1990
15	1985
20	1980
40	1960

Yaprak örneklerinde SOD (EC 1.15.1.1) ve CAT (EC 1.11.1.6) enzim aktiviteleri Plant (SOD) Elisa Kit (SunRed, Çin) ve Plant (CAT) Elisa Kite (SunRed, Çin) (Şekil 9) göre belirlenmiştir.



Şekil 9. SOD ve CAT enzim analizlerinde kullanılan Elisa kitleri

Yaprak örnekleri 50 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 6.0) örnekler ezildikten sonra 11.337 rpm’ de 15 dk 4°C ‘de santrifüjlenmiştir. Örneklerin süpernatant kısımları ayrılarak GPX ve APX enzim aktivitelerinin ölçümünde kullanılmıştır. Guaiakol Peroksidaz (GPX) (EC 1.11.1.7) enzim aktivitesi Scebba vd., (2001)’ın yöntemine göre ölçülmüştür. Reaksiyon için gerekli solüsyonların ardından 50 μ l enzim ekstraktı da eklenmiş (Tablo 4)

ve örneklerin 470 nm’de 30 saniye aralıklarla 240 saniye boyunca absorbanstaki değişimleri kaydedilerek örneklerdeki GPX enzim aktiviteleri hesaplanmıştır.

Tablo 4

GPX enzim aktivitesi ölçümü için kullanılan solüsyonlar

	Örnek	Kör
0,05 M Sodyum fosfat tamponu (pH 6.0)	2540 µl	2550 µl
Enzim ekstraktı	10 µl	-
250 mM guaiakol	150 µl	150 µl
100 mM H ₂ O ₂	300 µl	300 µl
Toplam	3 ml	3 ml

Askorbat peroksidaz (APX) (EC 1.11.1.11) enzim aktivitesi ise Nakano ve Asada, (1981) metoduna göre ölçülmüştür. Ölçüm için gerekli olan solüsyonlar ve enzim ekstraktı (Tablo 5) eklendikten sonra reaksiyon karışımı spektrofotometrede 290 nm’de 30 saniye aralıklarla 240 saniye boyunca ölçülmüş ve APX enzim aktivitesi belirlenmiştir.

Tablo 5

APX enzim aktivitesi ölçümü için kullanılan solüsyonlar

	Örnek	Kör
0,05 M Sodyum fosfat tamponu (pH 6.0)	2500 µl	2550 µl
Enzim ekstraktı	50 µl	-
250 mM guaiakol	150 µl	150 µl
100 mM H ₂ O ₂	300 µl	300 µl
Toplam	3 ml	3 ml

3.6. Hidrojen Peroksit ve Malondialdehit (MDA) İçeriklerinin Tespiti

Hidrojen peroksit ve malondialdehit içeriklerinin belirlenmesi için soya fasulyesi yaprak örnekleri (0.3 g), 3 ml soğuk % 0.1 trikloroasetik asit (TCA) içinde ezilmiş ve 4 °C’de 15 dakika boyunca 12.000 rpm ’de santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatantlar hidrojen peroksit (H₂O₂) ve malondialdehit (MDA) içeriklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Hidrojen peroksit ölçümü için 500 µl örnek, 500 µl 10 mM potasyum fosfat tamponu (pH

7.0) ve 1 ml 1M potasyum iyodür 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Hidrojen peroksit içeriği, potasyum iyodür oksidasyonu nedeniyle triiyodür oluşumunu takiben 390 nm'de absorbans ölçümü ile belirlenmiştir (Velikova vd., 2000). Malondialdehit içeriği, tiyobarbitürik asit (TBA) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Du ve Bramlage, 1992). Yedi yüz µl örnek üzerine 2800 µl TCA içeren TBA (% 20 TCA + % 0.5 TBA) solüsyonu eklenmiş ve tüpler 95°C'de 30 dk inkübasyon edilmiştir. İnkübasyon işlemini takiben tüpler reaksiyonun sonlanması için buz içerisine alınmıştır. Örnekleri içeren tüpler (1 ml) 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendikten sonra örneklere ait süpernatantların 440, 532 ve 600 nm'de ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

3.7. Prolin Seviyesinin Belirlenmesi

Uygulamalara ait yaprak örnekleri (0.3 g) 5 ml %3'lük sülfosalisilik asit içinde ezilmiş ve homojenatlar Whatman-2 filtre kağıdından süzölmüştür. Her örneğin 1 ml filtratı üzerine 2 ml asit-ninhidrin çözeltisi (50 ml glasiyal asetik içerisinde 0,625 g asit-ninhidrin çözdürölmüştür) eklenerek 30 dakika boyunca 100 °C'de inkübe edilmiştir. Reaksiyon buz banyosunda sonlandırıldıktan sonra karışımların absorbansı 508 nm'de ölçölmüştür (Shabnam vd., 2015). Prolin içeriği, farklı L-prolin konsantrasyonlarının standart eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır.

3.8. Toplam Fenolik ve Flavonoid Seviyesinin Tespiti

Yaprak örnekleri (0.3 g) 3 ml saf metanol (%100) içinde ezildikten sonra 4 °C'de 10 dakika boyunca 13.000 rpm'de santrifüjlenmiştir ve elde edilen süpernatantlar toplam fenolik ve flavonoid seviyesinin belirlemede kullanılmıştır. Toplam fenolik miktarının belirlenmesi amacıyla her örneğin (50 µl) süpernatantı üzerine 475 µl 0.25 N Folin-Ciocalteu reaktifi ve 475 µl 0.2 M Na₂CO₃ çözeltisi eklenmiştir. Karışımların absorbansı oda sıcaklığında 30 dak. inkübasyondan sonra 724 nm'de ölçölmüştür (Maksimović ve Živanović, 2012). Toplam fenolik içeriği, kafeik asit ile hazırlanan standart eğri kullanılarak hesaplanmıştır. Total flavonoid içeriği için her örneğin (0.5 ml) süpernatantı üzerine 1.5 ml metanol (% 100), 2.8 ml dH₂O, 0.1 ml % 10 AlCl₃ ve 0.1 ml 1 M potasyum asetat eklenmiştir. Oda sıcaklığında 30 dak. inkübasyondan sonra karışımların absorbansları 415 nm'de

ölçülmüştür (Shubhangi vd., 2017). Total flavonoid içeriği kuersetin ile hazırlanan standart eğri kullanılarak hesaplanmıştır.

3.9. Gen İfade Analizleri

Kontrol ve uygulama gruplarına ait bitkilerin yaprak dokularından total RNA izolasyonu RNA izolasyon kiti (GeneJet Plant RNA Purification Kit, Thermo, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Uygulanan RNA izolasyon kitine ait protokolün basamakları tablo 6'da verilmiştir. İzole edilen RNA örneklerinin miktarları ve saflık oranları (A260/A280) spektrofotometre cihazı, bütünlüğü ve kalitesi ise yatay elektroforez sistemi kullanılarak tespit edilmiştir.

Elektroforez işlemi için; %0,8'lik agaroz jel, 100 ml 0.5 X TBE (Tris-Borat-EDTA) solüsyonu içerisinde 0.8 g agaroz kaynatılarak hazırlanmıştır. Soğutulan jele 10 mg ml⁻¹ etidyum bromür (EtBr) stok çözeltisinden 3 µl eklenmiş elektroforez tankına dökülmüştür. DNA Ladder ve yükleme boyası ile karıştırılan RNA örnekleri 80 Voltta 1 saat koşturulmuştur.

Tablo 6

Bitkilerden RNA izolasyonu için kullanılan protokolün basamakları

Bitki RNA İzolasyonu Protokolü	
1.	Soya fasulyesine ait yaprak örnekleri (0,1 g) havan ve havaneli kullanılarak sıvı azot içerisinde ezildikten sonra tüplere aktarıldı ve üzerine Plant RNA Lysis solüsyonu (500 µl) eklenmiştir.
2.	Karışımı içeren tüpler 56°C' de 3 dakika inkübe edildikten sonra 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
3.	Santrifüj işlemi sonrasında örneklerden süpernatant kısmı alınıp (450-550 µl), temiz tüplere aktarılmış ve ardından tüplere 250 µl etanol eklenip pipetaj yapılmıştır.
4.	Hazırlanan karışım, saflaştırma kolonu yerleştirilmiş tüplere aktarılmış ve 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme sonrası tüpün alt kısmına inen kısım atılarak saflaştırma kolonu yeni tüp ile birleştirilmiş ve Wash Buffer 1 solüsyonundan 700 µl eklenerek 11.000 rpm'de 1 dakika daha santrifüj işlemi yapılmıştır. Benzer şekilde tüpün alt kısmına inen kısım atılmıştır.
5.	Saflaştırma kolonu yeni 2 ml'lik tüplere alınarak üzerlerine 500 µl Wash Buffer 2 solüsyonu eklenmiş ve 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlanmış ve her defasında tüplerin alt kısmında toplanan sıvı atılmıştır.
6.	Son aşamada saflaştırma kolonu yeni tüplere aktarılmış ve saflaştırma kolonunun merkezine 50 µl nükleaz içermeyen su eklenmiştir. 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüjle işlemi yapılarak kolondaki total RNA'nın tüpün alt kısmına indirilmesi sağlanmış ve total RNA izole edilmiştir.

RNA örneklerinden genomik DNA kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla DNaz I enzim (DNase 1, RNase-free, Thermo, Almanya) uygulaması yapılmıştır. DNaz 1 uygulaması için 1 µg total RNA örneklerine 10X reaksiyon tamponu (MgCl₂ ile birlikte) (1 µl), DNase 1 enzimi (1 µl) eklenmiş ve son hacim ultra saf su ile 10 µl'ye tamamlanmıştır. Örnekler 37°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyonunun sonlanması amacıyla tüplere 1 µl EDTA (50 mM) eklenmiş ve 65°C'de 30 dakika daha inkübe edilmiştir. Uygulama sonrası RNA örnekleri cDNA sentezi için RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo, Almanya) kullanılmıştır. cDNA sentezi için RNA örneklerine 1 µl Oligo(dT) eklenip 65°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Ardından tüplere 4 µl 5X reaksiyon tamponu, 2 µl 10mM dNTP (mix), 1 µl Ribolock RNase inhibitörü ve 1 µl RevertAid M-

MuLV reverse transkriptaz eklenerek 1 saat 42°C’de ardından 5 dakika 70°C’de bekletilerek cDNA sentez edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında ekspresyon seviyeleri araştırılacak genleri belirlemek için literatürler değerlendirilmiş ve araştırılmak üzere *Glycine max*’ta antioksidan sistem ile ilgili bazı genler tespit edilmiştir. Belirlenen genlere ait primerlerin erişim numaraları, primer sekansları, optimum çalışma sıcaklıkları ve referansları tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7

Tez kapsamında ifade analizlerinde kullanılan genlere ait primer ileri (F) ve geri (R) sekansları, optimum çalışma sıcaklıkları ve referansları

Genler	Erişim Numarası	Primer Sekansları (5’-3’)	T _a (°C)	Referans
<i>GmCSD5</i>	NM_001255882.1	F-AGGTGTGGCTATCATCATCGG R-TCACTCTCCCTGTCACATGG	58	Bu çalışma
<i>GmFSD3</i>	NM_001250972.2	F-GGGGAAACACCACAAGACATAT R-AAGCCCATCCTGAACCAAAT	58	Lu vd., 2020
<i>GmMSD1</i>	NM_001248137.2	F-CCCATAATCGGAGCTGGCAT R-CATGATTTGCGCGCTGATGG	58	Bu çalışma
<i>GmCAT1</i>	NM_001250627.1	F-TCTCTTTTGGACGACGAGGC R-AAGGGGGTCAAAGTCAAGCC	60	Bu çalışma
<i>GmAPX1</i>	L10292.1	F-ATGCGCTCCTCTAATGCTCC R-GTCAAGACCGTTGTTAGCGC	60	Bu çalışma
<i>GmPOD</i>	XM_006575142.4	F-ACGTTTGAAGAGCTCGGTG R-TGATCAGGTGTGCTCAGGTC	60	Bu çalışma
<i>GmActin-6</i>	NM_001289231.2	F-GCAAGTGGTCGTACAACCTGG R-AGACGAAGGATGGCATGTGG	58	Bu çalışma

Seçilen genlere ait primer tasarımları %GC, primer dimeri vb. durumlar göz önünde bulundurularak MacVector Pro 18 (USA) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tasarlanan primerlere ait optimum çalışma sıcaklıkları ön denemeler ile belirlenmiştir. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) 2X AMPIGENE qPCR Green Mix (Enzo Life Sciences, ABD) kullanılarak StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo, Almanya) cihazında gerçekleştirilmiştir (Şekil 10). Her qRT-PCR reaksiyonunda

Actin6 geni internal kontrol olarak tekrar edilmiştir. Tüm genler için qRT-PCR reaksiyonları 3 biyolojik ve 3 teknik tekrar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon koşulları, 95 °C'de 10 dakika, ardından 95 °C 15 saniye, 58-60°C 30 saniye ve 1 dakika 72 °C şeklinde olup 40 döngüdür. Hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri $2^{-\Delta\Delta Cq}$ formülü kullanılarak Livak ve Schmittgen, (2001) göre hesaplanmıştır.



Şekil 10. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (RT-qPCR) hazırlanması sırasında kullanılan alet ve ekipmanlar

3.10. İstatiksel Analiz

İstatiksel analizlerden önce, her bir veri seti için sırasıyla Shapiro-Wilk ve Bartlett testleri ile varyansın normalliği ve homojenliği incelenmiştir. Daha sonra, kontrol ve uygulama grupları arasındaki farklılıkları karşılaştırmak için veriler tek yönlü ANOVA ve çoklu karşılaştırmalar için Duncan testi uygulanmış, güven aralığı %95 olarak kabul edilmiştir.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kadmiyum Konsantrasyonlarının Belirlenmesine İlişkin Yapılan Ön Deneme

Tez çalışmasında soya fasulyelerine uygulanacak olan Cd konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla kurulan ön denemede soya tohumları 5 gün süre ile 0, 5, 10, 20, 40 ve 80 mg L⁻¹ Cd konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Uygulama sonucunda kök uzunlukları (cm) ölçülmüş ve buna bağlı olarak belirlenen büyüme (%) ve büyümede azalma (%) verileri tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8

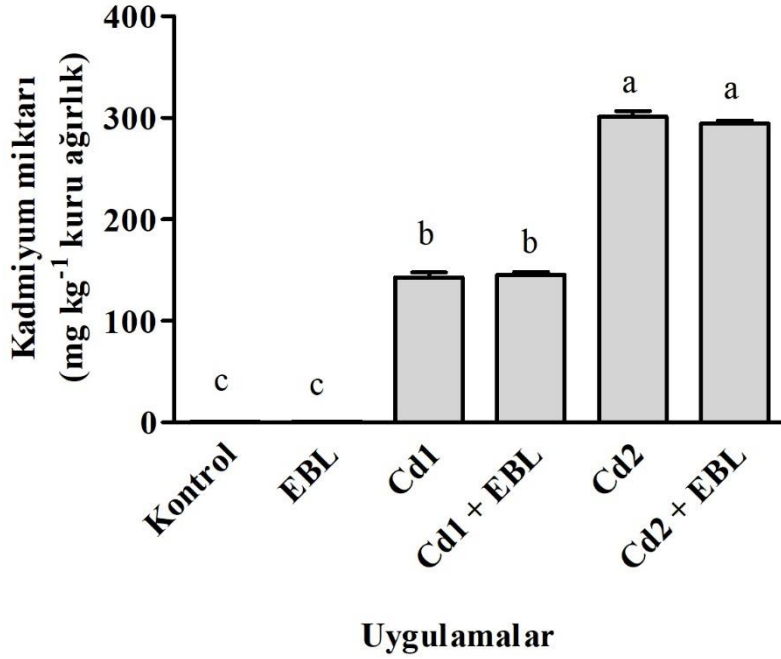
Soya fasulyesi fidelerinde kullanılan kadmiyum konsantrasyonlarının belirlenmesi dair ön deneme uygulamaları

Konsantrasyonlar (mg L ⁻¹)	Kök ortalama uzunluk (cm)	Büyüme (%)
0	8,46	100
5	7,24	85,95
10	6,15	72,73
20	5,15	60,91
40	4,19	49,55
80	2,94	34,72

Soya fasulyesi tohumlarına farklı konsantrasyonlarda Cd uygulaması sonucu lethal doz (LD₅₀) değeri olarak 40 mg L⁻¹ konsantrasyonu olarak seçilmiş ve LD₅₀ dozunun yarısı olan 20 mg L⁻¹ ikinci uygulanacak Cd konsantrasyonu olarak belirlenmiştir.

4.2. Kadmiyum Miktarı

Soya fasulyesine 20 mg L^{-1} konsantrasyonda uygulanan Cd ağır metali yapraklarda kontrole kıyasla $185,3$, 40 mg L^{-1} konsantrasyon ise $390,9$ kat artışa neden olmuştur. Kadmiyum konsantrasyonlarını takiben uygulanan EBL hormonu kadmiyum miktarında istatistiksel olarak önemli bir fark yaratmamıştır (Şekil 11).

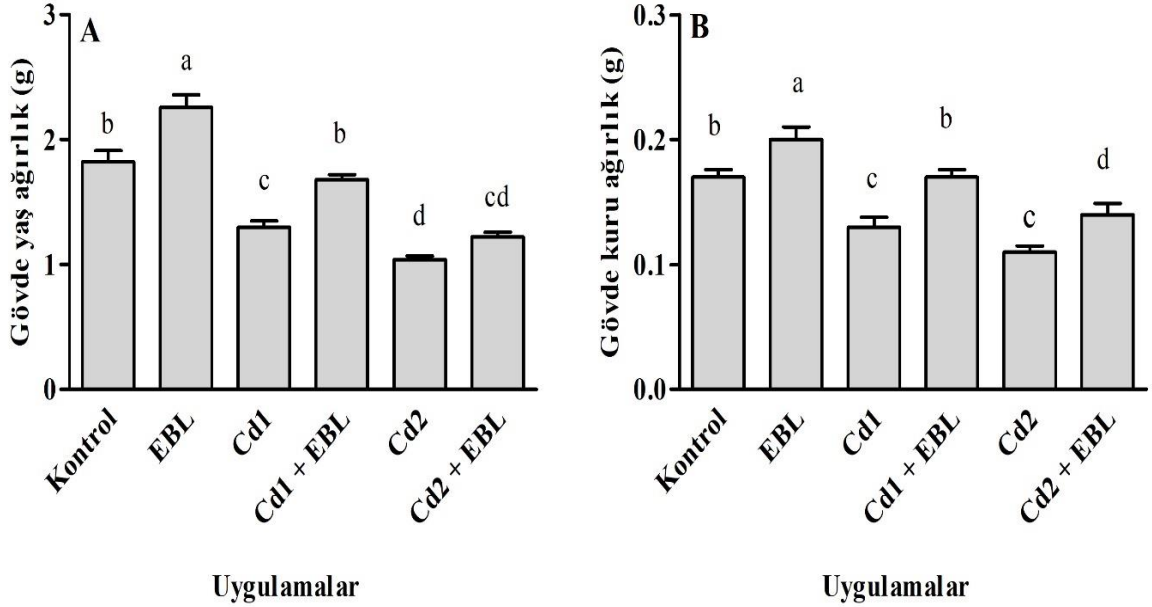


Şekil 11. Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi yapraklarında kadmiyum miktarı üzerine etkisi. K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L^{-1} Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L^{-1} Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış ($P < 0,05$, \pm standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir ($n=3$).

4.3. Fide Büyüme Parametreleri

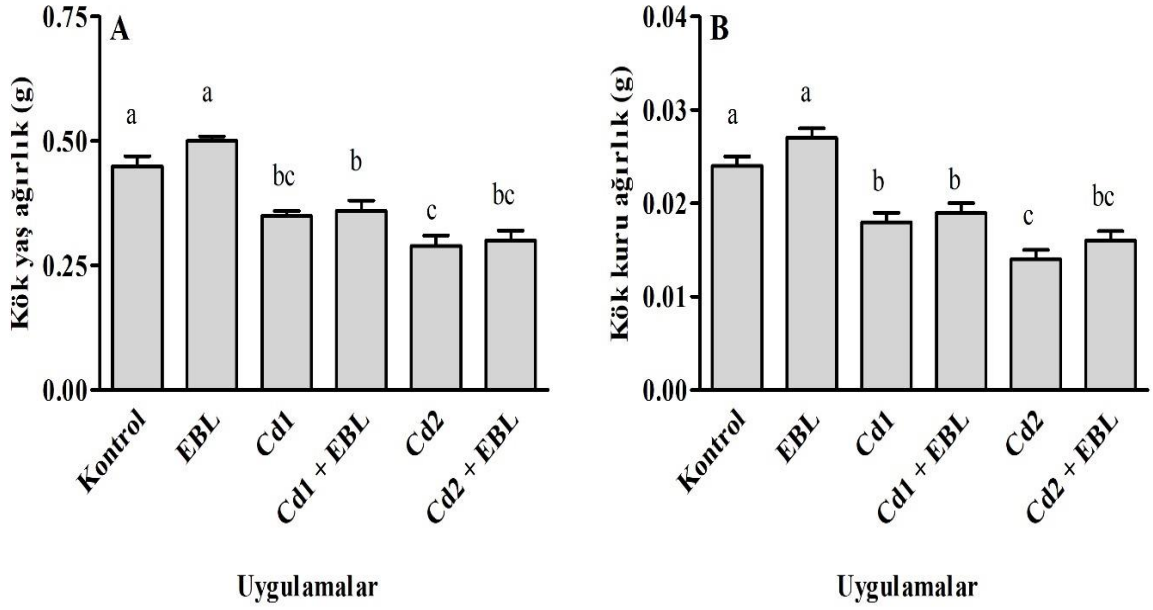
Yapılan analizler sonucunda Cd konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak fide gövde yaş ve kuru ağırlığında azalmalar gözlemlenmiştir. Kontrole kıyasla gövde yaş ve kuru ağırlıkları 40 mg L^{-1} Cd uygulaması sonucu sırasıyla %42,8 ve %35,2 oranında azalırken, 20 mg L^{-1} Cd ile birlikte yapılan EBL uygulaması yaş ve kuru ağırlıkları kontrol seviyelerine kadar ulaştırmıştır. Yüksek konsantrasyonda Cd (40 mg L^{-1}) ile birlikte yapılan EBL

uygulamasını gövde kuru ağırlığını tek başına yapılan 40 mg L⁻¹ Cd uygulamasına göre istatistiki bakımdan önem arz edecek düzeyde arttırmıştır. Bununla birlikte, EBL uygulamasının gövde yaş ve kuru ağırlıklarda sırasıyla %24,1 ve %17,6 oranında artışa neden olduğu görülmüştür (Şekil 12).



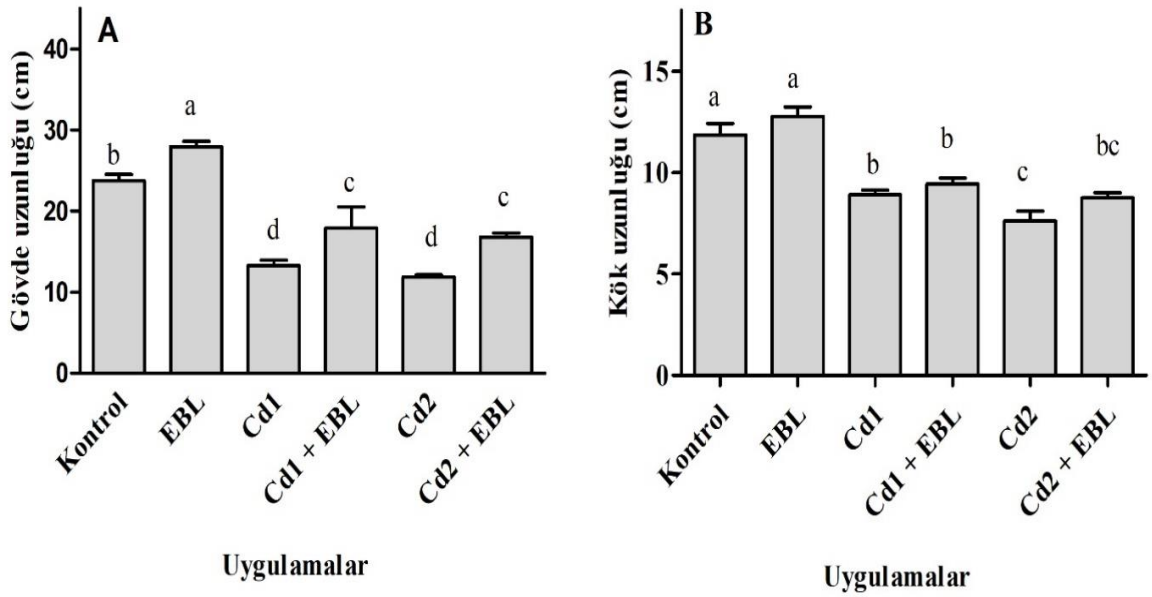
Şekil 12. Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi fidelerinin gövde yaş (A) ve kuru ağırlıkları (B) üzerine etkisi. K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış (P<0,05, ± standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir (n=10-12).

Soya fasulyesi kök örneklerinde yaş ve kuru ağırlıklar karşılaştırıldığında 20 mg L⁻¹ Cd uygulamasında sırasıyla %22,3 ve %25,0 oranında, 40 mg L⁻¹ Cd uygulamasının kök yaş ağırlığında %35,5, kuru ağırlığında ise %41,6 oranında azalmaya sebep olduğu saptanmıştır (Şekil 13).



Şekil 13. Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi fidelerinin kök yaş (A) ve kuru ağırlıkları (B). K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış (P<0,05, ± standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir (n=10-12).

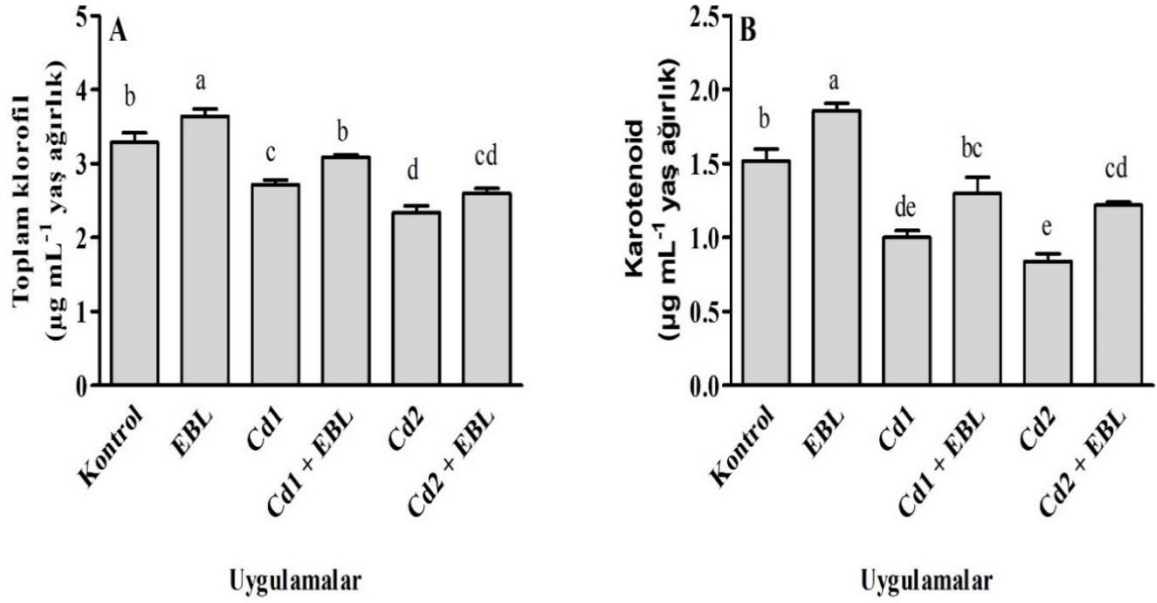
Gövde uzunluklarının 20 ve 40 mg L⁻¹ Cd uygulamaları sonucu %42,6 ve %50,0 oranında azalmıştır (Şekil 14A). Soya fasulyelerinin kök uzunlukları 20 ve 40 mg L⁻¹ Cd uygulamaları sonucu kontrole kıyasla sırasıyla %24,8 ve %35,6 oranlarında azalmaya neden olmuştur (Şekil 14B).



Şekil 14. Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi fidelerinin gövde (A) ve kök uzunlukları (B). K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış (P<0,05, ± standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir (n=10-12).

4.4. Toplam Klorofil ve Karotenoid

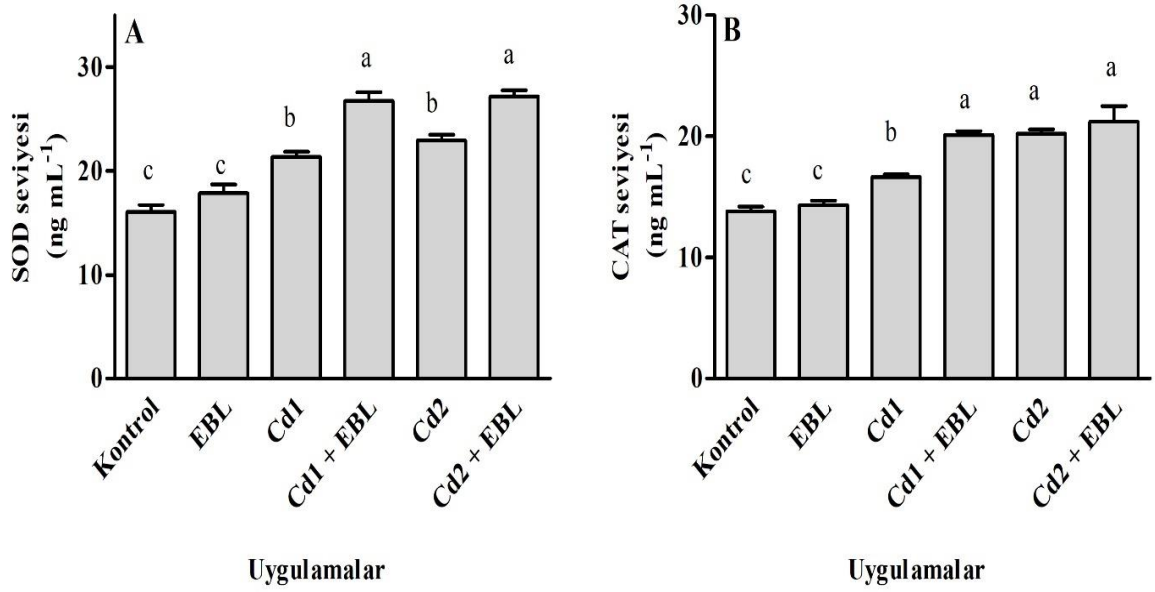
Soya fasulyelerine yapılan 20 ve 40 mg L⁻¹ Cd uygulamaları yapraklarda toplam klorofil içeriğini sırasıyla %17,3 ve %28,8 oranlarında azalmaya neden olurken, EBL'nin tek başına uygulamasında %10,6 oranında artış göstermiştir (Şekil 16A). Kadmiyumun 20 ve 40 mg L⁻¹ uygulamalarına göre EBL'nin kombine uygulamaları klorofil miktarında artışa sebep olmuştur (Şekil 15A). Tek başına yapılan EBL uygulaması karotenoid miktarını %19,2 oranında arttırmıştır. Kadmiyumun düşük konsantrasyonu olan 20 mg L⁻¹ de karotenoid miktarı %34,2, 40 mg L⁻¹ Cd uygulamasında karotenoid miktarında %55,2 oranında bir azalmaya neden olurken, 20 ve 40 mg L⁻¹ Cd ile birlikte yapılan 1 µM EBL uygulamalarında toplam karotenoid miktarında istatistiksel açıdan önemli bir artışa neden olmuştur (Şekil 15B).



Şekil 15. Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi yapraklarında toplam klorofil (A) ve karotenoid (B) miktarları. K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış (P<0,05, ± standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir (n=3).

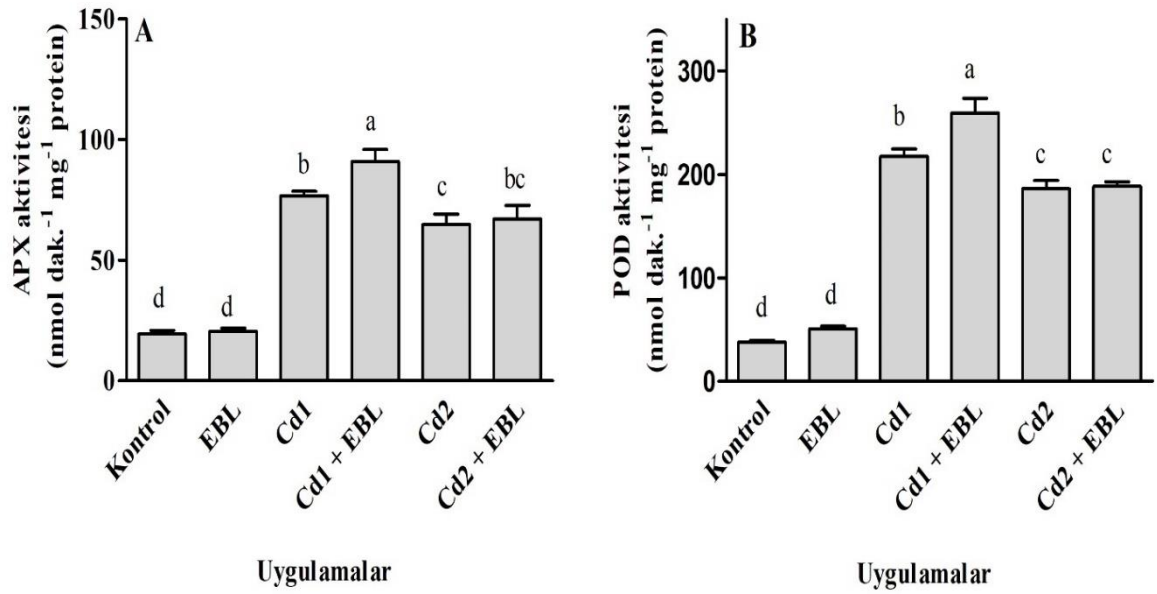
4.5. Antioksidan Enzim Aktiviteleri

Kontrole kıyasla 20 ve 40 mg L⁻¹ Cd uygulamaları SOD enzim seviyesinde sırasıyla %33,1 ve %42,9 oranlarında artışa neden olmuştur. Kadmiyum ile birlikte yapılan EBL uygulamaları ise SOD enziminin seviyesini kontrole kıyasla %66,4 ve %69,15 oranlarında arttırmıştır (Şekil 16A). Katalaz enzim seviyesi 20 ve 40 mg L⁻¹ Cd uygulamaları sonucu artarken, 20 mg L⁻¹ Cd ile uygulanan EBL hormonu CAT enzim aktivitesini hem kontrole hem de 20 mg L⁻¹ Cd uygulamasına göre arttırmıştır (Şekil 16B).



Şekil 16. Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi yapraklarında SOD (A) ve CAT (B) enzim seviyeleri. K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış (P<0,05, ± standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir (n=3).

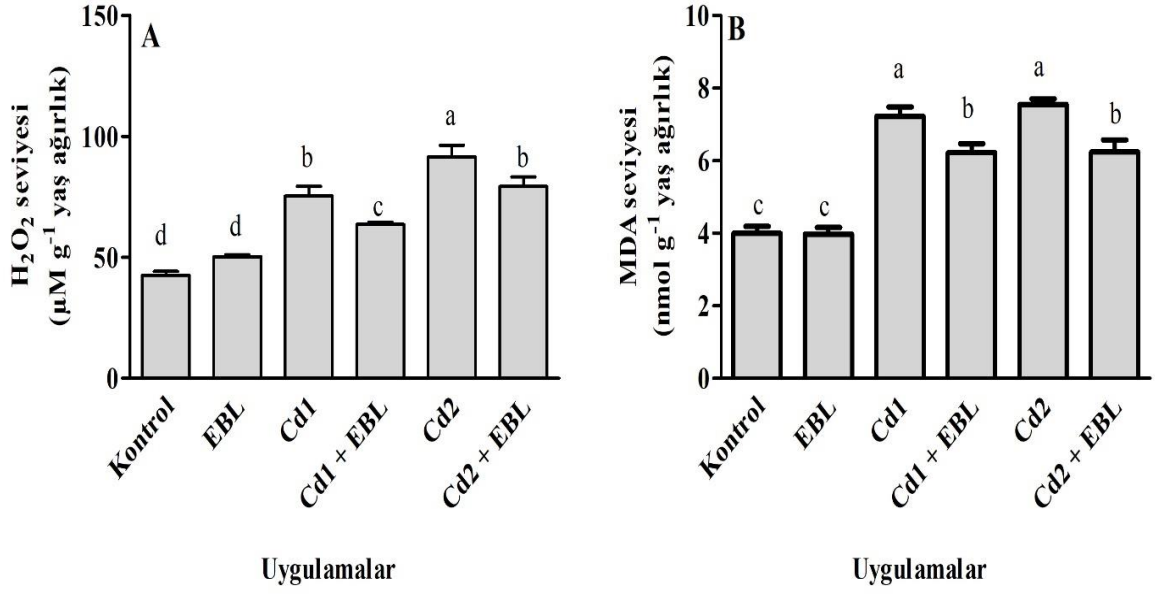
Askorbat peroksidaz ve POD enzimi aktiviteleri 20 ve 40 mg L⁻¹ Cd uygulamaları sonucu kontrole kıyasla artmıştır. Düşük konsantrasyonda Cd uygulaması (20 mg L⁻¹) ile birlikte yapılan EBL uygulaması APX ve POD enzim aktivitelerini kontrol ve 20 mg L⁻¹ Cd uygulamalarına göre arttırmıştır (Şekil 17).



Şekil 17. Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi yapraklarında APX (A) ve POD (B) enzim aktiviteleri. K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış (P<0,05, ± standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir (n=3).

4.6. H₂O₂ ve MDA Seviyeleri

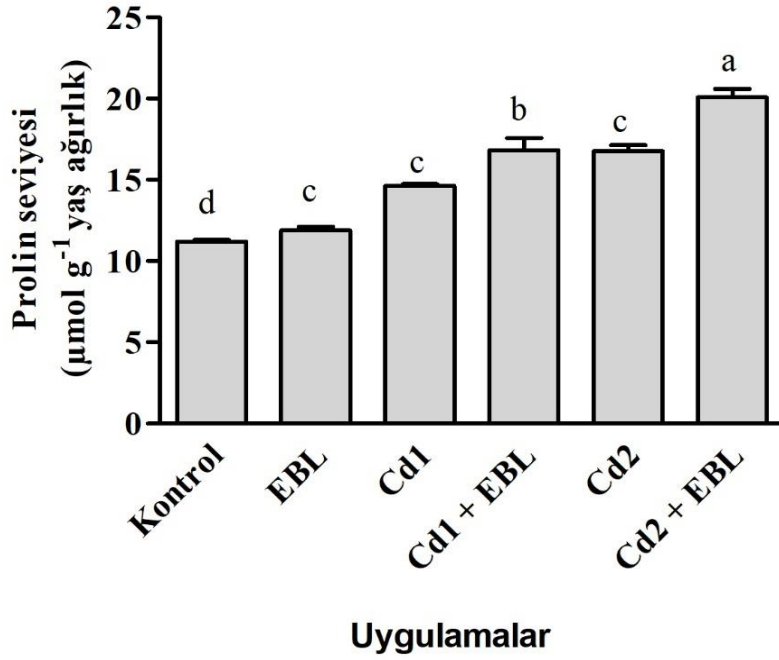
Uygulamalar sonucu soya fasulyelerine ait yaprak örneklerinde kontrole göre H₂O₂ miktarlarının 20 ve 40 mg L⁻¹ Cd uygulamaları sonucu sırasıyla %77,3 ve %115,3 oranlarında artış gösterdiği tespit edilmiştir. Kadmiyum ile birlikte uygulanan EBL, H₂O₂ miktarında %15,5 (20 mg L⁻¹ Cd) ve %13,4 (40 mg L⁻¹ Cd) azalmaya neden olmuştur (Şekil 18A). Oksidatif stresin önemli parametrelerinden biri olan MDA seviyesi, uygulanan Cd konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak artış göstermiştir. 24-Epibrassinolid uygulaması Cd stresi altında soya fasulyesi yapraklarında MDA seviyesinin istatistiki bakımdan önem arz edecek şekilde azalmasına neden olmuştur (Şekil 18B).



Şekil 18. Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi yapraklarında H₂O₂ (A) ve MDA (B) seviyeleri. K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış (P<0,05, ± standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir (n=3).

4.7. Prolin Seviyesi

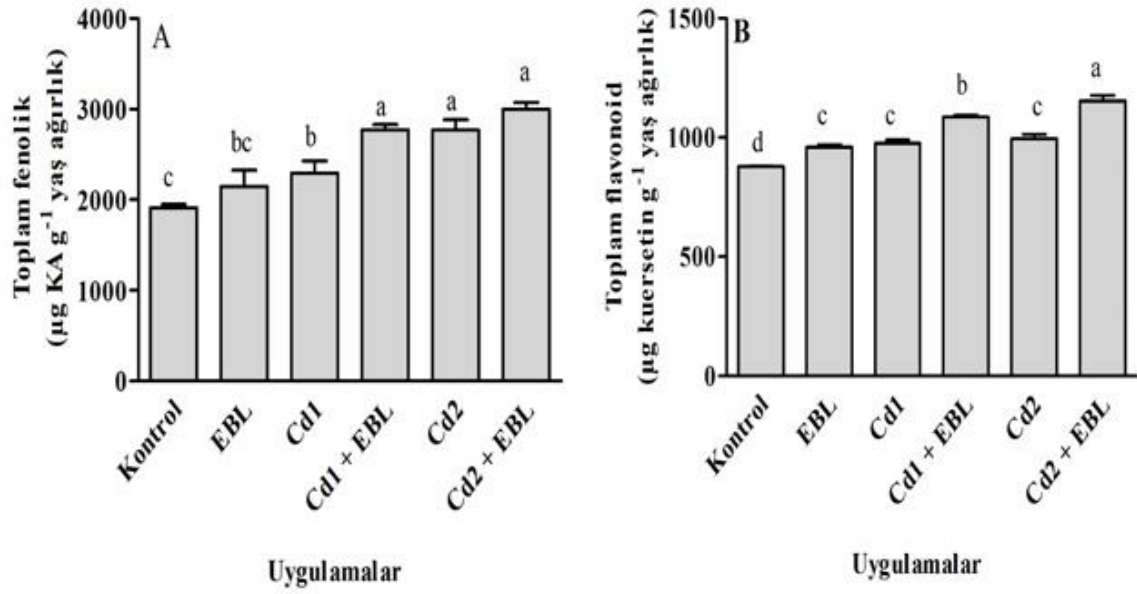
Prolin miktarın EBL'nin tek başına uygulaması sonucu %6,16 artış göstermiştir. Buna ek olarak 20 ve 40 mg L⁻¹ Cd uygulamaları sırasıyla %30,83 ve %49,8, EBL hormonu ile birlikte yapılan her iki konsantrasyonda da kontrole nazaran %50,3 ve %79,3 oranında artışa neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 19).



Şekil 19. Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi yapraklarında prolin miktarı. K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış (P<0,05, ± standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir (n=3).

4.8. Toplam Fenolik ve Flavonoid Seviyesi

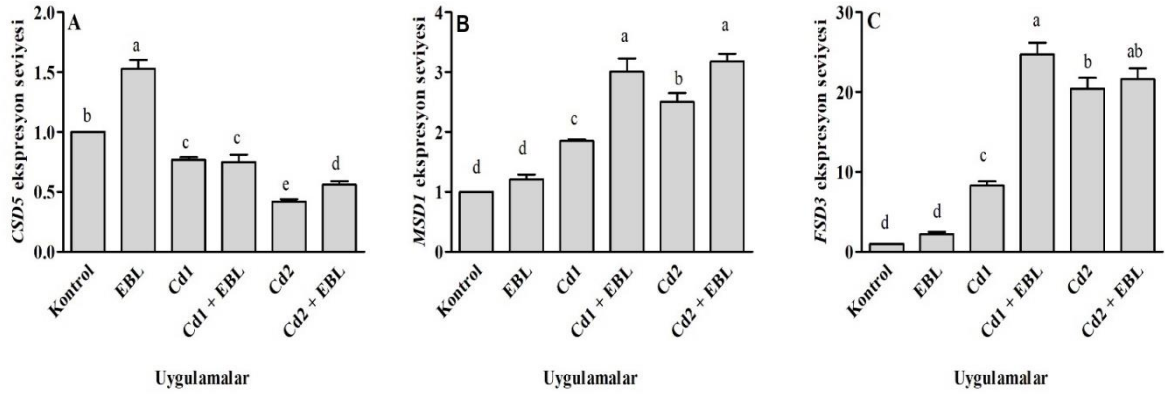
Toplam fenolik içeriği soya fasulyesi yapraklarında Cd uygulamaları sonucu artış göstermiştir. Düşük konsantrasyonda Cd ile birlikte yapılan EBL uygulaması toplam fenolik içeriğini kontrole kıyasla %18,8 arttırırken, 40 mg L⁻¹ Cd ve EBL uygulaması %57,0 oranında artışa neden olmuştur (Şekil 21A). Toplam flavonoid ölçümlerinde elde edilen sonuçlara göre EBL hormonunun yalnız uygulanması %9,3, 20 ve 40 mg L⁻¹ Cd uygulamaları sırasıyla %11,1 ve %13,3 oranında, hormon ile kombine uygulamalar ise sırasıyla %23,6 ve %31,3 oranlarında artışlara sebep olmuşlardır (Şekil 20B).



Şekil 20. Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi yapraklarında toplam fenolik (A) ve toplam flavonoid içerikleri. K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış (P<0,05, ± standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir (n=3).

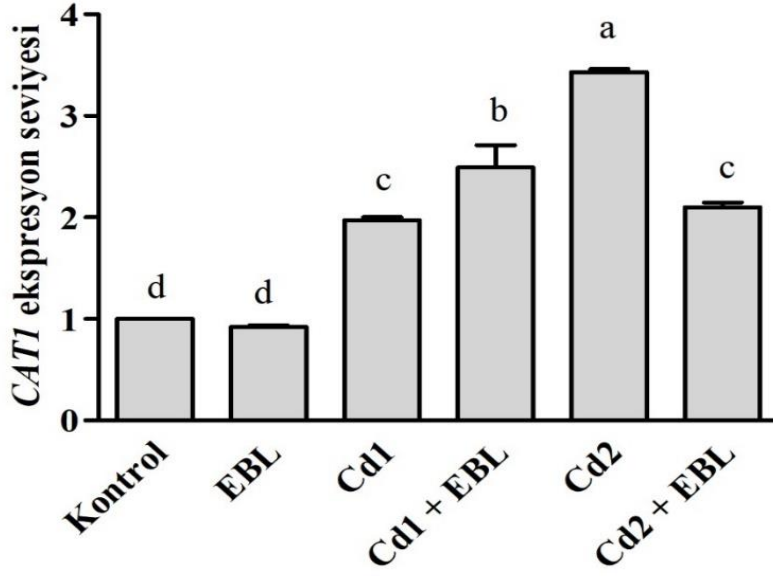
4.9. Gen İfade Analizleri

Çalışmada seçilen *SOD* genleri farklı ekspresyon desenleri sergilemiştir (Şekil 21). *GmCSD5* geninin ifade düzeyi tek başına yapılan EBL hormonu uygulaması sonucu 1,5 kat artış göstermiştir. 20 ve 40 mg L⁻¹ Cd uygulamaları *GmCSD5* geninin ekspresyonunu sırasıyla 1,3 ve 2,3 kat azaltmıştır (Şekil 21A). Kadmiyum uygulamaları *GmMSD1* geninin ifade düzeyini 1,8 (20 mg L⁻¹) ve 2,5 (40 mg L⁻¹) oranlarında arttırırken, Cd ve EBL'nin birlikte uygulanması *GmMSD1* genini kontrole ve stres uygulamalarına kıyasla daha fazla arttırdığı gözlemlenmiştir (Şekil 21B). Kontrol ile karşılaştırıldığında *GmFSD3* geninin ekspresyonu 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması sonucu 8,3 kat, 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması sonucu ise 20,4 kat arttırmıştır. Düşük konsantrasyonda Cd ile birlikte yapılan EBL uygulaması ise kontrole göre *GmFSD3* geninin ekspresyonunda 24,7 kat artış sağlamıştır (Şekil 21C).



Şekil 21. Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi yapraklarında SOD genlerinin ekspresyon seviyesi. GmCSD5 (A), GmMSD1 (B) ve GmFSD3 (C) genlerinin ekspresyon seviyeleri. K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış (P<0,05, ± standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir (n=3).

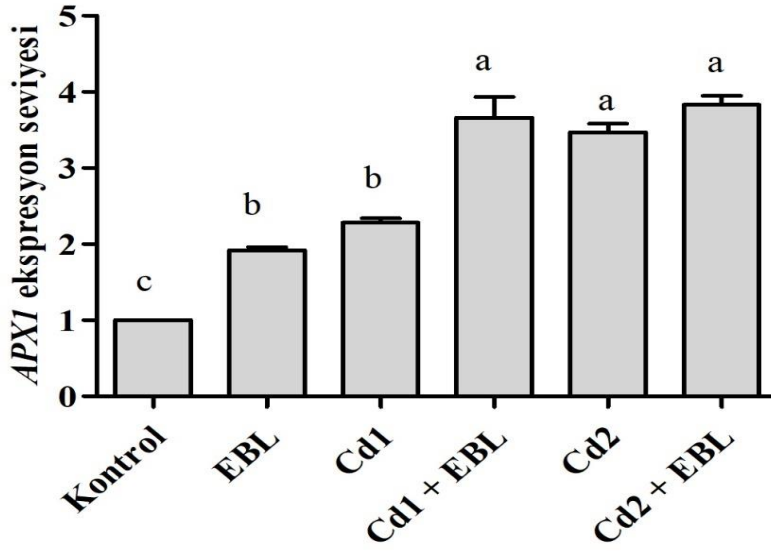
On günlük Cd uygulanan soya fasulyesi yapraklarında *GmCAT1* geninin ekspresyonu kontrole göre 1,9 (20 mg L⁻¹) ve 3,4 (40 mg L⁻¹) kat artış göstermiştir. 20 mg L⁻¹ Cd ile birlikte uygulanan EBL hormonu *GmCAT1* geninin mRNA seviyesini tek başına yapılan Cd uygulamasına göre 1,2 kat arttırmıştır. Bununla birlikte 40 mg L⁻¹ Cd'ye kıyasla, 40 mg L⁻¹ konsantrasyon ile kombine uygulanmış EBL hormonu *GmCAT1* gen ifadesinde 1.6 kat azalma meydana getirmiştir (Şekil 22).



Uygulamalar

Şekil 22. Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi yapraklarında *GmCAT1* geninin ekspresyon seviyesi. K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış (P<0,05, ± standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir (n=3).

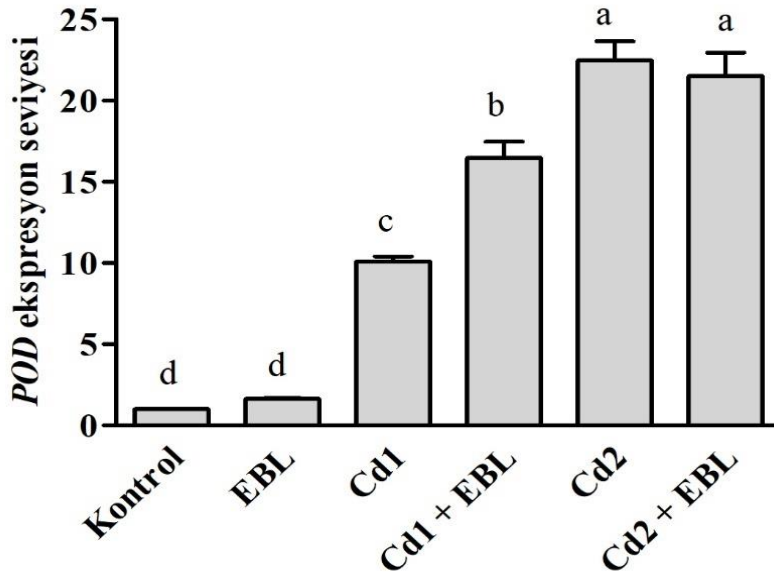
Çalışmada ekspresyon seviyesi araştırılan diğer bir gen olan *GmAPX1* geninin ekspresyon seviyesi tek başına yapılan EBL hormon uygulaması sonucu 1,9 kat artmıştır. Kadmiyum uygulamaları *GmAPX1* geninin mRNA seviyesini konsantrasyondaki artışa bağlı olarak artırmıştır. 20 mg L⁻¹ Cd stresi altında uygulanan EBL hormonu ise yapraklarda *GmAPX1* geninin ekspresyonunun kontrole ve tek başına yapılan 20 mg L⁻¹ Cd uygulamasına göre sırasıyla 3,66 ve 1,6 kat artmasına neden olmuştur (Şekil 23).



Uygulamalar

Şekil 23. Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi yapraklarında *GmAPXI* geninin ekspresyon seviyesi. K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış (P<0,05, ± standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir (n=3).

20 mg L⁻¹ Cd uygulaması soya fasulyesi yapraklarında *GmPOD* geninin ekspresyon seviyesini 10,0 kat arttırırken, 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması 22,4 kat artışa neden olmuştur. 20 mg L⁻¹ Cd stresi altında yapraklara spreyleme yöntemi ile uygulanan EBL hormonu *GmPOD* geninin ekspresyonunu kontrole göre 16,4, tek başına yapılan 20 mg L⁻¹ Cd uygulamasına göre 1,6 kat arttırmıştır (Şekil 24).



Uygulamalar

Şekil 24. Farklı konsantrasyonlarda Cd stresi altında EBL uygulamasının soya fasulyesi yapraklarında *GmPOD* geninin ekspresyon seviyesi. K: Kontrol, EBL: 24-Epibrassinolid, Cd1: 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması, Cd2: 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması. Duncan çoklu aralık testi kullanılmış (P<0,05, ± standart hata değeri) ve ortalamalar arasındaki farklılıklar harflendirme ile gösterilmiştir (n=3).

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Kadmiyum endüstriyel olarak kullanımının yanı sıra kimyasal yapısı gereği toprakta mevcudiyeti giderek artan ve bitkiler ve hayvanlar üzerinde oldukça toksik etkiler gösteren bir geçiş metalidir. Kadmiyumun toprakta hareketli olması bitki köklerinden, bitki bünyesine girerek diğer aksamalara da taşınmasına olanak sağlamaktadır. Besin maddesi olarak birincil grupta bulunan bitkilerin insan ve hayvanlar tarafından tüketilmesi sonucunda ağır metal zehirlenmelerine ve uzun vadede maruziyet sonucu ölümlere neden olabilmektedir. Ağır metal stresine karşı bitkilerin savunma sisteminin yetersiz kaldığı durumlarda hormonların kullanımı son yıllarda artış göstermektedir. Bu kapsamda, brassinosteroidler olarak adlandırılan hormon grubunun üyesi olan 24-Epibraassinolid gerek gelişim süreçlerinde gerekse stres koşullarında etkili bir hormon çeşididir. Kadmiyumun birçok bitkide negatif etkiler oluşturduğu gösterilmiştir. Soya fasulyesi üzerinde de bu durum farklılık göstermemekle birlikte yapılan tez çalışmasında uygulanan Cd konsantrasyonları morfolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeyde etkiler göstermiştir. Mevcut araştırmada, soya fasulyesi fidelerine yapılan Cd uygulamaları gövde ve kök kısımlarında uzunluk, yaş ve kuru ağırlıklarda azalmalara sebep olmuştur. Bununla birlikte, Cd uygulaması sonucu klorofil ve karotenoid içeriklerinde de azalmalar meydana gelmiştir. Uygulanan Cd konsantrasyonuna bağlı olarak yapraklarda Cd seviyesinde artış tespit edilmiştir. Yapraktan spreyleme ile uygulanan EBL hormonu Cd stresi altında fide gövde uzunluk, yaş ve kuru ağırlığının yanı sıra toplam klorofil ve karotenoid seviyesini genel olarak tek başına yapılan Cd uygulamalarına göre arttırmıştır.

Farklı konsantrasyonlarda yapılan Cd uygulamaları soya fasulyesi yapraklarında SOD (%33,1 - 42,9) ve CAT (%20,4 - 46,4) enzim aktivitelerinde artışa neden olurken, Cd ve EBL'nin kombine uygulaması enzim aktivitelerinin daha fazla artmasını sağlamıştır. Uygulamalar sonucu APX ve GPX enzim aktiviteleri benzer sonuçlar vermiş ve Cd uygulamaları sonucu artan enzim aktiviteleri, 20 mg L⁻¹ Cd ve EBL'nin birlikte uygulanması sonucu daha fazla artış göstermiştir. Stres altında bitkilerde meydana gelen reaktif oksijen türlerinden hidrojen peroksit radikali ve stres belirteci olan MDA seviyelerinde Cd uygulamaları artışa neden olmuştur. Fakat her iki Cd konsantrasyonunun EBL hormonuyla birlikte uygulanması soya fasulyesi yapraklarında hidrojen peroksit ve MDA seviyelerini

azaltmıştır. Soya fasulyesi yapraklarında artan Cd konsantrasyonuna bağlı olarak toplam fenolik ve flavonoid içeriğinde artış tespit edilmiştir. Toplam fenolik içeriği, 20 mg L⁻¹ Cd ve EBL uygulaması sonucu %18,8, 40 mg L⁻¹ Cd ve EBL uygulaması sonucu %57,0 oranında artmıştır. Toplam flavonoid içeriği 20 ve 40 mg L⁻¹ Cd uygulamaları sonucu sırasıyla %11,1 ve %13,3 oranında artarken, EBL ile kombine uygulandığında ise sırasıyla %23,6 ve %31,3 oranında artış göstermiştir. Prolin seviyesi EBL'nin tek başına uygulanması sonucu %6,1, 20 mg L⁻¹ Cd uygulaması sonucu %30,8 ve 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması sonucu %49,8 oranında artış göstermiştir. Kadmiyum stresi altında yapılan EBL uygulamaları sonucu prolin seviyesini %50,3 - %79,3 oranında arttırmıştır.

Kadmiyum ve/veya EBL uygulamaları antioksidan sistem ile ilgili *GmCSD5*, *GmFSD3*, *GmMSD1*, *GmCAT1*, *GmAPX1* ve *GmPOD* genlerinin ekspresyonlarını modifiye etmiştir. 24-Epibrassinolid hormonunun tek başına uygulaması *GmCSD5* ve *GmAPX1* genlerinin ekspresyon seviyelerinde kontrole kıyasla artış meydana getirmiştir. Kadmiyum uygulamaları *GmCSD5* geninin ekspresyonunu azaltırken, *GmFSD3*, *GmMSD1*, *GmPOD* ve *GmAPX1* genlerinin ifade düzeyini arttırmıştır. Düşük konsantrasyonda Cd (20 mg L⁻¹) ile birlikte uygulanan EBL hormonu, *GmCSD5* geni hariç diğer genlerin ifade düzeyini kontrole ve tek başına yapılan Cd uygulamasına göre arttırmıştır. Sonuç olarak, Cd stresi altındaki soya fasulyesi fidelerinin yapraklarına uygulanan EBL hormonu, Cd ağır metalinin büyüme, gelişme ve antioksidan sistem üzerinde meydana getirdiği olumsuz etkileri biyokimyasal ve moleküler düzeyde regüle ettiği ve 24-Epibrassinolid hormonunun düşük konsantrasyondaki kadmiyumun etkilerini tolere etmede daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKÇA

- Abbas, T., Rizwan, M., Ali, S., Adrees, M., Zia-Ur-Rehman, M., Qayyum, M. F., Ok, Y. S., ve Murtaza, G. (2017). "Effect of biochar on alleviation of cadmium toxicity in wheat (*Triticum aestivum* L.) grown on Cd-contaminated saline soil". *Environmental Functions of Biochar*, 25, 25668–256680. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8987-4>
- Ackova, D. G. (2018). "Heavy metals and their general toxicity on plants". *Plant Science Today*, 5(1), 14–18. <https://doi.org/10.14719/PST.2018.5.1.355>
- Alam, P., Albalawi, T. H., Altalayan, F. H., Bakht, M. A., Ahanger, M. A., Raja, V., Ashraf, M., ve Ahmad, P. (2019). "24-epibrassinolide (EBR) confers tolerance against NaCl stress in soybean plants by up-regulating antioxidant system, ascorbate-glutathione cycle, and glyoxalase system". *Biomolecules*, 9(11), 640. <https://doi.org/10.3390/biom9110640>
- Aleem, M., Aleem, S., Sharif, I., Aleem, M., Shahzad, R., Khan, M. I., Batool, A., Sarwar, G., Farooq, J., Iqbal, A., Jan, B. L., Kaushik, P., Feng, X., Bhat, J. A., ve Ahmad, P. (2022a). "Whole-Genome Identification of APX and CAT Gene Families in Cultivated and Wild Soybeans and Their Regulatory Function in Plant Development and Stress Response". *Antioxidants*, 11(8), 1–26. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX11081626/S1>
- Aleem, M., Aleem, S., Sharif, I., Wu, Z., Aleem, M., Tahir, A., Atif, R. M., Cheema, H. M. N., Shakeel, A., Lei, S., Yu, D., Wang, H., Kaushik, P., Alyemeni, M. N., Bhat, J. A., ve Ahmad, P. (2022b). "Characterization of SOD and GPX Gene Families in the Soybeans in Response to Drought and Salinity Stresses". *Antioxidants*, 11(3), 1–23. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX11030460/S1>
- Ali, M. M., Anwar, R., Malik, A. U., Khan, A. S., Ahmad, S., Hussain, Z., Hasan, M. U., Nasir, M., ve Chen, F. (2021). "Plant Growth and Fruit Quality Response of Strawberry is Improved After Exogenous Application of 24-Epibrassinolide". *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(4), 1786–1799. <https://doi.org/10.1007/S00344-021-10422-2/FIGURES/8>
- Anonim, (2023). "Serbest Oksijen Radikalleri Ve Antioksidanlar". <https://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf>
- Anuradha, S., ve Rao, S. S. R. (2007). "The effect of brassinosteroids on radish (*Raphanus*

- sativus L.) seedlings growing under cadmium stress*". Plant, Soil and Environment, 53(11), 465–472. <https://doi.org/10.17221/2307-PSE>
- Anwar, A., Liu, Y., Dong, R., Bai, L., Yu, X., Li, Y., Anwar, A., Liu, Y., Dong, R., Bai, L., Yu, X., ve Li, Y. (2018). "The physiological and molecular mechanism of brassinosteroid in response to stress: a review". Biological Research, 51(46), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S40659-018-0195-2>
- Artık, N. (1987). "Türkiye’de Yetiştirilen Bazı Soya Varyetelerinden Soya Peyniri (tofu) Üretimi Üzerinde Araştırma". Gıda, 12(5).
- Aserse, A. A., Räsänen, L. A., Aseffa, F., Hailemariam, A., ve Lindström, K. (2012). "Phylogenetically diverse groups of Bradyrhizobium isolated from nodules of Crotalaria spp., Indigofera spp., Erythrina brucei and Glycine max growing in Ethiopia". Molecular Phylogenetics and Evolution, 65(2), 595–609. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2012.07.00>
- Ausili, P., Borisov, A., Lindblad, P., Mårtensson, A., ve Rtensson, M. Ê. (2010). "Cadmium Affects the Interaction Between Peas and Root Nodule Bacteria". Acta Agriculturae Scandinavica, 52(1), 8–17. <https://doi.org/10.1080/090647102320259992>
- Balestrasse, K. B., Gardey, L., Gallego, S. M., ve Tomaro, M. L. (2001). "Response of antioxidant defence system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress". Functional Plant Biology, 28(6), 497–504. <https://doi.org/10.1071/PP00158>
- Barbosa, N., Neto, M., Marques S. S., Bomfim, D. C., ve Custódio, C. C. (2004). "Water Stress Induced by Mannitol and Sodium Chloride in Soybean Cultivars ". Brazilian Archives of Biology and Technology, 47(4), 521–529.
- Bari, R., ve Jones, J. D. G. (2008). "Role of plant hormones in plant defence responses". Plant Molecular Biology, 69(4), 473–488. <https://doi.org/10.1007/S11103-008-9435-0/FIGURES/1>
- Bartwal, A., ve Arora, S. (2020). "Brassinosteroids: Molecules with Myriad Roles". In Mérillon JM. ve Ramawat K. (Eds.), Co-Evolution of Secondary Metabolites , pp. 869–895). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96397-6_18
- Basit, F., Liu, J., An, J., Chen, M., He, C., Zhu, X., Li, Z., Hu, J., ve Guan, Y. (2021). "Brassinosteroids as a multidimensional regulator of plant physiological and molecular responses under various environmental stresses". Environmental Science and Pollution Research, 28(33), 44768–44779. <https://doi.org/10.1007/S11356-021-15087-8/FIGURES/4>

- Bhandari, S., ve Nailwal, T. K. (2020). "*Role of brassinosteroids in mitigating abiotic stresses in plants*". *Biologia*, 75(12), 2203–2230. <https://doi.org/10.2478/S11756-020-00587-8/TABLES/5>
- Bhattacharjee, S. (2019). "*ROS and Oxidative Stress: Origin and Implication*". In *Reactive Oxygen Species in Plant Biology*. Springer,. https://doi.org/10.1007/978-81-322-3941-3_1
- Bijarana, S., Pandey, A., Kumar, A., Rojaria, V., Shahani, M., Kumar, A., ve Choudhary, M. (2021). "*Genetic Variability Studies Based on Morpho-Physiological Traits Related to Temperature; Seedling Growth; Development and Phenology of Soybean [(Glycine max (L.) Merrill] "*. *International Journal of Plant & Soil Science*, 33(22), 22–30.
- 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. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Chandra, S., Das, R. T., Nagar, S., Satpute, G. K., Kumawat, G., Ratnaparkhe, M. B., Gupta, S., Rajesh, V., Nataraj, V., Shivakumar, M., Srivastva, M., Meena, S., Kavishwar, R., Kamble, V. G., Borah, M., Kumar, A., Deshmukh, M. P., ve Mehtre, S. P. (2022). "*Soybean Improvement for Waterlogging Tolerance*". In Shabir H.W., Najeeb ul R. S., Muhammed A. B., ve Feng L. (Eds.), *Soybean Improvement (1)*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-031-12232-3_3
- Chmielowska-Bak, J., Lefèvre, I., Lutts, S., ve Deckert, J. (2013). "*Short term signaling responses in roots of young soybean seedlings exposed to cadmium stress*". *Journal of Plant Physiology*, 170(18), 1585–1594. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.06.019>
- Chmielowska-Bak J., Lefèvre, I., Lutts, S., Kulik, A., ve Deckert, J. (2014). "*Effect of cobalt chloride on soybean seedlings subjected to cadmium stress*". *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 83(3), 201–207. <https://doi.org/10.5586/ASBP.2014.027>
- Ciampitti, I. A., Salvagiotti, F., ve Ciampitti, I. A. (2018). "*New Insights into Soybean Biological Nitrogen Fixation*". *Agronomy Journal* , 110, 1185–1196. <https://doi.org/10.2134/agronj2017.06.0348>
- Clouse, S. D. (2011b). "*Brassinosteroids*". *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 9, 1–29. <https://doi.org/10.1199/TAB.0151>
- DalCorso, G., Farinati, S., Maistri, S., ve Furini, A. (2008). "*How Plants Cope with*

- Cadmium: Staking All on Metabolism and Gene Expression*". Journal of Integrative Plant Biology, 50(10), 1268–1280. <https://doi.org/10.1111/J.1744-7909.2008.00737.X>
- Das, K., ve Roychoudhury, A. (2014). "*Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants*". Frontiers in Environmental Science, 2, 53. <https://doi.org/10.3389/FENV.S.2014.00053/BIBTEX>
- Divi, U. K., ve Krishna, P. (2009). "*Brassinosteroid: a biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance*". New Biotechnology, 26(3–4), 131–136. <https://doi.org/10.1016/J.NBT.2009.07.006>
- Doğru, A. (2019). "*Bitkilerde Antioksidan Sistemler ve Tuz Stresine Verdikleri Yanıtlar*". International Journal of Eastern Anatolia Science Engineering and Design, 1(2), 164–185.
- Du, Z., ve Bramlage, W. J. (1992). "*Modified Thiobarbituric Acid Assay for Measuring Lipid Oxidation in Sugar-Rich Plant Tissue Extracts*". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40, 1566–1570. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Dubey, S., Shri, M., Gupta, A., Rani, V., ve Chakrabarty, D. (2018). "*Toxicity and detoxification of heavy metals during plant growth and metabolism*". Environmental Chemistry Letters, 16(4), 1169–1192. <https://doi.org/10.1007/S10311-018-0741-8>
- Dumanović, J., Nepovimova, E., Natić, M., Kuća, K., ve Jaćević, V. (2021). "*The Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense System in Plants: A Concise Overview*". Frontiers in Plant Science, 11, 2106. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.552969/BIBTEX>
- Egbichi, I., Keyster, M., Jacobs, A., Klein, A., ve Ludidi, N. (2013). "*Modulation of antioxidant enzyme activities and metabolites ratios by nitric oxide in short-term salt stressed soybean root nodules*". South African Journal of Botany, 88, 326–333. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2013.08.008>
- Ekmekçi, Y., Tanyolaç, D., ve Ayhan, B. (2008). "*Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars*". Journal of Plant Physiology, 165(6), 600–611. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2007.01.017>
- El Rasafi, T., Oukarroum, A., Haddioui, A., Song, H., Kwon, E. E., Bolan, N., Tack, F. M. G., Sebastian, A., Prasad, M. N. V., ve Rinklebe, J. (2020). "*Cadmium stress in plants: A critical review of the effects, mechanisms, and tolerance strategies*". Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 52(5), 675–726.

- <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1835435>
- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F., ve Xie, Y. (2015). "Heavy Metal Stress and Some Mechanisms of Plant Defense Response". *Scientific World Journal*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/756120>
- Fanaei, H. R., Sadegh, H. N., Yousefi, T., ve Farmanbar, M. (2015). "*Influence of drought stress on some characteristics of plants*". *Biological Forum*, 7(1), 1732–1738. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20153255137>
- FAO. (2022, May 29). "*Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Data Base*". <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Ferguson, B. J., ve Gresshoff, P. M. (2009). "*Soybean as a model legume*". *Grain Legumes*, 53(7), 7.
- Ferreira, R. R., Fornazier, R. F., Vitória, A. P., Lea, P. J., ve Azevedo, R. A. (2006). "*Changes In Antioxidant Enzyme Activities In Soybean Under Cadmium Stress*". <Http://Dx.Doi.Org/10.1081/PLN-100108839>, 25(2), 327–342. <https://doi.org/10.1081/PLN-100108839>
- Finger-Teixeira, A., Lucio Ferrarese, M. de L., Ricardo Soares, A., da Silva, D., ve Ferrarese-Filho Osvaldo, O. (2010). "*Cadmium-induced lignification restricts soybean root growth*". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(8), 1959–1964. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.08.021>
- Forde, B., ve Lorenzo, H. (2001). "*The nutritional control of root development*". *Plant and Soil*, 232(1), 51–68. <https://doi.org/10.1023/A:1010329902165>
- Franic, M. (2018). "*Effects of cadmium on photosynthetic parameters in different maize genotypes*". University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek.
- Fried, H. G., Narayanan, S., ve Fallen, B. (2019). "*Evaluation of soybean [Glycine max (L.) Merr.] genotypes for yield, water use efficiency, and root traits*". *PLOS ONE*, 14(2), 1–18. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0212700>
- Fujioka, S., ve Yokota, T. (2003). "*Biosynthesis and Metabolism of Brassinosteroids*". *Annual Review of Plant Biology*, 54, 137–164. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ARPLANT.54.031902.134921>
- Gallego, S. M., Pena, L. B., Barcia, R. A., Azpilicueta, C. E., Iannone, M. F., Rosales, E. P., Zawoznik, M. S., Groppa, M. D., ve Benavides, M. P. (2012). "*Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms*". *Environmental and Experimental Botany*, 83, 33–46.

<https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2012.04.006>

- García-Caparrós, P., De Filippis, L., Gul, A., Hasanuzzaman, M., Ozturk, M., Altay, V., ve Lao, M. T. (2021). "*Oxidative Stress and Antioxidant Metabolism under Adverse Environmental Conditions: a Review*". *Botanical Review*, 87(4), 421–466. <https://doi.org/10.1007/S12229-020-09231-1/TABLES/2>
- Gill, M. (2014). "*Heavy metal stress in plants: a review*". *Int J Adv Res*, 2(6), 1043–1055.
- Gill, S. S., ve Tuteja, N. (2011). "*Cadmium stress tolerance in crop plants*". *Plant Signaling & Behavior*, 6(2), 215–222. <https://doi.org/10.4161/PSB.6.2.14880>
- Güler, D. (2013). "*Türkiye’de Soya Üretimi, Tüketimi ve Pazarlaması*". Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi .
- Gupta, D. K., Palma, J. M., ve Corpas, F. J. (2018). "*Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants*". In D. K. Gupta, J. M. Palma, ve F. J. Corpas (Eds.), *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-75088-0>
- Haider, F. U., Liqun, C., Coulter, J. A., Cheema, S. A., Wu, J., Zhang, R., Wenjun, M., ve Farooq, M. (2021). "*Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies*". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 211, 111887. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2020.111887>
- Hasan, S. A., Hayat, S., ve Ahmad, A. (2011). "*Brassinosteroids protect photosynthetic machinery against the cadmium induced oxidative stress in two tomato cultivars*". *Chemosphere*, 84(10), 1446–1451. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.04.047>
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Rahman, A., Mahmud, J. A., Hossain, M. S., ve Fujita, M. (2016). "*Soybean Production and Environmental Stresses*". *Environmental Stresses in Soybean Production: Soybean Production*, 2, 61–102. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801535-3.00004-8>
- Hatfield, J. L., ve Dold, C. (2019). "*Water-use efficiency: advances and challenges in a changing climate*". *Frontiers in Plant Science*, 10, 103.
- Hayat, S., Ali, B., Aiman Hasan, S., ve Ahmad, A. (2007). "*Brassinosteroid enhanced the level of antioxidants under cadmium stress in Brassica juncea*". *Environmental and Experimental Botany*, 60(1), 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2006.06.002>
- Hayat, S., Alyemeni, M. N., ve Hasan, S. A. (2012). "*Foliar spray of brassinosteroid*

- enhances yield and quality of Solanum lycopersicum under cadmium stress*". Saudi Journal of Biological Sciences, 19(3), 325–335. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.03.005>
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., ve Ahmad, A. (2012). "*Role of proline under changing environments*". Plant Signaling and Behavior, 7(11), 1456–1466. <https://doi.org/10.4161/PSB.21949>
- He, S., Yang, X., He, Z., ve Baligar, V. C. (2017). "*Morphological and Physiological Responses of Plants to Cadmium Toxicity: A Review*". Pedosphere, 27(3), 421–438. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60339-4](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60339-4)
- Hoagland, D. R., ve Arnon, D. I. (1938). "*Growing plants without soil by the water-culture method*". In Growing plants without soil by the water-culture method.
- Hossain, Z., Khatoon, A., ve Komatsu, S. (2013). "*Soybean Proteomics for Unraveling Abiotic Stress Response Mechanism*". Journal of Proteome Research, 12(11), 4670–4684. <https://doi.org/10.1021/PR400604B>
- Hu, D., Wei, L., ve Liao, W. (2021). "*Brassinosteroids in Plants: Crosstalk with Small-Molecule Compounds*". Biomolecules, 11(12), 1800. <https://doi.org/10.3390/BIOM11121800>
- Hussain, M. A., Fahad, S., Sharif, R., Jan, M. F., Mujtaba, M., Ali, Q., Ahmad, A., Ahmad, H., Amin, N., Ajayo, B. S., Sun, C., Gu, L., Ahmad, I., Jiang, Z., ve Hou, J. (2020). "*Multifunctional role of brassinosteroid and its analogues in plants*". Plant Growth Regulation 2020 92:2, 92(2), 141–156. <https://doi.org/10.1007/S10725-020-00647-8>
- Hussain, S., Rao, M. J., Anjum, M. A., Ejaz, S., Zakir, I., Ali, M. A., Ahmad, N., ve Ahmad, S. (2019). "*Oxidative stress and antioxidant defense in plants under drought conditions*". In Hasannüzzaman M., Hakeem K.R., Nahar K., ve Alharby H. (Eds.), Plant Abiotic Stress Tolerance: Agronomic, Molecular and Biotechnological Approaches. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-06118-0_9/COVER
- Hymowitz, T., ve Newell, C. A. (1981). "*Taxonomy of the genus Glycine, domestication and uses of soybeans*". Economic Botany, 35(3), 272–288. <https://doi.org/10.1007/BF02859119>
- Jia, C., Zhao, S., Bao, T., Zhao, P., Peng, K., Guo, Q., Gao, X., ve Qin, J. (2021). "*Tomato BZR/BES transcription factor SlBZR1 positively regulates BR signaling and salt*

- stress tolerance in tomato and Arabidopsis*". Plant Science, 302, 110719. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2020.110719>
- Kagale, S., Divi, U. K., Krochko, J. E., Keller, W. A., ve Krishna, P. (2006). "*Brassinosteroid confers tolerance in Arabidopsis thaliana and Brassica napus to a range of abiotic stresses*". Planta , 225(2), 353–364. <https://doi.org/10.1007/S00425-006-0361-6>
- Kanwar, M. K., Bajguz, A., Zhou, J., ve Bhardwaj, R. (2017). "*Analysis of Brassinosteroids in Plants*". Journal of Plant Growth Regulation, 36(4), 1002–1030. <https://doi.org/10.1007/S00344-017-9732-4/TABLES/1>
- Kapoor, D., Kaur, S., ve Bhardwaj, R. (2014). "*Physiological and Biochemical Changes in Brassica juncea Plants under Cd-Induced Stress*". BioMed Research International, 2014, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/726070>
- Khalid, A., ve Aftab, F. (2016). "*Effect of exogenous application of 24-epibrassinolide on growth, protein contents, and antioxidant enzyme activities of in vitro-grown Solanum tuberosum L. under salt stress*". In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant, 52(1), 81–91. <https://doi.org/10.1007/S11627-015-9745-2/FIGURES/1>
- Kireççi, O. A. (2018). "*Bitkilerde enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar*". Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 7(2), 473–483.
- Kohli, S. K., Handa, N., Sharma, A., Gautam, V., Arora, S., Bhardwaj, R., Wijaya, L., Alyemeni, M. N., ve Ahmad, P. (2018). "*Interaction of 24-epibrassinolide and salicylic acid regulates pigment contents, antioxidative defense responses, and gene expression in Brassica juncea L. seedlings under Pb stress*". Environmental Science and Pollution Research, 25(15), 15159–15173. <https://doi.org/10.1007/S11356-018-1742-7/FIGURES/9>
- Korshunova, Y. O., Eide, D., Clark, W. G., Guerinot, M. L., ve Pakrasi, H. B. (1999). "*The IRT1 protein from Arabidopsis thaliana is a metal transporter with a broad substrate range*". Plant Molecular Biology, 40(1), 37–44. <https://doi.org/10.1023/A:1026438615520>
- Kumar, S., ve Pandey, A. K. (2013). "*Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview*". The Scientific World Journal, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- Li, S., Zheng, H., Lin, L., Wang, F., ve Sui, N. (2020). "*Roles of brassinosteroids in plant growth and abiotic stress response*". Plant Growth Regulation 2020 93:1, 93(1), 29–38. <https://doi.org/10.1007/S10725-020-00672-7>

- Liu, L., Chen, X., Hao, L., Zhang, G., Jin, Z., Li, C., Yang, Y., Rao, J., ve Chen, B. (2020). "Traditional fermented soybean products: processing, flavor formation, nutritional and biological activities". <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1848792>, 62(7), 1971–1989. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1848792>
- Liu, Y., Liu, L., Qi, J., Dang, P., ve Xia, T. (2019). "Cadmium activates *ZmMPK3-1* and *ZmMPK6-1* via induction of reactive oxygen species in maize roots". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 516(3), 747–752. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2019.06.116>
- Livak, K. J., ve Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method". *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>
- Lu, W., Duanmu, H., Qiao, Y., Jin, X., Yu, Y., Yu, L., ve Chen, C. (2020). "Genome-wide identification and characterization of the soybean SOD family during alkaline stress". *PeerJ*, 2020(2), 1–19. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.8457/SUPP-13>
- Luan, Z. Q., Cao, H. C., ve Yan, B. X. (2008). "Individual and combined phytotoxic effects of cadmium, lead and arsenic on soybean in Phaeozem". *Plant Soil Environ*, 54(9), 403–411.
- Maheshwari, P., ve Kovalchuk, I. (2016). "Genetic Transformation of Crops for Oil Production". In Thomas A. M., Douglas G. H., ve Randall J. W. (Eds.), *Industrial Oil Crops* (pp. 379–412). AOCS Press. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-98-1.00014-2>
- Maksimović, J. J. D., ve Živanović, B. D. (2012). "Quantification of the Antioxidant Activity in Salt-Stressed Tissues". *Methods in Molecular Biology*, 913, 237–250. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-986-0_16
- Mao, J., ve Li, J. (2020). "Regulation of Three Key Kinases of Brassinosteroid Signaling Pathway". *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12). <https://doi.org/10.3390/IJMS21124340>
- Medic, J., Atkinson, C., ve Hurburgh, C. R. (2014). "Current knowledge in soybean composition". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(3), 363–384. <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2407-9>
- Meijaard, E., Brooks, T. M., Carlson, K. M., Slade, E. M., Garcia-Ulloa, J., Gaveau, D. L. A., Lee, J. S. H., Santika, T., Juffe-Bignoli, D., Struebig, M. J., Wich, S. A., Ancrenaz, M., Koh, L. P., Zamira, N., Abrams, J. F., Prins, H. H. T., Sendashonga,

- C. N., Murdiyarso, D., Furumo, P. R., ve Sheil, D. (2020). "*The environmental impacts of palm oil in context*". *Nature Plants* , 6(12), 1418–1426. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-00813-w>
- Meudt, W. J., Thompson, M. J., ve Bennett, H. W. (1983). "*Investigations on the mechanism of the brassinosteroid response*". III. Techniques for potential enhancement of crop production [Barley, bean]. Proceedings Annual Meeting Plant Growth Regulator Society of America.
- Nakano, Y., ve Asada, K. (1981). "*Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts*". *Plant and Cell Physiology*, 22(5), 867–880. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.PCP.A076232>
- Neeti, M., Vinita, S., ve Shabir H. W. (2017). "*Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress*". In M. I. R. Khan ve N. A. Khan (Eds.), *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5>
- Neto, E. M., Lara, L. M., Maciel de Oliveira, S., Santos, R. F., Braccini, A. L., Inoue, T. T., ve Batista, M. A. (2021). "*Nutrient Removal by Grain in Modern Soybean Varieties*". *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.615019/FULL>
- Nishikawa, N., Toyama, S., Shida, A., ve Futatsuya, F. (1994). "*The uptake and the transport of 14C-labeled epibrassinolide in intact seedlings of cucumber and wheat*". *Journal of Plant Research*, 107(2), 125–130. <https://doi.org/10.1007/BF02346007>
- Oh, M. H., ve Clouse, S. D. (1998). "*Brassinolide affects the rate of cell division in isolated leaf protoplasts of Petunia hybrida*". *Plant Cell Reports*, 17(12), 921–924. <https://doi.org/10.1007/S002990050510>
- Otie, V., Udo, I., Shao, Y., Itam, M. O., Okamoto, H., An, P., ve Eneji, E. A. (2021). "*Salinity Effects on Morpho-Physiological and Yield Traits of Soybean (Glycine max L.) as Mediated by Foliar Spray with Brassinolide*". *Plants* , 10(3), 541. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10030541>
- Pagano, M. C., ve Miransari, M. (2016). "*The importance of soybean production worldwide*". *Abiotic and Biotic Stresses in Soybean Production*, 1, 1–26. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801536-0.00001-3>
- Palomo, I., Guzman, L., Leiva, E., Mujica, V., Carrasco, G., Morgado, N., ve Gonzalez, D. R. (2011). "*Soybean Products Consumption in the Prevention of Cardiovascular*

- Diseases*". In H. El-Shemy (Ed.), *Soybean and Health* (pp. 1–20). IntechOpen.
- Pereira, Y. C., Silva, F. R. da, Silva, B. R. S. da, Cruz, F. J. R., Marques, D. J., ve Lobato, A. K. da S. (2020). "*24-epibrassinolide induces protection against waterlogging and alleviates impacts on the root structures, photosynthetic machinery and biomass in soybean*". *Plant Signaling and Behavior*, 15(11), 1–12. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1805885>
- Planas-Riverola, A., Gupta, A., Betegón-Putze, I., Bosch, N., Ibañes, M., ve Caño-Delgado, A. I. (2019). "*Brassinosteroid signaling in plant development and adaptation to stress*". *Development*, 146(5). <https://doi.org/10.1242/DEV.151894>
- Qin, S., Liu, H., Nie, Z., Rengel, Z., Gao, W., Li, C., ve Zhao, P. (2020). "*Toxicity of cadmium and its competition with mineral nutrients for uptake by plants: A review*". *Pedosphere*, 30(2), 168–180. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(20\)60002-9](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(20)60002-9)
- Randeniya, L. K., ve De Groot, G. J. J. B. (2015). "*Non-Thermal Plasma Treatment of Agricultural Seeds for Stimulation of Germination, Removal of Surface Contamination and Other Benefits: A Review*". *Plasma Processes and Polymers*, 12(7), 608–623. <https://doi.org/10.1002/PPAP.201500042>
- Riaz, M., Kamran, M., Rizwan, M., Ali, S., Parveen, A., Malik, Z., ve Wang, X. (2021). "*Cadmium uptake and translocation: selenium and silicon roles in Cd detoxification for the production of low Cd crops: a critical review*". *Chemosphere*, 273, 1–16. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.129690>
- Rizwan Ali Sheirdil. (2012). "*Effect of cadmium on soybean (Glycine max L) growth and nitrogen fixation*". *African Journal Of Biotechnology*, 11(8), 1886–1891. <https://doi.org/10.5897/AJB11.2849>
- Roy, S. K., Cho, S. W., Kwon, S. J., Kamal, A. H. M., Kim, S. W., Oh, M. W., Lee, M. S., Chung, K. Y., Xin, Z., ve Woo, S. H. (2016). "*Morpho-Physiological and Proteome Level Responses to Cadmium Stress in Sorghum*". *Plos One*, 11(2), e050431. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0150431>
- Saraiva, M. P., Maia, C. F., da Silva, B. R. S., Batista, B. L., ve Lobato, A. K. da S. (2021). "*24-Epibrassinolide induces protection against nickel excess in soybean plants: anatomical evidences*". *Brazilian Journal of Botany* , 44(1), 197–205. <https://doi.org/10.1007/S40415-021-00701-3>
- Scabba, F., Sebastiani, L., ve Vitagliano, C. (2001). "*Activities of Antioxidant Enzymes during Senescence of Prunus Armeniaca Leaves*". *Biologia Plantarum* 2001 44:1,

- 44(1), 41–46. <https://doi.org/10.1023/A:1017962102950>
- Sebastian, A., ve Prasad, M. N. V. (2018). "*Exogenous citrate and malate alleviate cadmium stress in Oryza sativa L.: Probing role of cadmium localization and iron nutrition*". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 166, 215–222. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2018.09.084>
- Sebastian, A., ve Prasad, M. N. V. (2019). "*Photosynthetic light reactions in Oryza sativa L. under Cd stress: Influence of iron, calcium, and zinc supplements*". *The EuroBiotech Journal*, 3(4), 175–181.
- Senden, M. H. M. N., Vand Der Meer, A. J. G. M., Verburg, T. G., ve Woltetbeek, H. T. (1994). "*Effects of cadmium on the behaviour of citric acid in isolated tomato xylem cell walls*". *Journal of Experimental Botany*, 45(5), 597–606. <https://doi.org/10.1093/JXB/45.5.597>
- Shabnam, N., Tripathi, I., Sharmila, P., ve Pardha-Saradhi, P. (2015). "*A rapid, ideal, and eco-friendlier protocol for quantifying proline*". *Protoplasma*, 253(6), 1577–1582. <https://doi.org/10.1007/S00709-015-0910-6>
- Shah, A. A., Ahmed, S., ve Yasin, N. A. (2019). "*24-epibrassinolide triggers cadmium stress mitigation in Cucumis sativus through intonation of antioxidant system*". *South African Journal of Botany*, 127, 349–360. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2019.11.003>
- Shah, F. U. R., Ahmad, N., Masood, K. R., Peralta-Videa, J. R., ve Ahmad, F. U. D. (2010). "*Heavy Metal Toxicity in Plants*". In M. Ashraf, M. Ozturk, ve M. S. A. Ahmad (Eds.), *Plant Adaptation and Phytoremediation* (pp. 71–97). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9370-7_4
- Shahzad, B., Tanveer, M., Che, Z., Rehman, A., Cheema, S. A., Sharma, A., Song, H., Rehman, S., ve Zhaorong, D. (2018). "*Role of 24-epibrassinolide (EBL) in mediating heavy metal and pesticide induced oxidative stress in plants: A review*". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147, 935–944. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.066>
- Shanmugaraj, B. M., Chandra, H. M., Srinivasan, B., ve Ramalingam, S. (2012). "*Cadmium Induced Physio-Biochemical and Molecular Response in Brassica Juncea*". *International Journal of Phytoremediation*, 15(3), 206–218. <https://doi.org/10.1080/15226514.2012.687020>
- Shanmugaraj, B. M., Malla, A., ve Ramalingam, S. (2019). "*Cadmium Stress and Toxicity*

- in Plants: An Overview*". In Hasanuzzaman M., Prasad M. N. V., ve Fujita M. (Eds.), *Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants: From Physiology to Remediation* (pp. 1–17). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814864-8.00001-2>
- Silva, L. C. C., da Matta, L. B., Pereira, G. R., Bueno, R. D., Piovesan, N. D., Cardinal, A. J., God, P. I. V. G., ve Ribeiro, C. (2021). "*Association studies and QTL mapping for soybean oil content and composition*". *Euphytica*, 217(2), 1–18. <https://doi.org/10.1007/S10681-020-02755-Y/TABLES/4>
- Simaei, M., Khavari-Nejad, R. A., ve Bernard, F. (2012). "*Exogenous Application of Salicylic Acid and Nitric Oxide on the Ionic Contents and Enzymatic Activities in NaCl-Stressed Soybean Plants*". *American Journal of Plant Sciences*, 3(10), 1495–1503. <https://doi.org/10.4236/AJPS.2012.310180>
- Smeets, K., Ruytinx, J., Van B. F., Semane, B., Lin, D., Vangronsveld, J., ve Cuypers, A. (2008). "*Critical evaluation and statistical validation of a hydroponic culture system for Arabidopsis thaliana*". *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(2), 212–218. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2007.09.014>
- Sulieman, S., Abdelrahman, M., ve Tran, L. S. P. (2022). "*Carbon metabolic adjustment in soybean nodules in response to phosphate limitation: A metabolite perspective*". *Environmental and Experimental Botany*, 196, 104810. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2022.104810>
- Sumanta, N., Imranul Haque, C., Nishika, J., ve Suprakash, R. (2014). "*Spectrophotometric Analysis of Chlorophylls and Carotenoids from Commonly Grown Fern Species by Using Various Ex.. Related papers Spectrophotometric Analysis of Chlorophylls and Carotenoids from Commonly Grown Fern Species by Using Various Extracting Solvents*". *Research Journal of Chemical Sciences*, 4(9), 63–69.
- Sun, H., Chen, Z. H., Chen, F., Xie, L., Zhang, G., Vincze, E., ve Wu, F. (2015). "*DNA microarray revealed and RNAi plants confirmed key genes conferring low Cd accumulation in barley grains*". *BMC Plant Biology*, 15(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S12870-015-0648-5/FIGURES/7>
- Surgun-Acar, Y., ve Zemheri-Navruz, F. (2019). "*24-Epibrassinolide promotes arsenic tolerance in Arabidopsis thaliana L. by altering stress responses at biochemical and molecular level*". *Journal of Plant Physiology*, 238, 12–19. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2019.05.002>
- Surgun-Acar, Y., ve Zemheri-Navruz, F. (2021). "*Exogenous Application of 24-*

- Epibrassinolide Improves Manganese Tolerance in Arabidopsis thaliana L. via the Modulation of Antioxidant System*". Journal of Plant Growth Regulation, 1–12. <https://doi.org/10.1007/S00344-021-10320-7/FIGURES/4>
- Surgun, Y., Çöl, B., ve Bürün, B. (2016). "Differential expression analysis of boron transporters and some stress-related genes in response to 24-epibrassinolide and boron by semi-quantitative RT-PCR in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh". Genetika, 48(2), 547–563. <https://doi.org/10.2298/GENSR1602547S>
- Surgun, Y., Yılmaz, E., Çöl, B., ve Bürün, B. (2012). "Altıncı Grup Bitki Hormonu: Brassinosteroidler". Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 8(1), 27–46.
- Švubová, R., Slováková, L., Holubová, L., Rovňanová, D., Gálová, E., ve Tomeková, J. (2021). "Evaluation of the Impact of Cold Atmospheric Pressure Plasma on Soybean Seed Germination". Plants 10(1), p.p 177. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10010177>
- Taiz, L. (2008). *Bitki fizyolojisi*. İsmail Türkan (çev.). Palme Yayınları: Ankara.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., ve Sutton, D. J. (2012). "Heavy Metal Toxicity and the Environment". In Luch A. (Ed.), Molecular, clinical and environmental toxicology (101), p.p. 133-164. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6
- Thomey, M. L., Slattery, R. A., Köhler, I. H., Bernacchi, C. J., ve Ort, D. R. (2019). "Yield response of field-grown soybean exposed to heat waves under current and elevated [CO₂] ". Global Change Biology, 25(12), 4352–4368.
- T.C Tarım Orman Bakanlığı (2021). Tarım Ürünleri Piyasaları Soya Raporu. Erişim: 20 Ekim 2022, <https://arastirma.tarimorman.gov.tr>
- Velikova, V., Yordanov, I., ve Edreva, A. (2000). "Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines". Plant Science, 151(1), 59–66. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00197-1)
- Verma, V., Ravindran, P., ve Kumar, P. P. (2016). "Plant hormone-mediated regulation of stress responses". BMC Plant Biology 2016 16:1, 16(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12870-016-0771-Y>
- Wang, X., Zhang, H., Gao, Y., ve Zhang, W. (2016). "Characterization of Cu/Zn-SOD enzyme activities and gene expression in soybean under low nitrogen stress". Journal of the Science of Food and Agriculture, 96(8), 2692–2697. <https://doi.org/10.1002/JSFA.7387>

- Welch, R. M., ve Norvell, W. A. (1999). "*Mechanisms of Cadmium Uptake, Translocation and Deposition in Plants*". In M. J. McLaughlin ve B. R. Singh (Eds.), *Cadmium in Soils and Plants*, pp. 125–150. Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4473-5_6
- Wu, C., Chen, P., Hummer, W., Zeng, A., ve Klepadlo, M. (2017). "*Effect of Flood Stress on Soybean Seed Germination in the Field*". *American Journal of Plant Sciences*, 8(1), 53–68. <https://doi.org/10.4236/AJPS.2017.81005>
- Xue, Z.-C., Gao, H.-Y., ve Zhang, L.-T. (2013). "*Effects of cadmium on growth, photosynthetic rate and chlorophyll content in leaves of soybean seedlings*". *Biologia Plantarum*, 57(3), pp.587–590. <https://doi.org/10.1007/S10535-013-0318-0>
- Yang, S., Xie, J., ve Li, Q. (2012). "*Oxidative Response and Antioxidative Mechanism in Germinating Soybean Seeds Exposed to Cadmium*". *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9(8) pp. 2827-2838. <https://doi.org/10.3390/IJERPH9082827>
- Yue, R., Lu, C., Qi, J., Han, X., Yan, S., Guo, S., Liu, L., Fu, X., Chen, N., Yin, H., Chi, H., ve Tie, S. (2016). "*Transcriptome analysis of cadmium-treated roots in maize (zea mays L.)*". *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.01298/BIBTEX>
- Zaripova, N. R., Kholodova, V. P., Zubo, Y. O., Kusnetsov, V. V., ve Kuznetsov, V. V. (2011). "*Transcriptional and posttranscriptional regulation of chloroplast gene expression by heavy metals in barley seedlings*". *Russian Journal of Plant Physiology*, 58(6), pp. 1040–1047. <https://doi.org/10.1134/S1021443711060203>
- Zhao, C., Liu, B., Piao, S., Wang, X., Lobell, D. B., Huang, Y., Huang, M., Yao, Y., Bassu, S., Ciais, P., Durand, J. L., Elliott, J., Ewert, F., Janssens, I. A., Li, T., Lin, E., Liu, Q., Martre, P., Müller, C., ve Asseng, S. (2017). "*Temperature increase reduces global yields of major crops in four independent estimates*". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(35), 9326–9331. https://doi.org/10.1073/PNAS.1701762114/SUPPL_FILE/PNAS.1701762114.SAPP.PDF
- Zhiponova, M. K., Vanhoutte, I., Boudolf, V., Betti, C., Dhondt, S., Coppens, F., Mylle, E., Maes, S., González-García, M. P., Caño-Delgado, A. I., Beemster, G. T. S., De Veylder, L., ve Russinova, E. (2012). "*Brassinosteroid production and signaling differentially control cell division and expansion in the leaf*". *New Phytologist*,

197(2), 490–502. <https://doi.org/10.1111/NPH.12036>

Zuorro, A., Dominguez, J. R., García R. J., Peres, J. A., Frontistis, Z., Albqmi, M., Kastanek, F., Spacilova, M., Krystynik, P., Dlaskova, M., ve Solcova, O. (2023). "*Fenton Reaction; Unique but Still Mysterious*". *Processes* , 11(2), 432–453. <https://doi.org/10.3390/PR11020432>

