


Kurşun (II) Asetat ve Salisilik Asidin *Medicago sativa* L. Bitkisinde Gelişim, Biyokimyasal Parametreler ve miRNA156 Gen Anlatımı Üzerine Etkileri

Mustafa AKÇAY^{1*} 

¹Kafkas Üniversitesi, Kars Meslek Yüksekokulu, Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojileri Bölümü, Kars

*Sorumlu Yazar: mustafaakcay@kafkas.edu.tr

Geliş Tarihi: 23.08.2024 Düzeltme Geliş Tarihi: 14.10.2024 Kabul Tarihi: 05.12.2024

ÖZ

Bitkiler buldukları çevre içinde büyüme, gelişim ve fotosentezini engelleyen farklı şekillerde meydana gelebilen olumsuz koşullara maruz kalabilmektedirler. Kurşun (II) asetate, bitkilerin büyüme ve gelişmesini sınırlayan toksik bir ağır metaldir. Salisilik asit, bitkiler tarafından sentezlenebilen ve bitkilerin büyüme ve gelişiminde önemli rol oynayan bir fitohormondur. Bu çalışmada, materyal olarak Türkiye’de tarımı en fazla yapılan ve hayvan beslenmesinde kullanılan yem bitki türü baklagillerinden yonca (*Medicago sativa* L.) bitkisinin Erzurum genotipi kullanılmış ve kurşun (II) asetate ($Pb(CH_3COO)_2$), salisilik asit (SA) ve kombinasyon uygulamalarının bitki üzerinde çeşitli bitki büyüme parametreleri, biyokimyasal analiz ve miRNA ifadesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bitkiler, 25°C sıcaklık 16/8 fotoperiyot ve %60 neme ayarlanmış bitki büyütme kabini içerisinde 28 gün boyunca büyütülmüş ve ardından uygulama aşamasına geçilmiştir. Bitkilere uygulanan konsantrasyon uygulamaları kurşun (II) asetate (100 ve 1000 ppm), salisilik asit (0.5 mM ve 2 mM) ve kombinasyonları şeklinde olup, konsantrasyonlar bitkilerin toprağına 8 gün boyunca 40 ml çözelti şeklinde uygulanmıştır. Bu süre sonunda bitkiler hasat edilerek yapılan uygulamaların kök ve bitki uzunlukları (cm) ile kök ve yaprak yaş ağırlıkları (g), MDA içeriğı ve miRNA156 gen anlatım seviyesi üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, kurşun (II) asetate (100 ve 1000 ppm), uygulamalarının bitkinin kök ve bitki uzunlukları ile yaprak ve kök yaş ağırlıklarını azalttığı, MDA içeriğini şiddetli artırdığı ve miRNA156 gen anlatım seviyesini aşağı regüle ederek bitkinin büyüme ve gelişmesini olumsuz etkilediğı, buna karşın salisilik asit (0,5 mM ve 2 mM) uygulamaları bitkinin kök ve bitki uzunlukları ile yaprak ve kök yaş ağırlıklarını artırdığı, MDA içeriğini azalttığı ve miRNA156 gen anlatım seviyesini yukarı regüle ederek bitkinin büyüme ve gelişmesini sağladığı tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Medicago sativa* L., Kurşun (II) asetate, Salisilik asit, Lipit peroksidasyonu, miRNA156

Effects of Lead (II) Acetate and Salicylic Acid on Growth, Biochemical Parameters and miRNA156 Gene Expression in *Medicago sativa* L.

ABSTRACT

Plants can be exposed to unfavourable conditions in their environment that can occur in different ways that prevent them from growing, developing and photosynthesising. Lead (II) acetate is a toxic heavy metal that limits the growth and development of plants. Salicylic acid is a phytohormone that can be synthesised by plants and plays an important role in plant growth and development. In this study, Erzurum genotype of alfalfa (*Medicago sativa* L.), one of the most widely cultivated forage legume plants in Türkiye and used in animal nutrition, was used as material and the effects of lead (II)

acetate ($Pb(CH_3COO)_2$), salicylic acid (SA) and combination treatments on various plant growth parameters, biochemical analyses and miRNA expression were investigated. Plants were grown for 28 days in a plant growth chamber adjusted to 25°C temperature, 16/8 photoperiod and 60% humidity and then the application phase was started. Concentrations of lead (II) acetate (100 and 1000 ppm), salicylic acid (0.5 mM and 2 mM) and their combinations were applied to the soil of the plants as 40 ml solution for 8 days. At the end of this period, the plants were harvested and the effects of the treatments on root and plant lengths (cm), root and leaf wet weights (g), MDA content and miRNA 156 gene expression level were investigated. As a result of the study, lead (II) acetate (100 and 1000 ppm) treatments decreased the root and plant lengths and leaf and root wet weights, increased the MDA content severely and down-regulated the miRNA156 gene expression level and negatively affected the growth and development of the plant, On the other hand, salicylic acid (0.5 mM and 2 mM) treatments increased root and plant lengths, leaf and root wet weights, decreased MDA content, and up-regulated miRNA156 gene expression level and promoted plant growth and development.

Key words: *Medicago sativa* L., Lead (II) acetate, Salicylic acid, Lipid peroxidation, miRNA156

GİRİŞ

Yonca (*Medicago sativa* L.), baklagiller familyasına ait yem bitkileri içerisinde önemli bir yere sahip olan ve ülkemizde ekim alanı en fazla yapılan bir bitkidir (Yolcu ve Tan, 2008). Yonca, yem bitkilerinin kraliçesi olarak bilinir ve dünya çapında yaklaşık 32 milyon hektarda yetiştirilen önemli bir yem baklagilidir (Song ve ark., 2019). Yonca, yüksek protein, mineraller (Ca, Mg, S, K ve Zn) ve vitamin içeriği ile en iyi yem bitkileri arasında yer alır ve hayvanlarda lezzetli bir yem oluşturur (Radovic ve ark., 2009). Yıl içerisinde birkaç kez hasat edilebilen yonca, verimi yüksek, işlenebilir güçlü bir bitkidir. Bundan dolayı da hayvancılıkta direkt yem, saman, silaj ve yeşil gübre olarak kullanılmaktadır (Ozkose, 2018). Dahası, kökleri derinlemesine nüfuz eder, böylece daha derin toprak seviyelerinden Ca, K ve P sağlayarak verimli üst toprak alanını zenginleştirir (Zhang ve ark., 2019). Ayrıca *Rhizobium* bakterilerinin simbiyotik özellikleriyle ilişkili azot emme kabiliyeti nedeniyle toprak verimliliğini artırdığı için sürdürülebilir tarım için de önemlidir (Tabande ve ark., 2022). Yonca ve ilişkili gram-negatif toprak bakterileri (*Rhizobium* türleri), ağır metallerden ciddi şekilde etkilenir çünkü ağır metaller simbiyozun verimliliğini ve dolayısıyla yoncanın azot bağlama yeteneğini azaltır (Li ve ark., 2014). Yoncanın ağır metal kontaminasyonu, hayvancılıkta da yaygın olarak kullanıldığı için hayati öneme sahiptir. Dünya çapındaki mahsul bitkilerinin kalitesini ve üretkenliğini etkileyen çevresel kirleticilerin düzeylerinin artmasına insanoğlunun tarımsal ve endüstriyel faaliyetleri yol açmaktadır. Bu nedenle çevresel kirleticilerin zararlı etkilerini azaltma ya da ortadan kaldırma olanaklarını anlamak ve incelemek hayati önem taşımaktadır (Alloway, 2013). Biyosfere salınan zehirli maddeler bitkiler dahil tüm canlı organizmaları etkiler. Ağır metaller, toprağın bütünlüğü ile bitki sağlığı açısından önemli bir sorun oluşturmaktadır. Mahsullerin kirlenmiş olması gıda veya yem pazarlarında küresel riskler oluşturmaktadır (Gan ve ark., 2020). Ağır metal kelimesi, bilim camiasında farklı tanım ve yorumlar ile tartışmalar yaratmış olsa da genel olarak metalik özelliklere sahip kimyasal elementler grubu olarak tanımlanmaktadır (Duffus, 2002). Ağır metallerin temel ve zorunlu olmayan iki ana kategorisi mevcuttur. Bitkilerde temel ağır metaller mikro elementler olarak da işlev görürler ve en önemlileri; demir (Fe), çinko (Zn), bakır (Cu), kobalt (Co), molibden (Mo), manganez (Mn), vanadyum (V) ve nikel (Ni) (Rai ve ark., 2019). Temel ağır metallerle ilgili olarak iki büyük endişe söz konusudur. Birincisi, bitkilerin gelişmesinde başarısızlığa yol açabilecek ve fotosentetik üretimde azalmaya neden olabilecek element eksikliğidir. İkincisi ise elementlerin toksik semptomlara ve ölüme sebebiyet verebilecek yüksek doz ya da uzun süreli düşük dozda aşırı kullanımınıdır (Dimkpa ve Bindraban, 2016). Zorunlu olmayan ağır metaller ise, kadmiyum (Cd), krom (Cr), cıva (Hg), kurşun (Pb) ve arsenik (As) olup bu elementler toksik etki gösterebilmektedir (Rascio ve Nvari-Izzo, 2011). Ağır metaller içerisinde yer alan çevresel kirliliğe neden olan ve toksik madde bulunduran kurşun bulunduğu ortamlardan bitkiler aracılığıyla absorbe edilerek doku ve organlarda biriktirilmektedir (Nriagu, 1992). Pb, As'tan sonra ikinci en tehlikeli maddedir (Pourrut ve ark., 2011). Kurşunun, kaynakları olarak kömürün yakılması, depolama bataryaları, cevherlerinin madenciliği ve eritilmesi, endüstri atık

suları, metal kaplama gibi çok sayıda örnek verilebilmektedir (Gottesfeld ve ark., 2018). Bitkiler için zorunlu olmayan kurşun elementi bütün bitkilerde doğal olarak bulunmaktadır (Dere ve Doğan, 2020). Ancak kurşun stresine maruz kalan bitkilerde kurşunun aşırı birikmesi durumunda bitkilerde kök uzamasında, biyokütlerde, enzim aktivitelerinde, klorofil biyosentezinde (Kieffer ve ark., 2008), tohum çimlenmesinde (Yang ve ark., 2010), fide büyümesinde ve mineral besin alımında azalma (Kopittke ve ark., 2007) gibi çok sayıda fizyolojik ve biyokimyasal olumsuz sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Salisilik asit (SA), 2-hidroksi benzoik asit olarak da bilinir ve renksiz, kristal bir yapıya sahiptir (Arteca, 1996). Bitkiler tarafından sentezlenen salisilik asit, bitkinin tüm organlarında mevcuttur (Raskin, 1992). Aromatik bir halkaya sahip olan salisilik asit bitkiler tarafından üretilen sinyaller olarak görev almaktadır (Li ve ark., 2002). Bitki hormonlarından biri olan salisilik asit, bitkilerin büyüme ve gelişmesinde, olgunlaşma ve çiçeklenmesinde, biyotik ve abiyotik (sıcaklık, kuraklık, tuzluluk, düşük sıcaklık, ağır metal gibi) streslere karşı tepkilerin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Hara ve ark., 2012). Salisilik asit, bitkide stoma kapanmasını ve gen ekspresyonunu etkilemektedir (Fu ve ark., 2012). Ağır metallerin neden olduğu reaktif oksijen türleri (ROT) hasarlarına karşı antioksidan savunma sistemini çalıştırarak bitki koruması sağlamaktadır (Chen ve ark., 2016). Yapılan çalışmalar salisilik asidin bitki üzerindeki etkisinin çevresel faktörlere, uygulama şekline, doz uygulamasına ve bitki çeşidine göre değiştiğini göstermiştir. Salisilik asidin düşük dozlarda büyümeyi uyardığı buna karşın yüksek doz kullanımında büyümeyi engellediği ileri sürülmüştür (Bagautdinova ve ark., 2022). Bütün bu bulgular salisilik asidin ağır stres koşullarında bitkinin toleransını artırabileceğini göstermektedir. miRNA, (mikroRNA) 20-24 nükleotid uzunluğunda, küçük, tek sarmala sahip, protein kodlamayan ve gen ifadesinin temel denetleyicisi olan RNA molekülleridir. miRNA'lar hedef mRNA'lara bağlanarak mRNA'yı keserek veya inhibe ederek gen ifadesinin negatif yönde düzenlenmesini sağlarlar (Jones-Rhoades, 2012). Biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı çok sayıda miRNA'lar tanımlanmıştır (Zhou ve ark., 2008). Son dönemlerde yapılan çalışmalar miRNA'ların stres faktörlerine karşı önemli rol oynadığını göstermektedir. Kuraklık, tuzluluk, düşük ve yüksek sıcaklık gibi abiyotik stres faktörleri bitkilerin büyüme ve gelişmesinden sorumlu miRNA'ların ifadelerini değiştirmektedir (Shriram ve ark., 2016). miRNA'ların aktivitesi hem yukarı hem de aşağı regülasyon olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir. miRNA aracılı gen regülasyonu, bitkilerin abiyotik strese verdiği yanıtlar da dahil olmak üzere farklı yollarda kritik öneme sahiptir. Ağır metal stresi sırasında miRNA'lar sülfatların asimilasyonu ve tahsisi, fitohormonların sinyalizasyonu, antioksidan temizleyicilerin aktivasyonu ve biyogenez miRNA'ları için metal stresine duyarlı metabolik yollarda yer alan çeşitli genleri hedef alırlar. Ağır metal strese yanıt veren bazı miRNA'lar; miR156, miR159, miR162, miR166, miR171, miR390, miR393, miR395 ve miR396 olmak üzere çeşitli bitki türlerinde *Brassica juncea*, *B. napus*, *M. truncatula*, *O. sativa* ve *Phaseolus vulgaris* gibi genom çapında tanımlama yoluyla tanımlanmıştır (Yang ve Chen, 2013). Çoğu miRNA'ların, metalik strese yanıt olarak bitkilerin doğal büyüme ve gelişme sürecine katılan transkripsiyon faktörlerini hedef aldığı gözlemlenmiştir. miRNA156, bitkilerde bolca bulunan, miRNA ailesi içerisinde yüksek oranda korunan ve ilk olarak da *Arabidopsis thaliana* bitkisinde keşfedilmiş, 20 nükleotit uzunluğundaki miRNA'dır. miRNA156'nın 2 hedef geni vardır. Bunlar; SBP/SPL (SQUAMOSA promotör bağlayıcı protein) gen ailesidir. miRNA156, SPL gen ailesi üyelerinin ifadesini düzenleyerek bitkilerin büyüme ve gelişmesini sağlar (Xie ve ark., 2006).

Yonca (*Medicago sativa* L.) bitkileri, ağır metal etkilerini ve bunların hafifletilme potansiyelini inceleyen nispeten az sayıda çalışmanın konusu olmuştur. Bu bağlamda, bu çalışmada (Pb(CH₃COO)₂)'nin farklı konsantrasyon (100 ve 1000 ppm) toksisitetlerine maruz kalan yonca (*Medicago sativa* L.) bitkilerinde tolerans mekanizmalarının geliştirilmesi hedefi ile SA'nın farklı konsantrasyon (0.5 ve 2 mM) uygulamalarının büyüme parametreleri, biyokimyasal analiz ve moleküler düzeyde etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bitki Materyali, Büyüme Koşulları ve Uygulamalar

Bu çalışma, 2024 yılında Kafkas Üniversitesi Yaşam Bilimleri ve Teknolojileri Uygulama ve Araştırma Merkezinde yapılmıştır. Materyal olarak ülkemizde tarımı en fazla yapılmakta olan yonca (*Medicago sativa* L.)'nın (Avcıoğlu ve ark., 2009) Erzurum genotipine ait tohumları kullanılmıştır. Tohumlar bölgenin yerel çiftçilerinden temin edilmiştir. *Medicago sativa* L. tohumları öncelikle %75'lik etil alkol içerisinde yıkanmış ardından %5'lik sodyum hipoklorit (NaClO) ticari çamaşır suyunda 15 dk sterilize edilmiştir. Son olarak tohumlar saf su ile birkaç kez yıkanarak ekime hazır hale getirilmiştir. Tohumların ekimi daha önceden hazırlanmış olan toprak:perlit:torf (1:1:1) karışımı içeren viyollerde yapılmış ve her bir viyole eşit sayıda tohum ekilmiştir. Ekim sonrası viyoller 25°C sıcaklık 16/8 uzun gün fotoperiyodu ve %60 neme sahip bitki büyütme kabini içerisine alınarak yetiştirilmeye bırakılmışlardır. Her bir viyolde bulunan fideler hasat edilinceye kadar (4 hafta) yalnızca eşit miktarda su ile sulanmışlardır. 28. gün bitkilere kurşun (II) asetat ($Pb(CH_3COO)_2$), salisilik asit (SA) ve kombinasyon uygulamaları yapılmaya başlanmıştır. Uygulamaların konsantrasyonları literatür araştırmalarına ve ön çalışmaya göre belirlenmiştir (Altun ve Orcan, 2024). Kontrol dâhil toplam dokuz grup oluşturulmuştur. Gruplar; $Pb(CH_3COO)_2$ (100 ve 1000 ppm), SA (0.5 mM ve 2 mM) ve kombinasyonlar (100 ppm $Pb(CH_3COO)_2$ + 0.5 mM SA, 100 ppm $Pb(CH_3COO)_2$ + 2 mM SA, 1000 ppm $Pb(CH_3COO)_2$ + 0.5 mM SA ve 1000 ppm $Pb(CH_3COO)_2$ + 2 mM SA) şeklindedir. Konsantrasyon çözeltileri ise ($Pb(CH_3COO)_2$ ve SA) su ile çözdürülerek hazırlanmıştır. Her bir viyole 40 ml ilgili çözeltiler topraktan ilave edilmiş ve uygulamalar 8. gün sonlandırılmıştır. Uygulama süresi boyunca kontrol bitkileri olarak esas alınan viyole ise yalnızca su uygulaması yapılmıştır.

Büyüme Parametreleri

8. gün sonunda bitkiler hasat edilerek kök ve bitki uzunlukları hassas bir cetvel ile ölçülmüş, kök ve yaprak yaş ağırlıkları ise hassas terazi ile belirlenmiştir. Hasat edilen bitkilerin kökleri analiz yapıncaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi

Bitkilerde malondialdehit (MDA) içeriği lipid peroksidasyonun son ürünü olarak ifade edilir ($nmol\ g^{-1}$ Taze Ağırlık). MDA içeriğini belirlemede Heath ve Packer (1968) tarafından anlatılan yöntem kullanılmıştır. Öncelikle 0.2 g taze bitki örneği tartıldıktan sonra sıvı nitrojen kullanılarak havan içerisinde ezme işlemi yapılmıştır. 2 ml %0.1'lik trikloro asetik asit (TCA) ile homojenize edildikten sonra homojenat 15000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmından 1 ml alınıp, üzerine 1 ml %20'lik TCA ve 1 ml %0.5'lik tiobarbitürik asit (TBA) eklenmiştir. 100°C'lik su banyosunda 40 dk inkübe edildikten sonra buz banyosuna hızlıca alınarak soğutuldu ve 10000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısmı alınarak 532 ve 600 nm dalga boylarında 3'lü biyolojik tekrar şeklinde absorbans ölçümü yapılmıştır (Heath ve Packer, 1968).

RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Toplam RNA izolasyonu, RNA Mini Kit kullanılarak üreticinin talimatlarına göre yapılmış ve bitkilerin köklerinden elde edilmiştir (PureLink™/Cat. No. 12183018A). İzole edilen kök RNA örneklerinin kalite ve miktarları (260/280) nanodrop (Thermo Scientific Multiscan) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. cDNA sentezi için izole edilen RNA örnekleri ile stem loop primer ve "RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermoscientific/Cat. No. K1622)" protokülü kullanılmıştır. miRNA156 stem loop primer (GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCA CACTGGATACGACTGTGCT) NCBI veri tabanına göre dizayn edilmiştir.

Real-Time qPCR

miRNA156'nın gen ifadesindeki değişikliğini tespit edebilmek için "Hot Firepol Evagreen Real-Time qPCR Supermix 5x (Solis Biodyne/Cat. No. 08-36-00001)" kullanılmış ve kit protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Protokol kısaca, Solis Biodyne Evagreen Supermix 2 µl, ileri primer (F-5'ACCGGGGTGACAGAAGAGAGAG-3') 0.2 µl, geri primer (R-5'CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA-3') 0.2 µl, cDNA 2 µl, Nükleaz Free Water (distile su) 5.6 µl olmak üzere toplam 10 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon protokolünde kullanılan miRNA156 ileri ve geri primer setleri miRbase (mikroRNA dizisi veritabanı) kullanılarak tasarlanmıştır. Referans gen olarak 6U (F-5' TCGGGGACATCCGATAAAAT-3' ile R-5' TTTGTGCGTGCATCCTTGC-3') kullanılmıştır (Shu ve ark., 2016). Reaksiyon koşulları ise, 95°C'de 12 dk pre-denatürasyon aşamasını takiben, 40 döngü 95°C'de 15 sn, 58°C'de 20 sn, 72°C'de 20 sn şeklinde gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonunun spesifikliğini kontrol etmek için PCR ürünleri erime eğrisi analizi ile kontrol edilmiştir. Reaksiyonlar her bir örnek için 3 biyolojik tekrar şeklinde çalışılmıştır. Reaksiyon sonucunda elde edilen veriler ile gen ifadesindeki değişiklikler ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) yöntemiyle hesaplanmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001).

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme için SPSS 17.0 paket programı kullanılmıştır. Çalışma 3 tekrarlı olarak yapılmış verilerin ortalaması; üç tekrarın ortalaması \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. Elde edilen veriler üzerinde tek yönlü varyans analizi testi (ANOVA) yapılmış ve ortalamalar arasındaki farklılıklar Duncan Testi ile karşılaştırılmıştır. $P < 0.05$ olan değerler istatistiksel bakımdan anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Pb(CH₃COO)₂, SA ve Kombinasyon Uygulamalarının *Medicago sativa* L. bitkisinde Büyüme Parametreleri Üzerine Etkileri

Medicago sativa L. fideleri üzerine uygulanan Pb(CH₃COO)₂, SA ve kombinasyon uygulamalarının büyüme parametreleri üzerine etkisi (bitki ve kök uzunluğu) Çizelge 1' de, kök ve yaprak yaş ağırlığı ise Çizelge 2'de verilmiştir.

Bitki ve kök uzunluğu (cm)

Tüm uygulamalar arasındaki bitki uzunlukları Çizelge 1'e bakıldığında 9.16 ile 24.5 cm aralığında değişiklik göstermiştir. Pb(CH₃COO)₂'nin iki farklı konsantrasyonunun da bitkinin boyunu azalttığı, konsantrasyon miktarı arttıkça bitki boyundaki azalmanın daha şiddetli gerçekleştiği görülmüştür. SA'nın uygulanan iki farklı konsantrasyonu ise kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında bitki uzunluğunu artırmıştır. Konsantrasyon arttıkça bu artışın daha fazla olduğu görülmektedir ($p < 0.05$). En düşük bitki uzunluğu kontrole göre %56 azalma ile Pb(CH₃COO)₂'nin yüksek konsantrasyonu 1000 ppm uygulamasında görülürken, bitki uzunluğundaki en yüksek artış %17 oranla SA'nın yüksek konsantrasyonu olan 2 mM uygulamasında gerçekleşmiştir. Pb(CH₃COO)₂ ve SA'nın kombinasyon uygulamaları değerlendirildiğinde, kombinasyon uygulamalarının kontrole göre bitki uzunluklarını azalttığı fakat Pb(CH₃COO)₂'nin her iki konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında bitki uzunluklarını artırdığı görülmüştür. Ağır metal stresinin bitki uzunlukları üzerine olan etkileri ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında kurşunun farklı konsantrasyonlarının 11 farklı susam (*Sesamum indicum*) bitkisi üzerinde yapılan bir araştırmasında artan konsantrasyona bağlı olarak bitki uzunluklarının azaldığı ve büyümenin olumsuz etkilendiği bildirilmiştir (Kaya ve ark., 2019). Kıvırcık salata (*Lactuca sativa* var. *crispa*) bitkisi üzerinde kurşunun 150 ve 300 ppm'lik uygulamasının yapıldığı bir çalışmada 300 ppm kurşun uygulamasının bitkinin uzunluğunu en fazla etkilediği bildirilmiştir (Kıran, 2015). Benzer şekilde Alzahrani ve ark. (2020) yıldız çiçeği (*Dahlia variabilis* Cav) üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada kurşun ağır metalinin tüm konsantrasyonları (0, 100, 500 ve 5000 mg/kg) bitki uzunluklarını, kontrole göre önemli derecede azalttığını bildirmişlerdir. Kök uzunlukları değerlendirildiğinde, kök uzunlukları 4.85 ile 14.80

cm aralığında değişiklik göstermiştir (Çizelge 1). En düşük kök uzunluğu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %58 azalma ile $Pb(CH_3COO)_2$ 'nin yüksek konsantrasyonu olan 1000 ppm uygulamasında gerçekleşmiştir. Kök uzunluklarındaki en yüksek artış ise bitki uzunluğunda olduğu gibi SA uygulamasının yüksek konsantrasyonu 2 mM'da %28 artış oranı ile gerçekleşmiştir. $Pb(CH_3COO)_2$ 'nin her iki konsantrasyon uygulaması (100 ve 1000 ppm) bitki kök uzunluklarındaki büyümeyi azaltmış ve konsantrasyon miktarı arttıkça kök uzunluğundaki azalma şiddetli derecede artmıştır ($p<0.05$). SA'nın 2 mM konsantrasyon uygulamasında bitkilerin kök uzunlukları kontrole göre artmıştır. ($p<0.05$). Bitkilerin Pb'yi metal bulaş çözeltilerden aldıkları ve büyüme ve gelişmeyi olumsuz etkiledikleri bilinmektedir. Pb uygulamalarının kök uzunluklarında azalmalara yol açtığını gösteren literatür çalışmalarına bakıldığında, Ghani ve ark. (2010) iki mısır (*Zea mays* L.) çeşidini (Neelam ve Desi) 10, 20 ve 30 ppm Pb'ye maruz bırakmışlar ve kök büyümesi inhibisyonunun gerçekleştiğini bildirmişlerdir. (Kopittke ve ark. (2007) börülcede (*Vigna unguiculata*) yapmış oldukları çalışmada uygulamış oldukları Pb'nin (3 ve 5 μM) kök uzunluğunu azalttığını rapor etmişlerdir. Benzer şekilde Małkowski ve ark. (2002) yaptığı bir çalışmada mısır (*Zea mays* L.) fidelerine uygulanan kurşun ağır metalinin tüm konsantrasyonlarının (10, 100 ve 1000 μM) kök büyümesini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Obroucheva ve ark. (1998) genç mısır (*Zea mays* L.) fidelerinde yapmış oldukları çalışmada (10^{-2} ve 10^{-5} M) Pb uygulamasının bitkinin kök gelişimini engellediğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde Godbold ve Kettner (1991), avrupa ladini (*Picea abies*) üzerine yapmış oldukları çalışmada, 0.5 μM Pb uygulamasının sonucunda bitki kök gelişiminin kontrole göre azaldığını bildirmişlerdir. Bhatti ve ark. (2013) buğdaya (*Triticum aestivum* L.) uygulamış oldukları 40 ve 60 ppm'lik Pb çözeltilerinin kök uzunluğunu azalttığını rapor etmişlerdir.

Bitki ve kök uzunlukları ile ilgili elde ettiğimiz bulgulara göre *Medicago sativa* L. bitkilerinde artan $Pb(CH_3COO)_2$ konsantrasyon uygulamasıyla kök ve bitki uzunlukları önemli derecede azalmış, artan SA konsantrasyon uygulamasıyla da kök ve bitki uzunlukları önemli derecede artış göstermiştir. $Pb(CH_3COO)_2$ konsantrasyonunun kök ve bitki uzunluklarında azalmaya neden olması Pb tarafından indüklenen hücre bölünmesinin bir inhibisyonundan kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir (Eun ve ark., 2000).

Çizelge 1. *Medicago sativa* L. fideleri üzerine uygulanan $Pb(CH_3COO)_2$, SA ve kombinasyon uygulamalarının bitki ve kök uzunluğu üzerine etkisi.

Uygulamalar	Bitki uzunluğu	Kök uzunluğu
Kontrol	20.93±1.63 ^{bc}	11.53±0.97 ^b
100 ppm $Pb(CH_3COO)_2$	16.25±3.72 ^f	8.30±1047 ^c
1000 ppm $Pb(CH_3COO)_2$	9.16±1.57 ^g	4.85±1.02 ^d
0.5 mM SA	23.10±1.89 ^{ab}	13.14±3.33 ^{ab}
2 mM SA	24.50±2.57 ^a	14.80±3.59 ^a
100 ppm $Pb(CH_3COO)_2$ + 0.5 mM SA	19.65±1.85 ^{cde}	10.85±1.59 ^b
100 ppm $Pb(CH_3COO)_2$ + 2 mM SA	20,33±3.80 ^{cd}	11.12±3.56 ^b
1000 ppm $Pb(CH_3COO)_2$ + 0.5 mM SA	17,55±2.45 ^{ef}	11.04±3.34 ^b
1000 ppm $Pb(CH_3COO)_2$ + 2 mM SA	18.40±2.43 ^{def}	11.45±2.88 ^b

* $Pb(CH_3COO)_2$: Kurşun (II) asetat, SA: Salisilik asit

*Değerler üç paralel ölçümün ortalama \pm standart sapması olarak verilmiştir (n=3).

*Aynı sütundaki farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki fark, istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$).

Kök ve yaprak yaş ağırlığı (g)

Bitkilerin kök yaş ağırlığı, Çizelge 2'ye bakıldığında 0.07 ile 0.27 g aralığında değişiklik göstermiştir. $Pb(CH_3COO)_2$ uygulamasının konsantrasyon miktarı arttıkça kök yaş ağırlığında azalma, SA

uygulamasının konsantrasyon miktarı arttıkça kök yaş ağırlığında artış gerçekleşmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en düşük kök yaş ağırlığı $Pb(CH_3COO)_2$ uygulamasının yüksek konsantrasyonu olan 1000 ppm'de %61 ile en düşük ağırlığa sahip iken en yüksek kök yaş ağırlığı SA'nın yüksek konsantrasyonu 2 mM uygulamasıyla %50 artış oranında gerçekleşmiştir ($p<0.05$). Bitkideki büyüme parametresi ağırlık artışı ile yakından ilişkilidir. Bitkilerdeki ağırlık artışının metal stresiyle azaldığını birçok araştırmacı rapor etmiştir (Abdelgawad ve ark., 2020; Ahmad ve ark., 2012). Ouzounidou ve ark. (1997), yılında üç günlük buğday (*Triticum aestivum* L.) bitkileriyle yapmış oldukları çalışmalarında artan Cd stresi ile kök, sürgün ve yaprak ağırlıklarının azaldığını, büyüme ve gelişmenin neredeyse durduğunu bildirmişlerdir. Akıncı ve ark. (2010), yılında domates (*Solanum lycopersicum* L.) bitkisi üzerinde yapmış oldukları çalışmada Pb'nin farklı konsantrasyonlarının (75, 150 ve 300 mg l) bitkinin kök yaş ağırlıklarını azalttığını ve konsantrasyon arttıkça bu azalmanın daha şiddetli olduğunu bildirmişlerdir.

Bitkilerin yaprak yaş ağırlığı değerlendirildiğinde ise, yaprak yaş ağırlıkları 0.01 ile 0.08 g aralığında değişiklik göstermiştir (Çizelge 2). Genel olarak $Pb(CH_3COO)_2$ uygulamasının konsantrasyon miktarı arttıkça kök yaş ağırlığında azalma, SA uygulamasının konsantrasyon miktarı arttıkça da kök yaş ağırlığında artış gerçekleşmiştir. $Pb(CH_3COO)_2$ uygulamasının her iki dozunda (100 ve 1000 ppm) yaprak yaş ağırlığı kontrole göre kıyaslandığında azalmıştır ($p<0.05$). Yaprak yaş ağırlığında ki en fazla azalma kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $Pb(CH_3COO)_2$ 1000 ppm uygulamasında %83 oranıyla gerçekleşmiştir. SA uygulamasının her iki dozu (0.5 ve 2 mM) ise kontrole göre kıyaslandığında yaprak yaş ağırlığını artırmıştır. Yaprak yaş ağırlığındaki en yüksek artış SA'nın 2 mM uygulamasında %33 oranıyla gerçekleşmiştir ($p<0.05$). Yaprak yaş ağırlığının metal stresiyle azaldığını bildiren çalışmalar söz konusudur. Deswal ve ark. (2018) yılında bezelye (*Pisum sativum* L.) bitkisi üzerine kadmiyum (Cd), nikel (Ni) ve kurşunun (Pb) çeşitli konsantrasyonlarını uygulamış ve bitkilerin organlarının yaş ağırlıklarının azaldığını ve bu azalmanın konsantrasyon artışı ile arttığını bildirmişlerdir. Hussain ve ark. (2018) mısır (*Zea mays* L.) bitkisinde kurşunun farklı konsantrasyonlarının (0, 25, 50, 100, 200, 500 mM) büyüme üzerine etkisini araştırmış ve bitkilerin yaş ağırlıklarının azaldığını rapor etmişlerdir.

Kök ve yaprak yaş ağırlıkları ile ilgili elde ettiğimiz bulgulara göre *Medicago sativa* L. bitkilerinde artan $Pb(CH_3COO)_2$ konsantrasyon uygulamasıyla kök ve yaprak yaş ağırlıkları önemli derecede azalmış, artan SA konsantrasyon uygulamasıyla da kök ve yaprak yaş ağırlıkları önemli derecede artış göstermiştir.

Çizelge 2. *Medicago sativa* L. fideleri üzerine uygulanan $Pb(CH_3COO)_2$, SA ve kombinasyon uygulamalarının kök ve yaprak yaş ağırlığı üzerine etkisi.

Uygulamalar	Kök yaş ağırlığı	Yaprak yaş ağırlığı
Kontrol	0.18±0.09 ^b	0.06±0.01 ^{bc}
100 ppm $Pb(CH_3COO)_2$	0.13±0.01 ^{cd}	0.03±0.01 ^e
1000 ppm $Pb(CH_3COO)_2$	0.07±0.01 ^e	0.01±0.01 ^f
0.5 mM SA	0.19±0.02 ^b	0.07±0.00 ^b
2 mM SA	0.27±0.02 ^a	0.08±0.01 ^a
100 ppm $Pb(CH_3COO)_2$ + 0.5 mM SA	0.15±0.03 ^{bc}	0.05±0.01 ^d
100 ppm $Pb(CH_3COO)_2$ + 2 mM SA	0.16±0.06 ^{bc}	0.05±0.01 ^{cd}
1000 ppm $Pb(CH_3COO)_2$ + 0.5 mM SA	0.09±0.05 ^{de}	0.05±0.00 ^{cd}
1000 ppm $Pb(CH_3COO)_2$ + 2 mM SA	0.13±0.01 ^{cd}	0.05±0.00 ^{cd}

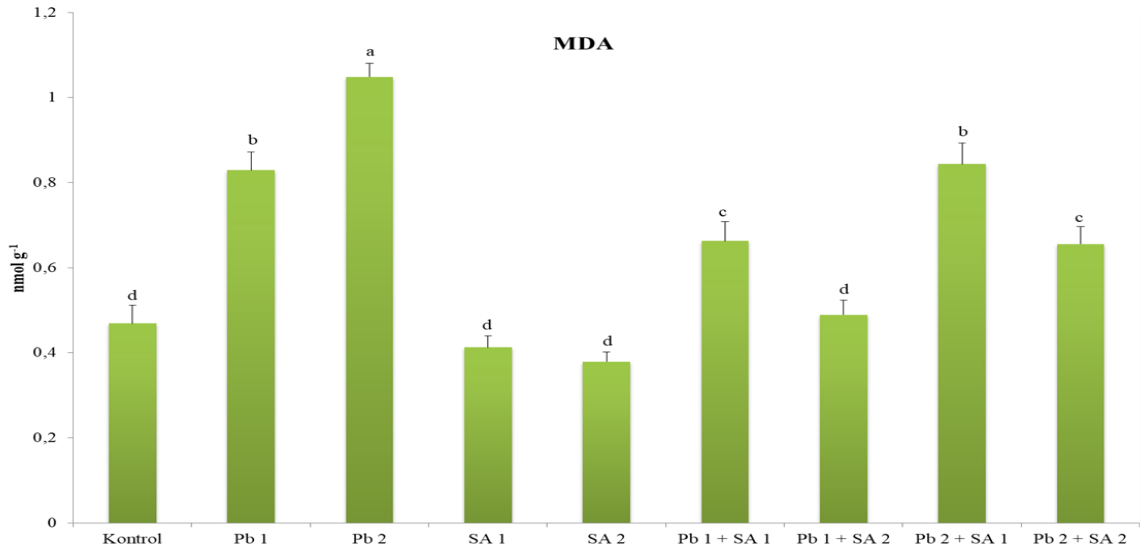
* $Pb(CH_3COO)_2$: Kurşun (II) asetat, SA: Salisilik asit

*Değerler üç paralel ölçümün ortalama ± standart sapması olarak verilmiştir (n=3).

*Aynı sütundaki farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki fark, istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$).

Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi

Hem biyotik hemde abiyotik stres faktörleri lipidlerde peroksidasyona (LPO) neden olurlar (Rama Devi ve Prasad, 2004). Reaktif oksijen türlerinin tetiklenmesi sonucunda meydana gelen oksidatif stres kurşun ağır metalinin neden olduğu etkilerden biridir. Oksidatif stres; karbonhidrat, lipit, protein ve DNA'nın yapısını bozabilir stres süresi uzadıkça da geri dönüşü olmayan tahribatlara neden olabilir. Lipit peroksidasyon düzeyini belirlemek için malondialdehit (MDA) düzeyinin tespiti önemlidir. MDA, lipit peroksidasyonunun son ürünüdür. Şekil 1'e bakıldığında MDA içeriği 0.379 ile 1.049 nmol g⁻¹ arasında değişiklik göstermiştir. Pb(CH₃COO)₂ uygulamasının konsantrasyon uygulaması arttıkça MDA içeriğinde artış, SA uygulamasının konsantrasyon uygulaması arttıkça da MDA içeriğinde azalma gerçekleşmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Pb(CH₃COO)₂'nin 100 ppm uygulamasında %77 (0.8293 nmol g⁻¹), 1000 ppm uygulamasında %123 (1.049 nmol g⁻¹) oranıyla MDA içeriğinde artış gerçekleşmiştir (p<0.05). Buna karşın kontrol grubuyla karşılaştırıldığında SA'nın 0.5 mM uygulamasında %12 (0.4133 nmol g⁻¹), 2 mM uygulamasında %19 (0.3790 nmol g⁻¹) oranıyla MDA içeriğinde azalma gerçekleşmiştir. Pb(CH₃COO)₂ ve SA'nın kombinasyon uygulamaları, MDA içeriği artışına neden olan Pb(CH₃COO)₂'nin her iki konsantrasyon uygulamasıyla karşılaştırıldığında ise Pb(CH₃COO)₂'nin her iki konsantrasyon uygulamasından daha düşük MDA içeriği göstermiştir. Pb ve SA ile yapılan literatür çalışmalarına bakıldığında, Pb'nin farklı konsantrasyonları (2, 4, 8, 16, 32 ve 64 ppm) ile sorgum (*Sorghum bicolor* L.) bitkisi üzerinde yapılan bir çalışmada MDA içeriğinin bitkide hem kökte hemde yaprakta önemli derecede arttığı bildirilmiştir (Yılmaz, 2015). Benzer şekilde iki arpa (*Hordeum vulgare* L.) çeşidine (Tarm/Tokak) uygulanan Pb'nin 15 mM konsantrasyon uygulamasının kontrole göre MDA içeriğini artırdığı bildirilmiştir (Gezer, 2011). Song ve ark. (2012) buğday (*Triticum aestivum*) bitkisinde yapmış oldukları çalışmada Pb uygulamasının MDA içeriğini artırdığını buna karşın SA uygulamasının Pb'nin etkisini azalttığını bildirmişlerdir. MDA ile ilgili elde ettiğimiz bulgulara göre *Medicago sativa* L. bitkilerinde artan Pb(CH₃COO)₂ konsantrasyon uygulamasıyla MDA içeriğinde önemli derecede bir artış gerçekleştirerek bitkide hüresel hasara sebebiyet vermiştir. SA konsantrasyon uygulamasıyla da MDA içeriğinde azalma ile bitkide Pb(CH₃COO)₂ 'nin oluşturmuş olduğu hasarın etkisini hafiflettiği görülmüştür.



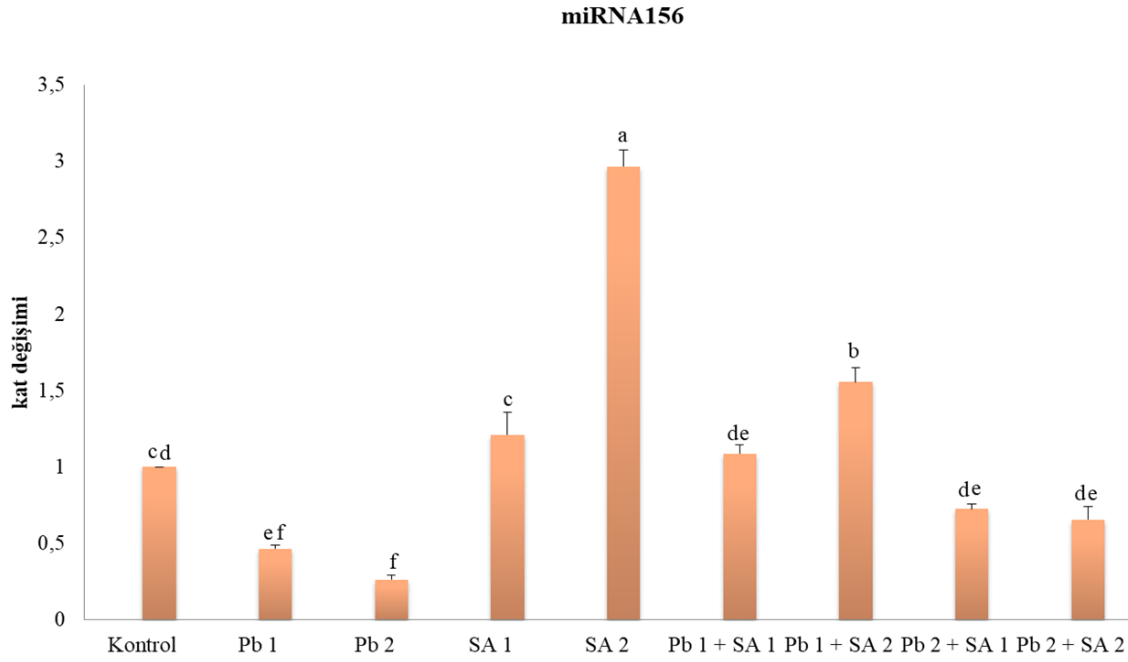
*Pb 1: Pb(CH₃COO)₂ 100 ppm, Pb 2: Pb(CH₃COO)₂ 1000 ppm, SA 1: SA 0.5 mM, SA 2: SA 2mM, Pb 1+ SA1: Pb(CH₃COO)₂ 100 ppm + SA 0.5 mM, Pb 1+ SA 2: Pb(CH₃COO)₂ 100 ppm + SA 2 mM, Pb 2+SA 1: Pb(CH₃COO)₂ 1000 ppm + SA 0,5 mM, Pb 2+ SA 2: Pb(CH₃COO)₂ 1000 ppm + SA 2 mM

*Aynı sütundaki farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki fark, istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

Şekil 1. *Medicago sativa* L. köklerindeki lipit peroksidasyon (MDA) düzeyi.

Real-Time qPCR

Medicago sativa L. Pb(CH₃COO)₂ SA ve kombinasyon uygulamalarıyla miRNA156 gen anlatım seviyesinde farklı sonuçlar vermiştir (Şekil 2). Pb(CH₃COO)₂'nin 100 ve 1000 ppm uygulamaları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gen anlatım seviyesinde azalma, SA'nın 0.5 ve 2 mM uygulamaları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gen anlatım seviyesinde artış gerçekleşmiştir. Kombinasyon uygulamalarında ise gen anlatım seviyesinde artış ve azalış şeklinde uygulamalara göre farklı sonuçlar ortaya çıkmıştır. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Pb(CH₃COO)₂'nin 100 ppm uygulaması %53.3 oranı ve 0.46 kat değişimi ile gen anlatım seviyesinde aşağı regüle olurken, 1000 ppm uygulaması %74 oranı ve 0.26 kat değişimi ile en düşük gen anlatım seviyesinde aşağı regüle olmuştur (p<0.05). SA'nın 0.5 mM uygulaması %21 oranı ve 1.21 kat değişimi ile gen anlatım seviyesinde yukarı regüle olurken, 2 mM uygulaması %196 oranı ve 2.97 kat değişimi ile en yüksek gen anlatım seviyesinde yukarı regüle olmuştur (p<0.05). Kombinasyon uygulamaları ise Pb(CH₃COO)₂ 'nin 100 ppm uygulaması SA'nın her iki konsantrasyon uygulamasıyla sırasıyla (1.08-1.55) kat değişimi ile yukarı regüle olurken, Pb(CH₃COO)₂ 'nin 1000 ppm yüksek konsantrasyonu SA'nın her iki konsantrasyon uygulamasıyla sırasıyla (0.72-0.65) kat değişimleriyle aşağı regüle olmuştur (p<0.05) (Şekil 2). Bitkilerde, miRNA'lar gen ifadesini esas olarak kesme için mRNA'ları hedef alarak düzenler; bu nedenle, belirli bir miRNA'nın ifadesinin seviyesi ile hedeflerinin ifadesinin seviyesi arasında ters bir korelasyon olabilir. miRNA156, transkripsiyon faktörlerini kodlayan promotör bağlama benzeri SPL genlerini hedefler ve SPL gen ailesi üyelerinin ekspresyonunu düzenleyerek bitkinin büyüme ve gelişmesini sağlar (Xu ve ark., 2016). Pb(CH₃COO)₂'nin 100 ve 1000 ppm uygulamalarının gen anlatım seviyelerinin aşağı doğru regüle olması muhtemelen hedeflediği genin yukarı doğru düzenlenmesine neden olarak bitkinin büyüme ve gelişmesini olumsuz etkilediği düşünülmektedir. Aynı şekilde SA'nın 0.5 ve 2 mM uygulamalarının gen anlatım seviyelerinin yukarı doğru regüle olması muhtemelen hedeflediği genin aşağı doğru düzenlenmesine neden olarak bitkinin büyüme ve gelişmesine olumlu yönde etki ettiği düşünülmektedir. Ağır metal stres ile ilgili yapılan miRNA gen anlatım seviyesi çalışmalarına bakıldığında, ağır metal stresi ve bitki çeşidine göre miRNA gen anlatım seviyesinde farklı değişiklikler söz konusudur. *Oryza sativa* (pirinç) bitkisinin 60 µM Cd ile muamele edilmiş köklerinde miRNA156 aşağı regüle (Ding ve ark. (2011), *Zea mays* (mısır) köklerinde 200 ppm Cd stresi ile miRNA156'nın aşağı regüle (Gao ve ark. (2019), Pb kaynaklı strese karşı *Gossypium hirsutum* L. (pamuk) bitkisinin köklerinde miRNA156 25 ve 50 ppm uygulamasında yukarı, 100 ve 200 ppm uygulamasında aşağı doğru regüle olduğu bildirilmiştir (He ve ark., 2014). Wang ve ark. (2015) yılında *Raphanus sativus* L. (turp) ile yapmış oldukları çalışmada Pb stresinde miRNA156'nın yukarı regüle olduğunu bildirmişlerdir.



*Pb 1: $Pb(CH_3COO)_2$ 100 ppm, Pb 2: $Pb(CH_3COO)_2$ 1000 ppm, SA 1: SA 0.5 mM, SA 2: SA 2-mM, Pb 1+ SA1: $Pb(CH_3COO)_2$ 100 ppm + SA 0.5 mM, Pb 1+ SA 2: $Pb(CH_3COO)_2$ 100 ppm + SA 2 mM, Pb 2+SA 1: $Pb(CH_3COO)_2$ 1000 ppm + SA 0,5 mM, Pb 2+ SA 2: $Pb(CH_3COO)_2$ 1000 ppm + SA 2 mM

*Aynı sütundaki farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki fark, istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

Şekil 2. *Medicago sativa* L. köklerindeki miRNA156 mRNA seviyesindeki değişiklik

SONUÇ ve ÖNERİLER

Medicago sativa L. bitkileri üzerine uygulanan $Pb(CH_3COO)_2$, SA ve kombinasyonlarının etkileri değerlendirildiğinde, $Pb(CH_3COO)_2$ 'nin her iki konsantrasyonunda (100 ve 1000 ppm) bitkinin kök ve bitki uzunluklarını, kök ve yaprak yaş ağırlıklarını azalttığı, MDA içeriğini artırdığı ve miRNA156 gen anlatım seviyesini aşağı regüle ettiği görülmüştür. Çalışmada 1000 ppm $Pb(CH_3COO)_2$ uygulamasının daha şiddetli etki gösterdiği ve bitkilerde stres oluşturduğu bununla beraber toksik etki yaratarak büyüme ve gelişmeyi olumsuz etkilediği görülmüştür. SA uygulamalarının her iki konsantrasyonunda (0.5 ve 2 mM) MDA içeriğini azalttığı, bitkinin kök ve bitki uzunluklarını, kök ve yaprak yaş ağırlıklarını artırdığı ve miRNA156 gen anlatım seviyesini yukarı regüle ettiği görülmüştür. SA'nın $Pb(CH_3COO)_2$ ile olan kombinasyon uygulamalarına bakıldığında ise $Pb(CH_3COO)_2$ 'nin MDA içeriği, kök, bitki uzunlukları ile kök ve yaprak yaş ağırlıklarında neden olduğu olumsuz etkiyi iyileştirdiği görülmüştür. SA uygulamaları, $Pb(CH_3COO)_2$ 'nin bitki üzerindeki yaratmış olduğu olumsuz etkilerin azaltılmasında etkili olduğu ve bitkiye bir koruma görevi sağladığı görülmüştür. SA'nın olumlu etkisinin daha fazla net bir şekilde ortaya çıkarılabilmesi için farklı çeşitlerde farklı stres ve SA konsantrasyonlarını içeren çalışmaların yapılması önem arz etmektedir.

YAZAR ORCID NUMARALARI

Mustafa AKÇAY  <http://orcid.org/0000-0003-1747-2314>

KAYNAKLAR

Abdelgawad, H., Zinta, G., Hamed, B. A., Selim, S., Beemster, G., Hozzein, W. N. ve Abuelsoud, W. 2020. Maize roots and shoots show distinct profiles of oxidative stress and antioxidant defense under heavy metal toxicity. *Environmental Pollution*, 258, 113705.

- Ahmad, P., Ozturk, M. ve Gucl, S. 2012. Oxidative damage and antioxidants induced by heavy metal stress in two cultivars of mustard (*Brassica juncea* L.) plants. *Fresenius Environ Bull*, 21(10), 2953-2961.
- Akinci, I.E., Akinci, S. ve Yilmaz, K. 2010. Response of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to lead toxicity: Growth, element uptake, chlorophyll and water content. *African Journal of Agricultural Research*, 5(6), 416-423.
- Alloway, B.J. 2013. Sources of heavy metals and metalloids in soils. *Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability*, 11-50.
- Altun, H. ve Orcan, P. 2024. Responses to exogenous elicitor treatment in lead-stressed *Oryza sativa* L. *BMC Plant Biology*, 24(1), 897.
- Alzahrani, Y., Alharby, H.F., Hakeem, K.R. ve Alsamadany, H. 2020. Modulating effect of EDTA and SDS on growth, biochemical parameters and antioxidant defense system of Dahlia variabilis grown under cadmium and lead-induced stress. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 48(2), 906-923.
- Arteca, R.N. 1999. *Plant growth substances: principles and applications*. Springer Science & Business Media. New York, 128 s.
- Avcioglu, R., Geren, H., Tamkoç, A. ve Karadağ, Y. 2009. Yonca (*Medicago sp.* L.). Yem Bitkileri Cilt II: Baklagil Yem Bitkileri. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü, İzmir, 293-295.
- Bagautdinova, Z.Z., Omelyanchuk, N., Tyapkin, A.V., Kovrizhnykh, V.V., Lavrekha, V.V. ve Zemlyanskaya, E.V. 2022. Salicylic acid in root growth and development. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2228.
- Bhatti, K.H., Sehrish Anwar, S.A., Khalid Nawaz, K.N., Khalid Hussain, K.H., Siddiqi, E.H., Sharif, R.U. ve Aneela Khalid, A.K. 2013. Effect of heavy metal Lead (Pb) stress of different concentration on wheat (*Triticum aestivum* L.). *Middle East Journal of Scientific Research*, 14(2), 148-154.
- Chen, Y.E., Cui, J.M., Li, G.X., Yuan, M., Zhang, Z.W., Yuan, S. ve Zhang, H.Y. 2016. Effect of salicylic acid on the antioxidant system and photosystem II in wheat seedlings. *Biologia plantarum*, 60(1), 139-147.
- Dere, S. ve Doğan, M. 2020. Kurşun Uygulamasının Yerfistiği (*Arachis hypogaea* L.)'ndeki Morfolojik ve Fizyolojik Etkileri. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 7(3), 233-245.
- Deswal, M. ve Laura, J.S. 2018. Effect of heavy metals cadmium, nickel and lead on the seed germination and early seedling growth of *Pisum sativum*. *Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 4, 368-383.
- Dimkpa, C.O. ve Bindraban, P.S. 2016. Fortification of micronutrients for efficient agronomic production: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 36(1), 7.
- Ding, Y., Chen, Z. ve Zhu, C. 2011. Microarray-based analysis of cadmium-responsive microRNAs in rice (*Oryza sativa*). *Journal of experimental botany*, 62(10), 3563-3573.
- Duffus, J.H. 2002. "Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure and applied chemistry*, 74(5), 793-807.
- Eun, S.O., Shik Youn, H. ve Lee, Y. 2000. Lead disturbs microtubule organization in the root meristem of *Zea mays*. *Physiologia plantarum*, 110(3), 357-365.
- Fu, Z.Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N. ve Dong, X. 2012. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*, 486(7402), 228-232.
- Gan, C.D., Chen, T. ve Yang, J.Y. 2020. Remediation of vanadium contaminated soil by alfalfa (*Medicago sativa* L.) combined with vanadium-resistant bacterial strain. *Environmental Technology & Innovation*, 20, 101090.
- Gao, J., Luo, M., Peng, H., Chen, F. ve Li, W. 2019. Characterization of cadmium-responsive MicroRNAs and their target genes in maize (*Zea mays*) roots. *BMC Molecular Biology*, 20, 1-9.
- Gezer, E. 2011. Arpa (*hordeum vulgare* L.) Bitkisinin bazı çeşitlerinde ağır metal stresi etkilerinin fizyolojik olarak araştırılması., *Sakarya Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi*, 1-43
- Ghani, A., Shah, A.U. ve Akhtar, U. 2010. Effect of lead toxicity on growth, chlorophyll and lead (Pb) content of two varieties of maize (*Zea mays* L.). *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(9): 887891.
- Godbold, D.L. ve Kettner, C. 1991. Lead influences root growth and mineral nutrition of *Picea abies* seedlings. *Journal of plant physiology*, 139(1), 95-99.

- Gottesfeld, P., Were, F.H., Adogame, L., Gharbi, S., San, D., Nota, M.M. ve Kuepouo, G. 2018. Soil contamination from lead battery manufacturing and recycling in seven African countries. *Environmental research*, 161, 609-614.
- Hara, M., Furukawa, J., Sato, A., Mizoguchi, T. ve Miura, K. 2012. Abiotic stress and role of salicylic acid in plants. *Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability*, 235-251.
- He, Q., Zhu, S. ve Zhang, B. 2014. MicroRNA–target gene responses to lead-induced stress in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Functional & integrative genomics*, 14, 507-515.
- Heath, R.L. ve Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125(1), 189-198.
- Hussain, A., Abbas, N., Arshad, F., Akram, M., Khan, Z.I., Ahmad, K. ve Mirzaei, F. 2013. Effects of diverse doses of Lead (Pb) on different growth attributes of *Zea-Mays* L. *Agricultural Sciences*, 4(5), 262-265.
- Jones-Rhoades, M.W. 2012. Conservation and divergence in plant microRNAs. *Plant molecular biology*, 80, 3-16.
- Kaya, A.R., Eryigit, T., Uslu, O.S., Gedik, O. Ve Tunçturk, M. 2019. Effects of lead on seed germination and seedling growth in different sesame (*Sesamum Indicum*) genotypes. *Fresenius Environmental Bulletin*, 28(9), 6574-6579.
- Kıran, S., Özkay, F., Kuşvuran, Ş. ve Ellialtıoğlu, Ş. 2015. Kurşunun kıvrıkcık salata (*Lactuca sativa* var. Crispa) bitkisinin bazı morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine etkisi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5(1), 83-88.
- Kieffer, P., Dommes, J., Hoffmann, L., Hausman, J.F. ve Renaut, J. 2008. Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants. *Proteomics*, 8(12), 2514-2530.
- Kopittke, P.M., Asher, C.J., Blamey, F.P.C. ve Menzies, N.W. 2007. Toxic effects of Pb²⁺ on the growth and mineral nutrition of signal grass (*Brachiaria decumbens*) and Rhodes grass (*Chloris gayana*). *Plant and Soil*, 300, 127-136.
- Li, X., Schuler, M.A. ve Berenbaum, M.R. 2002. Jasmonate and salicylate induce expression of herbivore cytochrome P450 genes. *Nature*, 419(6908), 712-715.
- Li, Z., Ma, Z., Hao, X., Rensing, C. Ve Wei, G. 2014. Genes conferring copper resistance in *Sinorhizobium meliloti* CCNWSX0020 also promote the growth of *Medicago lupulina* in copper-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(6), 1961-1971.
- Livak K.J ve Schmittgen T.D. 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Małkowski, E., Kita, A., Galas, W., Karcz, W. Ve Kuperberg, J.M. 2002. Lead distribution in corn seedlings (*Zea mays* L.) and its effect on growth and the concentrations of potassium and calcium. *Plant Growth Regulation*, 37, 69-76.
- Min Yang, Z. ve Chen, J. 2013. A potential role of microRNAs in plant response to metal toxicity. *Metallomics*, 5(9), 1184-1190.
- Nriagu, J.O. 1992. Toxic metal pollution in Africa. *Science of the Total Environment*, 121, 1-37.
- Obroucheva, N.V., Bystrova, E.I., Ivanov, V.B., Antipova, O.V. ve Seregin, I.V. 1998. Root growth responses to lead in young maize seedlings. In *Root Demographics and Their Efficiencies in Sustainable Agriculture, Grasslands and Forest Ecosystems: Proceedings of the 5th Symposium of the International Society of Root Research, held 14–18 July 1996 at Madren Conference Center, Clemson University, Clemson, South Carolina, USA*, Springer Netherlands, 445-456.
- Ouzounidou, G., Moustakas, M. ve Eleftheriou, E.P. 1997. Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 32, 154-160.
- Ozkose, A. 2018. Effect of environment x cultivar interaction on protein and mineral contents of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in central Anatolia, Turkey. *Sains Malays*, 47(3), 551-562.
- Pourrut, B., Jean, S., Silvestre, J. Ve Pinelli, E. 2011. Lead-induced DNA damage in *Vicia faba* root cells: potential involvement of oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 726(2), 123-128.
- Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J., Devi, S.R. ve Prasad, M.N.V. 1999. Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants. *Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems*, Berlin Heidelberg, 99-116.

- Radović, J., Sokolović, D. Ve Marković, J.J.B.A.H. 2009. Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25(5-6-1), 465-475.
- Rai, P.K., Lee, S.S., Zhang, M., Tsang, Y.F. ve Kim, K.H. 2019. Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management. *Environment international*, 125, 365-385.
- Rascio, N. ve Navari-Izzo, F. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting?. *Plant science*, 180(2), 169-181.
- Raskin, I. 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annual review of plant biology*, 43(1), 439-463.
- Shriram, V., Kumar, V., Devarumath, R.M., Khare, T.S. ve Wani, S.H. 2016. MicroRNAs as potential targets for abiotic stress tolerance in plants. *Frontiers in Plant Science*, 7, 817.
- Shu, Y., Liu, Y., Li, W., Song, L., Zhang, J. Ve Guo, C. 2016. Genome-wide investigation of microRNAs and their targets in response to freezing stress in *Medicago sativa* L., based on high-throughput sequencing. *G3:Genes, Genomes, Genetics*, 6(3), 755-765.
- Song, W., Zheng, A., Shao, H., Chu, L., Brestic, M. ve Zhang, Z. 2012. The alleviative effect of salicylic acid on the physiological indices of the seedling leaves in six different wheat genotypes under lead stress. *Plant Omics*, 5(5), 486-493.
- Song, Y., Lv, J., Ma, Z. ve Dong, W. 2019. The mechanism of alfalfa (*Medicago sativa* L.) response to abiotic stress. *Plant Growth Regulation*, 89, 239-249.
- Tabande, L., Sepehri, M., Yasrebi, J., Zarei, M., Ghasemi-Fasaei, R. ve Khatabi, B. 2022. A comparison between the function of *Serendipita indica* and *Sinorhizobium meliloti* in modulating the toxicity of zinc oxide nanoparticles in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environmental Science and Pollution Research*, 1-14.
- Xie, K., Wu, C. ve Xiong, L. 2006. Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice. *Plant physiology*, 142(1), 280-293.
- Xu, M., Hu, T., Zhao, J., Park, M.Y., Earley, K.W., Wu, G. ve Poethig, R.S. 2016. *Arabidopsis thaliana*'daki miR156 tarafından düzenlenen SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-BENZERİ (SPL) genlerinin gelişimsel işlevleri. *PLoS genetiği*, 12 (8), e1006263.
- Yang, Y., Wei, X., Lu, J., You, J., Wang, W. Ve Shi, R. 2010. Lead-induced phytotoxicity mechanism involved in seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Ecotoxicology and environmental safety*, 73(8), 1982-1987.
- Yılmaz, H.Ş. 2015. Bazı ağır metal uygulamalarının sorgum (*Sorghum bicolor* L.) bitkisinin enzim aktivitesi üzerine etkisi. *Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 1-74.
- Yolcu, H. ve Tan, M. 2008. Ülkemiz yem bitkileri tarımına genel bir bakış. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 14(3), 303-312.
- Zhang, F., Liu, M., Li, Y., Che, Y. ve Xiao, Y. 2019. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi, biochar and cadmium on the yield and element uptake of *Medicago sativa*. *Science of the Total Environment*, 655, 1150-1158.
- Zhou, Z.S., Huang, S.Q. ve Yang, Z.M. 2008. Bioinformatic identification and expression analysis of new microRNAs from *Medicago truncatula*. *Biochemical and biophysical research communications*, 374(3), 538-542.