

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2012-DR-005

Pleurochaete squarrosa (Brid.) Lindb. ve
Timmiella barbuloides (Brid.) Moenk. 'in
AĞIR METAL STRESİNE VERDİĞİ CEVAPLARIN
ARAŞTIRILMASI

Serap AYDOĞAN

Tez Danışmanı:
Doç. Dr. Bengi ERDAĞ
Doç. Dr. Lale YILDIZ AKTAŞ

AYDIN

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Serap AYDOĞAN tarafından hazırlanan “*Pleurochaete squarrosa* (Brid.) Lindb.ve *Timmiella barbuloides* (Brid.) Moenk’in ağır metal stresine verdiği cevapların araştırılması” başlıklı tez 27.08.2012 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan : Prof. Dr. Avni GÜVEN	EGE ÜNİV.
Üye : Prof. Dr. A.Alev KARAGÖZLER	ADÜ
Üye : Doç.Dr. Bengi ERDAĞ	ADÜ
Üye : Doç. Dr. Lale YILDIZ AKTAŞ	EGE ÜNİV.
Üye : Yrd. Doç. Dr. Mesut KIRMACI	ADÜ

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla .../.../2012 tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN
Enstitü Müdürü

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

27/ 08/ 2012

Serap AYDOĞAN

ÖZET
***Pleurochaete squarrosa* (Brid.) Lindb ve**
***Timmiella barbuloides* (Brid.) Moenk'in**
AĞIR METAL STRESİNE VERDİĞİ CEVAPLARIN
ARAŞTIRILMASI

Serap AYDOĞAN
 Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
 Tez Danışmanları: Doç. Dr. Bengi ERDAĞ
 Doç. Dr. Lale YILDIZ AKTAŞ
 2012, 124 sayfa

Son yıllarda biyomonitör olarak yaygın kullanımlarına rağmen, ağır metal kirliliği sonucu biryofitlerde meydana gelen oksidatif stres mekanizmaları hakkında çok az bilgi vardır. Bu çalışmada Pottiaceae familyasına ait iki biryofit türünün (*Pleurochaete squarrosa* ve *Timmiella barbuloides*) ağır metal stresine karşı gösterdiği hızlı fizyolojik tepkiler ve antioksidan mekanizmada meydana gelen değişiklikler belirlenmiştir. Bu doğrultuda, araziden toplanan örnekler sterilizasyon işlemlerinin ardından, nikel (Ni), kurşun (Pb), bakır (Cu) ve krom (Cr) içeren çözeltilerle kültüre alınmıştır. Metallerle stres koşullarına maruz bırakılan iki biryofit türünün ağır metalleri biriktirme düzeyleri, kuru ağırlıkları, lipid peroksidasyonu, fotosentetik pigment analizi, hidroksil radikali (OH[·]) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarı tayini, antioksidan enzimlerin (süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz, glutatyon redüktaz, askorbat peroksidaz) aktivite ölçümleri ve enzimatik olmayan antioksidan moleküllerin (glutatyon ve askorbik asit, prolin) miktarları ve antiradikal aktiviteleri belirlenmiştir. *P. squarrosa* ve *T. barbuloides*'in maruz kaldıkları metalleri bünyelerinde biriktirdikleri ve en çok biriktirilen metallerin Pb ve Ni olduğu belirlenmiştir. *T. barbuloides*'te Ni ve Pb'un yüksek derecede birikimine rağmen, kuru ağırlığını azaltmaması, pigment degradasyonuna ve lipid peroksidasyonuna sebep olmaması ve antiradikal mekanizmanın etkin çalışması türün bu metallere toleransını ortaya koymuştur. Cr ve özellikle Cu her iki türde de yüksek derecede oksidatif hasara yol açmıştır. Deneme sonuçlarına göre *P. squarrosa*'nın uygulanan ağır metal stresinden göreceli olarak daha çok etkilendiği ve *T. barbuloides*'e göre daha hassas olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Pleurochaete squarrosa*, *Timmiella barbuloides*, ağır metal, stres, antioksidan

ABSTRACT**INVESTIGATION THE RESPONSES OF
Pleurochaete squarrosa (Brid.) Lindb and *Timmiella barbuloides*
(Brid.) Moenk TO HEAVY METAL STRESS**

Serap AYDOĞAN

Ph.D. Thesis, Biology Department
Supervisors: Doç. Dr. Bengi ERDAĞ
Doç. Dr. Lale Yıldız AKTAŞ
2012, 124 pages

In recent years, despite their widespread use as biomonitor, very little is known about mechanisms of oxidative stress occurring in bryophyte seen as a result of heavy metal pollution. In this study, the rapid physiological responses against heavy metal stress and changes of antioxidant mechanism of two bryophyte species (*Pleurochaete squarrosa* and *Timmiella barbuloides*) belong to Pottiaceae family are determined. At this direction, samples collected from field, and then they were cultured nickel (Ni), lead (Pb), copper (Cu) and chromium (Cr)-containing solutions after the sterilization procedures. Levels of heavy metals accumulation, dry weight, lipid peroxidation, photosynthetic pigments analysis, hydroxyl radical (OH·) and hydrogen peroxide (H₂O₂) determination, antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, peroxidase, glutathione reductase, ascorbate peroxidase) activity measurements and non-enzymatic antioxidant molecules (glutathione, ascorbic acid and proline) amounts, antiradical activity analysis were evaluated in two bryophyte species exposed to metals stress. It was determined that *P. squarrosa* and *T. barbuloides* accumulated metals which they were exposed, and Pb and Ni are the most accumulated metals. Despite the high accumulation of Ni and Pb in *T. barbuloides*, there is no reduction in dry weight, the pigment degradation, lipid peroxidation and effective antiradical mechanism revealed the tolerance of the species on these metals. Cr and especially Cu caused high degree of oxidative damage in both species. According to result of experiments *P. squarrosa* is relatively more affected by applied heavy metals stress and it is determined to be more sensitive than *T. barbuloides*.

Key words: *Pleurochaete squarrosa*, *Timmiella barbuloides*, heavy metal, stress, antioxidant

ÖNSÖZ

Tez konumun seçimi, tez çalışmam boyunca büyük özveri ile bana her konuda yardımcı olan, bilgi ve birikimlerinden faydalandığım, en önemlisi lisans ve lisansüstü eğitimim boyunca öğrenimime yaptığı tüm katkıları ve yakın ilgisi için hocam sayın Doç. Dr. Bengi ERDAĞ'a,

Bu araştırmanın gerçekleşmesinde, sağladığı uygun çalışma ortamı ile tez çalışmam boyunca bilgi ve birikimleriyle, değerli öneri ve yönlendirici katkılarıyla bana destek verdiği için hocam sayın Doç. Dr. Lale YILDIZ AKTAŞ'a,

Tez çalışmasına değerli bilgi ve birikimleriyle katkılarından dolayı sayın Prof.Dr. Adnan ERDAĞ'a,

Tez izleme komitelerinde, değerli bilgi ve birikimleriyle tez çalışmasına katkılarından dolayı sayın Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER'e

Değerli bilgi ve birikimleriyle, tez çalışması ve hazırlanması sırasında bana zaman ayırdığı için sayın Yrd. Doç. Dr. Mesut KIRMACI'ya

Laboratuvar imkanlarından faydalanmamı sağlayan Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Bölümü Botanik Anabilim Dalı, Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü'ne, sayın Prof. Dr. Gönül AYDIN ve sayın Araş. Gör. Mustafa Ali KAPTAN'a,

Bitkilerin toplanması ve izolasyonundaki yardımları için Emre AĞCAGİL'e,

Aynı laboratuvarı paylaşmaktan büyük mutluluk duyduğum, her türlü yardım ve desteklerini esirgemeyen Esra EVCİ ERÇELEBİ ve Duygu DİLEK'e,

Yardımları ve dostluğuyla her zaman yanımda olan Burcu KAVADAR SARAÇ ve ailesine,

Tüm tez çalışmam boyunca bana vermiş olduğu sonsuz manevi destek, anlayış ve özverisi için eşim Çınar AYDOĞAN'a,

Ayrıca, tez çalışmamı proje (Proje No: FEF 11011) olarak destekleyen 'Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi'ne ve çalışanlarına teşekkürü borç bilirim.

Serap AYDOĞAN

AYDIN

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
3.1. Materyal.....	24
3.1.1. <i>Pleurochaete squarrosa</i> (Brid.) Lindb.....	24
3.1.2. <i>Timmiella barbuloidea</i> (Brid.) Moenk.....	26
3.2. Yöntem.....	27
3.2.1. Arazi Çalışması, Bitkilerin Toplanması ve İzolasyonu.....	27
3.2.2. Uygulama Ortamlarının Hazırlanması ve Biryofitlere Ağır Metal Uygulanması.....	27
3.2.3. Örnek Analizleri İçin Tartımların Yapılması.....	28
3.2.4. Ağır Metal Biriktirme Düzeyleri.....	28
3.2.5. Kuru Ağırlık Tayini.....	28
3.2.6. Hidroksil Radikali (OH ⁻) Miktarı Tayini.....	29
3.2.7. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarı Tayini.....	29
3.2.8. Lipit Peroksidasyonu.....	30
3.2.9. Fotosentetik Pigment Analizi.....	30
3.2.10. Enzim Ekstraktlarının Hazırlanması.....	30
3.2.11. Protein Miktarının Belirlenmesi.....	31
3.2.12. Süperoksit Dismutaz(SOD,EC1.15.1.1)Aktivitesinin Belirlenmesi.....	31
3.2.13. Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) Aktivitesinin Belirlenmesi.....	31

3.2.14. Peroksidaz (POX, EC 1.11.1.7) Aktivitesinin Belirlenmesi.....	32
3.2.15. Askorbat Peroksidaz (APX, EC 1.1.1.11) Aktivitesinin Belirlenmesi	32
3.2.16. Glutasyon Redüktaz (GR, EC 1.6.4.2) Aktivitesinin Belirlenmesi.....	32
3.2.17. Askorbat Miktarı Tayini	32
3.2.18. Glutasyon Miktarı Tayini.....	33
3.2.19. Prolin Miktarı Tayini	34
3.2.20. Antiradikal Aktivite Tayini	34
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	36
4.1. Ağır Metal Biriktirme Düzeylerinin Belirlenmesi	36
4.2. Kuru Ağırlık	39
4.3. Hidroksil Radikali Miktarı.....	41
4.4. Total Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarı	44
4.5. Lipit Peroksidasyonu	46
4.6. Fotosentetik Pigmentler	49
4.7. Protein Miktarları	60
4.8. Süperoksit Dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) Aktivitesi	63
4.9. Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) Aktivitesi	65
4.10. Peroksidaz (POX, E.C.1.11.1.7) Aktivitesi	68
4.11. Askorbat Peroksidaz (APX, EC 1.1.1.11) Aktivitesi.....	70
4.12. Glutasyon Redüktaz (GR, EC 1.6.4.2) Aktivitesi	73
4.13. Askorbat Miktarları	75
4.14. Glutasyon Miktarları	78
4.15. Prolin Miktarları	83
4.16. Antiradikal Aktivite.....	86
5. SONUÇ	89
KAYNAKLAR.....	99
ÖZGEÇMİŞ.....	123

SİMGELER DİZİNİ

APX	Askorbat peroksidaz
DAB	3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid
DHA	Dehidroaskorbat
DHAR	Dehidroaskorbat redüktaz
DMSO	Dimetilsulfoksit
DPPH	2,2-diphenyl-picrylhydrazyl
DTNB	5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	İndirgenmiş glutasyon
GSSG	Yükseltgenmiş glutasyon
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
KAT	Katalaz
MDA	Malondialdehit
MDHA	Monodehidroaskorbat
MDHAR	Monodehidroaskorbat redüktaz
Na ₂ EDTA	Disodyum etilendiamintetraasetik asit
NBT	Nitro blue tetrazolium klorid
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NEM	N-Ethylmaleimide
OH·	Hidroksil radikali
PMSF	Fenil metil sulfonil florid
PO	Peroksidaz
PVP	Polivinil prolidon
PVPP	Polivinil poliprolidon
SOD	Süperoksitdismutaz
TBA	Tiyobarbütirik asit
TCA	Trikloroasetik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bitkilerde ROT'nin süpürülme yolları	10
Şekil 1.2. H ₂ O ₂ 'nin kloroplastlardaki askorbat-glutasyon döngüsü ile etkisiz hale getirilmesi	15
Şekil 3.1. Henderson (1961 Türkiye kareleme sistemine göre <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'nın yayılışı.....	25
Şekil 3.2. <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'nın genel görüntüsü.....	25
Şekil 3.3. Henderson (1961 Türkiye kareleme sistemine göre <i>Timmiella barbuloides</i> 'in yayılışı.....	26
Şekil 3.4. <i>Timmiella barbuloides</i> 'in genel görüntüsü	27
Şekil 4.1. <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'da ağır metal birikimi	37
Şekil 4.2. <i>Timmiella barbuloides</i> 'de ağır metal birikimi	37
Şekil 4.3. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'nın kuru ağırlıkları	40
Şekil 4.4. Ağır metal stresi uygulanan <i>Timmiella barbuloides</i> 'in kuru ağırlıkları	40
Şekil 4.5. <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'da hidroksil radikali etkisiyle oluşan malonildialdehit miktarları	42
Şekil 4.6. <i>Timmiella barbuloides</i> 'te hidroksil radikali etkisiyle oluşan malonildialdehit miktarları	43
Şekil 4.7. <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'da hidrojen peroksit miktarları	45
Şekil 4.8. <i>Timmiella barbuloides</i> 'in hidrojen peroksit miktarları	45
Şekil 4.9. <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'da ağır metal stresi sonucu oluşan MDA miktarları	48
Şekil 4.10. <i>Timmiella barbuloides</i> 'de ağır metal stresi sonucu oluşan MDA miktarları	48
Şekil 4.11. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'da klorofil <i>a</i> miktarları	50
Şekil 4.12. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'da klorofil <i>b</i> miktarları	50
Şekil 4.13. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'da total klorofil miktarları	50
Şekil 4.14. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'da klorofil <i>a/b</i> oranı	51

Şekil 4.15. Ağır metal stresi uygulanan <i>Timmiella barbuloides</i> 'de klorofil <i>a</i> miktarları	51
Şekil 4.16. Ağır metal stresi uygulanan <i>Timmiella barbuloides</i> 'de klorofil <i>b</i> miktarları	52
Şekil 4.17. Ağır metal stresi uygulanan <i>Timmiella barbuloides</i> 'de total klorofil miktarları	52
Şekil 4.18. Ağır metal stresi uygulanan <i>Timmiella barbuloides</i> 'de klorofil <i>a/b</i> oranı	53
Şekil 4.19. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'da toplam karotenoid miktarları	56
Şekil 4.20. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'da β karoten miktarları	57
Şekil 4.21. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'da neoksantin miktarları	57
Şekil 4.22. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'da lutein miktarları	57
Şekil 4.23. Ağır metal stresi uygulanan <i>Timmiella barbuloides</i> 'de toplam karotenoid miktarları	58
Şekil 4.24. Ağır metal stresi uygulanan <i>Timmiella barbuloides</i> 'de β karoten miktarları	58
Şekil 4.25. Ağır metal stresi uygulanan <i>Timmiella barbuloides</i> 'de neoksantin miktarları	58
Şekil 4.26. Ağır metal stresi uygulanan <i>Timmiella barbuloides</i> 'de lutein miktarları	59
Şekil 4.27. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'da çözünebilir protein miktarları	61
Şekil 4.28. Ağır metal stresi uygulanan <i>Timmiella barbuloides</i> 'de çözünebilir protein miktarları	62
Şekil 4.29. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'da SOD enzim spesifik aktiviteleri	64
Şekil 4.30. Ağır metal stresi uygulanan <i>Timmiella barbuloides</i> 'de SOD enzim spesifik aktiviteleri	64
Şekil 4.31. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'da CAT enzim spesifik aktiviteleri	66
Şekil 4.32. Ağır metal stresi uygulanan <i>Timmiella barbuloides</i> 'de CAT enzim spesifik aktiviteleri	67

Şekil 4.33. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'da POX enzim spesifik aktiviteleri	69
Şekil 4.34. Ağır metal stresi uygulanan <i>Timmiella barbuloides</i> 'de POX enzim spesifik aktiviteleri	69
Şekil 4.35. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'da APX enzim spesifik aktiviteleri	71
Şekil 4.36. Ağır metal stresi uygulanan <i>Timmiella barbuloides</i> 'de APX enzim spesifik aktiviteleri	72
Şekil 4.37. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'da GR enzim spesifik aktiviteleri	74
Şekil 4.38. Ağır metal stresi uygulanan <i>Timmiella barbuloides</i> 'de GR enzim spesifik aktiviteleri	74
Şekil 4.39. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'da askorbat miktarları	76
Şekil 4.40. Ağır metal stresi uygulanan <i>Timmiella barbuloides</i> 'de askorbat miktarları	77
Şekil 4.41. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'da total glutatyon miktarları	80
Şekil 4.42. Ağır metal stresi uygulanan <i>Timmiella barbuloides</i> 'de total glutatyon miktarları	80
Şekil 4.43. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'da GSSG miktarları	81
Şekil 4.44. Ağır metal stresi uygulanan <i>Timmiella barbuloides</i> 'de GSSG miktarları	82
Şekil 4.45. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'da GSH miktarları	83
Şekil 4.46. Ağır metal stresi uygulanan <i>Timmiella barbuloides</i> 'de GSH miktarları	83
Şekil 4.47. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'da prolin miktarları	84
Şekil 4.48. Ağır metal stresi uygulanan <i>Timmiella barbuloides</i> 'de prolin miktarları	85
Şekil 4.49. <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'nın ağır metal stresi ile değişen antiradikal aktiviteleri	87
Şekil 4.50. <i>Timmiella barbuloides</i> 'in ağır metal stresi ile değişen antiradikal aktiviteleri	87

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. <i>Pleurochaete squarrosa</i> ve <i>Timmiella barbuloides</i> 'de ağır metal birikimi	36
Çizelge 4.2. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> ve <i>Timmiella barbuloides</i> 'in kuru ağırlıkları	39
Çizelge 4.3. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> ve <i>Timmiella barbuloides</i> 'in hidroksil radikali etkisiyle oluşan MDA miktarları ..	42
Çizelge 4.4. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> ve <i>Timmiella barbuloides</i> 'in hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarları	44
Çizelge 4.5. <i>Pleurochaete squarrosa</i> ve <i>Timmiella barbuloides</i> 'de ağır metal stresi ile oluşan malondialdehit (MDA) miktarları	47
Çizelge 4 6. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> 'nın fotosentetik pigment miktarlarındaki değişimler.....	59
Çizelge 4.7. Ağır metal stresi uygulanan <i>Timmiella barbuloides</i> 'in fotosentetik pigment miktarlarındaki değişimler.....	60
Çizelge 4 8. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> ve <i>Timmiella barbuloides</i> 'te çözünebilir protein miktarları	61
Çizelge 4.9. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> ve <i>Timmiella barbuloides</i> 'te SOD enzim spesifik aktiviteleri	63
Çizelge 4.10. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> ve <i>Timmiella barbuloides</i> 'te CAT enzim spesifik aktiviteleri	66
Çizelge 4.11. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> ve <i>Timmiella barbuloides</i> 'te POX enzim spesifik aktiviteleri	68
Çizelge 4.12. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> ve <i>Timmiella barbuloides</i> 'te APX enzim spesifik aktiviteleri	71
Çizelge 4.13. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> ve <i>Timmiella barbuloides</i> 'te GR enzim spesifik aktiviteleri	73
Çizelge 4.14. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> ve <i>Timmiella barbuloides</i> 'te askorbat miktarları.....	76

Çizelge 4.15. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> ve <i>Timmiella barbuloides</i> 'te total glutatyon miktarları	79
Çizelge 4.16. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> ve <i>Timmiella barbuloides</i> 'te okside glutatyon (GSSG) miktarları	81
Çizelge 4.17. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> ve <i>Timmiella barbuloides</i> 'te indirgenmiş (GSH) miktarları	82
Çizelge 4.18. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarros</i> ve <i>Timmiella barbuloides</i> 'te prolin miktarları	84
Çizelge 4.19. Ağır metal stresi uygulanan <i>Pleurochaete squarrosa</i> ve <i>Timmiella barbuloides</i> 'in antiradikal aktiviteleri.....	86

1. GİRİŞ

Stres, önemli fizyolojik ve metabolik değişimlere yol açarak bitkilerde büyüme ve gelişmeyi olumsuz şekilde etkilerken, üründe nitelik ve nicelik kaybına (ürün kalitesinin ve miktarının azalmasına), bitkinin veya organlarının ölümüne yol açan olumsuz etmenlerdir. Bitkilerin normal gelişme seyrini ve fizyolojik olaylarını etkileyen, yavaşlatan ve/veya durduran tüm çevre etmenleri stres faktörleri olarak adlandırılmaktadır.

Stres faktörleri; biyotik ve abiyotik olmak üzere ikiye ayrılır. Biyotik stres faktörleri patojenler, yabancı bitkiler, böcekler, mikroorganizmalar, hayvanlar iken, abiyotik stres faktörleri kuraklık, tuzluluk, yüksek ya da düşük sıcaklık, radyasyon, bitki besin elementleri, pestisitler (zirai ilaçlar), tuzlar ve ağır metaller olarak gruplandırılırlar (Taiz ve Zieger, 2002). Abiyotik stres faktörleri birçok bitki türünün coğrafi olarak dağılımında ve yaşamlarını başarı ile sürdürme kapasitelerinin sınırlanmasında önemli rol oynamaktadır.

Abiyotik stres faktörlerinden biri olarak ağır metaller, ekolojik dengeyi bozan, canlının büyüme ve gelişmesini önemli ölçüde etkileyen ve çevreyi kirleten temel etkenler arasındadır (Ruis-Jimenez vd., 2003). Toprağa veya suya giren bazı zararlı maddeler, uzaklaştırılabildikleri veya biyolojik olarak parçalanabildikleri halde, ağır metaller uzaklaştırılmazlar. Bu nedenle, alıcı ortamlara girmiş bulunan ağır metaller, yüksek oranda birikimleriyle, kimyasal ve biyolojik süreçleri olumsuz yönde etkilerler. Bir metalin toksisitesi, makromolekül, metabolit ve hücre organelleriyle birlikte, biyolojik sistemlerdeki dinamik yaşam proseslerine zarar verme kapasitesine dayanır. En tehlikeli yönleri yem ve besin maddelerine, oradan da besin zinciri yoluyla canlılara geçmeleridir (Artan, 2007).

Ağır metal tanımı fiziksel özellik açısından yoğunluğu 5 g/cm^3 'ten daha yüksek olan metaller için kullanılır. Ancak ağır metal tanımı, disiplinler arası farklılıklar gösterebilmektedir. Fizyologlar için, biyolojik yapıda biriken ve toksik etki yapabilen metaller ağır metal olarak kabul edilmektedir. Bu gruba kurşun, kadmiyum, krom, demir, kobalt, bakır, nikel, civa ve çinko başta olmak üzere altmıştan fazla metal dahil edilmektedir. Bunların çoğu bitkide mikrobesein veya iz element olarak da kullanılmaktadır. Bu elementler doğaları gereği yer kürede genellikle, karbonat, oksit, silikat ve sülfür halinde stabil bileşikler olarak veya silikatlar içinde bileşik yaparak bulunmaktadır.

Endüstriyel faaliyetler, motorlu taşıtların egzoz gazları, maden yatakları ve işletmeleri, volkanik faaliyetler, tarımda gübreleme ve ilaçlama gibi pek çok etken ağır metal kirliliğinin nedenleri arasında yer almaktadır. Ağır metallerin ekosisteme katılma derecelerine bakıldığında doğal çevrimlerden daha çok, insan müdahalesi ve etkisi altında çevreye yayıldıkları görülmektedir. Genel olarak antropojenik kaynaklardan giriş, doğal kaynaklardan girişin birkaç kat üzerindedir (Öztürk vd., 1992).

Karasal ekosistemlerde ağır metallerin en önemli birikme ortamı topraktır. Topraktaki kil ve humus miktarları, kil minerali tipleri, asit karakterli katyonların miktarı ve bileşimleri ağır metallerin toprakta birikmesi konusunda önemli etmenlerdir. Ağır metaller, yağışların durumuna bağlı olarak doğrudan toprağa geçerek bitkilere, hatta bazen taban suyuna ulaşırlar. Ağır metallerin bitkiler tarafından alınma miktarları da bitki türüne göre çeşitlilik göstermektedir (Çepel, 1997). Metal iyonlarının kök yüzeyine tutunması, kök içine alınımı ve kütle akışı ve difüzyon aracılığıyla gövdeye translokasyonu bitkiler tarafından metal iyonlarının alınımlarının aşamalarıdır. Toprak partiküllerine bağlı halde bulunan metallerin alınımı köklerden rizosfere salgılanan metal şelatlayıcı moleküller, plazma membranına bağlı metal redüktaz ve proton salınımıyla sağlanmaktadır (Salt vd., 1995). Bitki türüne ve metal tipine bağlı olarak, metal iyonları kökler tarafından ya simplast (interselüler) ya da apoplast (ekstraselüler) yolla alınmaktadır. Apoplastik taşınım hücre çeperinin katyon değişim kapasitesi ile sınırlandırılmaktadır (Raskin vd., 1997). Simplastik taşınım, metal iyonları yaklaşık 170 mV'luk negatif potansiyele sahip plazma membranından geçmektedir. Bu membran potansiyeli, metal iyonlarının hücre içine hareketi için kuvvetli bir elektrokimyasal gradient sağlamaktadır (Ghosh ve Singh, 2005). Metal iyonlarının çoğu enerji gerektiren bir işlemle; spesifik veya genel iyon taşıyıcıları veya kanalları aracılığıyla bitki hücrelerine girmektedir (Bubb ve Lester, 1991). Bitkilerde birkaç protein sınıfı ağır metal taşınımında fonksiyon görmektedir. Bitkilerde ağır metal toleransı ile ilişkili olarak metal iyonu homeostazisi ve toleransında fonksiyon gören ağır metal ATPaz'ları (Williams vd., 2000), katyon-difüzyon hızlandırıcı (CDF) protein ailesi ve çinko-demir permeaz (ZIP) ailesi (Guerinot, 2000) gibi metal taşıyıcıların birkaç sınıfı belirlenmiştir.

Tolerans, bitkinin olumsuz ortam koşulları ile başa çıkma potansiyelidir. Ağır metal toleransı bitkilerde, birbiriyle ilişkili fizyolojik ve moleküler mekanizmalarla belirlenmektedir. Toksik metallerin artan seviyelerine tolerans, toksik elementlerin bitki dışında tutulması (exclusion) veya metabolik toleranstan kaynaklanmaktadır (Singh vd., 2003). Bazı bitkiler toprak üstü organlarında topraktaki metal konsantrasyonundan 50 ila 500 kat daha fazla metal biriktirebilirler, bu bitkiler hiperakümülatör olarak adlandırılmaktadır (Clemens, 2006). Diğer bir ifadeyle, hiperakümülatör bitkiler ağır metalleri herhangi bir toksisite semptomu göstermeksizin toprak üstü organlarında diğer bitki türlerine göre 100 ila 1000 kat daha fazla biriktirebilmektedir (Brooks, 1998). Günümüze kadar yaklaşık 450 bitki türü (Angiospermlerin sadece % 0.2'si) hiperakümülatör olarak tanımlanmıştır (Baker ve Brooks, 1989; Ellis ve Salt, 2003; Reeves, 2006; Milner ve Kochian, 2008). Toprak üstü organlarında herhangi bir fitotoksik etki göstermeksizin yüksek miktarlarda ağır metalleri biriktirebilen hiperakümülatör bitkiler için detoksifikasyon ve içsel alıkoyma önemli özelliklerdir. Hiperakümülatör bitkilerin toprak üstü organlarında detoksifikasyon ve alıkoyma mekanizmaları genel olarak ağır metallerin ligandlar (fitoşelatinler ve metallotiyoninler) ile kompleks oluşturulmasını veya ağır metallerin metabolik olarak aktif sitoplazmadan vakuol ve hücre çeperi gibi inaktif bölgelere taşınımını kapsamaktadır (Rascio ve Navari-Izzo, 2011).

Mikro besin elementi olarak bitkide kullanılsın ya da kullanılsın ağır metal konsantrasyonunun atmosferde, suda veya toprakta belli bir seviyenin üzerine çıkması, tüm canlılar için önemli metabolik veya yaşamsal problemlere neden olmaktadır (Benavides vd., 2005). Birçok kirlenmede olduğu gibi ağır metal kirlenmesinde de öncelikle etkilenen grup primer üreticiler olan bitkilerdir. Ağır metallerin -özellikle belirli konsantrasyonlardan itibaren- bitkilerdeki fizyolojik fonksiyonları ve biyokimyasal olayları doğrudan veya dolaylı olarak etkilediği bilinmektedir. Bitki dokularında ağır metal birikimi fazla olduğunda mineral besin alınımı (Ouzounidou vd., 1992), transpirasyon (Poschenrieder, vd.,1989), fotosentez (Lidon vd., 1993), birçok enzim aktivitesi (Nussbaum, vd., 1988), nükleik asit yapısı (Doncheva, 1996), klorofil biyosentezi (Somashekaraiah vd., 1992) ve çimlenme (Munzuroğlu ve Geçkil., 2002) gibi çok sayıda olay olumsuz yönde etkilenmektedir. Bu olumsuz etkilere biyolojik membranlarda hasar (Kennedy ve Gonsalves, 1987), hormon dengesinin bozulması ve su ilişkisinin değişmesi gibi fizyolojik olaylar da ilave edilebilmektedir (Zengin ve Munzuroğlu,

2003). Tez konumuz kapsamında etkilerini incelediğimiz, fizyolojik ve biyokimyasal olaylara sebep olabilecek ağır metaller ve etkileri aşağıda verilmiştir:

Nikel (Ni), yer kabuğundaki belli başlı elementlerden olup, günümüzde mutlak gerekli elementlerden biri olarak kabul edilir. Nikelin tarım topraklarındaki konsantrasyonu genelde çok düşüktür, ancak serpantin gibi ultra bazik püskürük kayalardan oluşan topraklarda nikel içeriği 100-5000 mg Ni/kg arasında değişmektedir (Kacar ve Katkat, 2006). Nikel, paslanmaz ve alaşım çeliği üretiminde, demirsiz alaşımlarda ve elektro kaplamada kullanılır. Nikel, kilyet bileşiklerini kolaylıkla oluşturması nedeniyle, bitkilerdeki enzimlerde ve fizyolojik aktif merkezlerde bulunan ağır metallerle yer değiştirir. Nikel bitkiler için üreaz ve hidrogenaz enzimlerinin yapısında ve aktivitesinde yer alır; azot metabolizması için gereksinim duyulan temel bir elementtir. Nikelin olumsuz etkisi, fotosentez ve solunumu engellemesi; hücre zarı geçirgenliğini azaltması; fotosentetik elektron taşınımının engellemesi; hücre de peroksidaz ve üreaz aktivitesini düşürmesi; protein sentezini, klorofil ve azot düzeyini azaltması; hücre su dengesini değiştirmesi gibi fizyolojik ve biyokimyasal işlemlerin aksamasından kaynaklanmaktadır (Brown vd., 1990; Pandolfini vd.,1992; Gajewska ve Sklodowska, 2005).

Kurşun (Pb), bitkiler için gerekli bir element olmamasına karşın, bütün bitkilerde doğal olarak bulunmaktadır. Endüstriyel ve tarımsal faaliyetlerde yaygın olarak kullanılması nedeniyle sık rastlanan bir elementtir. Topraktaki kurşun konsantrasyonu 150 ppm'i aşmadığı sürece insan ve bitki sağlığı açısından tehlike oluşturmaz. Ancak 300 ppm'i aştığında potansiyel olarak insan sağlığı açısından tehlikelidir (Dürüst vd., 2004). Ortamda kurşuna maruz kalan bitkilerde kök uzaması ve biyokütlede azalma (Fargasova, 1994), klorofil biyosentezinde engellenme (Miranda ve Ilangovan, 1996), bazı enzim aktivitelerinde tetiklenme veya engellenmeler olduğu (Assche ve Clijsters, 1990) mu tespit edilmiştir. Ayrıca kurşun, hücre turgoru ve hücre çeperi stabilitesini olumsuz etkilemesi, stoma hareketlerini ve yaprak alanını azaltması nedeniyle bitki su rejimini etkilemektedir. Aynı zamanda kökler tarafından tutulması ve kök gelişimini azaltması nedeniyle bitkilerin katyon ve anyon alımını azaltmakta, dolayısıyla besin alımını etkilemektedir (Sharma ve Dubey, 2005).

Bakır (Cu), Bakır bitkilerin büyümesi ve canlılığı için çok önemli bir mikro besindir. Bitki bünyesinde enzim aktivasyonu, karbonhidrat ve lipid metabolizmasında yer alması nedeniyle önemli bir elementtir (Kacar ve Katkat, 2006). Bakır kirliliği çeşitli sebeplerle oluşabilmektedir, bunlar arasında insan aktivitesi sonucu oluşan emisyon ve atmosferik depositler, pestisid kullanımı, kanalizasyon atıklarının gübre olarak değerlendirilmesi, kömür ve maden yatakları sayılabilir. Toprakta 100 mg/kg, bitki kuru maddesinde ise 15-30 mg/kg'dan fazla bakır toksik etkilidir. Bakır toksisitesi genellikle bitki kök sistemlerinde açığa çıkar ve bitki bünyesinde protein sentezi, fotosentez, solunum, iyon alımı ve hücre membran stabilitesi gibi bazı fizyolojik olayların bozulmasına neden olur (Sossé vd., 2004). Bakırın hücre çeperine bağlanması doğrudan ya da kalsiyumu çıkarmak suretiyle iki şekilde meydana gelmektedir. Bu durumda hücre çeperi elastisitesi bozulmakta ve turgor azalmaktadır. Bu yönüyle köklerden yapraklara kalsiyum taşınmasını azaltmaktadır (Ouzounidou, 1994).

Krom (Cr); paslanmaz çelik üretimi, çeşitli lehim ve pas engelleyicilerin üretimi ile ilgili metalurji endüstrisinde, boya, cila, cam ve seramik malzemelerinde, deri endüstrisinde kullanılmaktadır. Ana materyale göre değişmekle birlikte toprakta 5-100 mg/kg oranlarında bulunur. Bitkide ise kuru madde de 100 mg/kg bulunması birçok yüksek bitki için toksiktir (Özbek vd., 1995). Bitki bünyesinde toksik seviyeye ulaşan kromun bitkide etkilediği ilk fizyolojik olay tohum çimlenmesidir. Krom, amilaz aktivitesi ve embriyoya şeker taşınmasını azaltması ve proteaz aktivitesini artırması sonucunda tohum çimlenmesini engeller. Oldukça toksik olan Cr membran zararlarına, organellerde yapısal değişikliklere, metabolik aktivitede bozulmalara ve büyümede inhibisyona neden olmaktadır (Kimbrough, 1999). Krom fitotoksitesisi fide gelişimini inhibe etmekte, besin ve su dengesini bozmakta, fotosentetik pigmentlerde bozulmalara ve antioksidant enzimlerin aktivitesinde değişimlere neden olmaktadır (Choundry ve Panda, 2005; Ali vd., 2011).

Diğer stres faktörlerinde olduğu gibi bitkilerde ağır metal stresi de serbest radikal oluşumunu teşvik ederek bitki dokularında oksidatif hasarlara neden olmaktadır. Bitkilerde serbest radikaller endojen olarak; kloroplastlardaki fotosentez reaksiyonlarında, plastit ve peroksizomlarda, mitokondrilerdeki sitrik asit döngüsünde oksidazlar, hücre çeperi peroksidadları ve amino oksidazlar gibi enzimlerin etkisiyle oluşur (Van Breusegem ve Dat, 1998; Van Camp vd.,1998). Kuraklık, düşük ve yüksek sıcaklık değerleri, UV ışık, beslenme noksanlıkları,

yüksek derecede tuzlu ortam, yüksek ışık stresi ve ağır metaller ise ekzojen serbest radikal kaynaklarıdır (Lamb ve Dixon, 1997; Gechev vd., 2003).

Serbest radikallerin en yaygın formu serbest oksijen radikalleridir. Bunlara Reaktif Oksijen Türleri (ROT) de denilmektedir. Serbest radikaller; atomik veya moleküler yörüngesinde bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektron (e^-) bulduran basit bir molekül, atom veya iyondur. Başka bir ifade ile serbest radikaller, negatif yüklü elektron sayısının, pozitif yüklü proton sayısı ile eşit olmadığı moleküllerdir. Başlıca serbest oksijen radikalleri; Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali (OH^{\cdot}), singlet oksijen (1O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2), radikalidir.

Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

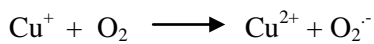
Canlılarda oluşan ilk ve temel oksijen radikali süperoksit radikalidir (süperoksit anyonu, $O_2^{\cdot-}$). Başlıca aşağıdaki mekanizmalarla üretilmektedir:

(a) İndirgeyici özellikteki moleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken, süperoksit radikali oluşur. Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, ferrodoksinler, indirgenmiş nükleotitler gibi yüzlerce biyolojik molekül aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit yapımına neden olurlar.

(b) Başta çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere, yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında süperoksit radikali bir ürün olarak oluşabilir (Corpas vd., 2001).

(c) Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin % 1-5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımı NADH-dehidrogenaz ve koenzim-Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağı nedeniyle gerçekleşir. (Maxwell vd.,1999)

d) İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu süperoksit meydana getirebilir.



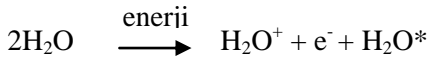
Süper oksidin yükseltgen ve indirgen olma özelliği vardır. İndirgen olarak görev yaptığında bir elektronunu kaybeder ve oksijene yükseltgenir. Aldığı elektronu

metal iyonuna, sitokrom-*c* ye veya bir radikale verirse tekrar oksitlenir. Oksidant olarak görev yaptığında ise bir elektron alır ve hidrojen perokside indirgenir. Süperoksit, serbest radikal olmakla beraber tek başına çok etkili değildir. Süperoksit radikalının asıl önemi, peroksit kaynağı ve geçiş metali iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır.

Hidroksil Radikali (OH[•])

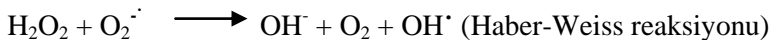
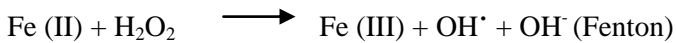
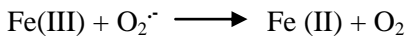
Biyolojik ve kimyasal sistemlerde üretilen hidroksil radikali iki mekanizma ile oluşabilir:

1) İyonlaştırıcı radyasyonun etkisi ile sulu ortamda su moleküllerinin iyonlaşması gerçekleşir.



Uyarılmış su molekülü (H₂O^{*}) homolitik yıkım ile; H₂O⁺ ise bir su molekülü ile tepkimeye girerek başlıca reaktif radikal olarak hidroksil radikalini oluştururlar. Bu tepkimeler çok kısa sürede gerçekleşir ve üretilen OH[•], radyasyonun bitkilerdeki toksik etkisinden sorumlu başlıca kimyasal türdür.

2) Hidrojen peroksidin eksik indirgenmesi ile OH[•] yapımı, bu radikalın en önemli kaynağıdır. H₂O₂'nin iki elektron ile indirgenmesi ile su oluşurken, tek elektronla indirgenmesi OH[•] yapımına neden olur. Bu tür indirgenme demir (Fe), bakır (Cu) gibi metal iyonları tarafından katalizlenir. Haber-Weiss tepkimesi ve Fenton tepkimesi olarak adlandırılan tepkimelerde ne kadar HO[•] oluşacağı üretilen H₂O₂ derişimi ve serbest metal iyonunun varlığına bağlıdır (Kılınç, 1985)



Hidroksil radikali de çok kararsız bir molekül olup, oksidasyon ile enzimlere ve lipitlere zarar verir. Bitki hücresi hidroksil radikaline karşı koruyucu enzimlere sahip değildir.

Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$)

Moleküler oksijenin en düşük eksite gösterdiği formudur. Fakat spin kısıtlaması olmadığı için oksidan özelliği oldukça artmış reaktif bir oksijen formudur. Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Oksijenin enerjetik olarak uyarılan bu formunda reaktivite çok yüksektir. Aldığı enerjiyi çevreye dalga enerjisi şeklinde verip yeniden oksijene dönebilir.

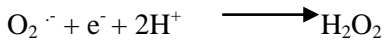
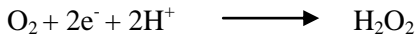
Başlıca şu mekanizmalarla oluşabilir:

- (a) Pigmentlerin (örneğin flavin içeren nükleotidler) oksijenli ortamda ışığı absorblamasıyla,
- (b) Hidroperoksitlerin metaller varlığındaki tepkimelerinde,
- (c) Kendiliğinden dismutasyon tepkimeleri sırasında,

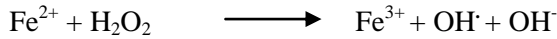
Serbest oksijen radikalleri biyolojik sistemlerdeki membran yapılarına, proteinlere, nükleik asitlere, karbonhidrat ve enzim gibi moleküllere etki ederler. DNA hasarı oluşturur, membran yapısını bozar, enzim sistemlerine etki ederler.

Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitlerin enzimatik ve non-enzimatik dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşur.

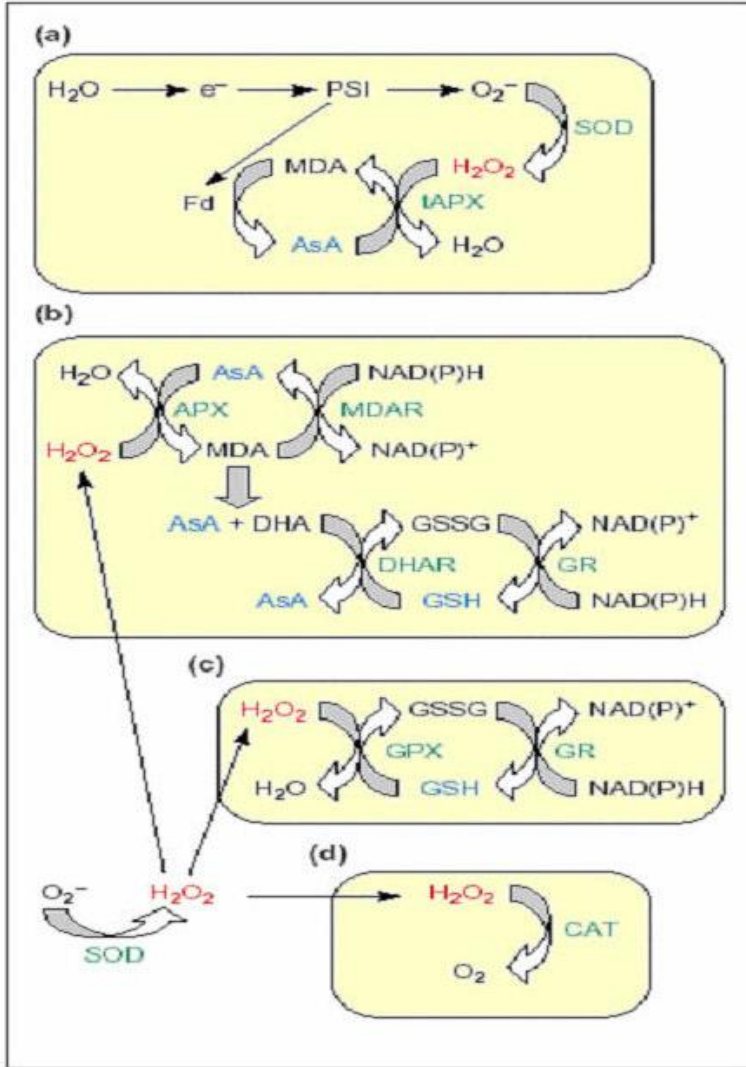


Hidrojen peroksit yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz, reaktif bir tür değildir. Hidrojen peroksitin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni, demir (Fe), bakır (Cu) gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalinin öncülü olarak davranmasıdır. Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki *hem* grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipit peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir.



Hidrojen peroksitin lignin sentezi ve hücre çeperinin çapraz bağlanması, peroksizom biyosentezi, programlanmış hücre ölümü, savunma reaksiyonları gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde merkezi rol oynadığı belirlenmiştir (Tamas vd., 2004). Kloroplastlarda CO₂ indirgenme döngüsünde görev alan birçok enzim hidrojen peroksite oldukça duyarlı olduğundan CO₂ fiksasyonunun inhibe olmaması için hidrojen peroksitlerin bir an önce ortadan kaldırılması gerekir. Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin uzaklaştırılmasında glioksizomlar, peroksizomlar ve mitokondride yer alan katalaz enzimleri ile çeşitli formlardaki peroksidazlar görev almaktadır.

Bitkiler oluşan bu serbest radikallerin verdiği zararı ortadan kaldırmak için çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu savunma mekanizmaları; düşük molekül ağırlıklı, tiyol içeren ve metal bağlayan bir polipeptid sınıfı olan bitki şelatları (Kramer vd., 1996) ve antioksidan savunma sistemlerini içermektedir. Bitkiler, oksidatif zararlara karşı kendilerini koruyan askorbat, glutatyon, α-tokoferol gibi düşük molekül ağırlıklı çeşitli antioksidan moleküller ve süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz, peroksidaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlere sahiptirler. Çeşitli bitkilerle yapılan çalışmalarda, ağır metallerin toksik düzeylerine karşı geliştirilen savunma mekanizmasında antioksidan enzimlerin önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Şekil 1.1) Kloroplastlarda su-su döngüsü (Şekil 1.1-a), kloroplast, mitokondri, sitoplazma, apoplast ve peroksizomlarda askorbat - glutatyon döngüsü (Şekil 1.1-b), glutatyon-peroksidaz (Şekil 1.1-c) ve peroksizomlarda CAT döngüsü (Şekil 1.1-d) ile ROT süpürülmektedir. (Prasad vd., 1999; Romero vd., 1999; Schickler ve Caspi, 1999; Fang ve Kao, 2000, Rao ve Stresty, 2000; Landberg ve Grager, 2002; Tewari vd., 2002; Schutzendubel ve Polle, 2002; Baek ve Skinner, 2003; Nikookar vd., 2005).



Şekil 1.1. Bitkilerde ROT'nin süpürülme yolları (Mittler, 2002) Semboller: PSI, fotosistem I; SOD, süperoksit dismutaz; MDA, monodehidroaskorbat; AsA, askorbat; Fd, ferrodoksin; APX, askorbat peroksidaz; MDAR, monodehidroaskorbat reduktaz; DHA, dehidroaskorbat; DHAR, DHA reduktaz; GSSG, okside glutatyon; GSH, glutatyon; GR, glutatyon reduktaz; CAT, katalaz

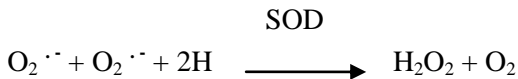
Antioksidant sistemler

Enzimatik Antioksidant Sistemler

Reaktif oksijen türlerine karşı enzimatik savunma, stres altındaki bitkiler için gereklidir. Antioksidan enzimler; süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1), katalaz (CAT, EC 1.11.1.6), peroksidaz (POX, EC 1.11.1.7), askorbat peroksidaz (APX, EC 1.1.1.11), glutatyon redüktaz (GR, EC 1.6.4.2) ve diğer askorbat-glutatyon çevrimi enzimleri monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR; EC 1.6.5.4) ve dehidroaskorbat redüktaz (DHAR, EC 1.8.5.1); antioksidant moleküllerin çevrimini, degradasyonunu ve sentezini veya doğrudan hücreden serbest radikallerin atılmasını katalizleyebilir.

Süperoksit Dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1)

Süperoksit dismutaz enzimi, oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde bulunur. Oksijen toksisitesine karşı önemli bir savunma olarak işlev görmektedir. Süperoksit dismutazın fonksiyonu aerobik organizmaları süperoksitin zararlı etkisine karşı korumaktır. Süperoksit radikallerinin, H_2O_2 ve oksijene hızlıca dismutasyonunu katalize eder. SOD katalitik aktivitesi çok yüksek olan bir enzimdir (Fridovich, 1995; Sheng, 2004)

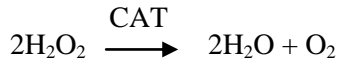


Bu reaksiyon oksidatif sisteme karşı ilk savunma olarak da adlandırılmaktadır. Çünkü süperoksit zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısıdır. Bu sistem sayesinde hücresel kompartmanlardaki $O_2 \cdot^-$ düzeyleri kontrol altında tutulur. Oksijen metabolize eden tüm organizmalarda ve bazı anaerobik canlılarda gerçekleşir ve sonucunda moleküler oksijen (O_2) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) açığa çıkar. Bitkilerde metal kofaktörlerine bağlı olarak sınıflandırılan 3 farklı SOD izoenzimi vardır: Bunlar Mn, Fe ve Cu/Zn SOD olarak adlandırılırlar (Alscher vd., 2002). Mn-SOD'ların peroksizom ve mitokondride (Del Rio vd., 2003) ve bazı bitkilerin kloroplastlarında bulunduğu bildirilmiştir (Hayakawa vd., 1984). Fe-SOD'ın bütün bitkilerde bulunmadığı (Ferreira vd., 2002) fakat kloroplastlarla

ilgili olduğu gösterilmiştir (Alscher vd., 2002). Cu/Zn–SOD’lar peroksizomlarda, kloroplastlarda ve sitozolde bulunur (Del Rio vd., 2002). Stres durumunda gerek apoplastik gerekse toplam hücreSEL SOD miktarının üretiminde artış olduğu belirlenmiştir (Hernandez vd., 2001; Minibaeva ve Gordon, 2003; Eyidogan vd., 2003).

Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6)

Katalaz; hidrojen peroksidin su ve oksijene dismutasyonunu katalizleyen bir enzimdir. Askorbat peroksidaz ve glutatyon redüktaz ile birlikte hidrojen peroksidin detoksifikasyonunda rol oynamaktadır. Hidrojen peroksit, katalaz ve peroksidaz enzimleri tarafından yok edilmektedir (Mc Kersie ve Lehsem, 1994).



Ancak katalazın koruyucu etkisi sınırlıdır çünkü kendi substratına karşı ilgisi zayıftır, ışığa karşı aşırı duyarlıdır, ayrıca sadece peroksizomlarda bulunmaktadır. Bu nedenle, Calvin döngüsünde tiyol içeren enzimlerin oksidasyonlarına neden olarak fotosentezi doğrudan engelleyen hidrojen peroksidin etkisiz hale getirilmesi için daha etkili enzimatik mekanizmalar gerekmektedir.

CAT, hidrojen peroksiti substrat olarak, hem elektron alıcısı hem de elektron vericisi olarak kullanılmaktadır (Lanir ve Schejler, 1975; Jones ve Masters, 1976; Nicholls vd., 2000; Robertson, 2004). Birçok *in vivo* ortamlarda peroksidaz aktivitesi olarak CAT tercih edilmektedir. Katalazın temel fonksiyonu oksidazlar tarafından ortaya çıkan hidrojen peroksiti ortadan kaldırmaktır.

Peroksidaz (POX, EC 1.11.1.7)

Peroksidazın işlevi belirli metabolik reaksiyonlardan sonra toksik özellikteki hidrojen peroksiti (H_2O_2) su ve oksijene dönüştürmesidir. Diğer bir ifade ile peroksidazlar H_2O_2 yi suya indirgerken substratı da okside ederler. Oksijen genellikle hücredeki diğer bileşiklerle reaksiyona girerek sekonder ürünleri meydana getirir.



Diğer yandan gerçek peroksidazdan başka peroksidatif reaksiyonlar belli substratlarla katalaz tarafından da katalizlenebilir. Örneğin, fenoller, alkoller ve bazı inorganik bileşikler POX substratlarıyla reaksiyona girer. Sonuç olarak bazı durumlarda oksidazlar, POX gibi hidrojen peroksidi oksijen kaynağı olarak kullanılabilir.

Askorbat Peroksidaz (APX, EC 1.8.5.1)

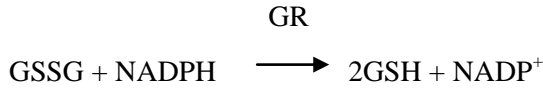
H_2O_2 ; güçlü bir oksidan olan OH^\cdot radikalinin üretilmesine neden olmaktadır. Bitki hücrelerinde H_2O_2 için, hem kloroplastlarda hem de sitosolde çalışan askorbat-glutasyon döngüsü etkin bir detoksifikasyon mekanizmasıdır. Bu mekanizma ile H_2O_2 , askorbat peroksidaz aracılığıyla suya indirgenmektedir. Bunun için askorbik asit kullanılmakta ve monodehidroaskorbat (MDHA) açığa çıkmaktadır (Asada, 1992).



APX'in kloroplast, sitozol, mitokondri, peroksizomlar ve glioksizomlarda bulunan farklı izoformları vardır (Jimenez vd.,1997; Leonardis vd., 2000). Membran-bağlı APX peroksizomda ve tilakoid membranlarda bulunur.

Glutasyon Redüktaz (GR, EC 1.6.4.2)

Glutasyon redüktaz, glutasyon peroksidazın ve glutasyon S-transferazın katalizlediği reaksiyonlar sırasında oluşan okside glutasyonu (GSSG) redükte glutasyona (GSH) dönüştürmek sureti ile dolaylı olarak antioksidan etki gösteren bir enzimdir. Bu katalizi gerçekleştirirken koenzim olarak nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) kullanır (Peter, 1984).



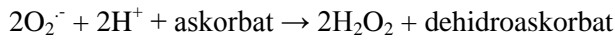
Hücrelerdeki fizyolojik GSH-GSSG oranı çok önemlidir. Okside glutatyon (GSSG) olmadığı durumlarda NADPH' in hücre içi seviyesinin düşmesi glutatyon redüktazı inaktive etmektedir. Oksidatif bir stres sonucu GSSG' nin hücre içi seviyesi artınca glutatyon redüktaz yeniden aktive olmaktadır (Kılınç, 1985). Glutatyon redüktaz hayvanlarda, bitkilerde ve bakterilerde bulunur. Bu enzim askorbat-glutatyon döngüsünde görevli önemli bir enzimdir (Wen-Chi Hou, 2004).

Enzimatik olmayan antioksidant sistemler

Enzimatik olmayan savunma mekanizmaları; glutatyon, askorbat, karotenoidler, vitamin E (α -tokoferol) ve flavonoidler, lignanlar, tanenler ve ligninler gibi çeşitli fenilpropanoid türevlerini (fenolik bileşikler) içerir.

Askorbat

Askorbat, hem bitki hem de hayvan dokularında önemli bir antioksidandır. Serbest radikaller için bir indirgeyici olarak askorbatın gerçekleştirdiği fonksiyonlar, oksidatif stresin neden olduğu hasarı da minimuma indirir. Askorbat, bitki hücrelerinin hidrofilik çevrelerinde bu serbest radikalleri uzaklaştıran süreçte terminal elektron vericisidir. Askorbat, hidroksil radikallerini difüzyon-kontrollü olarak uzaklaştırır (McKersie, 1996). Süperoksitle reaksiyon, süperoksit uzaklaştırıcı enzim olan SOD'a fizyolojik olarak benzer bir rol sunabilir:

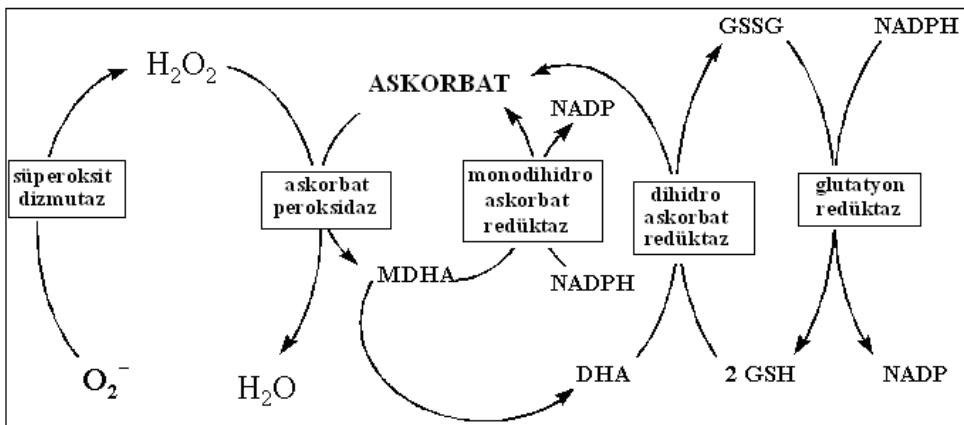


Askorbat, su ve monodehidroaskorbat üretecek şekilde dikkate değer bir ölçüde H_2O_2 ile tepkir. Reaksiyon, yüksek bitkilerin sitozol ve kloroplastında askorbat peroksidaz tarafından katalizlenir. Kloroplastlar peroksizomlarda bulunan ve hidrojen peroksiti uzaklaştıran katalazdan yoksun olduklarından, bu organelde H_2O_2 'yi elimine etmede askorbat çok önemli bir role sahiptir. Birincil bir antioksidant olarak rol oynamasının yanı sıra, askorbat antioksidant olarak ikincil bir fonksiyona da sahiptir. Askorbat havuzu, α -tokoferol ve zeaksantin gibi membran-bağlı antioksidantları rejenere etmede kullanılan bir antioksidant

potansiyel kaynağı sunar. Bunlar, lipid peroksit ve singlet oksijeni sırasıyla ortadan kaldırır (Foyer, 1993).

Askorbat, kloroplast, sitosol ve vakuolde bulunmaktadır. Askorbik asidin yaklaşık olarak % 20-40'ı yaprak hücrelerinin mezofil dokusunun kloroplastlarında lokalize olmuştur. Kloroplastlar, askorbik asidin okside formundan indirgenmiş formunu oluşturacak tüm enzimleri içermektedir.

H_2O_2 'nin detoksifikasyonu, en çok peroksizomlarda yerleşmiş olan katalaz tarafından sağlanır. Buna rağmen katalazın H_2O_2 affinitesi oldukça düşüktür. Aktivitesi de sitozolde, mitokondride ve kloroplastta ya aşırı düşüktür ya da ölçülemez (Halliwell, 1981). Bitki hücrelerinde H_2O_2 'ye karşı hem kloroplast hem de sitozolde bulunan ve askorbat-glutasyon ya da Halliwell-Asada döngüsü adını alan daha etkili ve alternatif bir detoksifikasyon mekanizması da vardır (Asada ve Takahashi, 1987; Foyer ve Halliwell, 1976). Bu yol, mitokondride olduğu kadar kloroplast ve sitozolde de en etkili H_2O_2 detoksifikasyon sistemi gibi gözükmemektedir. İndirgenmiş düzeydeki askorbat ve glutasyon havuzlarının devamlılığında da bu yol önemlidir (Şekil 1.2)



Şekil 1.2. H_2O_2 'nin kloroplastlardaki askorbat-glutasyon döngüsü ile etkisiz hale getirilmesi (McKersie ve Lehem, 1994)

Halliwell-Asada döngüsünün ilk enzimi, H_2O_2 'nin suya indirgenmesini katalizleyen ve indirgeyici olarak askorbata büyük bir affinite ve özgülük gösteren askorbat peroksidazdır (Asada, 1999). Askorbat-glutasyon döngüsü tarafından, askorbat düzeyi sabit bir seviyede tutulurken, hidrojen peroksit etkili bir şekilde ortadan kaldırılır. Askorbik asitin oksidasyonu, birincisinde monodehidroaskorbat ve ardından dehidroaskorbat üreten iki sıralı basamakta meydana gelir. Monodehidroaskorbat ya NAD(P)H-bağlı MDHAR aktivitesi ile ya doğrudan askorbata indirgenir ya da kendiliğinden dehidroaskorbata ayrışır. Dehidroaskorbat aynı zamanda yüksek pH değerlerinde oldukça kararsızdır. Karbon zinciri, tartarat veya oksalat gibi ürünlere bağlıdır ve toksik ürünler üretmek üzere ayrışabilir. Oksidasyonun ardından askorbat havuzunun kaybından kaçınmak için, kloroplast, hem monodehidroaskorbat hem de dehidroaskorbatın geri dönüşümünü sağlayan mekanizmalar içerir ve bunlar askorbat havuzunun büyük ölçüde indirgenmiş formda kalmasını sağlar. Kloroplastta milimolar konsantrasyonlarda bulunan indirgenmiş glutasyon (GSH), toplam indirgenmenin sadece % 0.1'inden sorumlu olduğu halde, 7.0'den yüksek pH değerlerinde non-enzimatik olarak dehidroaskorbatı tekrar askorbata indirgeyebilir. Bu reaksiyon; yapraklarda, tohumlarda ve diğer dokularda yüksek aktivitede bulunan dehidroaskorbat redüktaz tarafından katalizlenir. DHAR; dehidroaskorbatın askorbata indirgenmesinde elektron verici olarak indirgenmiş glutasyonu (GSH) kullanır. Katalizde, enzimi inaktive eden SH-grupları gereklidir (Foyer, 1993). Halliwell-Asada döngüsünün son enzimi, yükseltgenmiş glutasyonun NADPH bağımlı indirgenmesini katalizleyen glutasyon redüktazdır.

Glutasyon

Tripeptid glutasyon (γ -Glu-Cys-Gly, GSH) birçok bitkide bulunan düşük moleküler ağırlığa sahip tiyoldür. GSH yüksek yapılı bitkilerin birçok doku ve hücrelerinde bulunmuştur. Hücrelerde, GSH konsantrasyonu en fazla kloroplastlarda olmakla beraber sitozolde de dikkate değer bir birikim olur. GSH'nin antioksidant fonksiyonu; oksidasyon sırasında, GSSG üretmektir. GSH, dehidroaskorbatın askorbata indirgenmesi veya proteinlerin disülfid bağının indirgenebilmesi için -340 mV bir redoks potansiyeline sahiptir (Klapheck, 1988). GSSG'nin GSG'ye indirgenmesi glutasyon redüktaz enzimi tarafından katalizlenir. GSH birçok şekilde bir antioksidant gibi işlev gösterebilir. Hidroksil radikalleri, süperoksit ve singlet oksijenle kimyasal olarak tepkiyebilir ve bu yüzden doğrudan serbest radikal uzaklaştırıcı olarak fonksiyon yapabilir. GSH; lipid peroksidasyon

reaksiyonları tarafından oluşturulan alkol peroksitleri uzaklaştırarak membran yapısını kararlı tutabilir (Price vd.,1990; Hausladen ve Alscher 1993; McKersie, 1996).

Karotenoidler

Hem fotosentetik hem de fotosentetik olmayan bitki dokularındaki plastidlerde yerleşmiş olan C40 izoprenoidleri veya tetraterpenlerdir. Işık alımındaki aksesuar pigment fonksiyonlarına ek olarak, ışıkla fotosentetik komplekslerin uyarılmasının bir sonucu olarak oluşan triplet klorofil ve çeşitli reaktif oksijen formlarını detoksifiye ederler. Karotenoidlerin iki sınıfı vardır: karotenler hidrokarbonlardır, ksantofiller ise bir veya iki oksijen atomu içeren karoten türevleridirler (McKersie ve Lehsem, 1994). Antioksidant özellikleriyle karotenoidler, fotosistemleri dört yoldan biriyle korurlar: 1-Zincir reaksiyonlarını bitirmek için lipit peroksidasyon ürünleriyle tepkime suretiyle (Burton ve Ingold, 1984); 2-Singlet oksijeni uzaklaştırarak ve enerjiyi ısı olarak dağıtarak (Mathis ve Kleo, 1973); 3-Singlet oksijenin oluşmasını önlemek için triplet ve uyarılmış klorofil molekülleri ile tepkiyerek; 4-Fazla eksitasyon enerjisinin ksantofil döngüsüne doğru dağıtılması ile (McKersie, 1996) gerçekleşmektedir.

Prolin

Prolin, proteinleri oluşturan 20 amino asitten biridir. Metal stresine maruz kalmış bitkilerde meydana gelen diğer bir reaksiyon şekli ise serbest prolin gibi özel metabolitlerin akümüle edilmesidir. Prolin, stres altındaki birçok bitkide reaktif oksijen türleri tarafından meydana gelen hasara karşı bitkinin savunma sistemini desteklemek için biriktirilir. Prolin ayrıca osmoregülasyon, enzimlerin korunması, protein sentez sisteminin dengelenmesi ve hücre içi asitliğin düzenlenmesi gibi birçok olayda önemli roller üstlenir. Prolinin ağır metal stresi sonucu oluşan reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonunda fonksiyon görerek stresi azalttığı vurgulanmıştır (Siripornadulsil vd., 2002). Bitkilerde yaygın olarak bulunan ve diğer amino asitlere oranla daha fazla miktarda biriken prolin, kullanılabilir azot birikimini düzenlemektedir (Abraham, 2003). Bitki dokularında prolin birikimi; 1) prolin degradasyonundaki azalma, 2) prolin biyosentezindeki artma, 3) protein sentezindeki veya prolin kullanımındaki azalma, 4) proteinlerin hidrolizinden kaynaklanabilmektedir (Yoshida vd., 1997). Lipit peroksidasyonunun neden olduğu hücre zararı, membran geçirgenliğini değiştirerek su stresine benzer

koşullar oluşturmakta ve bu durum prolin sentezini teşvik etmektedir (Sinha ve Gupta, 2005). Şelatlama özelliği ile prolinin metal iyonlarını bağlayabilmesi, bitkilerin ağır metal stresi altında hayat döngülerini tamamlayabilmesine katkıda bulunmaktadır (Sinha ve Saxena, 2006). Prolinin, proteinlerin yapılarını stabilize eden moleküler şaperonlar olarak fonksiyon gördüğü ve prolin birikiminin sitosolik pH'ı ve hücrenin redoks durumunu dengede tutabildiği düşünülmektedir.

Antioksidanlar; canlı sistemde meydana gelen bütün fizyolojik olaylar, enzim, hormon ve iz elementler gibi farklı ajanlar tarafından yönetilen oksidasyon ve indirgeme reaksiyonlarının kompleks kombinasyonlarını içerir. Farklı oksidasyon reaksiyonlarını düzenleyen ve dokularda doğal bir şekilde bulunan antioksidant bileşikler, uzun ömürlü determinantların potansiyel bir sınıfı olarak değerlendirilmektedir (Gülçin vd., 2002). Ağır metal kirliliğinde biyolojik ve fizyolojik süreçlerde neden oldukları etkilerle ya bitkide organ veya tüm bitki düzeyinde büyümenin engellenmesi, verimin düşmesi ve yaprak yaralanması gibi hasarlara; ya da bitki popülasyonunun tümünde gözlenebilen geniş çaplı hasarlara sebep olabilir (Darrall, 1989; Taylor, 1984; Folkkeson ve Andersson-Bringmark, 1988). Büyüme ve hasatta gözle görülebilir hasarlar ve belirgin morfolojik değişiklikler ancak yüksek kirletici seviyelerine maruz kaldıktan sonra belirlenebilirken, metabolizmada ağır metal etkisi çok daha erken belirlenebilmektedir (Malhotra ve Khan, 1984). Ağır metal konsantrasyonu bitki morfolojisinde belirgin farklılık ortaya koymayacak kadar düşük olduğunda biyogörüntüleme, metal kirliliğine karşı yalnız çelişik cevaplar verebilir. Bu nedenle, bitkide gözle görülebilir semptomlar belirlenemediğinde, metabolik değişiklikler ağır metal kirliliği durumunun uygun bir göstergesi olarak işlev görebilir (Roy ve Hanninen, 1995). Bu anlamda ağır metal kirliliğinde biomarker olarak antioksidan enzimlerden faydalanılabileceği çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir (Ahmad vd., 2000).

Çevresel stres faktörlerine karşı tüm bitki türlerinin toleransları aynı değildir. Bu durum bitki türüne hatta aynı türün genotiplerine, stres faktörüne, strese maruz kalma süresine ve strese maruz kalan doku veya organın yapısına göre büyük değişiklikler göstermektedir. Günümüze değin yapılan çalışmalar genellikle yüksek bitkiler üzerinedir. Ancak, bitkilerin özellikle çevresel stres faktörlerine farklı adaptif mekanizmalar geliştirmesi, bu tip çalışmaların çok sayıda farklı tür üzerinde yapılmasını zorunlu hale getirmektedir.

Biryofit terimi, ciğerotları, boynuzlu ciğerotları ve karayosunlarını da içerisine alan geniş bir bitki grubu için kullanılır. Biryofitler, bazen göze çarpmayan küçük boyutları ile birçok botanikçi tarafından ihmal edilmiş, bitkiler aleminin 15.000 - 25.000 üyesi olan özel bir grubunu teşkil etmektedir. Biryofitler, ilk kara bitkileri olmaları açısından oldukça önemlidirler. Yaşamlarını farklı çevresel koşullar altında sürdürebilirler. Biryofitler bitkilerdeki kompleks biyolojik proseslerin açıklanması için güçlü deneysel modelleri ve araçları oluşturmaktadırlar (Cove vd., 1997; Reski, 1997; Schumaker ve Dietrich, 1998). Yüksek yüzey/hacim oranı ve gelişmiş bir kutikularının bulunmaması gibi nedenlerle yüksek oranda metal biriktirme kapasitesine sahiptirler (Sun vd., 2007). Bu durumun bir sonucu olarak ağır metalden kaynaklanan morfolojik ve genomik değişim modelleri (Bassi vd., 1995) ve çevresel kirliliğin biyosensörleri olarak yaygın bir biçimde kullanılmaktadırlar (Samecka vd., 2002; Zechmeister vd., 2003). Yüksek bitkilerin aksine bünyelerinde gelişmiş bir kütikula tabakası bulunmadığı için, atmosferden ağır metalleri yaprak yüzeyleri aracılığıyla doğrudan alarak toplarlar ve kuruduklarında bile bu metalleri bünyelerinde barındırabilirler. Ayrıca toprak üzerinde halı gibi geniş bir yüzey alanına sahip olmaları bu kapasitelerini arttırmaktadır (Avcı, 2005). Bu özellikleri sayesinde pek çok biryofit türü çevresel kirlilik ile ilgili çalışmalarda kullanılmaktadır. *Marchantia polymorpha*'nın bakırı, *Pottia truncata*, *Dicranella heteromalla* ve *Bryum argenteum* türlerinin de kadmiyum, bakır ve çinkoyu belli oranlarda bünyelerinde biriktirebildikleri, *Hypnum cupressiforme*'nin çinko, bakır ve kadmiyumu bünyesinde üç katına kadar biriktirme eğiliminde olduğu tespit edilmiştir (Briggs, 1972; Nash, 1972; Thomas, 1983; Glime, 2007).

Kirlilik ile ilgili çalışmalarda yaygın kullanılmalarına rağmen, ağır metal kirliliğine maruz kalan biryofitlerin oksidatif stres mekanizmaları hakkında çok az bilgi vardır (Sun vd., 2009). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda stres faktörlerine maruz bırakılan biryofitlerde reaktif oksijen türlerini detoksifiye edici sistemin aktivitesindeki değişikliklere veya ROT seviyesindeki etkilerine dair bilgiler çok yetersizdir. Ağır metal stresi uygulanan karayosunlarında antioksidan metabolizmanın bileşenleri ve stres sonucu meydana gelen metabolik değişimlere ait kapsamlı bir çalışma bildiğimiz kadarı ile ülkemizde henüz hiçbir karayosunu türü için yapılmamıştır. Bu anlamda ortaya konulan bu çalışma ile yeni bir çalışma alanına adım atarak, karasal yaşama adapte olan ilkel bitkilerde yaşamsal bir metabolizma olan antioksidan metabolizma ve ağır metal stresi ilişkisinin

ortaya konulmasında dünyada yapılan çalışmalara katkı sağlamak hedeflenmiştir. Bu doğrultuda tez çalışması kapsamında Türkiye’de geniş bir yayılış gösteren *Pottiaceae* familyasına ait *Pleurochaete squarrosa* (Brid.) Lindb. ve *Timmiella barbuloides* (Brid.) Moenk’in ağır metal stresine (Ni, Pb, Cu ve Cr) karşı gösterdikleri kısa süreli tepkileri ve antioksidan mekanizmalarında oluşan değişimler araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Tremper vd. (2004), biryofit türleri *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst. ve *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt.' de 3 aylık süre içinde çeşitli zaman aralıklarında (0, 4, 8 ve 12 hafta) topladıkları örneklerde Cu, Pb ve Zn birikimini araştırmışlardır. Biryofitlerdeki metal birikiminin muamele süresine bağlı olarak arttığını, özellikle ruderal türlerde daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Aynı örneklerde ağır metal birikimi ve klorofil konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi incelemişler, ama anlamlı bir korelasyon görememişlerdir. Klorofil konsantrasyonlarını başka şartların etkilediğini düşünerek, Cu, Pb ve Zn'yu laboratuvar ortamında uygulamışlar ve Cu'nun klorofil *a* konsantrasyonunda önemli derecede azalmaya sebep olduğunu tespit etmişlerdir.

Panda ve Choudhury (2005), biryofit *Polytrichum commune* Hedw.'ye Cr, Cu ve Zn'nin 24 ve 48 saatlik uygulamaları sonunda, metal birikimlerinin zamana ve doza bağlı olarak değiştiğini ve birikimin çoktan aza doğru sırasıyla Cu, Cr ve Zn olduğunu belirtmişlerdir. Cr, Cu ve Zn'nin klorofil içeriğinde azalmaya, MDA içeriğinde artmaya sebep olduğunu tespit etmişlerdir. Metallerin artan konsantrasyonlarının 24 ve 48 saat uygulama sonunda CAT, GR ve SOD aktivitelerini arttırdığını, Cu uygulamasının GPX aktivitesini azalttığını belirlemişlerdir.

Choudhury ve Panda (2005), bir biryofit türü olan *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth.'de Pb ve Cr stresinin etkisini incelenmişler, 12 ve 24 saat Pb ve Cr uygulaması ile kuru ağırlığın ve toplam klorofil içeriğinin azaldığını belirlemişlerdir. Yirmidört saat Pb ve Cr uygulamasından sonra biryofitte bu metallerin önemli ölçüde biriktiğini ve Pb'daki birikimin Cr'a göre daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Pb ve Cr uygulamalarından sonra H₂O₂ ve O₂⁻ gibi radikallerin üretimini arttığını ve bu artışın 24 saat Pb uygulamasında daha belirgin olduğunu belirlemişlerdir. On iki ve yirmidört saat Pb ve Cr uygulamasından sonra SOD aktivitesi artarken, CAT, POX ve GR aktivitelerinin azaldığını saptamışlardır. Askorbat ve glutatyon miktarının Pb ve Cr uygulamalarından sonra önemli şekilde arttığını belirlemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara dayanarak metallerin yüksek konsantrasyonlarının, antioksidan metabolizmayı inhibe ettiğini, lipid peroksidasyonu ve ROT oluşumu ile karakterize olan oksidatif stresi indüklediğini rapor etmişlerdir.

Carreras ve Pignata (2007), bir liken türü olan *Usnea amblyoclada* (Müll. Arg.) Zahlbr'da Cu, Ni, Pb ve Zn uygulamasının klorofil ve MDA içeriğine etkisini incelemişlerdir. Zn'nin hiçbir değişime sebep olmadığını belirtirken, türde klorofil konsantrasyonunu en fazla düşüren ve en fazla MDA oluşumuna sebep olan metalin Cu olduğunu ve bunu Pb ve Ni'in izlediğini belirtmişlerdir.

Basile vd. (2008), epifitik bir yosun *Scorpiurum circinatum* (Brid.) Fleisch. & Loeske ile epifitik bir liken olan *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf türünün ağır metal birikim kapasitesini karşılaştırmışlar ve bu doğrultuda Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Ti, ve Zn metal düzeylerini ölçmüşlerdir. Sonuç olarak her iki türün de tüm ağır metalleri biriktirdiğini ve tüm metaller açısından yosun türünün likene göre daha fazla biyobirikim kapasitesine sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Shakya vd. (2008) 'nin karayosunu türleri olan *Thuidium delicatulum* (Hedw.) Schimp. ve *Thuidium sparsifolium* (Mitt.) Jaeg. ve bir ciğerotu olan *Ptychanthus striatus* (Lehm. & Lindenb.) Nees.'da Cu, Zn ve Pb'nun klorofil içeriği üzerine etkilerini inceledikleri çalışmada, Pb ve Zn birikimi her iki *Thuidium* türünde klorofil içeriğinde önemsiz derecede azalmaya sebep olmakla beraber *Ptychanthus striatus*'ın total klorofil içeriğinde önemli derecede azalmaya sebep olduğunu belirlemiştir. Cu birikiminin her üç türde de klorofil *a*, klorofil *b* ve total klorofilde diğer metallere göre daha çok klorofil hasarı meydana getirdiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, bakırda meydana gelen yüksek derecedeki klorofil hasarını bu metalin klorofil biyosentezinde görevli enzimlerin aktivitelerini azaltıcı ve/veya inhibe edici etkisinden kaynaklandığını öne sürmüşlerdir.

Sun vd. (2009), *Hypnum plumaeforme* Wils.'de Pb ve Ni stresinin etkisi incelendiği bir diğer çalışmada metal uygulamalarının ROT oluşumuna ve lipit peroksidasyonuna sebep olduğunu belirtmişlerdir. Total klorofil içeriğinin ve SOD aktivitesinin yüksek metal konsantrasyonlarında azaldığını, her iki metalin tek tek ve kombine uygulamalarında CAT aktivitesinin azaldığını, POX aktivitesinin ise yükseldiğini belirtmişlerdir. *Hypnum plumaeforme*'de süperoksit radikali birikimini düşük SOD aktivitesi ile, H₂O₂ nin birikimi ise azalan CAT aktivitesi ile açıklamışlardır. *Hypnum plumaeforme* de özellikle yüksek Pb ve Ni konsantrasyonlarının, oksidatif strese sebep olurken Pb ve Ni'in sinerjistik etki gösterdiklerini belirlemiştir.

Dazy vd. (2009), akuatik bir biryofit türü olan *Fontinalis antipyretica* Hedw.'da Cd, Cu, Pb ve Zn'nun etkilerini incelenmişlerdir. Bu metallere maruz kalan yosunun lipid peroksidasyonunda ve SOD, CAT, APX, GR ve GPX aktivitelerinde artış olduğunu belirtmişlerdir. Test edilen en yüksek metal konsantrasyonlarında, bu hücrel savunma sistemlerinin bastırıldığını belirtmişler ve bunu da MDA seviyesindeki önemli artışlara bağlamışlardır.

Sun vd. (2011), *Hypnum plumaeforme* Wils., *Thuidium cymbifolium* (Dozy & Molk.) Dozy & Molk. ve *Brachythecium piligerum* Card. türlerinde Ni ve Pb'un etkisini araştırmışlardır. Her iki metalin de reaktif oksijen türlerinin oluşumuna sebep olduğunu ve lipid peroksidasyonunu arttırdığını belirtmişlerdir. *H. plumaeforme* ve *T. cymbifolium*'da Ni ve Pb uygulamalarının SOD ve CAT aktivitelerinde azalmaya neden olduğunu tespit etmişlerdir. *B. piligerum*'da ise Pb uygulamasının SOD aktivitesinde artışa, Ni uygulamasının ise CAT aktivitesinde artışa sebep olduğunu belirlemişlerdir. Her üç yosun türünde de POX aktivitesinin her iki metal etkisinde de arttığını gözlemişlerdir. Bu biryofit türleri içinde Ni ve Pb'na en hassas türü *B. piligerum*, en toleranslı türü ise *T. cymbifolium* olarak belirlemişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

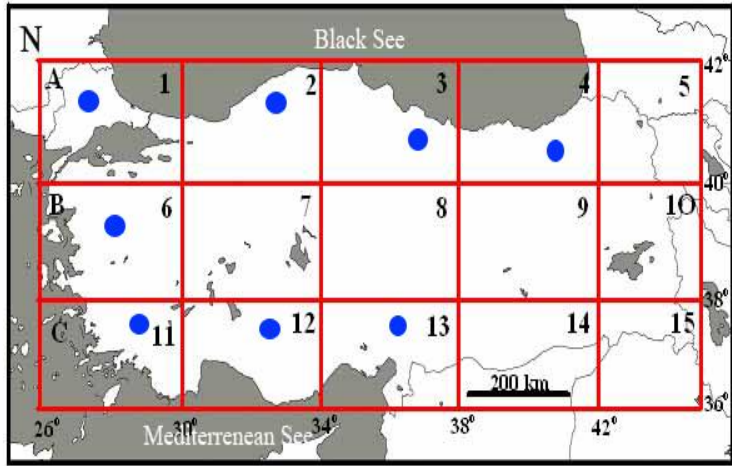
Ağır metal stresi etkisi ile biryofit metabolizmasında meydana gelen değişikliklerin belirlenmesine yönelik çalışmamız için çalışma materyali olarak seçilen biryofit örnekleri Türkiye’de geniş bir yayılış gösteren *Pottiaceae* familyasına ait *Pleurochaete squarrosa* (Brid.) Lindb. (Şekil 3.1, Şekil 3.2) ve *Timmiella barbuloidea* (Brid.) Moenk. ’dir (Şekil 3.3, Şekil 3.4).

3.1.1. *Pleurochaete squarrosa* (Brid.) Lindb.

1-7 cm’ ye kadar boylanabilen, gevşek, sarımsı-yeşil öbekler halinde bulunur. Yapraklar kuruyken içeriye doğru kıvrık, nemliyken dik veya geriye kıvrıktır. Yaprak şekli lanseolattan-linear lanseolata değişir, uç kısmı akuminat, yaprak kenarı düz, alt kısımda dentikulat olup, üst kısmında krenulat ve düzensiz dişlidir. Yaprığın arka kısmında pürüzsüz olan kosta, yaprak ucunun altında sonlanır veya hafifçe çıkıktır. Taban hücreleri dikdörtgen veya dar dikdörtgen biçimlerde ve kalın çeperlidir. Yaprak tabanı kenar hücreleri ince çeperli 3-4 sıralı şeffaf bir bant oluşturur. Bu özelliği ile mikroskop altında kolaylıkla tanınabilir. Yaprığın ortasındaki hücreler izodiametrik, 8-10 µm genişliğinde, mat ve papillalıdır. Sporofit nadiren görülür (Smith, 2004).

Kurak alanlarda topraklar veya kayaları örten topraklar üzerinde bulunur.

Dünya Yayılışı: *Submediterranean-subatlantik*. Güney ve Batı Avrupa’da kuzeyde Gotland, Türkiye, Kıbrıs, Kafkasya, İran, Himalayalar, Çin, Makaronezya, Kuzey Afrika, Kenya, Arizona, Orta Amerika.



Şekil 3.1. Henderson (1961) Türkiye kareleme sistemine göre *Pleurochaete squarrosa*'nın yayılışı (Kırmacı, M. kişisel görüşme)

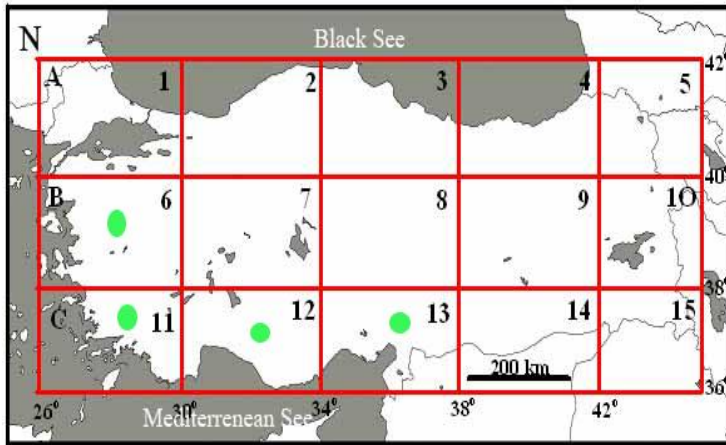


Şekil 3.2. *Pleurochaete squarrosa*'nın genel görüntüsü

3.1.2. *Timmiella barbuloidea* (Brid.) Moenk.

İki cm'ye kadar boylanabilen takson, parlak yeşilden – kahverengimsi yeşile kadar yamalar veya öbekler halinde bulunabilir. Gövde alt kısımlarda hafifçe tüylü, rizoidler koyu kırmızı-kahverengi, pürüzsüz, yapraklar kuruyken kuvvetli bir şekilde içe doğru kıvrık, 5 mm uzunluğunda, uzunca lanseolattan-lingulata kadar değişir. Yaprak üst kısımları hafifçe undulat, kenarı hafifçe içe dönük, kosta geniş, (alt kısımlarda laminanın 1/3 ü kadar), parlak ve sarımsı (kuruyken). Hücreler üst kısımlarda 2 sıralı, düzensiz yuvarlak 9-13 µm genişliğinde ve tabanda dikdörtgen. Seta neredeyse düz, sarımsı-kırmızımsı, kapsül simetrik, operkulumla birlikte 5-6 mm, peristom dişleri filiform, papillalı veya neredeyse düz, sporlar 13-16 µm ve hafifçe papillose. Bitki kalkerli veya hafif asidik topraklarda, gölgedeki kayalar üzerinde ve toprak banklarda sıklıkla görülür. Sporofit yıl boyu görülebilir (Smith, 2004).

Dünyada Yayılışı: Kıbrıs, Lübnan, Ürdün, Türkiye, Irak, İran, İsrail, Afganistan, Suudi Arabistan, Umman ve Arap Emirlikleri



Şekil 3.3. Henderson (1961) Türkiye kareleme sistemine göre *Timmiella barbuloidea* 'nin yayılışı (Kırmacı, M. Kişisel görüşme.)



Şekil 3.4. *Timmiella barbulooides*'in genel görüntüsü

3.2. Yöntem

3.2.1. Arazi Çalışması, Bitkilerin Toplanması ve İzolasyonu

Çalışma materyali olarak belirlenen türlerin (*Pleurochaete squarrosa* ve *Timmiella barbulooides*) toplanması amacıyla Kasım 2010 tarihinde Aydın-Kepez merkez kampüsünde arazi çalışması yapılmıştır. Arazi çalışmasında toplanan bitkiler polietilen torbalara alınarak laboratuvar ortamına getirilmiştir. Bitkiler burada tür bazında ayrılmış, araya karışma ihtimali olan yabancı türler stereo mikroskop kullanılarak ayıklanmıştır. Taze örnekler toprak partiküllerinden arındırılmak üzere çeşme suyu altında bir süre bekletildikten sonra distile su ile yıkanarak filtre kağıtlarında kurutulmuştur.

3.2.2. Uygulama Ortamlarının Hazırlanması ve Biryofitlere Ağır Metal Uygulanması

Toplanan örnekler için uygulama ortamı olarak 1mM'lık nikel (Ni), kurşun (Pb), bakır (Cu) ve krom (Cr) içeren çözeltiler hazırlanmıştır. Bu doğrultuda; nikel klorür (Ni), kurşun asetat (Pb), bakır sulfat (Cu), potasyum di kromat (Cr), kullanılmıştır. Her bir metal için 1 mM madde içeren 1000 mL'lik çözeltiler

hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler daha önceden sterilize edilen kavanozlara 250 mL olacak şekilde paylaştırılmış, böylece her tür için uygulama ortamı oluşturulmuştur. Ayrıca her örnek için sadece distile su içeren kontrol grupları da hazırlanmıştır. Hazırlanan ortamlara bitkiler yaklaşık 85 g olacak şekilde yerleştirildikten sonra, 16/8 saat fotoperiyot koşulları altında ve 24 ± 2 °C de iklim odasında bekletilmiştir.

3.2.3. Örnek Analizleri İçin Tartımların Yapılması

Kırksekiz saat sonunda, örnekler hasat edilerek, yarım saat süre ile filtre kağıtlarında kurutulduktan sonra, her analiz için gerekli miktarlarda olacak şekilde tartımlar yapılmıştır. Örnekler analizleri yapılana kadar -20 °C dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.2.4. Ağır Metal Biriktirme Düzeyleri

Ağır metal biriktirme düzeyleri incelenecek örnekler, yaş yakma yöntemine göre analize hazırlanmıştır (Kaçar ve İnal, 2008). Yaş yakma işlemi için 100 ml'lik erlenler kullanılmıştır. Erlenlerin içine 0.25 g kuru biryofit örneği konulduktan sonra 12 ml per klorik asit ve nitrik asit karışımı (1:4) eklenmiştir. Asit ilave edilen örnekler daha sonra ısıtıcı tabla üzerine yerleştirilmiş ve sıcaklık kademeli olarak artırılarak yakma işlemi gerçekleştirilmiştir. Yakma işlemi bittiğinde erlenlerin soğumaları beklenmiştir. Her örnek 100 ml'lik balon jodelere bir miktar ultra saf su ile yıkanmak koşuluyla süzümüştür. Erlenlerin çeperlerinde hiç partikül kalmadığında emin olduğunda jodelerin son hacimleri tamamlanarak plastik kaplara alınmıştır. Ağır metallerin (Ni, Pb, Cu, Cr) belirlenmesi her bir metal için ayrı katot lambalar kullanılarak atomik absorpsiyon spektrofotometre (Varian, Spectra AA 220) cihazında yapılmıştır.

3.2.5. Kuru Ağırlık Tayini

Uygulama sonrası her örnek, 0.5 g olacak şekilde tartılmış ve 48 saat boyunca 70°C etüvde bekletilmiştir. Bu süre sonunda örnekler yeniden tartılmış ve kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Denemeler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. Hidroksil Radikali (OH[•]) Miktarı Tayini

Hidroksil radikali, deoksiriboz ile reaksiyona girdiğinde çoğunluğunu malonildialdehitin (MDA) oluşturduğu çeşitli ürünler oluşur. Bu yöntem hidroksil radikali ile deoksiribozun etkileşimi sonucu oluşan malonildialdehitin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır (Halliwell ve Gutteridge, 1989).

Hidroksil radikali tayini için 0.4 g bitki örneği 6 mM deoksiriboz ile homojenize edilmiş ve üzerine % 40'lık TCA ilave edilmiştir. Bütün örnekler 14000 rpm de +4 °C'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen supernatantın 0.5 ml si üzerine 50 mM sodyum hidroksit (NaOH) ile hazırlanmış % 1 tiyobarbitürik asit (TBA) ilave edilmiştir. Örnekler vortekslendikten sonra 100 °C su banyosunda 30 dakika tutulmuştur. Bu süre sonunda örnekler buz banyosuna yerleştirilmiştir. Otuz dakika bekletilen örneklerin daha sonra oda sıcaklığına gelmeleri beklenmiştir. Örneklerin absorbansları 535 nm'de okunmuş, ayrıca girişim yapabilecek diğer maddelere karşı kontrol amaçlı 730 nm'de ayrı bir okuma yapılmıştır. Oluşan MDA konsantrasyonu µM MDA olarak verilmiştir.

3.2.7. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Miktarı Tayini

Denemelerde hidrojen peroksit içeriği Patterson vd. (1984)'nin yöntemine göre ölçülmüştür. Yöntem prensibi H₂O₂'nin Ti (IV) tuzu ve 4-(2-pyridylazo) resorsinol kompleksi (Ti(IV)- PAR kompleks) ile etkileşimi sonucu oluşan turuncu-pembemsi ürünün 508 nm'de absorbansın okunması esasına dayanır. Bu üçlü kompleks Ti(IV)-PAR-H₂O₂, Ti(IV)-PAR kompleksine göre stabildir. Deneme için, 0.5 gram ağırlığındaki biryofit örnekleri aktif kömür kullanılarak % 5 trikloroasetik asit (TCA) içerisinde ekstre edildikten sonra 15000 rpm'de 30 dakika +4 °C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatanın pH'sı % 25'lik NH₄OH kullanılarak nötralize edilmiştir. Nötralize edilen örnekler vortekslendikten sonra 15000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen supernatanın 1.0 ml'si üzerine daha önceden hazırlanan Ti(IV)-PAR kompleksinden ilave edildikten sonra 60 dakika 45 °C su banyosunda bekletilmiştir. Oda sıcaklığına gelen örneklerde 508 nm'de absorpsiyon okunmuştur. H₂O₂ içeriği standart eğri kullanılarak hesaplanmış ve nmol g⁻¹ taze ağırlık olarak ifade edilmiştir.

3.2.8. Lipit Peroksidasyonu

Biryofit örneklerinde lipit peroksidasyon düzeylerinin belirlenmesi, oksidatif hasar sonucunda oluşan malonildialdehitin (MDA) tiyobarbitürük asit (TBA) reaktifi kullanılarak spektrofotometrik tayinine dayanmaktadır. Oluşan MDA, TBA ile renkli bir kompleks oluşturur. Bu amaçla her örnek, üç tekrarlı olacak şekilde 0.15 g tartılmış ve % 0.1'lik TCA ile homojenize edilmiştir. Homojenat 20 dk 10.000 rpm +4°C de santrifüjlenmiştir. Süpernatant 1'er ml alınarak ikiye bölünmüştür. Bir seriye, TCA içinde TBA (% 20'lik TCA içinde %0.5 TBA olacak şekilde) ilave edilmiş, diğer seriye ise yalnız % 20'lik TCA ilave edilmiştir. Bu seri örnekler antosiyanin girişiminden kaynaklanacak hataya karşı kontrol olarak hazırlanmıştır. TBA içeren örnekler su banyosunda 100°C'de 30 dk kadar bekletildikten sonra buz banyosuna alınmış, buz banyosunun ardından oda sıcaklığına gelmeleri beklenmiştir. Örneklerin absorbansı spektrofotometrik olarak 532 nm ve 600 nm'de belirlenmiştir. Malonildialdehit konsantrasyonu (μM olacak şekilde) ekstinksiyon katsayısından ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) yararlanılarak hesaplanmıştır (Çakmak ve Horst, 1991).

3.2.9. Fotosentetik Pigment Analizi

Örneğin 0.15 gramı için 0.0075 g polivinilpolipirolidon (PVPP) tartılarak temiz tüplere alınmıştır. Tartılan örnekler tüplere yerleştirildikten sonra üzerine pipet yardımıyla 3 mL dimetil sülfoksit (DMSO) eklenmiştir. Tüplerin ağzı parafilm ile kapatıldıktan sonra karanlıkta 65° C'de su banyosunda 1 saat bekletilmiştir. Su banyosundan alınan örnekler 10 saniye vortekslenmiş ve oda sıcaklığına gelmeleri beklenmiştir. Süzüntü plastik küvetlere alınarak, spektrofotometrik olarak pigmentlerin absorpsiyonları ölçülmüştür. 665.1- 649.1- 435- 415 nm'de klorofil miktarı, 480 nm'de karotenoid miktarı, 461 nm'de lutein miktarı, 477.8 de β -karoten, 453.4 nm'de ise neoksantin miktarı ölçülmüştür (Welburn, 1994)

3.2.10. Enzim Ekstraktlarının Hazırlanması

Ağır metal stresi altında biryofitlerde antioksidant enzim (SOD, KAT, POX, APX, GR) aktivitelerinde meydana gelen değişimleri saptamak için örnekler, % 2 (w/v) çözünmez polivinilpyridon (PVP), 2 mM etilendiamintetraasetik asit (EDTA) , % 10 gliserol, 1 mM Fenil metil sülfonil florid (PMSF) içeren 5 ml 0.1 M K-fosfat tamponunda (pH 7.8) homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekler 30

dakika süresince 12 000 rpm devir hızında +4 °C’de santrifüj edildikten sonra, elde edilen supernatant toplanmış ve enzim analizlerinde kullanılmıştır. Ayrıca supernatan aynı zamanda çözünebilir protein analizlerinde de kullanılmıştır. Örnekler analiz yapıncaya kadar -20°C dondurucuda tutulmuştur.

3.2.11. Protein Miktarının Belirlenmesi

Kontrol ve ağır metal uygulaması yapılan biryofit örneklerinin protein konsantrasyonları, Bradford metoduna (Bradford, 1976) göre sığır serum albumin (BSA) standartları kullanılarak mg mL⁻¹ düzeyinde belirlenmiştir. Bu yöntemeye göre, tüplere 300 µl örnek ile 200 µl deiyonize su ve 5 mL seyreltik Bradford belirteci eklenmiştir. Bu karışım 10 saniye vortekslelendikten sonra 10 dakika karanlıkta bekletilmiş ve absorbans değerleri 595 nm dalga boyunda spektrofotometrede üç tekrarlı olacak şekilde okunmuştur.

3.2.12. Süperoksit Dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) Aktivitesinin Belirlenmesi

Superoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi Beauchamp ve Fridovich (1970) yöntemine göre yapılmıştır. SOD enzim aktivitesi, nitro blue tetrazolium klorürün (NBT) ışık altında superoksit serbest radikal (O₂⁻) tarafından indirgenmesine göre ölçülmüştür. Reaksiyon karışımına 50 mM 0.1 M (pH 7,8) K-fosfat tamponu, 0.1 mM EDTA, 10 mM L-methionin, 33 µM NBT, 3.3µM riboflavin eklenmiştir. Örnek ilave edildikten sonra karışımlar floresan lamba altına yerleştirilmiştir. 10 dakika boyunca reaksiyonun oluşması sağlanmış ve tüpler karanlığa alınarak reaksiyon durdurulmuştur. Örneklerin absorbansları 560 nm de ölçülmüştür. Karanlıkta tutulan karışım kontrol olarak kullanılmıştır. Işıқта riboflavin varlığında; 560 nm’de NBT’nin yüzde elli inhibisyonuna neden olan enzim miktarı, bir enzim ünitesi olarak belirlenmiştir.

3.2.13. Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalaz aktivitesi Bergmeyer ve Grabl (1983) yöntemine göre belirlenmiştir. Katalaz aktivitesi için reaksiyon ortamına (3 mL) 0,1 mM EDTA içeren K-fosfat tamponu (pH 7,0), 0.2 ml örnek ve % 30 H₂O₂ (m/v) eklenmiştir. Reaksiyon H₂O₂ ilave edilmesi ile başlatılmış ve aktivite, ekstrakt içermeyen köre karşı 240 nm’de absorbans H₂O₂ azalma olarak okunmuştur. Enzim spesifik aktivitesi µmol H₂O₂ dk⁻¹ mg protein⁻¹ olarak belirtilmiştir.

3.2.14. Peroksidaz (POX; EC 1.11.1.7) Aktivitesinin Belirlenmesi

Peroksidaz aktivitesi Herzog ve Fahimi (1973) yöntemine göre belirlenmiştir. Bu yöntemde substrat olarak 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorür (DAB) kullanılmış ve 465 nm'de bu substratın oksidasyonu sonucu oluşan kahve-kırmızı ürününün, okside-DAB oluşum oranı da enzim aktivitesi olarak belirlenmiştir. Üç mililitre reaksiyon karışımında DAB çözeltisi (0.4 mM DAB; 0.009 g DAB + 25 mL %50 w/v jelatin + 25 mL 0.15 M Na-fosfat-sitrat tamponu), H₂O₂ (3 mM; % 0,6) ve 0.05 mL enzim ekstraktı içermektedir. Reaksiyon H₂O₂ ilave edilerek başlatılmış ve 465 nm dalga boyunda 3 dakikalık süre içinde izlenmiştir. Bir miligram proteinde bulunan enzim ünite sayısı spesifik aktivite olarak kabul edilmiştir.

3.2.15. Askorbat Peroksidaz (APX, EC 1.1.1.11) Aktivitesinin Belirlenmesi

Askorbat peroksidaz aktivitesi Garcia-Limones vd. (2002) metoduna göre, 290 nm'de ($E = 2.8 \text{ mM cm}^{-1}$) askorbat oksidasyonu ölçülerek yapılmıştır. Buna göre, son hacmi 3 ml olacak şekilde ayarlanan reaksiyon ortamına, 1 mM EDTA içeren 0.05 M'lık fosfat tamponu (pH 7.8), 0.03 mL % 0.03'luk H₂O₂, 0.035 mL 0.03 M L- askorbik asit ve 0.1 mL enzim ekstraktı ilave edilmiş ve askorbat oksidasyonu 290 nm'de okunmuştur.

3.2.16. Glutatyon Redüktaz (GR, EC 1.6.4.2) Aktivitesinin Belirlenmesi

Glutatyon reduktaz aktivitesi Carlberg ve Mannervik (1985)'e göre 340 nm'de NADPH'nın oksidasyonu esas alınarak ölçülmüştür. Buna göre, son hacmi 3 mL olacak şekilde ayarlanan reaksiyon ortamına 0,06 M K-fosfat tamponu (pH 7.4), 1mM okside glutatyon (GSSG), 0.1 mM NADPH ve 0.2 ml enzim ekstraktı ilave edilerek NADPH oksidasyonu 340 nm'de okunmuştur. Toplam GR enzim aktivitesi, NADPH'nın ekstinksiyon katsayısı (6.2mM.cm^{-1} , 340nm) kullanılarak reaksiyonun başlangıç hızından ($\text{nmol NADPH dk}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$) hesaplanmıştır.

3.2.17. Askorbat Miktarı Tayini

Deney bitkilerimizdeki askorbat miktarı Kampfenkel vd. (1995) tarafından belirtilen yöntemle ölçülmüştür. Bu amaçla 0.1 g bitki materyali % 6 TCA ile homejenize edildikten sonra 4°C'de 5 dakika boyunca 15000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatandan 0.2 ml alınmış, üzerine 10 mM DTT

0.2 mL (1,4 dithiotreitol), 0.8 mL 0.2 M'lık fosfat tamponu (pH 7.4), eklenmiştir. Karışım vortekslendikten sonra 42 °C'deki su banyosunda 15 dakika inkübe edilmiştir. Bu sürenin bitiminde aşırı DTT'yi ortadan kaldırmak için bu çözeltinin üzerine 0.2 mL % 0,5'lik (w/v) NEM (N-ethylmaleimide) eklenmiştir. Daha sonra örnekler sırasıyla 1 mL % 10'luk TCA (trikloroasetik asit), 0.8 ml % 42'lük fosforik asit (H₃PO₄), 0.8 mL 4 % 2,2' - dipirydyl, 0.4 mL % 3 FeCl₃ eklenmiştir. Kimyasallar ortama eklendikten sonra 42°C'de 40 dakika inkübe edilmiştir. Hazırlanan örneklerin 525 nm'de spektrofotometrede absorbansları okunmuştur. Askorbat düzeyleri µmol/g olarak belirlenmiştir.

3.2.18. Glutasyon Miktarı Tayini

Total glutasyon

Deney bitkilerimizdeki glutasyon miktarı Griffith (1980) yöntemine göre tayin edilmiştir. Bu yöntemde Elman ayracı olarak bilinen 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile sülfidril gruplarının reaksiyonu sonucu oluşan sarı renkli ürün, spektrofotometrik olarak değerlendirilir. Bunun için 0.2 g bitki materyali Na₂EDTA içeren 0,1 M potasyum fosfat tamponu ile hazırlanmış, % 5'lik sulfosalisilik asit (SSA) ile homojenize edildikten sonra 14000 rpm'de +4 °C'de 30 dakika boyunca santrüfjü edilmiştir. Elde edilen süpernatanın 0.2 ml'si üzerine 0,6 mL K-fosfat tamponu (pH 7.6), 0.6 mL 5 mM Na₂EDTA içeren 0.1 M fosfat tamponu, 3 mM NADPH ve 6 mM DTNB ilave edilmiştir. Kör için, örnek yerine SSA konulmuştur. Tüpler vortekste iyice karıştırıldıktan sonra 30 °C'da 5 dakika bekletilmiştir. Reaksiyon 100 µL Glutasyon Reduktaz (GR) çözeltisinin eklenmesiyle başlatılmış ve 412 nm'de absorbans artışı izlenmiştir. Örneklerdeki glutasyon konsantrasyonu, hazırlanan standart grafikten yararlanılarak µmol g⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

Okside glutasyon (GSSG) ve redükte glutasyon (GSH) tayini

Okside glutasyon miktarı, total GSH miktarının ölçülmesinde kullanılan yöntem ile belirlenmektedir. Farklı olarak; elde edilen süpernatanın 200 µL'si 5 µL 2-vinilpiridin ile türevlendirilmekte, GSH'nin 2-vinilpiridin ile türevlendirilmesiyle sadece GSSG miktarı ölçülmektedir (Griffith, 1980). Bu şekilde hazırlanan örnek oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiş, bu sırada 10 dakikada bir vortekslenmiştir. Daha sonra üzerine 800 µL dietil eter eklenerek iki faza ayrılmıştır. Üstte kalan

eterik faz pastör pipeti ile çekilerek uzaklaştırılmıştır. Altta kalan GSSG içeren sulu fazın tamamı küvete alınarak üzerine 0,6 ml 5 mM EDTA_{Na}2 içeren 0,1 M fosfat tamponu, 3 mM NADPH ve 6 mM DTNB ilave edilmiş ve kör için örnek yerine SSA konulmuştur. Tüpler vortekste iyice karıştırıldıktan sonra 30°C 5 dakika bekletilmiştir. Reaksiyon 100 µL Glutasyon Reduktaz (GR) çözeltisi eklenmesiyle başlatılmış ve 412 nm’de absorbans artışı izlenmiştir. Elde edilen absorbans değerleri total GSH için hazırlanan standart grafik kullanılarak konsantrasyon değerlerine dönüştürülmüştür. Glutasyon miktarı (GSH), total glutatyon dan okside glutatyon değerinin çıkarılması ile µmol g⁻¹ olarak elde edilmiştir.

3.2.19. Prolin Miktarı Tayini

Prolin analizi Bates (1973)’e göre yapılmıştır. Yarım gram olarak tartılan biryofit örnekleri 10 mL % 3 lük sülfosalisilik asit ile ekstrakte edilmiş, elde edilen ekstrakt kaba filtre kağıdından süzöldükten sonra ninhidrin metodu ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Bunun için 2 mL ekstrakt üzerine 2 mL asetik asit, 2 mL ninhidrin reaktifi konulmuş, vorteksleme işleminin ardından 100 °C su banyosunda 1 saat bekletilmiştir. Bu işlemin ardından 5 dakika boyunca da buz banyosunda bekletilen tüplerin üzerine, daha önceden soğutulan toluen eklenmiş ve oluşan renkli kısmın absorbansı 518 nm dalga boyunda okunmuştur. Prolin miktarı standart grafik üzerinden µg prolin olarak belirlenmiştir.

3.2.20. Antiradikal Aktivite Tayini

Antiradikal aktivite tayini, DPPH serbest radikal giderme yöntemine göre yapılmıştır (Brand-Williams vd. 1995). Yöntem 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl’in (DPPH) antioksidantların etkisiyle indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Bunun için örnekler % 80’lik etanolle homojenize edildikten sonra +4 °C’de 10 000 rpm’de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Temiz supernatantlar analiz yapıncaya kadar buz banyosunda muhafaza edilmiştir. Stok DPPH çözeltisi 0,06 mM olacak şekilde metanolde hazırlanmıştır. Hazırlanan bu stok DPPH çözeltisinin 1.99 mL’si küvete konulduktan sonra 515 nm’de absorbansı ölçölmüştür. Sonra 0.01 mL örnek ilave edilerek 515 nm’deki absorbans azalışı durağan hale gelene kadar kaydedilmiştir. Standart antioksidan olarak Trolox kullanılmış ve örneklerin antiradikal aktivitesi aynı inhibisyona denk gelen µmol Trolox g⁻¹ cinsinden ifade edilmiştir.

Çalışma sonucu elde edilen veriler SPSS istatistik paket programı (SPSS for WINDOWS, standard version, release 16.0) kullanılarak One-way ANOVA testi ile değerlendirilmiş, verilerin ortalamaları LSD testi ile karşılaştırılmış ve p değerinin 0.01 ve 0.05'den küçük olması önemli fark olarak belirtilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Ağır Metal Biriktirme Düzeylerinin Belirlenmesi

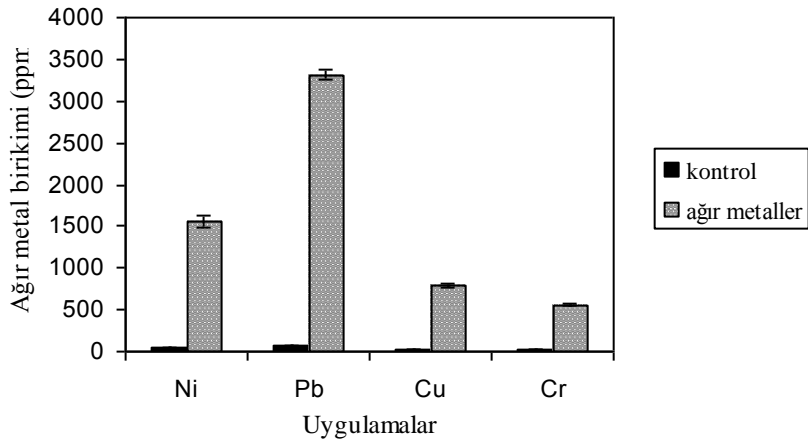
Biryofitler radyoaktif izotopların ve ağır metallerin pasif toplayıcılarıdır. Biryofitlerin çoğunun-ölüdüğü hücre çeperinde metal iyonlarını bağlama yeteneğine sahip oldukları bilinmektedir (Tyler, 1989). Karayosunlarının özel morfoloji ve fizyolojileri nedeniyle ağır metalleri yüksek derecede alabilmesi bu konunun yaygın olarak çalışılmasını sağlamıştır (Brown ve Buck, 1985; Tyler, 1990; Sawidis vd., 1993; Wolterbeek vd., 1995; Markert vd., 1996; Zechmeister, 1998; Fernandez vd., 2002; Shakyta vd., 2004; Samecka ve Cymerman, 2005).

Ağır metal stresine maruz bırakılan *Pleurochaete squarrosa* ve *Timmiella barbuloides*'in ağır metalleri biriktirme düzeyleri atomik absorpsiyon spektrofometresi kullanılarak belirlenmiştir. *P. squarrosa* ve *T. barbuloides*'in ağır metal uygulanmış bütün örneklerinin, maruz kaldıkları metalleri biriktirebildikleri belirlenmiştir. *P. squarrosa*'nın metal içeren her örneği kontrolleriyle kıyaslandığında Ni içeriğinin 39 kat, Pb içeriğinin 46 kat, Cu içeriğinin 35 kat ve Cr içeriğinin 23 kat arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.1). *T. barbuloides*'te metal uygulanan örnekler kontrolleriyle kıyaslandığında Ni'in 263 kat, Pb'nın 52 kat, Cu'nun 46 kat ve Cr'un 33 kat arttığı belirlenmiştir (Çizelge 4.1) (Şekil 4.2).

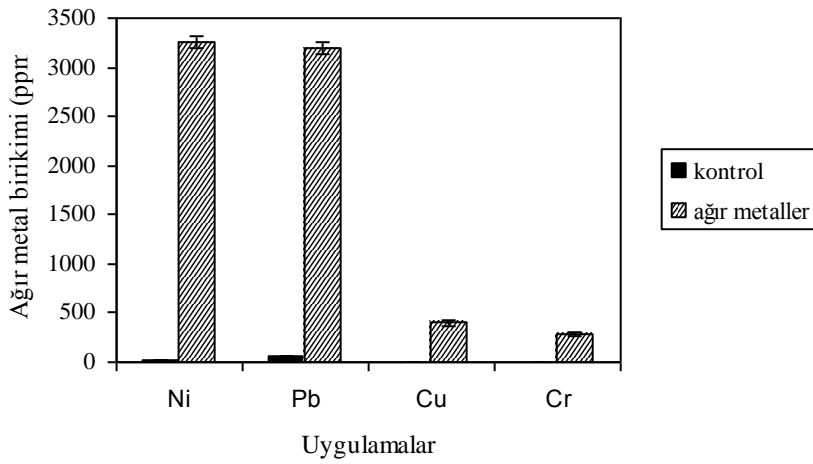
Çizelge 4.1. *Pleurochaete squarrosa* ve *Timmiella barbuloides*'de ağır metal birikimi (ppm, Ortalama \pm S.H, n=3)

Uygulamalar	<i>Pleurochaete squarrosa</i>		<i>Timmiella barbuloides</i>	
	<i>Kontrol</i>	<i>Metal</i>	<i>Kontrol</i>	<i>Metal</i>
Ni	38.2 \pm 7.4	1558.86 \pm 78,2**	12.3 \pm 1.4	3253.33 \pm 67.43**
Pb	70.4 \pm 10.99	3312.01 \pm 63,5**	60.2 \pm 6.46	3193.33 \pm 56.9**
Cu	21.6 \pm 3.3	795.2 \pm 25.26**	8.4 \pm 1.04	398.8 \pm 25.73**
Cr	22.4 \pm 5.13	558.4 \pm 13.2**	8.2 \pm 1.46	286.4 \pm 16.7**

**Kontrole göre p < 0.01 düzeyinde önemli farkı belirtmektedir.



Şekil 4.1 *Pleurochaete squarrosa*'da ağır metal birikimi



Şekil 4.2. *Timmiella barbuloidea*'de ağır metal birikimi

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere benzer şekilde, karayosunlarında metalleri biriktirme düzeyleri açısından önemli varyasyonlar belirlenmiştir. Örneğin, *Polytrichum commune* Hedw.'nin 12 ve 48 saat Cr, Cu ve Zn uygulamasından sonra ağır metal biriktirme düzeyleri incelendiğinde, en yüksek birikimi 48 saat sonunda 10 mM ve 100 mM metal uygulamalarında sırasıyla Cu, Cr ve Zn olarak belirlenmiştir (Choudry ve Panda, 2005). Bir başka biryofit türü olan *Taxithelium nepalense* (Schwägr.) Broth.'in Pb ve Cr'u yüksek oranda biriktirdiği ve Pb birikiminin Cr'a oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Choudry ve Panda, 2005). Diğer biryofit türleri; *Marchantia polymorpha*'nın bakırı, *Pottia truncata*, *Dicranella heteromalla* ve *Bryum argenteum*, *Hypnum cupressiforme* türlerinin kadmiyum, bakır ve çinkoyu yüksek konsanrasyonlarda biriktirme eğiliminde oldukları rapor edilmiştir (Briggs, 1972; Nash, 1972; Thomas, 1983; Glime, 2007).

Biryofitler ağır metallerin güçlü akümülatörleri olarak bilinmektedir. Gerçek kök, epidermis ve indirgenmiş kütikulanın varlığı ya da kütikula yokluğu, yüksek yüzey/hacim kapasitesine sahip olmaları gibi çeşitli nedenlerle hücrede hayati fonksiyonlara zarar vermeden apoplast ve simplast bölgelerinde çok miktarda ağır metal biriktirebilirler (Tyler, 1990). Vasküler bitkilerle kıyaslandığında, biryofitlerin ağır metallerin hiperakümüstasyonlarını çoğunlukla hücre çeperinde tutarak gerçekleştirmesi bu grup bitkilere stresin üstesinden gelmede önemli bir avantaj sağlamaktadır (Vukojevic vd., 2005). Biryofitler bunu hücre çeperlerinde bol bulunan negatif yüklü poliüronik asitler sayesinde yaparlar. Hücre çeperindeki negatif yüklü bu moleküller biryofitlerde yüksek derecede katyon değişim kapasitesi sağlar (Tyler, 1989, 1990; Chettri vd., 1998). Poliüronik asitler dışı bakan yüzeylerinde karboksil grubu bulundurlar. Bu karboksil grubu protonunu serbest bir şekilde metal iyonu ile değiştirir. Böylece katyon değişim kapasitesi metallerin yüksek derecede birikimine sebep olur. Negatif yüklü bu moleküllere bağlanan metal iyonlarının hareketi kurulan bu bağ etkisiyle kısıtlanır ve iyonlar sadece sınırlı ölçüde ve yavaş bir şekilde hücre içine taşınır; böylece hücre içinde ağır metallerin toksik etkileri azaltılır (Tyler, 1990).

P. squarrosa ve *T. barbuloides*'te görülen metal birikimi, biryofitlerin yüksek derecede metal biriktirebilme kapasitesine dair literatür bilgileriyle uyumludur. Her iki türde de yüksek derecedeki metal birikimi, öncelikle negatif yüklü gruplar ve bu sayede gerçekleşen katyon değişim kapasitesi ile, aynı zamanda hücre içinde bulunan şelatlayıcı moleküllerle (Bruns vd., 2001) ve vakuolde depolanarak

(Bruns vd.,2001) gerçekleştirilmiş olabilir. Kurşunun ve diğer ağır metallerin negatif yüklü poliüronik asitlere bağlandığı çeşitli araştırmacılar tarafından da rapor edilmiştir (Thurner ve Marshall, 1971; Burton ve Peterson, 1979; Satake vd., 1983; Satake ve Miyasaka, 1984).

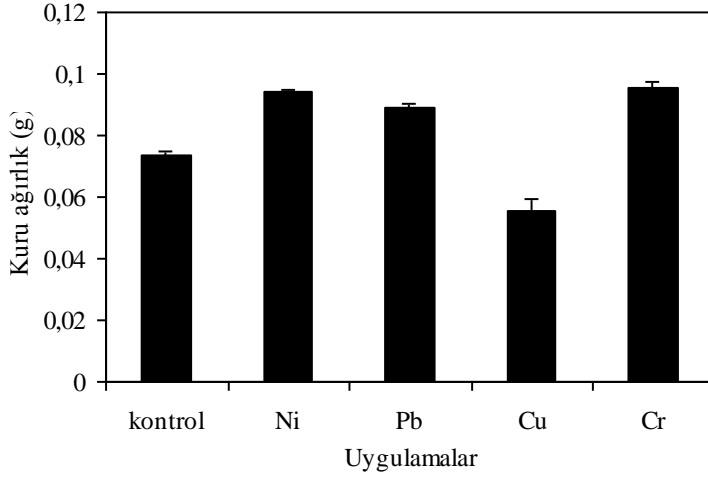
4.2. Kuru Ağırlık

Kuru ağırlık, stresin bitki büyümesinde meydana getirdiği etkinin açıklanabilmesi için kullanılabilir bir parametredir. Deneme sonuçlarımıza göre *P.squarrosa* ve *T. barbulooides*'in Pb, Ni ve Cr uygulanmış örnekleri kontrolleriyle kıyaslandığında kuru ağırlıklarının arttığı belirlenmiştir (Çizelge 4.2). *P. squarrosa*'nın Cr, Ni, Pb uygulanan örnekleri kontrolleriyle kıyaslandığında kuru ağırlıkları sırasıyla % 29, % 27, % 21 kadar artarken, Cu uygulanan örnekte %25 azalmıştır (Şekil 4.3). *T. barbulooides*'in ise Pb ile muamele edilen örneğinin % 48, Ni uygulanan örneği % 34 ve Cr uygulanan örneği %29 oranında arttığı belirlenirken, Cu uygulanan örneğin % 22 oranında azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.4).

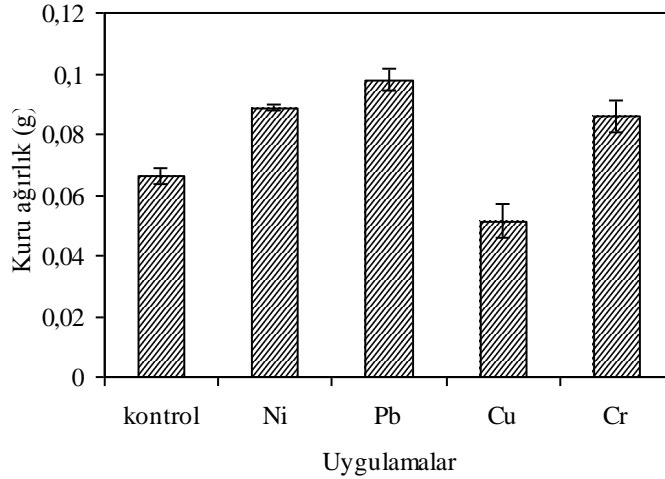
Çizelge 4.2. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa* ve *Timmiella barbulooides*'in kuru ağırlıkları (g, Ortalama± S.H, n=3)

Uygulamalar	<i>Pleurochaete squarrosa</i>	<i>Timmiella barbulooides</i>
Kontrol	0.0735 ± 0.0013	0.0661± 0.0027
Ni	0.0939 ± 0.0007**	0.0887± 0.0011**
Pb	0.0889 ± 0.0011**	0.0979 ± 0.0039**
Cu	0.0551 ± 0.0039**	0.0514 ± 0.0055**
Cr	0.0954 ± 0.0020**	0.0859 ± 0.0050**

**Kontrole göre p < 0.01 düzeyinde önemli farkı belirtmektedir.



Şekil 4.3. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa*'nın kuru ağırlıkları



Şekil 4.4 Ağır metal stresi uygulanan *Timmiella barbuloides*'in kuru ağırlıkları

P. squarrosa ve *T. barbuloides*'in Ni, Pb ve Cr uygulanan örneklerinde kuru ağırlık miktarlarında görülen artışlar, bitki bünyesinde veya yüzeyinde tutulan metal iyonları sayesinde olabileceği gibi, Clemens (2006) tarafından da belirtilen bu ağır metallerin biryofitlerin metabolizmalarında fotosentez ve bağlantılı diğer

sentez olaylarına ket vurmaması yani ağır metal toleransına bağlı büyümenin sürdürülmesi ile de ilişkili olabilir.

Bakır uygulaması, çalışılan her iki türde de kuru ağırlığın önemli ölçüde azalmasına neden olmuştur. Cu uygulanan örneklerde, kuru ağırlıkta meydana gelen bu azalma Cu toksitesinden kaynaklanmaktadır. Bakır toksitesini, bitki bünyesinde protein sentezi, fotosentez, solunum, iyon alınımı, hücre membran stabilitesinin değişimi ve doku yıkımının artması gibi bazı fizyolojik olayların bozulmasıyla ortaya çıkmaktadır (Sossé vd., 2004). Denemelerin daha sonraki aşamalarından elde edilen veriler yüksek bitkiler için öngörülen bu literatür bilgisinin iki biryofit türü için de geçerli olabileceğini desteklemektedir. Fotosentetik pigment tayini denemelerimizden elde ettiğimiz sonuçlar kuru ağırlıktaki azalmanın fotosentetik pigment kaybı ya da fotosentetik membranlardaki hasara bağlı olarak fotosentetik aktivitenin engellenmesi sonucu olabileceğini düşündürmektedir. Bu açıdan, çalışılan biryofit türlerinde belirlenen kuru ağırlık miktarındaki azalmaların, bakırın normal metabolizma işleyişinde aksamalara sebep olması ile gerçekleştiği ifade edilebilir.

4.3. Hidroksil Radikali Miktarı

Hidroksil radikali (OH[•]), Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten (H₂O₂), ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucu oluşmaktadır. Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksijen radikali olup, yarılanma ömrü çok kısa olduğundan doğrudan ölçülmesi zordur. Bu nedenle OH[•] üretimi artışının belirlenmesi, bozulma sonucu oluşan kararlı ürünlerin ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

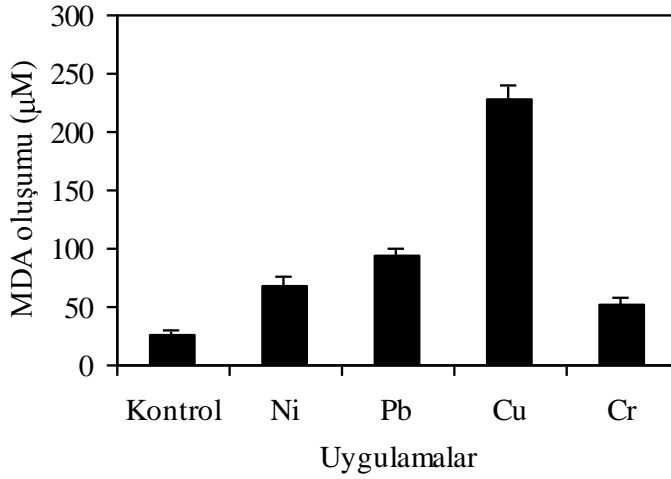
Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla reaksiyona girerek DNA yapısında değişikliklere yol açar. Hidroksil radikali etkisiyle deoksiriboz molekülünün bozulmasına bağlı olarak oluşan fragmentlerden olan malonildialdehit (MDA) miktarları *P. squarrosa*'nın Ni uygulanan örneğinde 1.5 kat, Pb uygulanan örnekte 2.5 kat, Cu uygulanan örnekte 7 kat artarken, Cr uygulanan örnekte % 94 artmıştır (Şekil 4.5) *T. barbulooides*'in Pb uygulanan örneğinde % 27 artarken, Cu uygulanan örneğinde 6 kat, Cr uygulanan örneğinde ise 2,4 kat artmıştır (Şekil 4.6) (Çizelge 4.3)

Çizelge 4.3. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa* ve *Timmiella barbuloides*'in hidroksil radikali etkisiyle oluşan MDA miktarları (μM , Ortalama \pm S.H, n=3)

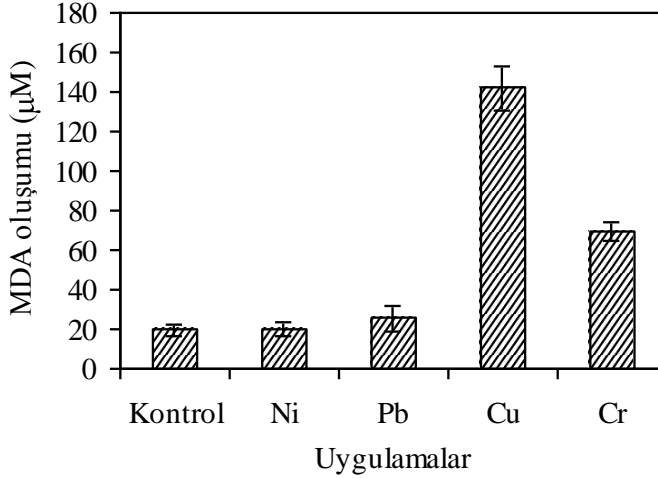
Uygulamalar	<i>Pleurochaete squarrosa</i>	<i>Timmiella barbuloides</i>
Kontrol	26.52 \pm 2.59	19.88 \pm 2.89
Ni	68.80 \pm 7.18**	20.30 \pm 3.48
Pb	94.56 \pm 5.03**	25.30 \pm 4.78*
Cu	228.20 \pm 10.98**	141.93 \pm 11.17**
Cr	51.60 \pm 6.01**	68.97 \pm 6.34**

* Kontrolle göre p < 0,05 düzeyinde önemli farkı belirtmektedir

**Kontrolle göre p < 0,01 düzeyinde önemli farkı belirtmektedir



Şekil 4.5. *Pleurochaete squarrosa*'da hidroksil radikali etkisiyle oluşan malonildialdehit miktarları



Şekil 4.6. *Timmiella barbuloides*’te hidroksil radikali etkisiyle oluşan malonildialdehit miktarları

Hidrojen peroksidin eksik indirgenmesi ile OH^\cdot üretimi, bu radikalin en önemli kaynağıdır. Hidroksil, bilinen en reaktif radikaldir. Amino asitler, nükleik asitler organik asitler, fosfolipidler ve şekerler gibi biyokimyasal maddelerin bir çoğuyla reaksiyona girebilir. Tek atom halinde ve bir elektronu eksik olan oksijen ile H^+ nin birleşmesinden oluşur. Hidroksilin yarılanma ömrü çok kısadır ve pek çok molekülden H atomu çıkarılmasını sağlar (Cherubini, 2005). Demir ve bakır gibi geçiş metalleri, fizyolojik şartlarda çeşitli oksidasyon basamaklarında görev alırlar. Bu özellikleri sayesinde geçiş metalleri serbest radikal tepkimelerini hızlandırarak katalizör görevi yaparlar. Nitekim *P. squarrosa*’da metal uygulanan bütün örneklerinde önemli derecede MDA artışı görülürken, en yüksek MDA miktarı bakır uygulanan örnekte belirlenmiştir. *T.barbuloides*’te ise Ni uygulanan örneğinde kontrole göre anlamlı bir değişim görülmezken, yine bakır uygulanan örnekte en yüksek MDA oluşumu görülmüştür. Bakır, diğer metallere göre hidroksil radikali oluşumunu artırmıştır. *T.barbuloides*’in Ni uygulanan örneğinde kontrole göre hidroksil radikalinde bir artış olmamıştır. Bu sonuç, nikelin *T. barbuloides*’te aşırı bir oksidatif hasara sebep olmadığını ya da oluşan hidroksil radikallerini detoksifiye eden mekanizmanın iyi çalıştığının bir göstergesi olabilir.

4.4. Total Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Miktarı

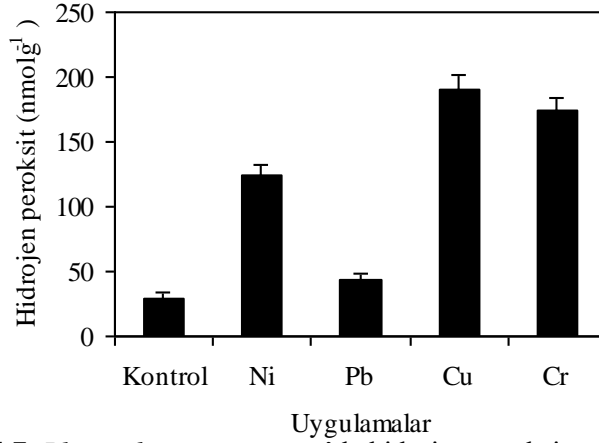
H₂O₂ radikali enzimatik olarak O₂'in iki elektron alarak indirgenmesiyle ya da O₂⁻ radikallerinin enzimatik veya non-enzimatik dismutasyonu sonucu oluşur. Hidrojen peroksitin bir oksidatif stres belirteci olduğu, uzun süreden beri bilinmektedir. *Pleurochaete squarrosa*'nın Pb uygulanan örneğinde H₂O₂ miktarında anlamlı bir değişim belirlenmezken, Cu uygulanan örneğinde 5 kat, Cr uygulanan örneğinde 4 kat ve Ni uygulanan örneğinde 3 kat arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.7). *T. barbulooides*'in Ni ve Pb uygulanan örneklerinde ise H₂O₂ miktarında anlamlı bir değişim belirlenmezken, Cu uygulanan örnekte % 43 ve Cr uygulanan örnekte % 35 arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.8) (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa* ve *Timmiella barbulooides*'in hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarları (nmolg⁻¹, Ortalama±S.E, n=3)

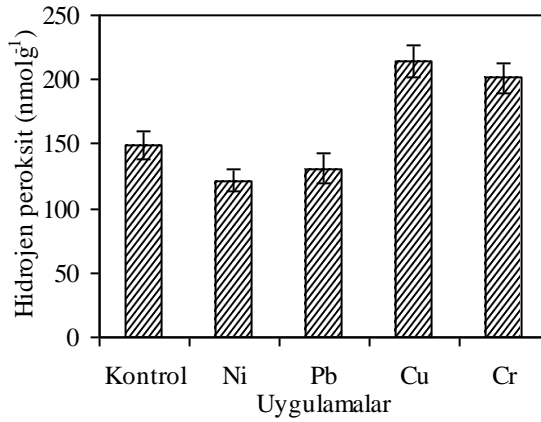
Uygulamalar	<i>Pleurochaete squarrosa</i>	<i>Timmiella barbulooides</i>
Kontrol	29.731 ± 4.14	148.494 ± 10.90
Ni	124.302 ± 8.02*	121.415 ± 8.58
Pb	42.756 ± 5.10	130.900 ± 11.54
Cu	189.869 ± 12.04**	213.649 ± 12.43*
Cr	173.649 ± 9.8**	201.144 ± 11.76*

* Kontrole göre p < 0,05 düzeyinde önemli farkı belirtmektedir.

**Kontrole göre p < 0,01 düzeyinde önemli farkı belirtmektedir.



Şekil 4.7. *Pleurochaete squarrosa*'da hidrojen peroksit miktarları



Şekil 4.8. *Timmiella barbulooides*'in hidrojen peroksit miktarları

Kendisi stabil bir bileşik olan H_2O_2 , zararlı etkisini hidroksil radikaline dönüşerek yapmaktadır. GPX, APX ve CAT gibi enzimler, H_2O_2 'in hızla yıkımını sağlayarak hücrede birikmesini önlerler. *P. squarrosa*'nın Pb uygulanan örneğinde H_2O_2 miktarında anlamlı bir değişimin olmaması denemelerin daha sonraki aşamalarında elde edilen H_2O_2 detoksifikasyonundan sorumlu APX enzim aktivitesindeki artışla paralellik göstermektedir.

T. barbulooides'in Ni ve Pb uygulanan örneklerinde H_2O_2 birikiminin olmaması, bu metallerin bu türde yüksek derecede bir toksiteye sebep olmayışlarının ya da

H₂O₂'nin detoksifiye edilmesini sağlayan mekanizmanın etkin çalıştığına bir göstergesi olabilir.

P. squarrosa ve *T. barbuloides*'te Cr stresi altında H₂O₂ miktarı önemli derecede artmıştır. Benzer şekilde bir biryofit türü *T. nepalense*'de 12 saat ve 24 saat süreyle Cr uygulamasından sonra H₂O₂ miktarının arttığı rapor edilmiştir (Choundry ve Panda, 2005). Her iki türün Cr uygulanan örneklerindeki H₂O₂ miktarının artması, H₂O₂ oluşumuna yol açan SOD enzim aktivitesinin artışı ve/veya krom stresi sonucu oluşan H₂O₂'i detoksifiye eden mekanizmanın yeterince etkin çalışmaması nedeniyle olabilir. Daha sonraki denemelerimizden elde edilen sonuçlara göre *P. squarrosa*'nın Cr uygulanan örneğindeki SOD enzim aktivitesinin artışı ve *T. barbuloides*'in Cr uygulanan örneğindeki H₂O₂ detoksifikasyonundan sorumlu POX aktivitesinin azalışı H₂O₂ birikimini açıklamaktadır.

Ayrıca her iki biryofit türünün Cu uygulanan örneklerinde H₂O₂'in aşırı birikimi belirlenmiştir. Bu artışın en önemli sebeplerinden biri olarak yine her iki türün Cu uygulanan örneklerindeki CAT aktivitesindeki azalma olduğunu söyleyenebilir.

4.5. Lipit Peroksidasyonu

Serbest radikallerin ilk hedefleri membran lipitlerindeki doymamış yağ asitleridir. Membranlardaki doymamış bağlar, serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyon oluştururlar (Kavas, 1990). Lipit peroksidasyonu, lipit hidroperoksidlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesiyle sona ermektedir. Bu bileşiklerden birisi olan malonildialdehit (MDA) miktarının ölçülmesi lipit peroksit düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. (Ohkawa vd., 1979). Bitki hücreleri için lipit peroksidasyonu sıkça kullanılan membran hasarını ortaya koyan bir stres indikatörüdür (Taulavuori vd., 2001).

Lipit peroksidasyonu, organizmada oluşan kuvvetli yükseltgen bir radikalin membran yapısında bulunan yağ asidi zincirindeki metilen gruplarından bir hidrojen atomu uzaklaştırılmasıyla başlamaktadır. Peroksidasyon membran akıcılığında ve reseptör sıralamasında bir kayba neden olarak hücrel lizis ile sonuçlanır (Kavas, 1990). Toksik düzeyde metal uygulanan bitkide, hücre membranlarında metal konsantrasyonunun artması nedeniyle serbest radikallerin oluşumu hızlanır ve bu da bitkide lipit peroksidasyonunu tetikler. Metal iyonları

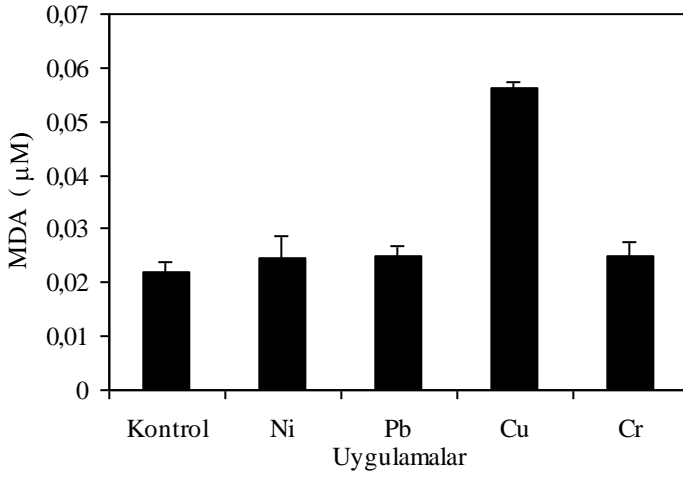
doğrudan lipit peroksidasyonunu arttırabildiği gibi, dolaylı olarak demir içeren bir enzim olan lipooksijenaz yoluyla da arttırabildiği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda bu membrana bağlı enzimin çoklu doymamış yağ asitlerini okside ederek serbest radikal oluşturduğu ve lipit peroksidasyonunu arttırdığı rapor edilmiştir (Mazhoudi vd, 1997).

Pleurochaete squarrosa ve *Timmiella barbuloides*'in Ni, Pb, Cr uygulanan örneklerinde ağır metal stresine bağlı olarak kontrole göre önemli oranda MDA oluşumu belirlenmezken, Cu uygulanan örneklerdeki MDA miktarlarının önemli derecede arttığı görülmüştür (Şekil 4.9, Şekil 4.10). Bu artışlar *P. squarrosa*'da kontrole göre % 155 olarak belirlenirken, *T. barbuloides*'te % 146 olarak belirlenmiştir. Her iki türde de diğer metaller (Ni, Pb, Cr) istatistiki önemde bir lipit peroksidasyonuna neden olmamıştır (Çizelge 4.5)

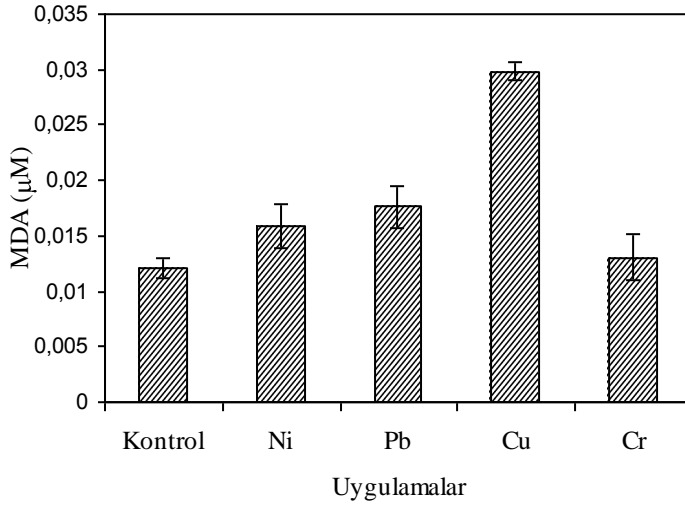
Çizelge 4.5. *Pleurochaete squarrosa* ve *Timmiella barbuloides*'de ağır metal stresi ile oluşan malonildialdehit miktarları (μM , Ortalama \pm S.E, n=3)

Uygulamalar	<i>Pleurochaete squarrosa</i>	<i>Timmiella barbuloides</i>
Kontrol	0.0219 \pm 0.0018	0.0121 \pm 0.0008
Ni	0.0246 \pm 0.0039	0.0158 \pm 0.0020
Pb	0.0250 \pm 0.0019	0.0175 \pm 0.0018
Cu	0.0560 \pm 0.0012**	0.0298 \pm 0.0008**
Cr	0.0251 \pm 0,0023	0.0130 \pm 0.0021

**Kontrole göre $p < 0.01$ düzeyinde anlamlı farkı belirtmektedir.



Şekil 4.9 *Pleurochaete squarrosa*'da ağır metal stresi sonucu oluşan MDA miktarları



Şekil 4.10. *Timmiella barbulooides*'de ağır metal stresi sonucu oluşan MDA miktarları

P. squarrosa ve *T. barbulooides*'te en yüksek MDA oluşumu Cu uygulanan örnekte görülmüştür. Benzer şekilde bir liken türü olan *Usnea amblyoclada* (Mll. Arg.) Zahlbr.'da Cu, Ni, Pb ve Zn etkisiyle oluşturulan ağır metal stresinde, en yüksek MDA birikiminin Cu uygulanan örnekte olduğu belirlenmiştir (Carreras ve

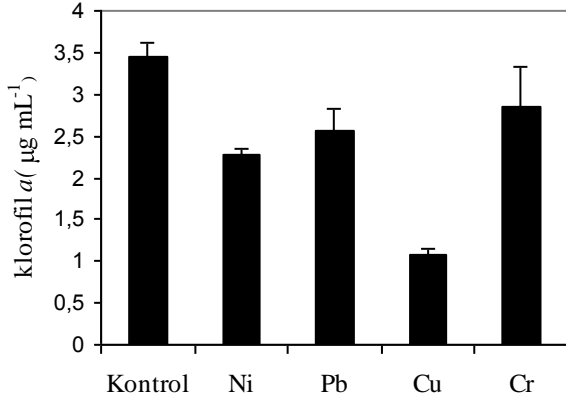
Pignata, 2007). Cu uygulanan örneklerde görülen artan lipit peroksidasyonu ve MDA birikimi bakırın sebep olduğu membran ve hücre hasarlarının diğer metallerden fazla olduğunu göstermektedir.

Hücre membranındaki ve intrasellüler membranlardaki lipit peroksidasyonu serbest radikallerin hepsiyle uyarılabildiği ve redoks katalisti olarak görev yapan demir ve bakır gibi geçiş metallerinin varlığında arttığı bildirilmiştir (Girotti, 1985). Bakırın; hidroksil, peroksil, ve alkoksil gibi zararlı serbest radikallerin oluşumunu katalizleyerek lipit peroksidasyonuna sebep olduğu Halliwell ve Gutteridge (1984) tarafından da rapor edilmiştir.

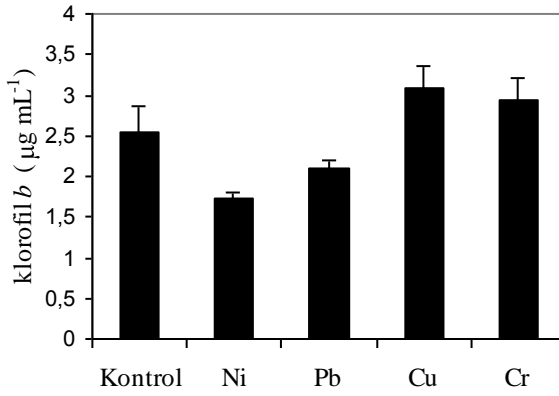
4.6. Fotosentetik Pigmentler

Çevresel stres faktörlerinin bitkiler üzerindeki etkilerini anlamak amacıyla sıkça başvurulan yollardan biri organizmadaki klorofil içeriğini belirlemektir. Bitkilerde klorofil içeriği fotosentez kapasitesini belirlemenin önemli bir göstergesidir. Ağır metallerin bitkilerdeki birçok prosesi etkilediği, özellikle fotosentez üzerine olan etkilerinin daha şiddetli olduğu belirtilmektedir (Foy vd., 1978; Kastori vd., 1992; Kastori vd., 1997). Metaller tarafından fotosentezin etkilenmesi ya metalin doğrudan fotosentez yoluna zarar vermesi, iyon dağılımını bozması ve fotosentezde görev alan enzim aktivitesini engellemesi ya da membran permabilitesi üzerine metalin yarattığı dolaylı etkinin yanıtı olarak oluşmaktadır (Heath, 1994). Metal etkisi ile bitkilerdeki fotosentezin inhibisyonunun, tilakoid membranın yapısal bütünlüğünün bozulması, elektron transportunun değişmesi ve klorofil pigmentlerinin bozulması sonucunda gerçekleştiği belirtilmektedir.

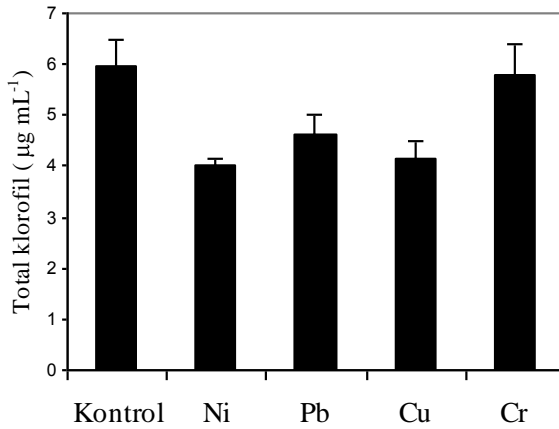
Denemelerimizde *Pleurochaete squarrosa*'nın ağır metal uygulanan örneklerinin kontrolleriyle kıyaslandığında fotosentetik pigment içeriklerinin genellikle azaldığı belirlenmiştir. *P. squarrosa*'nın Cu, Ni, Pb uygulanan örneklerinde klorofil *a* miktarının sırasıyla % 68, % 34, % 25 azaldığı (Şekil 4.11), klorofil *b* miktarının nikel Ni uygulanan örnekte % 32 azaldığı, Cu uygulanan örnekte % 22 arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.12). Total klorofil miktarının Ni uygulanan örnekte % 32, Cu uygulanan örnekte %30, Pb uygulanan örnekte % 22 azaldığı (Şekil 4.13), klorofil *a/b* oranının ise Cu uygulanan örnekte % 75 ve Cr uygulanan örnekte ise % 28 azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.14) (Çizelge 4.6) .



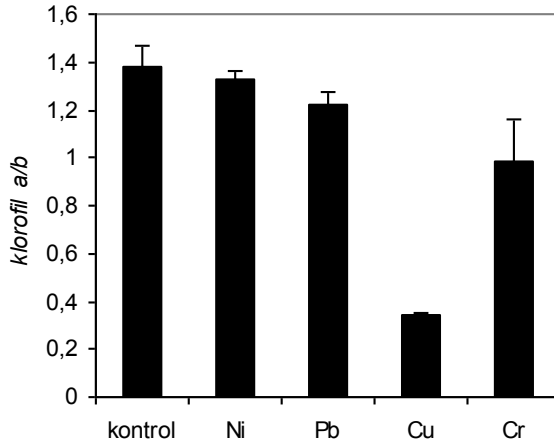
Şekil 4.11. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa*'da klorofil *a* miktarları



Şekil 4.12. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa*'da klorofil *b* miktarları

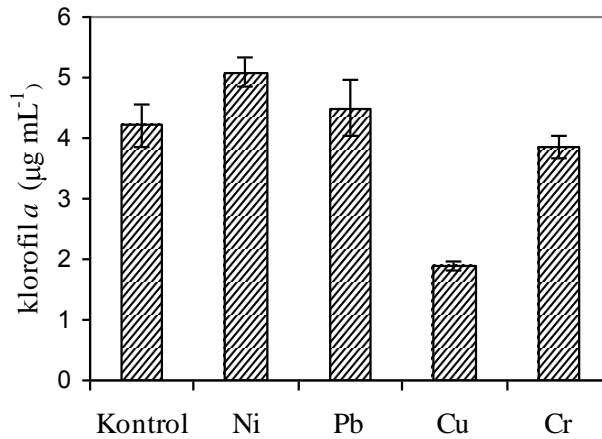


Şekil 4.13. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa*'da total klorofil miktarları

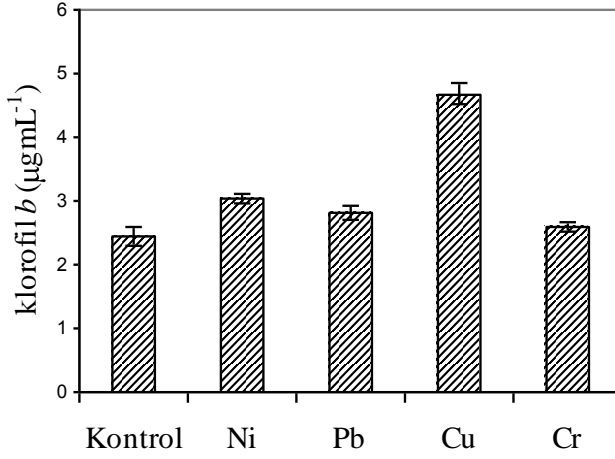


Şekil 4.14. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa*'da klorofil a/b oranları

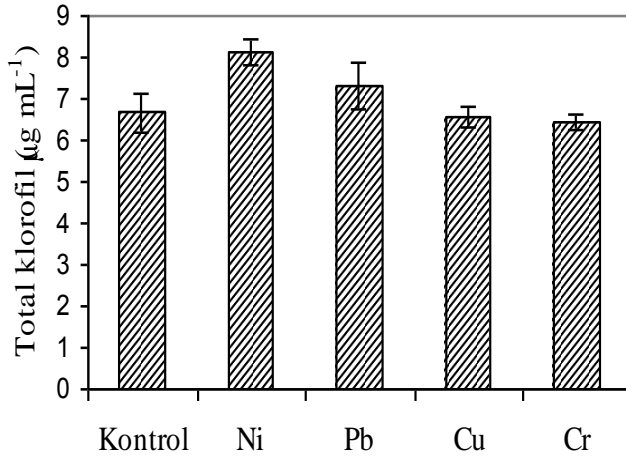
Timmiella barbulooides'in ağır metal uygulanan örneklerinin klorofil *a*, klorofil *b*, total klorofil, klorofil *a/b* oranlarında kontrole göre önemli değişiklikler olduğu belirlenmiştir. Klorofil *a* miktarının Cu uygulanan örnekte % 55 azaldığı belirlenirken, Ni uygulanan örnekte % 20 arttığı (Şekil 4.15), klorofil *b* miktarlarının Cu uygulanan örnekte % 90, Ni uygulanan örnekte ise % 20 arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.16). Total klorofil miktarının Ni uygulanan örnekte %21 arttığı (Şekil 4.17), klorofil *a/b* oranının Cu uygulanan örnekte %76 azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.18) (Çizelge 4.7)



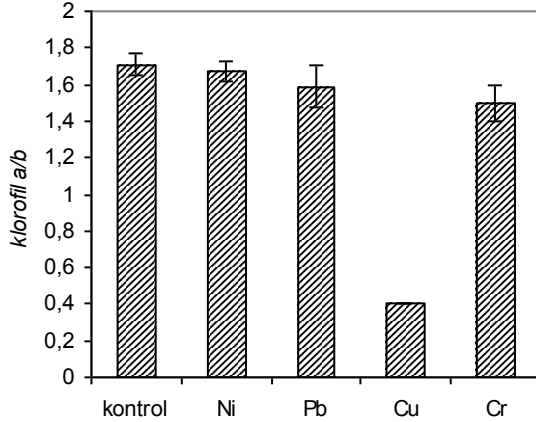
Şekil 4.15. Ağır metal stresi uygulanan *Timmiella barbulooides*'de klorofil *a* miktarları



Şekil 4.16. Ağır metal stresi uygulanan *Timmiella barbuloides*'de klorofil *b* miktarları



Şekil 4.17. Ağır metal stresi uygulanan *Timmiella barbuloides*'de total klorofil miktarları



Şekil 4.18. Ağır metal stresi uygulanan *Timmiella barbulooides*'de klorofil a/b oranları

Ağır metal stresinin klorofil *a*, klorofil *b* ve total klorofil içeriğini azalttığını gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Monni vd., 2001; Chettri vd., 1998; Öncel vd., 2000). Denemelerimizde *P. squarrosa*'da klorofil *a* miktarı Cu, Ni ve Pb etkisiyle azalırken, *T. barbulooides*'te sadece Cu etkisiyle azalmıştır. Ağır metallerin klorofil pigment biyosentezini ve bu süreçte görev yapan enzimleri inhibe ettiği rapor edilmiştir (De Fillippis ve Pallaghy, 1994). Her iki biryofit türünde de özellikle Cu uygulanan örneklerdeki klorofil *a* içeriği azalışının diğer metallerdeki azalışa göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde biryofit *Rhytidiadelphus squarrosus* 'da Cu, Zn ve Pb'un pigment miktarı üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada klorofil *a* miktarındaki azalmanın en çok Cu uygulamasında olduğu belirlenmiştir (Tremper vd., 2004). Bakırın kloroplast membranlarının peroksidasyonuna yol açarak, klorofil içeriğinde azalmaya neden olduğu bilinmektedir (Sandmann ve Boger, 1980). Çalıştığımız biryofit türlerinde yine bakırın uygulandığı örneklerde görülen yüksek MDA oluşumu klorofil miktarındaki azalmayı da açıklamaktadır. Ayrıca Cu uygulanan örneklerde görülen kuru ağırlık miktarlarındaki azalma da yine bu sonuçlarla paralellik göstermektedir. Klorofil floresens çalışmaları Cu'nun klorofil ve karotenoid sentezini inhibe ettiğini ve bu pigmentlerin fotosistemdeki görevlerini olumsuz etkilediğini ortaya koymaktadır (Caspı vd., 1999). Bakır stresi uygulanan bitkilerde görülen klorofil miktarındaki azalış, Cu'nun bitkiye verdiği hasarı gösteren parametrelerden biridir (Devi ve Prasad, 1998; Boswell vd., 2002). Cu etkisinde her iki biryofit türünde klorofil *a* miktarlarında meydana gelen bu azalma

klorofil biyosentez prosesinin bozulmasının, klorofil biyosentezinde görevli enzimlerin inhibe edilmesinin ya da klorofil parçalanmasının sonucu olabilir.

Klorofil *a* ve *b* molekülleri arasındaki fark, 2. pirol halkasının 3. karbon atomuna bağlanmış olan gruplardan kaynaklanır. Klorofil *a* 'nın 3. karbonuna metil (CH₃) grubu bağlanırken, klorofil *b*'nin 3. karbonuna aldehit grubu (CHO) bağlanmıştır. Bu farklılığa bağlı olarak bu moleküller çözünürlük ve ışığı absorbe etme yönünden birbirlerinden ayrılırlar. Metal stresi koşullarında klorofil *a* miktarındaki azalmaya karşın klorofil *b* miktarı artmaktadır; bu artış klorofil *a*'nın klorofil *b*'ye dönüşümünün indüklenmesi nedeniyle gerçekleşmektedir (Chettri vd., 1998). Klorofil *a*'nın ikinci halkasında bulunan metil grubu okside olur, bu da klorofil *b*'nin oluşmasına sebep olur. *P. squarrosa* ve *T. barbuloides*'te Cu uygulanan örnekte klorofil *a* miktarı azalırken klorofil *b* miktarının arttığı belirlenmiştir. Klorofil *b* miktarındaki bu yükseliş metal stresinden kaynaklanmaktadır. Böylece klorofil *a* ve paralel olarak klorofil *a/b* oranındaki azalma ağır metal toksitesinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Hartmut vd., 1990)

P. squarrosa'da total klorofil miktarının Ni, Cu ve Pb uygulanan örneklerde azaldığı belirlenmiştir. Sun vd. (2009), bir karayosunu olan *Hypnum plumaeforme*'de yaptıkları çalışmada da Pb ve Ni uygulamasından sonra total klorofil içeriğinde azalma gözlemiş ve bunun Ni ve Pb metal stresine bağlı lipid peroksidasyonunun sebep olduğu klorofil degradasyonu ve fotosentezin engellenmesi ile sonuçlanan bir tepki olduğunu belirtmişlerdir. Total klorofildeki azalış klorofil degradasyonu ve fotosentez inhibisyonuna sebep olan metallere özgü bir cevaptır (Bazzas vd., 1974).

T. barbuloides'te Ni uygulanan örnekte klorofil *a*, klorofil *b* ve total klorofilde meydana gelen artışlar *T. barbuloides*'te bu metalin klorofil degradasyonuna sebep olmadığına bir göstergesidir. Bu sonuç aynı zamanda *T. barbuloides*'in nikel toleransına da bir kanıt olarak gösterilebilir.

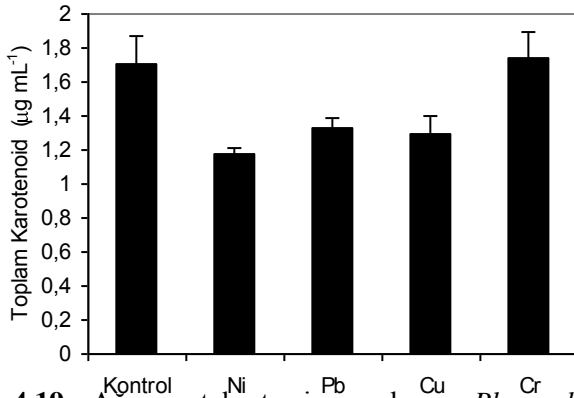
Klorofil *a/b* oranındaki değişimlerin Fotosistem I ve Fotosistem II arasındaki koşullardan etkilenme bakımından farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir (Keleş, 2000). Denememizde *P.squarrosa*'da klorofil *a/b* miktarının ise Cu uygulanan örnekte % 75 ve Cr uygulanan örnekte ise %28 azaldığı belirlenirken, *T. barbuloides*'in klorofil *a/b* oranının Cu uygulanan örnekte % 76 azaldığı belirlenmiştir. Metal etkisi ile klorofil *a/b* oranının azaldığı, stroma ve grana

lamellerinde yapısal bozuklukların meydana geldiği bilinmektedir (Chettri vd., 1998). *P. squarrosa*'nın Cu ve Cr uygulanan örneklerinde ve *T.barbuloides*'in Cu uygulanan örneğinde klorofil *a/b* oranında meydana gelen bu azalma metal stresine bağlı olarak ışık toplama kompleksinin azalması, tilakoid membranlarda meydana gelebilecek yapısal bozukluklar ve fotosistemler arası koordinasyonların bozulmasının göstergesi olabilir.

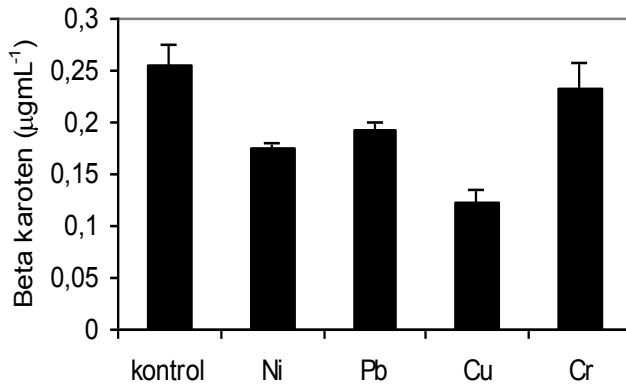
Karotenoidler ışığı toplayıcı pigmentlerdir ve stres koşullarında fotosentetik aygıtları koruyucu işlevleri vardır (Siefertmann-Harms, 1987). Ayrıca, fotosentetik sistemlerde karotenoidler (β - karoten ve ksantofiller) önemli antioksidan etkiye sahiptir (Halliwell, 1978; Larson, 1988). Karotenoidler; hem fotosentetik hem de fotosentetik olmayan bitki dokularındaki plastidlerde yerleşmiş bulunan tetraterpenler olup antioksidan özellikleriyle fotosistemleri koruyucu işlevlere sahiptirler. Kloroplast membranlarında lipit peroksidasyon ürünleri ile tepkimeye girerek zincir reaksiyonlarını bitirme özelliği karotenoidlerin en belirgin koruyucu işlevlerinden birisidir (Burton ve Ingold, 1984). Bunun dışında ışık reaksiyonları sırasında oluşan singlet oksijeni uzaklaştırma ve fazla enerjiyi ısı olarak dağıtma (Mathis ve Kleo, 1973) oksidatif hasarın ve fotoinhibisyonun azaltılmasında karotenoidlerin gerçekleştirdiği koruyucu bir rol olmaktadır. Benzer şekilde karotenoidler, kloroplastları ve fotosistemleri oksidatif hasardan singlet oksijenin oluşmasını önlemek üzere triplet ve uyarılmış klorofil molekülleri ile tepkiyerek de korumaktadırlar. Karotenoidlerin fotoinhibisyonu engelleyici etkisi özellikle, fazla eksitasyon enerjisinin ksantofil döngüsüne doğru dağıtmak (McKersie, 1996) şeklinde belirlemektedir.

Çeşitli stres faktörlerinin karotenoid birikimine neden oldukları rapor edilmiştir (Havaux ve Kloppstech, 2001). Bitkilerde ROT'un meydana getirdiği oksidatif hasarın fotosentetik kapasiteyi azaltmasına yönelik olarak kloroplastları koruyucu ve tamir edici mekanizmalar gelişir (Demming Adams ve Adams, 1992; Niyogi, 1999). Bu mekanizmalardan biri karotenoid miktarının artmasıdır. Bulgularımıza göre *T. barbuloides*'in toplam karotenoid miktarının Ni uygulanan örnekte % 21 arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.23). β -karoten miktarları Ni uygulanan örneğinde % 33 ve Pb uygulanan örneğinde % 25 artarken Cu uygulanan örneğinde ise % 37 azalmıştır (Şekil 4.24). Neoksantin miktarı Ni uygulanan örnekte % 20, Pb uygulanan örnekte % 15 artarken, Cu uygulanan örnekte % 22 azalmıştır. (Şekil 4.25) Lutein miktarı Ni uygulanan örnekte % 21 artmış, Cu uygulanan örnekte % 33 azalmıştır (Şekil 4.26) (Çizelge 4.7).

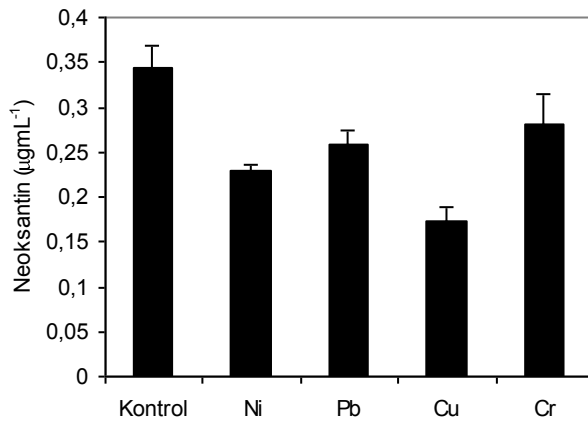
Stres faktörleri karotenoid birikimine neden olurken, stres sırasında klorofiller gibi karotenoid miktarında da azalma görülebilir (Munne-Bosch ve Penvelas, 2004). Denememizde toplam karotenoid miktarı *P. squarrosa*'nın toplam karotenoid miktarlarının Ni, Cu ve Pb uygulanan örneklerinde sırasıyla % 30, % 24, % 22 azalmış (Şekil 4.19), β -karoten miktarı ise Cu uygulanan örnekte % 52, Ni uygulanan örnekte % 32, Pb uygulanan örnekte % 24 oranında azalmıştır (Şekil 4.20). Neoksantin miktarı Cu uygulanan örnekte % 50, Ni uygulanan örnekte % 32, Pb uygulanan örnekte % 26 azaldığı belirlenirken (Şekil 4.21), lutein miktarının Cu uygulanan örnekte % 54, Ni uygulanan örnekte % 33 ve Pb uygulanan örnekte % 27 azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.22) (Çizelge 4.6). Karotenoidlerdeki azalmanın tilakoidlerde meydana gelen tekli oksijen miktarındaki artışla ilişkili olabileceğini bildiren çalışmalar (Munne-Bosch ve Penvelas, 2004, Choundry ve Behera, 2001), *T. barbulooides*'in Cu uygulanan örneğindeki azalmayı ve *P. squarrosa*'da ağır metal stresine bağlı karotenoid miktarındaki azalmayı açıklayabilir. Ayrıca, karotenoidlerin fotosentetik membranın devamlılığı ve korunması için önemli olduğu (Munne-Bosch ve Penvelas, 2004) her iki biryofite Cu uygulanan örneklerde görülen yüksek orandaki karotenoid kayıpları yine bu metal etkisiyle oluşan oksidatif strese bağlı lipid peroksidasyonu ile açıklanabilir.



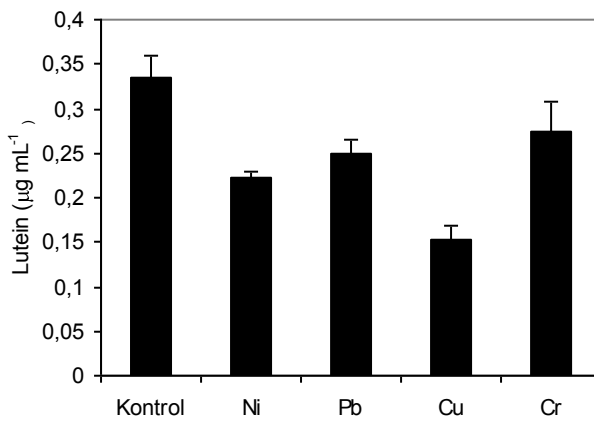
Şekil 4.19. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa*'da toplam karotenoid miktarları



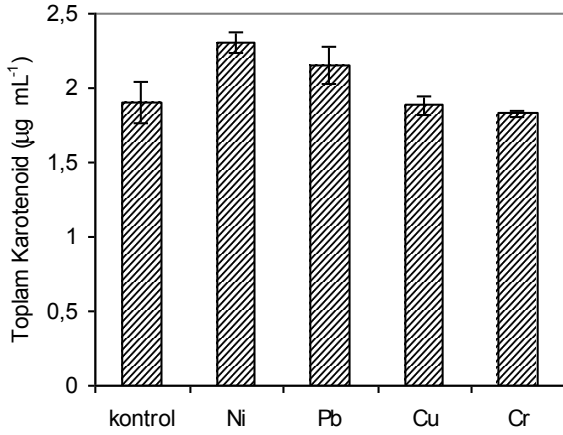
Şekil 4.20. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa*'da β karoten miktarları



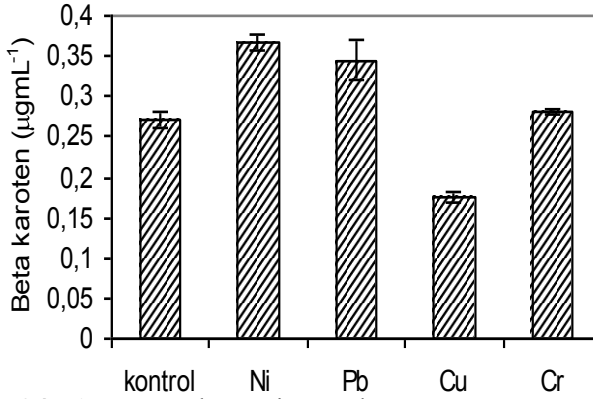
Şekil 4.21 Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa*'da neoksantin miktarları



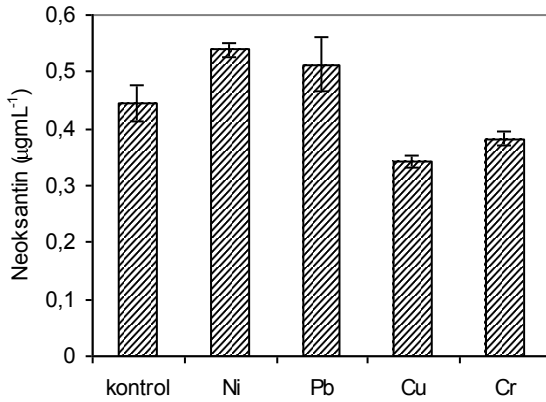
Şekil 4.22 Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa*'da lutein miktarları



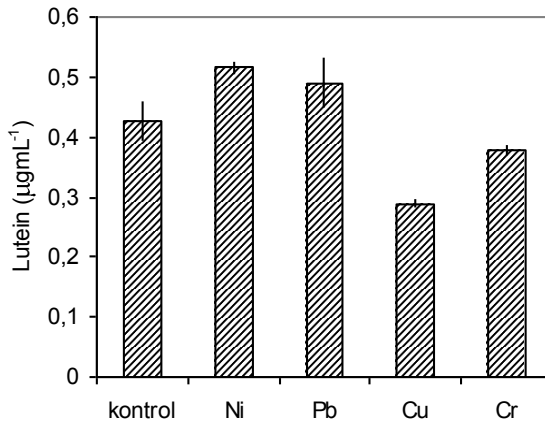
Şekil 4.23. Ağır metal stresi uygulanan *Timmiella barbuloides*'de toplam karotenoid miktarları



Şekil 4. 24. Ağır metal stresi uygulanan *Timmiella barbuloides*'de β-karoten miktarları



Şekil 4. 25. Ağır metal stresi uygulanan *Timmiella barbuloides*'de neoksantin miktarları



Şekil 4. 26. Ağır metal stresi uygulanan *Timmiella barbulooides*'de lutein miktarları

Çizelge 4.6. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa*'nın fotosentetik pigment miktarlarındaki değişimler

Pigment	Kontrol	Ni	Pb	Cu	Cr
Klorofil a	3.44 ± 0.18	2.27 ± 0.07**	2.55 ± 0.25*	1.07 ± 0.08**	2.84 ± 0.47
Klorofil b	2.53 ± 0.31	1.72 ± 0.08**	2.08 ± 0.11	3.09 ± 0.25*	2.93 ± 0.28
Total Klorofil	5.97 ± 0.50	4.00 ± 0.15**	4.64 ± 0.37*	4.16 ± 0.34**	5.77 ± 0.60
Klorofil a/b	1.37 ± 0.08	1.32 ± 0.03	1.21 ± 0.05	0.34 ± 0.03**	0.98 ± 0.17**
Karoten	1.70 ± 0.16	1.18 ± 0.02**	1.32 ± 0.06*	1.29 ± 0.11*	1.74 ± 0.15
β- karoten	0.25 ± 0,02	0.17 ± 0.03**	0.19 ± 0.08**	0.12 ± 0.01**	0.23 ± 0.02
Lutein	0.33 ± 0.02	0.22 ± 0.06**	0.24 ± 0.01*	0.15 ± 0.01**	0.27 ± 0.03
Neoksantin	0.34 ± 0.02	0.23 ± 0.05**	0.25 ± 0.01*	0.17 ± 0.01**	0.28 ± 0.03

* Kontrolle göre p < 0,05 düzeyinde önemli farkı belirtmektedir.

**Kontrolle göre p < 0,01 düzeyinde önemli farkı belirtmektedir.

Çizelge 4.7. Ağır metal stresi uygulanan *Timmiella barbuloides*'in fotosentetik pigment miktarlarındaki değişimler

Pigmentler	Kontrol	Ni	Pb	Cu	Cr
Klorofil a	4.20 ± 0.35	5.08	± 4.49 ± 0.45	1.89	± 3.86 ± 0.18
Klorofil b	2.45 ± 0.14	3.03	± 2.81 ± 0.10	4.67	± 2.58 ± 0.07
Total klorofil	6.65 ± 0.49	8.11	± 7.30 ± 0.54	6.56 ± 0.25	6.45 ± 0.17
Klorofil a/b	1.71 ± 0.05	1.67 ± 0.05	1.58 ± 0.11	0.40	± 1.49 ± 0.09
Karoten	1.90 ± 0.13	2.30	± 2.15 ± 0.12	1.88 ± 0.06	1.83 ± 0.02
β- karoten	0.27 ± 0.01	0.36	± 0.34	± 0.17	± 0.27 ±
Lutein	0.42 ± 0.03	0.51	± 0.49 ± 0.04	0.28	± 0.37 ± 0.01
Neoksantin	0.44 ± 0.03	0.53	± 0.51	± 0.34	± 0.38 ± 0.01

* Kontrolle göre $p < 0.05$ düzeyinde önemli farkı belirtmektedir.

**Kontrolle göre $p < 0.01$ düzeyinde önemli farkı belirtmektedir.

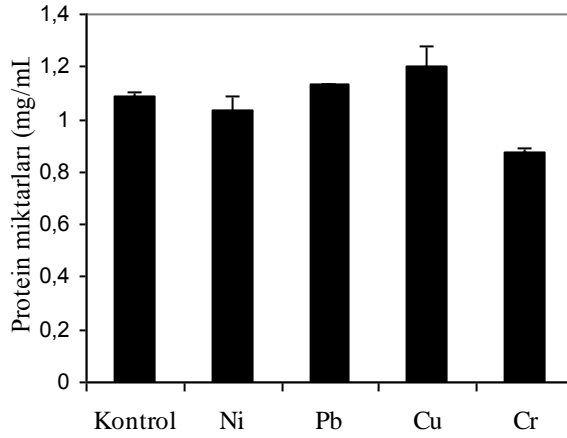
4.7. Protein Miktarları

Ağır metaller hücrelerdeki biyolojik makromoleküllerin göreceli miktarlarında değişikliğe neden olabilmektedirler (Stevenson vd., 1996). Çözünebilir protein miktarları incelendiğinde, *Pleurochaete squarrosa*'nın Ni, Pb ve Cu uygulanan örneklerinde kontrole göre anlamlı bir değişim görülmezken; Cr uygulanan örneğinde % 19 oranında azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.27). *Timmiella barbuloides*'in Cr uygulanan örneğinde % 23 ve Ni uygulanan örneğinde % 22 arttığı ve Cu uygulanan örneğinde ise % 22 oranında azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.28) (Çizelge 4.8)

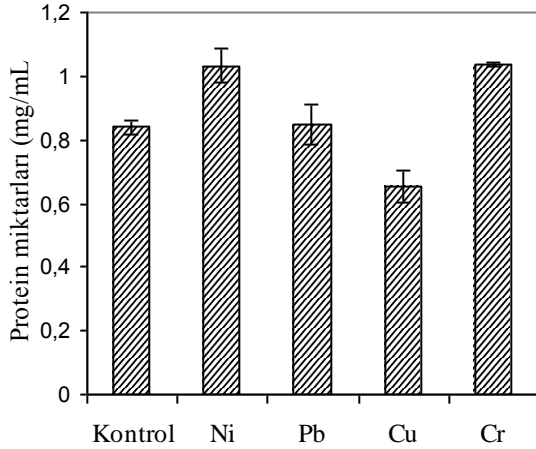
Çizelge 4.8. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa* ve *Timmiella barbuloides*'te çözünebilir protein miktarları (mg/mL, Ortalama±S.H,n=3)

Uygulamalar	<i>Pleurochaete squarrosa</i>	<i>Timmiella barbuloides</i>
Kontrol	1.087 ± 0.015	0.839 ± 0.022
Ni	1.038 ± 0.047	1.031 ± 0.054**
Pb	1.133 ± 0.020	0.849 ± 0.062
Cu	1.204 ± 0.075	0.653 ± 0.050**
Cr	0.878 ± 0.011**	1.035 ± 0.007**

**Kontrole göre p < 0.01 düzeyinde önemli farkı belirtmektedir



Şekil 4.27. Ağır metal stresi uygulanan *P. squarrosa*'da çözünebilir protein miktarları



Şekil 4.28. Ağır metal stresi uygulanan *Timmiella barbuloides*'de çözünebilir protein miktarları

T. barbuloides'te protein miktarında meydana gelen artış ağır metal stresine karşı dayanıklı olma ile ilişkili olarak metallotiyonein (Garcia-Hernandez vd., 1998), tiyoredoksinler (Lemaire vd., 1999), glutatyon metabolizmasının proteinleri (Xiang ve Oliver, 1998), antioksidant enzimler (Cho ve Park., 2000) ve sıcaklık şoku proteinleri (Didierjean vd.,1996) gibi ağır metal teşvikli genlerin ürettiği proteinlerin artmasına bağlı olarak gözlenebileceği daha önceki çalışmalarla ortaya konulmuştur. Ayrıca çözünebilir protein artışı, strese bağlı olarak gelişen savunma mekanizmasının bir sonucu olan antioksidan enzim ve stres proteinlerinin yeniden sentezinin artmasından da kaynaklanabilir.

Yüksek metal konsantrasyonları, fotosentez, solunum ve biyolojik moleküllerin sentezi gibi biyokimyasal ve fizyolojik prosesleri kontrol eden enzim sistemleri üzerine önemli toksik etkilere neden olmaktadır (Rai vd., 1981) *P. squarrosa*'da Cr ile muamele edilmiş örnekte görülen protein miktarındaki azalma ise Cr metalinin toksik etkisinden kaynaklanabilir. Ağır metal ve tuz streslerinde bitkide protein azalmasının nedenleri arasında genellikle, yeni protein sentezinin inhibisyonu ya da oksidatif stresle üretilen ROT'ların tetiklediği proteolizis sonucu olabileceği çeşitli çalışmalarla rapor edilmiştir (Solomon vd., 1999; Parida vd., 2004). Krom etkisinde bitkilerdeki protein azalması, çoğunlukla düşük nitrat redüktaz aktivitesine bağlanmaktadır; çünkü bu enzim aktivitesindeki azalmanın bitkilerde protein biyosentezini inhibe ettiği bilinmektedir (Solomanson ve Barber, 1990). *P. squarrosa*'daki protein içeriğinin krom etkisinde azalması gen düzeyinde

transkripsiyon ya da translokasyon aşamasındaki hasarlardan da ileri gelebilir. Hücre içinde Cr'un DNA'nın fosfat gruplarına bağlandığı ve böylece DNA replikasyonunu ve transkripsiyonu etkilediği çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (Nishio ve Uyeki, 1985; Bridgewater vd, 1994).

4.8. Süperoksit Dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) Aktivitesi

Süperoksit dismutaz, intraselüler ve ekstraselüler membranlarda bulunan lipitlerin reaktif oksijen türlerinden biri olan süperoksit radikalının zararlı etkilerinden korunmasından sorumlu önemli bir antioksidan enzimdir. Ayrıca süperoksit dismutaz süperoksit anyonlarının detoksifikasyonu için anahtar bir enzimdir. Bu nedenle enzim aktivitesindeki değişimler oksidatif strese bir cevap olarak kabul edilir.

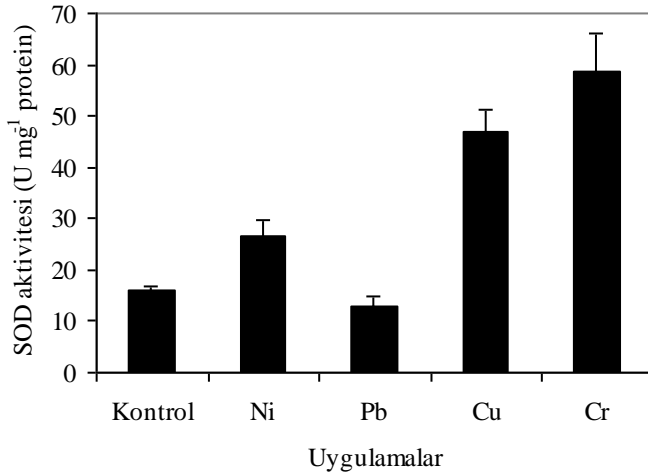
Pleurochaete squarrosa'nın Ni ve Pb uygulanan örneklerinde SOD enzim aktivitesinde kontrole göre anlamlı bir değişim belirlenmezken, Cr ve Cu uygulanan örneklerinde sırasıyla % 268 ve % 194 oranında arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.29). *Timmiella barbuloides*'in ise Ni, Pb ve Cu uygulanan örneklerinde SOD enzim aktivitesinde kontrole göre anlamlı bir değişim belirlenmezken, Cr uygulanan örneğinde kontrole göre % 52 oranında azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.30) (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa* ve *Timmiella barbuloides*'te SOD enzim spesifik aktiviteleri (Umg^{-1} protein, Ortalama \pm S.H,n=3)

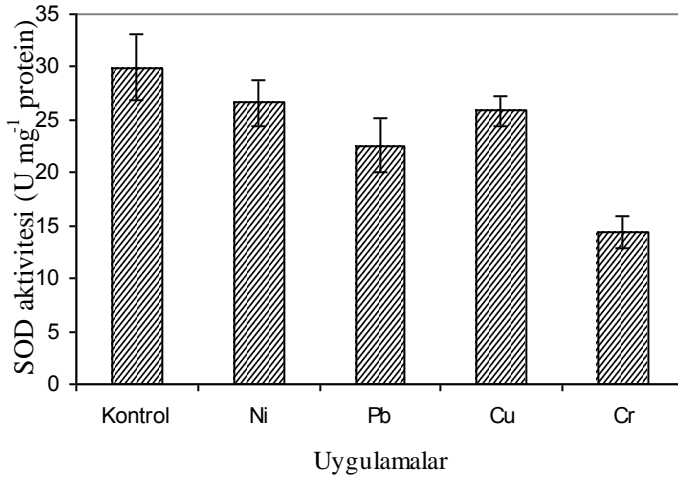
Uygulamalar	<i>Pleurochaete squarrosa</i>	<i>Timmiella barbuloides</i>
Kontrol	15.932 \pm 1.03	29.925 \pm 3.13
Ni	26.563 \pm 3.17	26.630 \pm 2.21
Pb	12.933 \pm 1.73	22.573 \pm 2.52
Cu	46.863 \pm 4.51**	25.881 \pm 1.45
Cr	58.703 \pm 7.21**	14.330 \pm 1.55*

*Kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde önemli farkı belirtmektedir

**Kontrole göre $p < 0,01$ düzeyinde önemli farkı belirtmektedir.



Şekil 4.29. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa*'daki SOD enzim spesifik aktiviteleri



Şekil 4.30. Ağır metal stresi uygulanan *Timmiella barbulooides*'de SOD enzim spesifik aktiviteleri

P. squarrosa'nın Cr ve Cu uygulanan örneklerinde SOD aktivitesi önemli derecede artmıştır. Benzer şekilde, bir karayosunu olan *Taxithelium nepalense*'de yapılan çalışmada SOD aktivitesinin 12 saat Cr uygulamasından sonra arttığı rapor edilmiştir (Choundry ve Panda, 2005). Sucul bir biryofit türü *Fontinalis antipyretica* Hedw. ise Cu uygulamasından sonra SOD aktivitesinde kontrole göre önemli artış olduğu belirtilmiştir (Dazy vd., 2009). Stres durumunda, bitkilerin bir

yada birkaç antioksidant enziminin aktivitesi artmaktadır. Strese cevap olarak süperoksit dismutaz aktivitesindeki artış enzimatik proteinin *de novo* sentezlenmesine bağlıdır (Lozano vd.,1996). SOD aktivitesindeki bu artış Cu'n ve Cr'un serbest radikal oluşumunda önemli bir rol oynadığının dolaylı kanıtı olabilir. Metal fitotoksitesin oksidatif strese neden olduğu (Gallego vd., 1996; Cuypers vd, 1999; Clijsters vd. 1999) ve bitkilerdeki süperoksit dismutaz aktivitesindeki artışın, oluşan oksidatif hasardan korumayı desteklediği yapılan çeşitli çalışmalarla rapor edilmiştir (Scebba vd., 2006; Mobin ve Khan, 2007).

T. barbuloides'in Ni, Pb ve Cu uygulanan örneklerinde SOD enzim aktivitesinde kontrole göre anlamlı bir değişim belirlenmezken, Cr uygulanan örneğinde kontrole göre % 52 oranında azaldığı belirlenmiştir. SOD aktivitesindeki bu azalma Cr uygulamasında H₂O₂'in fazladan artışından kaynaklanabileceği gibi, ağır metallerin enzimlerdeki sülfidril grupları ile olası etkileşimini sonucu enzimin olmasından kaynaklanabilir .

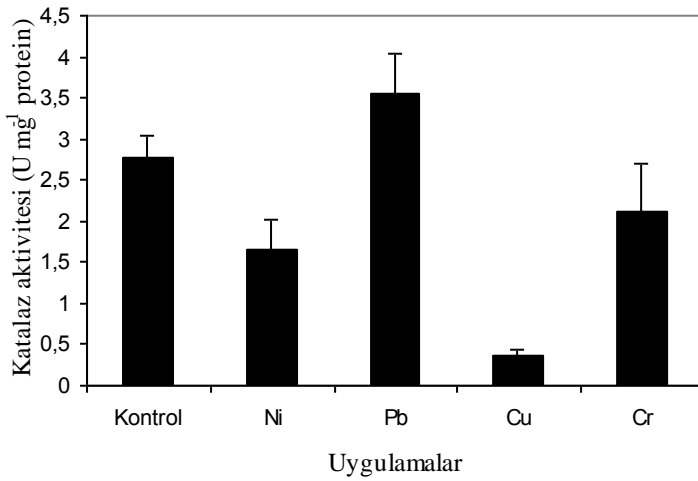
4.9. Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) Aktivitesi

Katalaz; hidrojen peroksidin su ve oksijene dismutasyonunu katalizleyen bir enzimdir. *P. squarrosa* ve *T. barbuloides*'in Ni, Pb ve Cr uygulanan örneklerinde CAT aktivitesinde kontrole göre anlamlı bir değişim görülmezken, bu enzim aktivitesinin Cu uygulanan örneklerinde önemli derecede azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.31, Şekil 4.32). *P. squarrosa*' da bu azalma kontrole göre % 87 iken, *T. barbuloides*'de % 79 oranında gerçekleşmiştir (Çizelge 4.10).

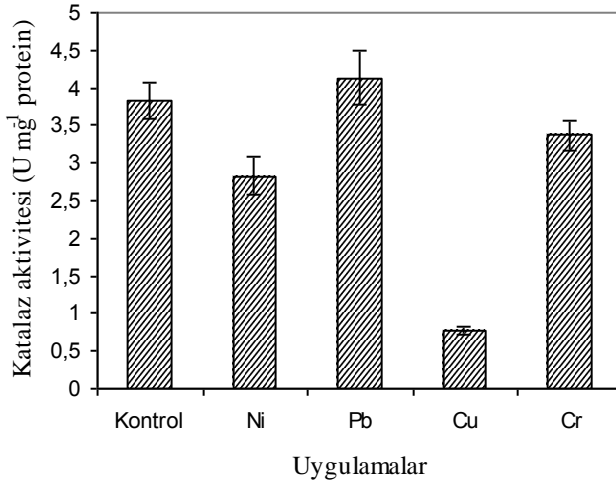
Çizelge 4.10. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa* ve *Timmiella barbuloides*'te CAT enzim spesifik aktiviteleri (Umg⁻¹protein, Ortalama±S.H,n=3)

Uygulamalar	<i>Pleurochaete squarrosa</i>	<i>Timmiella barbuloides</i>
Kontrol	2.766 ± 0.27	3.829 ± 0.22
Ni	1.644 ± 0.36	2.828 ± 0.24
Pb	3.544 ± 0.48	4.128± 0.35
Cu	0.356 ± 0.08**	0.774 ± 0.06**
Cr	2.121 ± 0.57	3.372 ± 0.19

**Kontrole göre p < 0.01 düzeyinde önemli farkı belirtmektedir.



Şekil 4.31 Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa*'da CAT enzim spesifik aktiviteleri



Şekil 4.32. Ağır metal stresi uygulanan *Timmia barbuloidea*'de CAT enzim spesifik aktiviteleri

Ağır metal iyonlarının katalazın yarışmalı olmayan inhibitörleri gibi davranabildiği bilinmektedir. Bir biryofit olan *Taxithelium nepalense*'de 24 saat 100 µM Pb ve Cr uygulamasından sonra katalaz aktivitesinin azaldığını rapor edilmiştir (Choudry ve Panda, 2005). Yine kurşun stresine maruz bırakılan başka biryofit türleri *Hypnum plumaeforme*, *Thuidium cymbifolium* ve *Brachythecium piligerum* ve nikel stresine maruz bırakılan *Thuidium cymbifolium* ve *Brachythecium piligerum* da CAT aktivitesinde azalma belirlenmiştir (Sun vd., 2011).

P. squarrosa ve *T. barbuloidea*'in Cu uygulanan örneklerinde, CAT aktivitesinde önemli derecede azalma belirlenmiştir. Bakır, redoks aktif metal olduğu için yüksek konsantrasyonları bitkide oksidatif hasara yol açmaktadır (Schützendübel ve Polle, 2002). Yüksek bakır konsantrasyonlarının serbest radikallerin oluşumuna ve membran lipidlerin oksidatif hasarına yol açtığı, H₂O₂ yıkımı için hücre savunma mekanizmalarını inhibe ettiği çeşitli çalışmalarda da rapor edilmiştir (Sandmann ve Boger 1980). CAT molekülü Fe⁺² içerir. Cu⁺², Pb⁺² ve Ni⁺² gibi metaller Fe ile kolayca yer değiştirerek CAT aktivitesini inaktive eder (Pandey ve Sharma, 2002), veya bu metaller CAT biyosentezini inhibe ederler (Ogawa vd., 1997). Enzim yapısını ve aktivitesini değiştiren bu metal enzim komplekslerinin CAT aktivitesinde azalışa neden olduğu çeşitli çalışmalarda da gösterilmiştir (Foyer vd., 1994; Mohan ve Hosetti, 1997). *P. squarrosa* ve *T. barbuloidea*'in Cu uygulanan örneklerinde CAT aktivitesinde meydana gelen azalma, literatür

bilgisini destekler niteliktedir. Her iki biryofit türünde de bakırın, CAT biyosentezini engelleyerek veya metal enzim kompleksi oluşturarak enzim aktivitesini inhibe ettiği belirlenmiştir. Daha önceki denemelerde elde ettiğimiz sonuca göre, bakır uygulanan örneklerdeki yüksek derecedeki H₂O₂ birikimi CAT aktivitesindeki bu azalışla açıklanabilir.

4.10. Peroksidaz (POX; E.C.1.11.1.7) Aktivitesi

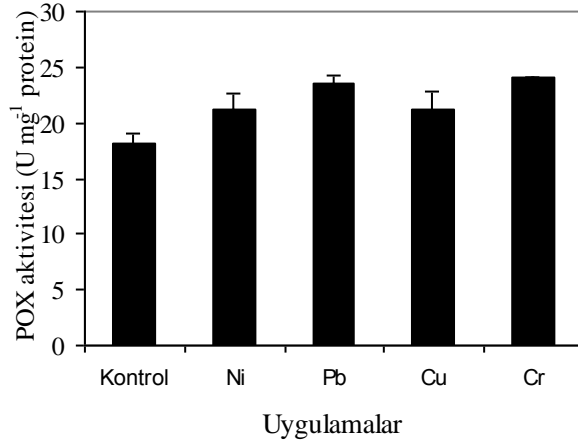
H₂O₂ yıkımının diğer bir yolu, H₂O₂'ye CAT'dan daha yüksek afiniteye sahip olan peroksidazlar yolu ile gerçekleştirilir. Peroksidaz aktivitesi sonuçları incelendiğinde, katalazın aksine *P. squarrosa*'nın metal uygulanan bütün örneklerinde (Ni, Pb, Cu, Cr) PO enzim aktivitesinin kontrole göre arttığı görülmüştür (Şekil 4.33) (Çizelge 4.11). Bu artışlar kontrole göre Cr uygulanan örnekte % 32, Pb uygulanan örnekte % 28, Cu uygulanan örnekte % 16 ve Ni uygulanan örnekte % 15 olarak belirlenmiştir. *T. barbuloides*'in ise Ni, Pb ve Cu uygulanan örneklerinde kontrole göre anlamlı bir değişim görülmezken, Cr uygulanan örneğinde % 26 azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.34) (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa* ve *Timmiella barbuloides*'te POX enzim spesifik aktiviteleri (U mg⁻¹ protein, Ortalama±S.H, n=3)

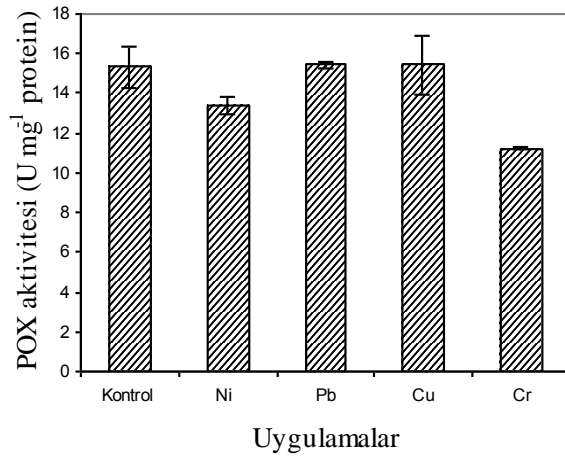
Uygulamalar	<i>Pleurochaete squarrosa</i>	<i>Timmiella barbuloides</i>
Kontrol	18.204 ± 0.82	15.324 ± 1.003
Ni	21.109 ± 1.51*	13.346 ± 0.43
Pb	23.455 ± 0.85**	15.457 ± 0.14
Cu	21.216 ± 1.57*	15.441 ± 0.50
Cr	24.128 ± 0.012**	11.236 ± 0.04**

* Kontrole göre p < 0,05 düzeyinde önemli farkı belirtmektedir

**Kontrole göre p < 0,01 düzeyinde önemli farkı belirtmektedir.



Şekil 4.33. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa*'da POX enzim spesifik aktiviteyi



Şekil 4. 34. Ağır metal stresi uygulanan *Timmiella barbulooides*'de POX enzim spesifik aktiviteyi

P. squarrosa'nın metal (Ni, Pb, Cu, Cr) uygulanan bütün örneklerinde POX enzim aktivitesinin kontrole göre arttığı görülmüştür. Peroksidazın bu induksiyonu metallerin toksik miktarlarına maruz kalan yüksek bitkilerin de verdiği bir tepkidir (Gajewska vd., 2006; Verma ve Dubey, 2003; Liu vd., 2009; Zacchini vd., 2003). *P. squarrosa*'da meydana gelen POX aktiviteindeki artış bu enzimin H₂O₂'nin detoksifikasyonundaki önemli rolünü ortaya koymaktadır. Ni ve Pb toksik konsantrasyonlarına karşı POX aktivitesinde artış meydana gelmesi *Hypnum*

plumaeforme, *Thuidium cymbifolium* ve *Brachythecium piligerum* gibi diğerk biryofitlerde de rapor edilmiştir (Sun vd., 2011). Peroksidazların bitkilerde stres enzimi olarak rolü yaygın olarak kabul edilmiştir ve peroksidaz aktivitesinin metal toksisitesi uygulanan bitkilerde potansiyel biomarker olarak kullanılabileceğı belirtilmiştir.

T. barbuloides'in Cr uygulanan örneğinde POX aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir. Benzer şekilde biryofit türü olan *Taxithelium nepalense*'de POX aktivitesi 12 saat 1000 µM Cr uygulamasından sonra azaldığı belirlenmiştir (Choundry ve Panda, 2005). POX enzim aktivitesindeki bu azalmanın Cr iyonlarının enzim aktivitesini azaltıcı veya inhibe edici etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

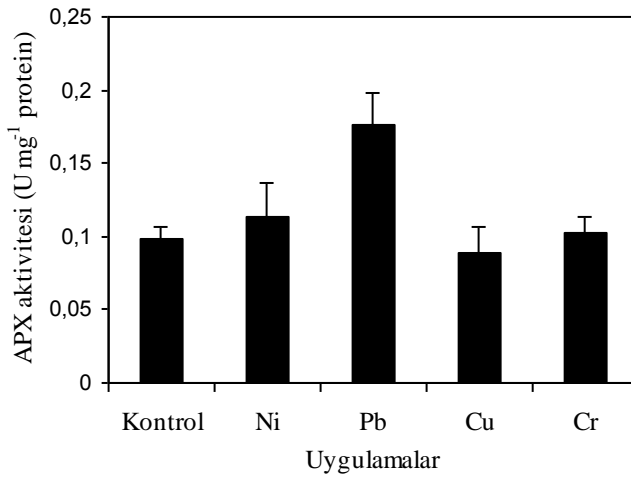
4.11. Askorbat Peroksidaz (APX, EC 1.1.1.11) Aktivitesi

H₂O₂'yi ortadan kaldıran askorbat-glutasyon döngüsündeki enzimler bitkilerde yüksek aktiviteye sahiptir. Bu yoldaki ilk adım, H₂O₂ detoksifikasyonunda en önemli rolü oynayan askorbat peroksidazdır. Denemelerimizde *P.squarrosa*'nın Ni, Cu, Cr uygulanan örneklerinde APX aktivitesinin kontrole göre değişmediğı belirlenirken, Pb uygulanan örnekte % 79 oranında arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.35) (Çizelge 4.12). *T. barbuloides*'de ise metal uygulanan hiçbir örnekte kontrole göre anlamlı bir değişim belirlenmemiştir (Şekil 4.36).

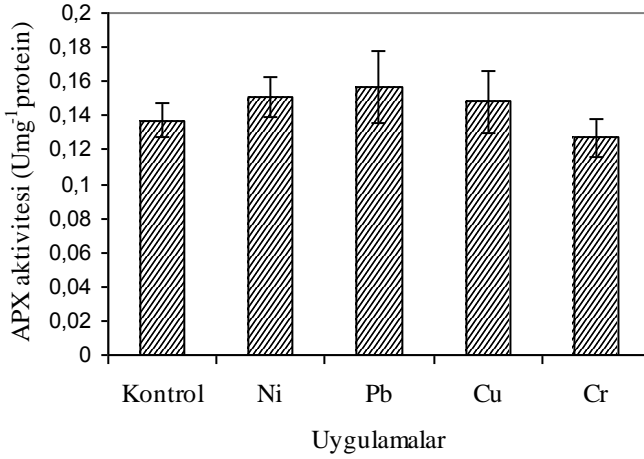
Çizelge 4.12. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa* ve *Timmiella barbuloides*'te APX enzim spesifik aktiviteleri (U mg⁻¹ protein, Ortalama±S.H,n=3)

Uygulamalar	<i>Pleurochaete squarrosa</i>	<i>Timmiella barbuloides</i>
Kontrol	0.098 ± 0.009	0.137 ± 0.010
Ni	0.114 ± 0.022	0.151 ± 0.012
Pb	0.176 ± 0.021*	0.157 ± 0.020
Cu	0.089 ± 0.018	0.148 ± 0.018
Cr	0.102 ± 0.011	0.127 ± 0.011

* Kontrolle göre p < 0,05 düzeyinde önemli farkı belirtmektedir.



Şekil 4.35. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa*'da APX enzim spesifik aktiviteleri



Şekil 4.36. Ağır metal stresi uygulanan *Timmiella barbuloides*'de APX spesifik enzim aktiviteleeri

Askorbat peroksidaz, H_2O_2 'in askorbat ile suya indirgenmesini katalizler (Porcel, 2003). Askorbat peroksidazın kloroplastta, sitoplazmada, mitokondri ve peroksizom membranlarında H_2O_2 'in ortadan kaldırılmasında rol oynadığı bilinmektedir (Del Rio vd., 2002). Askorbat peroksidazın aynı zamanda organel membranlarında bulunduğunu ve buradaki H_2O_2 'i membranlarda parçalayarak sitoplazmik H_2O_2 düzeyinin artmasını önlediği ve bu yolla gerek membranların gerekse hücrelerin bozulmasını inhibe ettiği bilinmektedir.

Denemelerimizde *P. squarrosa*'nın Ni, Cu, Cr uygulanan örneklerinde APX aktivitesinin kontrole göre değişmediği belirlenirken, Pb uygulanan örnekte % 79 oranında bir arttığı belirlenmiştir. Daha önceki denemelerde belirlenen, *P. squarrosa*'nın Pb uygulanan örneğinde H_2O_2 birikiminin olmaması artan APX aktivitesiyle açıklanabilir.

APX aktivitesi incelendiğinde, kontrole göre, *T. barbuloides*'in metal uygulanan örneklerinde anlamlı bir değişim belirlenmemiştir. *T. barbuloides*'te, Ni ve Pb uygulanan örneklerde H_2O_2 birikiminin olmaması mevcut APX ve CAT aktivitesinin H_2O_2 'nun detoksifikasyonunda etkili olduğunun ya da bu metallerin hücreyi aşırı strese sokacak bir oksidatif hasarı tetiklemediğinin göstergesi de olabilir.

4.12. Glutatyon Redüktaz (GR, EC 1.6.4.2) Aktivitesi

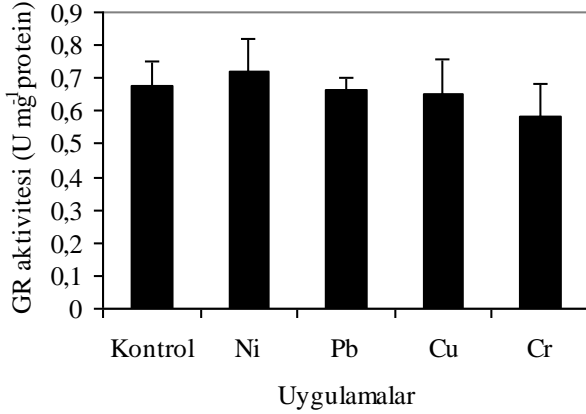
Askorbat-glutatyon döngüsünün bir enzimi olan glutatyon redüktaza ilişkin aktivite sonuçları incelendiğinde; *P. squarrosa*'nın metal uygulanan örneklerinde GR enzim aktivitesinde kontrole göre önemli bir değişim belirlenmezken (Şekil 4.37), *T. barbuloides*'in Ni, Pb, Cu uygulanan örneklerinde GR aktivitesinin önemli derecede arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.38). Bu artışlar kontrole kıyaslandığında; Cu uygulanan örnekte % 107 oranında iken, Ni uygulanan örnekte % 67 ve Pb uygulanan örnekte % 61 oranında gerçekleştiği belirlenmiştir. (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa* ve *Timmiella barbuloides*'te GR enzim spesifik aktiviteleri (U mg⁻¹ protein, Ortalama±S.H,n=3)

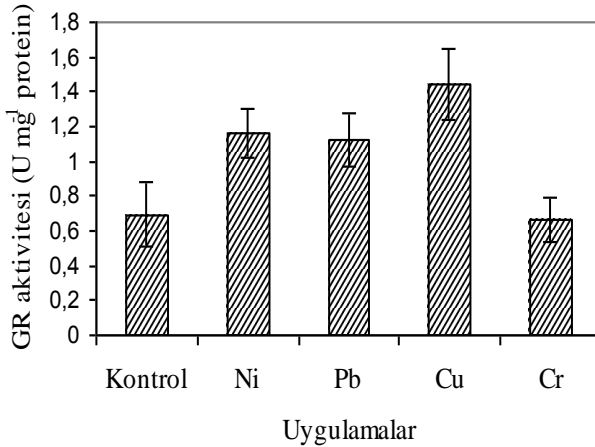
Uygulamalar	<i>Pleurochaete squarrosa</i>	<i>Timmiella barbuloides</i>
Kontrol	0.674 ± 0.076	0.694 ± 0.180
Ni	0.718 ± 0.102	1.161 ± 0.145*
Pb	0.662 ± 0.038	1.124 ± 0.153*
Cu	0.651 ± 0.106	1.443 ± 0.207**
Cr	0.583 ± 0.102	0.665 ± 0.129

* Kontrole göre p < 0,05 düzeyinde önemli farkı belirtmektedir.

**Kontrole göre p < 0,01 düzeyinde önemli farkı belirtmektedir.



Şekil 4.37. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa*'da GR enzim spesifik aktiviteleri



Şekil 4.38. Ağır metal stresi uygulanan *Timmiella barbulooides*'de GR spesifik enzim aktiviteleri

Hücrel GSH düzeyleri, GSH'ın sentezi ve yıkımı arasında kararlı bir durum dengesini yansıtmaktadır. GSH sentezi, *de novo* sentez yoluyla yapıldığı gibi GR enziminin katalizlediği GSSG'den GSH rejenerasyonu yoluyla da gerçekleşmektedir. İkinci reaksiyon, *de novo* senteze göre kantitatif olarak daha fazla ön plana çıkmaktadır. GR normal koşullarda total GSH havuzunu baskın olarak redükte formda tutar. Yüksek düzeydeki oksidatif stres durumunda özellikle GR aktivitesinin azalması sonucunda GSH dengesi GSSG düzeyleri lehine hızlı bir şekilde değişmektedir (Griffith, 1999). Normal hücrelerde GSH'ın GSSG'ye oranı (GSH/GSSG) oldukça yüksektir, bu nedenle hücrede oluşan GSSG'nin

yeniden GSH'a indirgenmesi zorunluluğu vardır. Bu indirgenme olayı GR enziminin aktivitesi ile sağlanmaktadır.

P. squarrosa'nın metal uygulanan örneklerinin GR enzim aktivitesinde kontrole göre önemli bir değişim belirlenmemesi, daha sonraki denemelerimizde belirlediğimiz Pb, Ni ve Cr'de meydana gelen GSSG birikimi ile paralellik göstermektedir. *Timmiella barbuloides*'in Ni, Pb, Cu uygulanan örneklerinde GR aktivitesi önemli derecede artmıştır. GR aktivitesinde meydana gelen bu artışlar, *Timmiella barbuloides*'in Cu, Ni ve Pb stresi ile oluşan oksidatif hasarı bertaraf etmek için GSSG'ü GSH'a dönüştürme potansiyelini ortaya koymaktadır.

4.13. Askorbat Miktarları

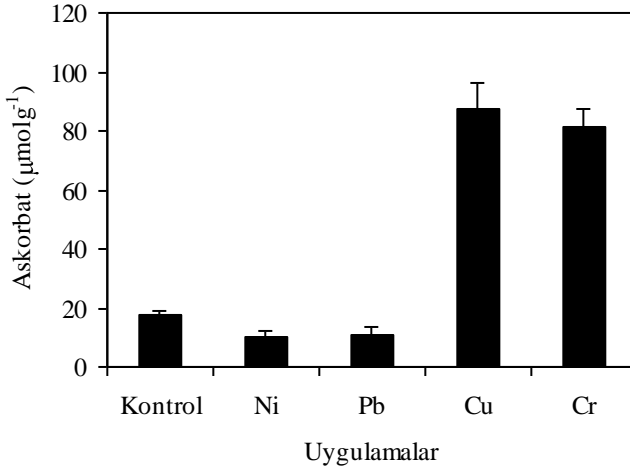
Askorbat, serbest radikalleri indirgeyerek oksidatif stresin neden olduğu hasarı azaltan önemli bir antioksidandır. Hidrojen peroksitin düşük konsantrasyonlarına bile çok duyarlı olması nedeniyle, kloroplastlardaki H₂O₂ detoksifikasyonu açısından son derece önemlidir. *P.squarrosa* ve *T.barbuloides*'in Ni ve Pb uygulanan örneklerinde askorbat miktarının kontrole göre azaldığı belirlenirken, Cu ve Cr uygulanan örneklerinde önemli derecede arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.39- 4.40). *P. squarrosa*'da askorbat miktarındaki bu azalma Ni uygulanan örnekte % 42, Pb uygulanan örnekte % 37 oranında iken, *T. barbuloides*'te azalma sırasıyla % 29 ve % 36 olarak gerçekleşmiştir. *P. squarrosa*'nın Cu uygulanan örneğinde, askorbat miktarındaki artış % 397 iken, Cr uygulanan örneğinde % 360 oranında bulunmuştur. *T. barbuloides*'te ise askorbat miktarı Cu uygulanan örnekte % 348, Cr uygulanan örnekte % 179 oranında artmıştır (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa* ve *Timmiella barbuloides*'te askorbat miktarları ($\mu\text{mol g}^{-1}$, Ortalama \pm S.H, n=3)

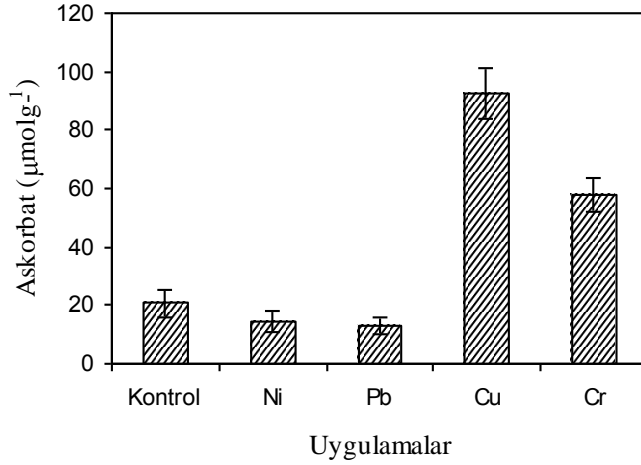
Uygulamalar	<i>Pleurochaete squarrosa</i>	<i>Timmiella barbuloides</i>
Kontrol	17.61 \pm 1.52	20.63 \pm 4.37
Ni	10.05 \pm 2.32*	14.59 \pm 3.5*
Pb	11.06 \pm 2.6*	13.07 \pm 2.68*
Cu	87.68 \pm 8.6**	92.50 \pm 8.42**
Cr	81.11 \pm 6.57**	57.68 \pm 5.59**

* Kontrole göre $p < 0.05$ düzeyinde önemli farkı belirtmektedir.

**Kontrole göre $p < 0.01$ düzeyinde önemli farkı belirtmektedir.



Şekil 4.39. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa*'da askorbat miktarları



Şekil 4.40 Ağır metal stresi uygulanan *Timmiella barbulooides*'de askorbat miktarları

Bitkide stres durumunda oluşan serbest radikallerden süperoksit, kendiliğinden olan bir dizmutasyonla ya da SOD enzimi aracılığıyla hidrojen peroksit dönüşmektedir (Asada, 1992). Oluşan hidrojen peroksit askorbat ya da askorbat peroksidad enzimi aracılığıyla etkisiz hale getirilmektedir. Böylece askorbik asitin monodehidroaskorbat (MDHA) ve dehidroaskorbat (DHA) formları oluşmaktadır. Monodehidroaskorbat (MDHA), NADH bağımlı monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) ile, dehidroaskorbat (DHA) ise GSH'a bağımlı dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) tarafından tekrar indirgenmiş askorbik aside dönüştürülmektedir. Bu yolla muhtemelen Fenton reaksiyonuna katılacak olan hidrojen peroksidin detoksifikasyonu sağlanmaktadır. Askorbatın elverişsiz çevresel koşulların meydana getirdiği oksidatif strese toleransın artmasıyla ilişkili olduğunu bildiren çeşitli çalışmalar rapor edilmiştir (Iturbe-Ormaetxe vd., 1998; Caretto vd., 2002)

P. squarrosa ve *T. barbulooides*, Cu ve Cr uygulanan örneklerinde askorbatın önemli derecede arttığı belirlenmiştir. Benzer şekilde *Taxithelium nepalense*'de 12 saat ve 24 saat Cr uygulamasından sonra bitkilerin askorbat miktarlarında önemli artışlar meydana geldiği kaydedilmiştir (Choundry ve Panda, 2005). Ayrıca Shanker (2003) Cr stresinin bitkilerde askorbat ve glutatyonun üretimini arttırdığını belirtmiştir. *P. squarrosa* ve *T. barbulooides*'te Cu ve Cr uygulaması ile askorbat miktarında meydana gelen artış, yoğun metal stresine karşı, antioksidant savunma mekanizmasının bir elemanı olan askorbik asidin daha etkin işlev görebilmesi

için, DHA redüktaz veya MDHA redüktaz gibi enzimlerin aktivitelerinin artması sonucu, oksideaskorbik asidin daha etkin (hızlı) bir şekilde indirgenmesiyle (rejenerasyonu) sağlanmış olabilir.

4.14. Glutasyon Miktarları

Hücrelerdeki redoks sistemi oksidasyon ile redüksiyon arasındaki dengeyi gösterir. Glutasyon tampon sistemi hücresel redoks değişimini düzenler. Bu sistem transkripsiyonel aktivasyon içeren hücresel metabolik süreçlerin çoğunun düzenlenmesinde önemlidir. Hücrelerde aerobik metabolizma sırasında sürekli olarak ROT üretildiği için hücresel redoks durumu hücre yaşamının korunmasında önemlidir (Jefferies vd, 2003). Oksidatif stres koşulları altında ROT, GSH tarafından indirgenirken, GSH okside glutatyona (GSSG)'a yükseltgenmektedir. Spontan oksidasyona karşı nispeten dirençli olmasına karşın, GSH OH⁻ ile çok hızlı ve enzimatik olmayan yolla reaksiyon vermektedir. Bir kimyasal antioksidant olmasının yanında GSH, peroksitlerin glutasyon peroksidaz (GPX) aracılığıyla enzimatik olarak indirgenmesini sağlar ve bu reaksiyon sonunda GSSG meydana gelir. Normal fizyolojik koşullar altında GSSG, GR tarafından GSH'a indirgenir ve bu şekilde bir redoks döngüsü meydana gelir. Hücrenin indirgeme kapasitesi yetersiz kaldığında GSH/GSSG oranında azalmalar meydana gelir. İntrasellüler GSSG miktarı bir oksidatif stres indikatörü olarak değerlendirilirken, GSH/GSSG oranı hücresel redoks durumu hakkında bilgi sağlamaktadır (Cnubben vd., 2001).

P. squarrosa'nın Pb ve Cr, *T. barbuloides*'in Ni ve Cr uygulanan örnekleri kontrolleriyle kıyaslandığında total glutasyon miktarlarında önemli derecede artışlar belirlenmiştir (Şekil 4.41, Şekil 4.42). Total glutasyon miktarı *P. squarrosa*'nın Pb uygulanan örneğinde % 34 ve Cr uygulanan örneğinde % 32 artarken, *T. barbuloides*'in Ni uygulanan örneğinde % 63, Cr uygulanan örneğinde % 41 oranında artmıştır (Çizelge 4.15).

P. squarrosa'nın metal uygulanan örneklerinin GSSG miktarları kontrolle kıyaslandığında, Pb uygulanan örneğinde %106, Ni uygulanan örneğinde % 80 ve Cr uygulanan örneğinde % 63 oranında arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.43). *T. barbuloides*'in ise yalnız Ni uygulanan örneğinde, GSSG miktarının % 82 oranında arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.44) (Çizelge 4.16).

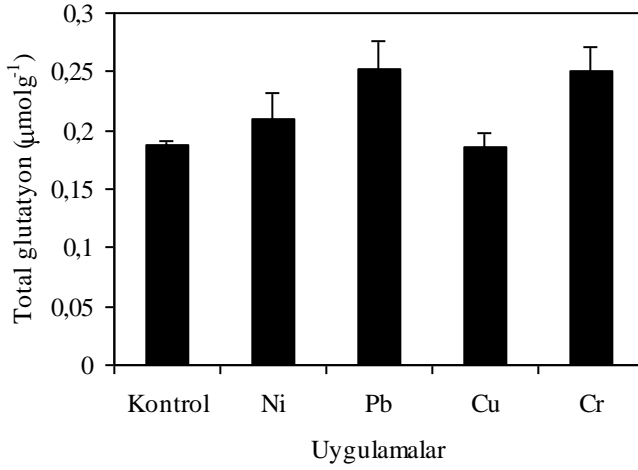
P. squarrosa'nın metal uygulanan örneklerinin indirgenmiş glutatyon (GSH) miktarları kontrolle kıyaslandığında Cu uygulanan örneğinde % 40, Pb uygulanan örneğinde % 39 ve Ni uygulanan örneğinde % 36 oranında azalma belirlenmiştir (Şekil 4.45). *P. squarrosa*'da glutatyon redüktaz (GR) enziminde artış meydana gelmemesi indirgenmiş glutatyon (GSH) miktarında meydana gelen azalmayı ve GSSG miktarındaki artmayı açıklamaktadır. GSSG'yi GSH'a dönüştürmekte görevli bu enzimin aktivitesinin değişmemesi hücredeki okside GSSG miktarı artmasına ve GSH miktarının azalmasına sebep olmuştur. *T. barbuloides*'in Cu uygulanan örneğinde GSH miktarında % 59 oranında artış görülmüştür (Şekil 4.46) (Çizelge 4.17). *T. barbuloides*'in Cu uygulanan örneğinde glutatyon miktarının artması enzimatik olmayan bir antioksidan olan bu molekülün ROT detoksifikasyonuna aktif katılımını gösterebilir. Bitkinin, Cu uygulanan örneğinde GSSG'nin GSH'a dönüşümünden sorumlu GR enzim aktivitesinin artışı Cu'da görülen GSH artışına paralellik göstermektedir.

Çizelge 4.15. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa* ve *Timmiella barbuloides*'te total glutatyon miktarları (μmolg^{-1} , Ortalama \pm S.H, n=3)

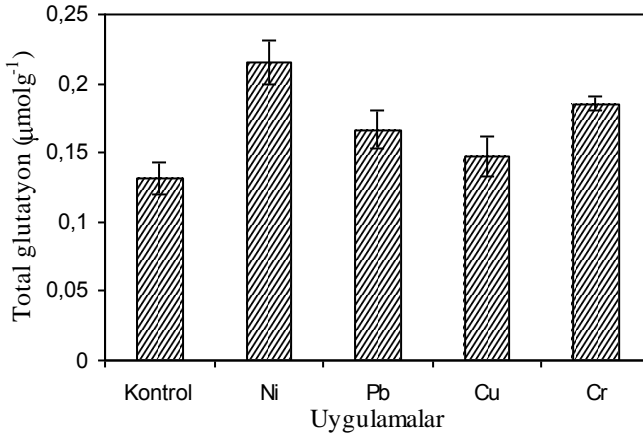
Uygulamalar	<i>Pleurochaete squarrosa</i>	<i>Timmiella barbuloides</i>
Kontrol	0.188 \pm 0.003	0.131 \pm 0.011
Ni	0.210 \pm 0.021	0.214 \pm 0.015**
Pb	0.252 \pm 0.024*	0.166 \pm 0.013
Cu	0.185 \pm 0.012	0.147 \pm 0.014
Cr	0.250 \pm 0.020*	0.185 \pm 0.004*

* Kontrolle göre $p < 0.05$ düzeyinde önemli farkı belirtmektedir.

**Kontrolle göre $p < 0.01$ düzeyinde önemli farkı belirtmektedir.



Şekil 4.41. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa*'da total glutatyon miktarları



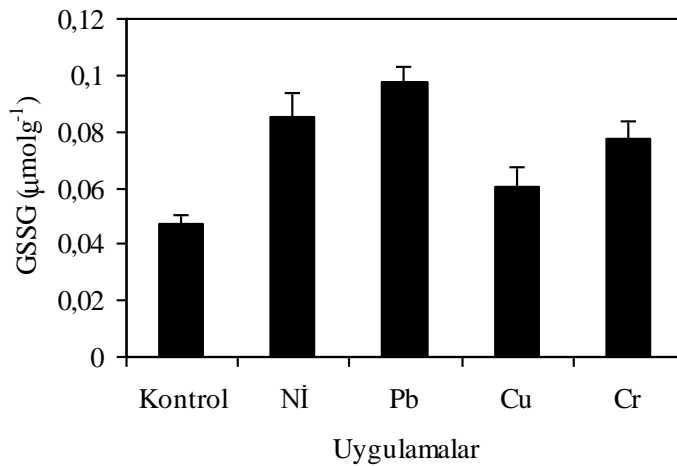
Şekil 4.42. Ağır metal stresi uygulanan *Timmiella barbulooides*'de total glutatyon miktarları

Çizelge 4.16. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa* ve *Timmiella barbuloides*'te okside glutasyon (GSSG) miktarları(μmolg^{-1} , Ortalama \pm S.H, n=3)

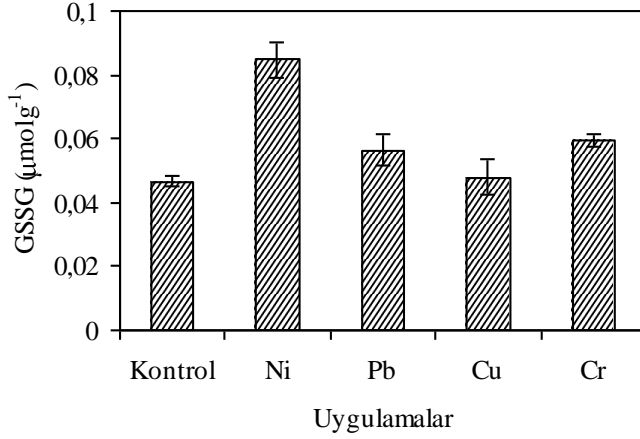
Uygulamalar	<i>Pleurochaete squarrosa</i>	<i>Timmiella barbuloides</i>
Kontrol	0.047 \pm 0.003	0.046 \pm 0.001
Ni	0.085 \pm 0.008**	0.084 \pm 0.005**
Pb	0.097 \pm 0.005**	0.056 \pm 0.004
Cu	0.060 \pm 0.007	0.047 \pm 0.005
Cr	0.077 \pm 0.006*	0.062 \pm 0.002

* Kontrolle göre $p < 0.05$ düzeyinde önemli farkı belirtmektedir.

**Kontrolle göre $p < 0.01$ düzeyinde önemli farkı belirtmektedir.



Şekil 4.43. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa*'da GSSG miktarları

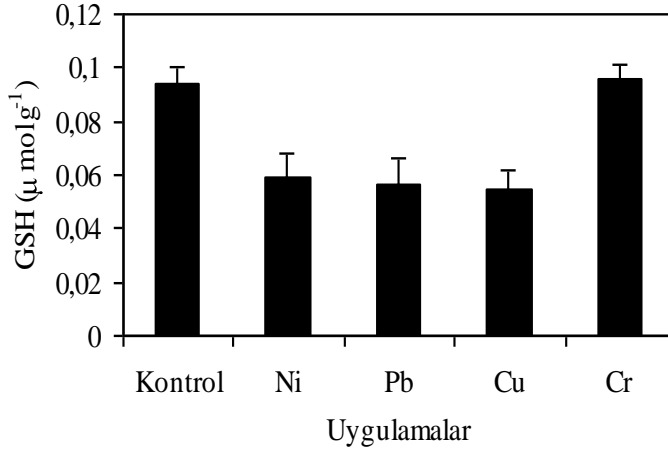


Şekil 4.44. Ağır metal stresi uygulanan *Timmiella barbulooides*'de GSSG miktarları

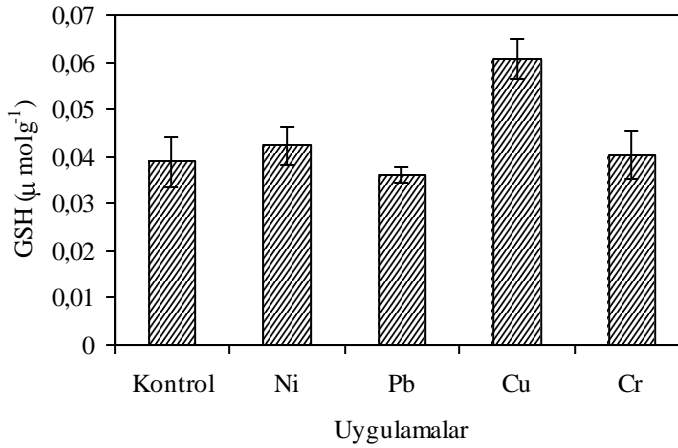
Çizelge 4.17. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa* ve *Timmiella barbulooides*'te indirgenmiş (GSH) miktarları (µmol g⁻¹, Ortalama±S.H, n=3)

Uygulamalar	<i>Pleurochaete squarrosa</i>	<i>Timmiella barbulooides</i>
Kontrol	0.093 ± 0.006	0.038 ± 0.005
Ni	0.059 ± 0.008**	0.042 ± 0.003
Pb	0.056 ± 0.009**	0.036 ± 0.001
Cu	0.055 ± 0.007**	0.0605 ± 0.004**
Cr	0.096 ± 0.004	0.040 ± 0.005

**Kontrole göre p < 0,01 düzeyinde önemli farkı belirtmektedir.



Şekil 4.45. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa*'da GSH miktarları



Şekil 4.46. Ağır metal stresi uygulanan *Timmiella barbuloides*'de GSH miktarları

4.15. Prolin Miktarları

Prolin birikimi stres cevabını etkileyen, stres sinyalinin bir parçası olabilmektedir (Ashraf., 2007). *P. squarrosa*'da prolin miktarları kontrolle kıyaslandığında Ni ve Pb uygulanan örneklerde önemli bir değişim belirlenmezken, Cu uygulanan örnekte % 82 oranında, Cr uygulanan örnekte ise % 36 oranında azalma belirlenmiştir (Şekil 4.47). *T. barbuloides*'in Ni ve Pb uygulanan örneğinde prolin miktarı kontrole göre sırasıyla % 81 ve % 57 arttığı belirlenirken, Cu ve Cr

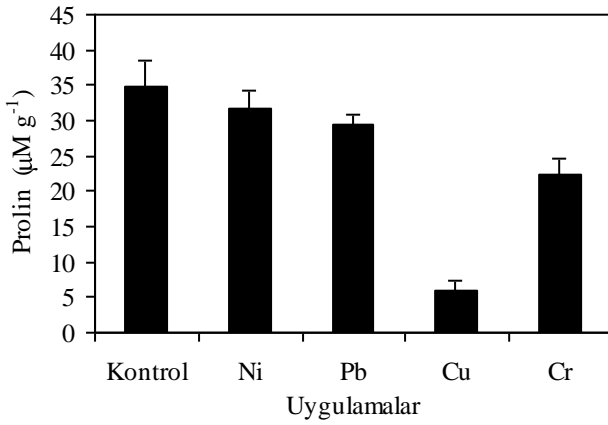
uygulanan örneklerinde anlamlı bir değişim ölçülmemiştir (Şekil 4.48) (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.18. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa* ve *Timmiella barbuloides*'te prolin miktarları ($\mu\text{M g}^{-1}$, Ortalama \pm S.H, n=3)

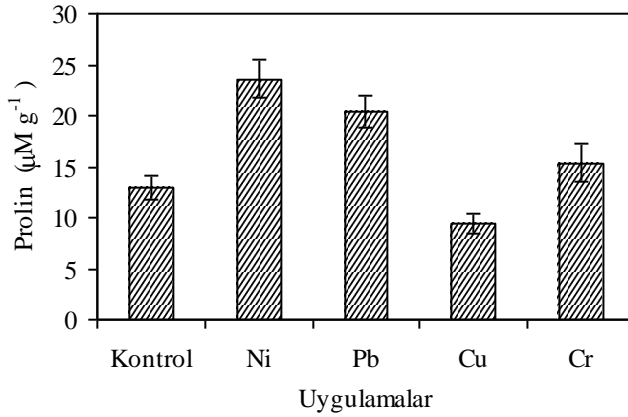
Uygulamalar	<i>Pleurochaete squarrosa</i>	<i>Timmiella barbuloides</i>
Kontrol	34.888 \pm 3.57	12.975 \pm 1.18
Ni	31.811 \pm 2.47	23.608 \pm 1.80**
Pb	29.372 \pm 1.55	20.436 \pm 1.51**
Cu	5.939 \pm 1.45**	9.457 \pm 0.93
Cr	22.259 \pm 2.34*	15.3 \pm 1.86

* Kontrolle göre $p < 0.05$ düzeyinde önemli farkı belirtmektedir.

**Kontrolle göre $p < 0.01$ düzeyinde önemli farkı belirtmektedir.



Şekil 4.47. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa*'da prolin miktarları



Şekil 4.48. Ağır metal stresi uygulanan *Timmiella barbuloides*'de prolin miktarları

Prolin, Cr gibi birçok ağır metal stresine cevap olarak bitki dokularında yüksek miktarlarda birikmektedir (Vernay vd., 2008, Ganesh, 2009). Bitkilerde prolin birikiminin tuzluluk, kuraklık, yüksek sıcaklık, düşük sıcaklık, ağır metal, patojen enfeksiyonu, besin kıtlığı, atmosferik kirlenme ve UV ışınım gibi stres durumlarında genellikle arttığı bildirilmiştir (Vernay vd., 2008; Verbruggen ve Hermans, 2008; Demirevska vd., 2010). *T. barbuloides*'in Ni ve Pb uygulanan örneklerinde prolin miktarının kontrole göre arttığı belirlenirken, Cu ve Cr uygulanan örneklerinde anlamlı bir değişim olmamıştır. *T. barbuloides*'in Ni ve Pb uygulanan örneklerindeki prolin artışı bu metallerin bitkideki detoksifikasyonları ile ilgilidir. Ağır metal stresine bağlı olarak prolin miktarının arttığı çeşitli biryofit türlerinde de rapor edilmiştir (Sun vd., 2011)

Pleurochaete squarrosa'nın prolin miktarları kontrole kıyaslandığında Ni ve Pb uygulanan örneklerde kontrole göre bir değişim belirlenmezken, Cu ve Cr uygulanan örneğinde azalmıştır. Xing vd., (2010), sucul bir bitki olan *Spirodela polyrrihiza*'nin maruz kaldığı Fe ve Cu konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak prolin içeriğinin azaldığını belirtmişlerdir. Aşırı metal uygulamasının hücre içi prolin içeriğini düşürdüğü yapılan çeşitli çalışmalarla rapor edilmiştir (Alia and Pardha, 1991; Bassi and Sharma, 1993; Sinha and Saxena, 2006). *P. squarrosa*'nın Cu ve Cr uygulanan örneklerindeki prolin miktarındaki azalma prolin degradasyonu, biyosentezinin inhibisyonu veya prolin kullanımındaki artıştan da kaynaklanabilir.

4.16. Antiradikal Aktivite

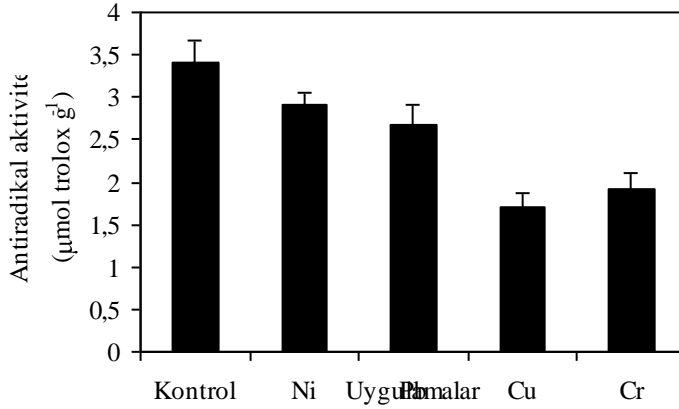
Antioksidan kapasitenin belirlenmesi amacıyla yapılan antiradikal aktivite sonuçları incelendiğinde, *P. squarrosa*'da Ni uygulanan örnekte % 16, Pb uygulanan örnekte ise % 21, Cu uygulanan örneğinde % 49, Cr uygulanan örnekte % 43 azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.49) (Çizelge 4.19). *T. barbuloides*'te antiradikal aktivitenin Ni uygulanan örnekte % 61, Pb uygulanan örnekte % 41 arttığı belirlenirken, Cu uygulanan örnekte % 36 ve Cr uygulanan örnekte % 24 azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.50) (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.19. Ağır metal stresi uygulanan *Pleurochaete squarrosa* ve *Timmiella barbuloides*'in antiradikal aktiviteleri ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$, Ortalama \pm S.H, n=3)

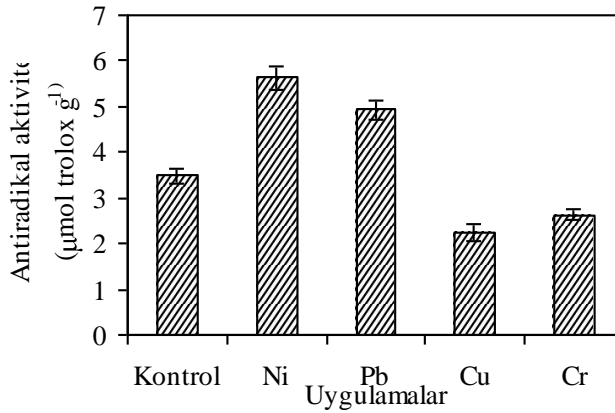
Uygulamalar	<i>Pleurochaete squarrosa</i>	<i>Timmiella barbuloides</i>
Kontrol	3.40 \pm 0.26	3.48 \pm 0.17
Ni	2.91 \pm 0.14 *	5.63 \pm 0.25**
Pb	2.68 \pm 0.23**	4.92 \pm 0.23**
Cu	1.71 \pm 0.15**	2.22 \pm 0.18**
Cr	1.91 \pm 0.18**	2.63 \pm 0.12**

* Kontrolle göre $p < 0,05$ düzeyinde önemli farkı belirtmektedir.

**Kontrolle göre $p < 0,01$ düzeyinde önemli farkı belirtmektedir.



Şekil 4.49. *P. squarrosa*'nın ağır metal stresi ile değişen antiradikal aktiviteleri



Şekil 4.50. *T. barbuloides*'in ağır metal stresi ile değişen antiradikal aktiviteleri

T. barbuloides'te Ni ve Pb uygulanan örneklerde antiradikal aktivitenin artması metal stresinin sebep olduğu oksidatif strese karşı bitkinin antioksidan mekanizmanın etkin çalıştığının, dolayısıyla bu metallerin zararlı etkilerinin bertaraf edilebildiğinin bir kanıtıdır. Bu da *T. barbuloides*'in Ni ve Pb'ye olan toleransının bir göstergesini oluşturabilir. *P. squarrosa* ve *T. barbuloides*'te de Cu ve Cr antiradikal aktivitenin önemli derecede azalmasına sebep olmuştur. Bu metallerin uygulandığı örneklerde OH⁻ ve H₂O₂ birikimi de bu sonuçlara paralellik göstermektedir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, Cu ve Cr'un her iki türde de toksik etki gösterdiği ortaya çıkmaktadır. Toksisitenin bir yönüyle, yüksek oksidatif hasar meydana getirmek ve enzimlerin aktivitelerinde azalma ya da

inhibisyon yoluyla, oluşan oksidatif hasarın üstesinden gelecek olan antioksidant mekanizmayı etkisiz hale getirerek meydana geldiği çalışmamız sonuçlarıyla ortaya konmuştur.

5. SONUÇ

Biryofitler ağır metallerin güçlü akümülatörü olarak bilinmektedir. Gerçek kök, epidermis ve gelişmiş kutikula tabakasının olmaması, yüksek yüzey/hacim kapasitesine sahip olmaları gibi çeşitli nedenlerle hücrede hayati fonksiyonlara zarar vermeden apoplast ve simplast bölgelerinde çok miktarlarda ağır metal biriktirebilirler. Ağır metal (Ni, Pb, Cu ve Cr) uygulanan *Pleurochaete squarrosa* ve *Timmiella barbuloides*'in bütün örneklerinin maruz kaldıkları metalleri bünyelerinde biriktirdikleri belirlenmiştir. *P. squarrosa*'nın bu metalleri biriktirme sırası çoktan aza doğru kurşun, nikel, bakır ve krom iken (Pb >Ni >Cu > Cr), *T. barbuloides*'in ise bu metalleri biriktirme sırası nikel, kurşun, bakır ve krom (Ni>Pb>Cu>Cr)'dur. *P. squarrosa* ve *T. barbuloides*'te görülen metal birikimi, biryofitlerin yüksek derecede metal biriktirebilme kapasitesine dair literatür bilgileriyle uyumludur. Her iki türde de yüksek derecedeki metal birikimi, negatif yüklü gruplar ve kation değişim kapasitesi ile, hücre içinde bulunan şelatlayıcı moleküllerle ve vakuolde depolanarak gerçekleştirilmiş olabilir. Ancak literatür bilgisi dahilinde biryofitlerin bu yüksek derecedeki metal birikimini daha çok hücre çeperinde metalleri negatif yüklü iyonlara bağlayarak hareketsizleştirme şeklinde yaptıkları bilinmektedir. Pb'nun ve diğer ağır metallerin negatif yüklü poliüronik asitlere bağlandığı çeşitli araştırmacılar tarafından da rapor edilmiştir.

Kuru ağırlık, stresin etkisinin bitki büyümesinde meydana getirdiği etkinin açıklanabilmesi için kullanılabilir bir parametredir. *P. squarrosa* ve *T. barbuloides*'in Pb, Ni ve Cr uygulanan örnekleri kontrolleriyle kıyaslandığında kuru ağırlıklarının arttığı belirlenirken, Cu uygulanan örneklerde önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Her iki biryofitin Pb, Ni ve Cr uygulanan örneklerinde kuru ağırlık miktarlarında artışın nedeni, bitki bünyesinde veya yüzeyinde tutulan metal iyonları sayesinde olabileceği gibi, bu ağır metallerin biryofitlerin metabolizmalarında fotosentez ve bağlantılı diğer sentez olaylarına ket vurmaması ve ağır metal toleransına bağlı büyümenin sürdürülmesi olabilir. Cu uygulanan örneklerde kuru ağırlıkta meydana gelen azalma ise muhtemelen Cu'nun bitki bünyesinde protein sentezi, fotosentez, solunum, iyon alımı ve hücre membran stabilitesi ve doku yıkımını arttırması gibi bazı fizyolojik olayların bozulmasına neden olmasıyla ilgilidir.

Stres sonucu oluşumu artan hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla reaksiyona girerek DNA yapısında değişikliklere yol açar. Hidroksil radikali etkisiyle deoksiriboz molekülünün bozulmasına bağlı olarak oluşan fragmentlerden olan MDA miktarları *P. squarrosa*'ın her örneğinde (Ni, Pb, Cu, Cr) önemli derecede artış gösterirken bu artış en çok Cu uygulanan örnekte belirlenmiştir. *T. barbuloides*'te ise Ni uygulanan örnekte kontrole göre anlamlı bir değişim görülmezken, Pb, Cu ve Cr uygulanan örneklerde önemli derecede artmıştır ve yine en çok MDA oluşumu Cu uygulanan örnekte belirlenmiştir. Bu sonuç bakırın fizyolojik şartlarda çeşitli oksidasyon basamaklarında görev alması nedeniyle OH⁻ oluşumunu hızlandırarak katalizör görevi yapmasından kaynaklanmaktadır. *T. barbuloides*'in Ni uygulanan örneğinde ise kontrole göre anlamlı bir değişimin olmaması bu metalin aşırı bir oksidatif hasara sebep olmadığını ya da oluşan hasarı detoksifiye eden antioksidan mekanizmanın iyi çalıştığının bir göstergesidir.

Bir diğer reaktif oksijen türü olan H₂O₂ miktarında, *P. squarrosa*'nın Pb uygulanan örneğinde anlamlı bir değişim görülmezken, Ni, Cu, Cr uygulanan örneğinde arttığı belirlenmiştir. *T. barbuloides*'in ise Ni ve Pb uygulanan örneklerde H₂O₂ miktarında anlamlı bir değişim belirlenmezken, Cu ve Cr uygulanan örneklerinde arttığı belirlenmiştir. GPX, APX ve CAT gibi enzimler, H₂O₂'in hızla yıkımını sağlayarak hücrede birikmesini önlerler. *P. squarrosa*'nın Pb uygulanan örneğinde H₂O₂ oranının artmaması H₂O₂ detoksifikasyonundan sorumlu APX aktivitesindeki artışla paralellik göstermektedir. *T. barbuloides*'te Ni ve Pb uygulanan örneklerde H₂O₂ birikiminin olmaması, bu metallerin türde yüksek derecede bir toksiteye sebep olmaması ya da H₂O₂'nin detoksifiye edilmesini sağlayan antioksidan mekanizmanın etkin çalışmasından kaynaklanabilir.

P. squarrosa ve *T. barbuloides*'te Cr stresi altında H₂O₂ içeriği önemli derecede artmıştır. Her iki türde H₂O₂ miktarının artması kromun H₂O₂ oluşumu tetiklemesine bağlıdır, ayrıca *P. squarrosa*'da bu artışın belirlenmesi, bu türün yine Cr uygulanan örneğindeki H₂O₂ oluşumunu sağlayan SOD enzim aktivitesinin artışı ile de paralellik göstermektedir. Ayrıca her iki bryofit türünün Cu uygulanan örneklerinde H₂O₂'in aşırı birikimi belirlenmiştir. Bu artışın en önemli sebeplerinden biri olarak her iki türün Cu uygulanan örneklerindeki H₂O₂ detoksifikasyonundan sorumlu CAT aktivitesindeki azalma olduğunu söyleyebiliriz.

Bitki hücreleri için lipit peroksidasyonu sıkça kullanılan membran hasarını ortaya koyan bir stres indikatörüdür. Lipit peroksidasyonu, lipit hidroperoksidlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesiyle sona ermektedir. Bu bileşiklerden birisi olan malonildialdehit (MDA) miktarının ölçülmesi lipit peroksit düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. *P.squarrosa* ve *T. barbuloides*'in Ni, Pb, Cr uygulanan örneklerinde ağır metal stresine bağlı olarak kontrole göre önemli oranda MDA oluşumu belirlenmezken, Cu uygulanan örneklerdeki MDA miktarlarının önemli derecede arttığı görülmüştür. Cu uygulanan örneklerde görülen artan lipit peroksidasyonu ve MDA birikimi bakırın sebep olduğu membran ve hücre hasarlarının diğer metallerden fazla olduğunu göstermektedir. Bakırın hidroksil, peroksil, ve alkoksil gibi zararlı serbest radikallerin oluşumunu katalizleyerek lipit peroksidasyonunu arttırdığı bilinmektedir.

Çevresel stres faktörlerinin bitkiler üzerindeki etkilerini anlamak amacıyla sıkça başvurulan yollardan biri organizmadaki klorofil içeriğini belirlemektir. Denemelerimizde *P. squarrosa*'nın klorofil *a* miktarının Cu, Ni, Pb uygulanan örneklerinde, klorofil *b* miktarının ise Ni uygulanan örnekte azaldığı, Cu uygulanan örnekte ise arttığı belirlenmiştir. Total klorofil miktarının Ni, Cu ve Pb uygulanan örnekte, klorofil *a/b* oranının Cu ve Cr uygulanan örnekte azaldığı belirlenmiştir.

T. barbuloides'in klorofil *a* miktarının Cu uygulanan örnekte azaldığı belirlenirken, Ni uygulanan örnekte arttığı, klorofil *b* miktarlarının Cu ve Ni uygulanan örneklerde arttığı belirlenmiştir. Total klorofil miktarı Ni uygulanan örnekte artarken, klorofil *a/b* oranı Cu uygulanan örnekte azalmıştır.

Bakır her iki biryofit türünde klorofil *a* miktarlarında azalmaya sebep olmuştur. Belirlenenen bu azalma olasılıkla klorofil biyosentez prosesinin bozulması, klorofil biyosentezinde görevli enzimlerin inhibe edilmesi ya da klorofil parçalanması nedeniyledir. Bakırın kloroplast membranlarının peroksidasyonuna yol açarak, klorofil içeriğinde azalmaya neden olduğu da bilinmektedir. Çalıştığımız biryofit türlerinde yine Cu'nun uygulandığı örneklerde görülen yüksek MDA oluşumu klorofil miktarındaki azalmayı da açıklamaktadır. Ayrıca Cu uygulanan örneklerde görülen kuru ağırlık miktarlarındaki azalma da yine bu sonuçlarla paralellik göstermektedir.

P. squarrosa ve *T. barbulooides*'te Cu uygulanan örnekte klorofil *a* miktarı azalırken klorofil *b* miktarının arttığı belirlenmiştir. Klorofil *b* miktarındaki bu yükseliş metal stresinden kaynaklanmaktadır. Bu stresin en yoğun olduğu metal her iki türde de Cu olarak belirlenmiştir. Stres durumunda klorofil *a*'nın ikinci halkasında bulunan metil grubu okside olur, bu da klorofil *b*'nin oluşmasına sebep olur. Böylece klorofil *a* ve paralel olarak klorofil *a/b* oranındaki azalma ağır metal toksitesinin bir göstergesi olmaktadır. Denememizde klorofil *a/b* oranı *P. squarrosa*'nın Cu ve Cr uygulanan örneklerinde ve *T. barbulooides*'in Cu uygulanan örneğinde azalmıştır. Metal etkisi ile klorofil *a/b* oranının azaldığı, stroma ve grana lamellerinde yapısal bozuklukların meydana geldiği bilinmektedir. *P. squarrosa*'nın Cu ve Cr uygulanan örneklerinde ve *T. barbulooides*'in Cu uygulanan örneğinde klorofil *a/b* oranında meydana gelen bu azalma metal stresine bağlı olarak ışık toplama kompleksinin azalması, tilakoid membranlarda meydana gelebilecek yapısal bozukluklar ve fotosistemler arası koordinasyonların bozulması nedeniyle meydana gelmiş olabilir.

P. squarrosa'da total klorofil miktarı Ni, Cu ve Pb uygulanan örneklerde azalırken, *T. barbulooides*'te Ni uygulanan örnekte artmıştır. *P. squarrosa*'nın Ni, Cu ve Pb uygulanan örneklerinde görülen bu azalma olasılıkla lipit peroksidasyonunun sebep olduğu klorofil degradasyonu ve fotosentezin engellenmesi ile sonuçlanan bir tepkidir. Total klorofildeki azalış klorofil degradasyonu ve fotosentez inhibisyonuna sebep olan metallere özgü bir cevaptır.

T. barbulooides'te Ni uygulanan örnekte klorofil *a*, klorofil *b* ve total klorofilde meydana gelen artışlar *T. barbulooides*'te bu metalin klorofil degradasyonuna sebep olmadığını bir göstergesidir. Bu da *T. barbulooides*'in nikel olan toleransına bir kanıt olarak gösterilebilir.

Karotenoidler ışığı toplayıcı pigmentlerdir ve stres koşullarında fotosentetik aygıtları koruyucu işlevleri vardır. Ayrıca, fotosentetik sistemlerde karotenoidler (β -karoten ve ksantofiller) önemli antioksidan etkiye sahiptir. *T. barbulooides*'in toplam karotenoid miktarının Ni uygulanan örnekte arttığı belirlenmiştir. β -karoten miktarları ve neoksantin miktarları Ni ve Pb uygulanan örneklerde artarken, Cu uygulanan örnekte azalmıştır. Lutein miktarı ise Ni uygulanan örnekte artmış, Cu uygulanan örnekte azalmıştır. *T. barbulooides*'in Ni ve Pb uygulanan örneklerinde karotenoid miktarında artışın meydana gelmesi metal toleransı ile ilişkili antioksidan mekanizmanın bir parçasıdır. Karotenoid

miktarının artması ROT'nin meydana getirdiği oksidatif hasarın fotosentetik kapasiteyi azaltmasına yönelik olarak kloroplastları koruyucu ve tamir edici mekanizmalardandır. Ayrıca bu metalin uygulandığı örneklerde klorofil degradasyonunun görülmemesi karotenoidlerin fotosentetik kapasiteyi koruduğunun kanıtıdır. Ancak stres sırasında klorofiller gibi karotenoid miktarı da azalma gösterebilir. Denememizde *P. squarrosa*'nın toplam karotenoid, β -karoten, neoksantin, ve lutein miktarları Ni, Cu ve Pb uygulanan örneklerde kontrole göre önemli derecede azalmıştır. Karotenoidlerdeki azalmanın tilakoidlerde meydana gelen singlet oksijen miktarındaki artışla ilişkili olabileceğini bildiren çalışmalar, *T. barbuloides*'in Cu uygulanan örneğindeki azalmayı ve *P. squarrosa*'da ağır metal stresine (Ni, Pb, Cu) bağlı karotenoid miktarındaki azalmayı açıklayabilir. Ayrıca, karotenoidlerin fotosentetik membranın devamlılığı ve korunması için önemli olduğu, her iki biryofite Cu uygulanan örneklerde görülen yüksek orandaki karotenoid kayıpları yine bu metal etkisiyle oluşan oksidatif strese bağlı lipit preoksidasyonu ile paralellik göstermektedir.

Ağır metaller hücrelerdeki biyolojik makromoleküllerin göreceli miktarlarında değişikliğe neden olabilmektedirler. Çözünebilir protein miktarları incelendiğinde *P. squarrosa*'nın Ni, Pb ve Cu uygulanan örneklerinde kontrole göre anlamlı bir değişim görülmezken Cr uygulanan örneğinde azaldığı belirlenmiştir, *T. barbuloides*'in ise Cr ve Ni uygulanan örneklerinde çözünebilir protein miktarları artarken, Cu uygulanan örneğinde azaldığı belirlenmiştir. *T. barbuloides*'te protein miktarında meydana gelen artış olasılıkla strese bağlı olarak gelişen savunma mekanizmasının bir sonucu olan antioksidan enzim ve stres proteinlerinin sentezinin artması nedeniyledir.

Yüksek metal konsantrasyonları, fotosentez, solunum ve biyolojik moleküllerin sentezi gibi biyokimyasal ve fizyolojik prosesleri kontrol eden enzim sistemleri üzerine önemli toksik etkilere neden olmaktadır. *P. squarrosa*'nın Cr uygulanan örneğinde görülen protein miktarındaki azalma Cr metalinin toksik etkisinden kaynaklanabilir. Ağır metal ve tuz streslerinde bitkilerin protein içeriğindeki azalma nedenlerinin genelde protein sentezinin inhibisyonunda ya da oksidatif streste üretilen ROT'nin tetiklediği proteolizisten kaynaklandığı da çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. Cr etkisinde bitkilerdeki protein azalması, çoğunlukla düşük nitrat redüktaz aktivitesine bağlanmaktadır; çünkü; bu enzim aktivitesindeki azalma bitkilerdeki protein biyosentezini inhibe etmektedir. *P.*

squarrosa'daki protein içeriğinin krom etkisinde azalması gen düzeyinde transkripsiyon ya da translasyon aşamasındaki hasarlardan da ileri gelebilir. Hücre içinde Cr'un DNA'nın fosfat gruplarına bağlandığı ve böylece de replikasyonun ve transkripsiyonun etkilendiği çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. Aynı metalin (Cr) iki bilyofitte farklı biyolojik cevaplara neden olması, metal detoksifikasyon ve antioksidan metabolizmanın türler arası farklılık gösterebileceğini kanıtlar niteliktedir.

Stres durumunda, oluşan oksidatif hasara karşı bitkilerin antioksidan savunma mekanizmasının etkinlik gösterdiği bilinmektedir. *P. squarrosa*'nın Ni uygulanan örneğinde SOD, CAT, APX ve GR enzim aktivitelerinde kontrole göre anlamlı bir değişim belirlenmezken, POX aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. *P. squarrosa*'nın Ni uygulanan örneğinde askorbat ve indirgenmiş glutatyon (GSH) miktarı azalmış, okside glutatyon (GSSG) miktarı artmıştır. GR aktivitesinde bir değişimin meydana gelmemesi Ni uygulanan örnekte kontrole göre GSSG miktarındaki birikimi açıklamaktadır. *P. squarrosa*'nın Ni uygulanan örneğinde askorbat miktarındaki azalma mevcut APX aktivitesinden kaynaklanabileceği gibi askorbat- glutatyon döngüsünde görev alan diğer enzimlerin (DHAR ve MDAR) yeterince çalışmayıp askorbat döngüsünü sağlayamamalarından da kaynaklanabilir.

P. squarrosa'nın Pb uygulanan örneğinde SOD, CAT, GR aktivitesinde kontrole göre önemli bir değişim belirlenmezken, POX ve APX aktiviteleri artmıştır. Askorbat ve GSH miktarı azalmış ve total glutatyon ve GSSG miktarı artmıştır. Askorbat miktarında görülen azalma APX enzim aktivitesinin artışı ile paralellik göstermektedir. GSSG miktarındaki birikme ve GSH miktarındaki azalma GR enzim aktivitesinde bir değişimin olmaması ile açıklanabilir. GSH miktarındaki azalmanın nedeni askorbat-glutatyon döngüsündeki diğer bir enzim olan glutatyon peroksidaz (GPX) enziminin olası aktivitesinden de kaynaklanmış olabilir. Hidrojen peroksit miktarında bir artışın görülmemesi bu kanıyı destekler niteliktedir.

P. squarrosa'nın Cu uygulanan örneğinde APX ve GR aktivitelerinde kontrole göre önemli bir değişim belirlenmezken, SOD, POX aktiviteleri artmıştır. CAT aktivitesi ise kontrole göre önemli derecede azalmıştır. Askorbat miktarı artarken, GSH miktarı azalmıştır. SOD aktivitesindeki artma ve CAT aktivitesindeki azalma bu metalin uygulandığı örnekteki yüksek derecede H₂O₂ birikimini açıklamaktadır.

P. squarrosa'nın Cr uygulanan örneğinde CAT, APX ve GR aktivitelerinde bir değişim görülmezken, SOD ve POX aktiviteleri artmıştır. GSH miktarında bir değişim görülmezken GSSG ve paralelinde total glutatyon artmıştır. Askorbat miktarı kontrole göre önemli derecede artmıştır. GSSG miktarındaki artış GR aktivitesinde bir değişimin olmaması ile açıklanabilir. H₂O₂ miktarındaki birikim SOD enzim aktivitesinin artması, CAT enziminin etkin çalışmaması ile açıklanabilir.

Timmiella barbuloides'in Ni ve Pb uygulanan örneklerinde SOD, CAT, POX, APX enzim aktivitelerinde kontrole göre anlamlı bir değişim belirlenmezken GR aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Askorbat miktarı her iki metalin uygulandığı örnekte azalmış, ancak sadece Ni uygulanan örnekte total glutatyon ve GSSG miktarı artmıştır. GR aktivitesindeki bu artışa rağmen GSH oranında anlamlı bir değişim olmamıştır. Bu durum GSH'dan GSSG oluşumunu sağlayan enzimlerinin (dehidroaskorbat redüktaz ve glutatyon peroksidaz) olası faaliyetinden kaynaklanabilir.

T. barbuloides'in Cu uygulanan örneğinde SOD, POX, APX miktarlarında kontrole göre anlamlı bir değişim olmazken, GR aktivitesi artmıştır. CAT aktivitesi önemli oranda azalmıştır. Askorbat ve GSH miktarı kontrole göre önemli derecede artmıştır. GSH miktarında görülen yükselme artan GR enzim aktivitesi ile açıklanabilir. *P. squarrosa* ve *T. barbuloides*'in Cu uygulanan örneklerinde CAT önemli derecede azalmıştır. CAT aktivitesindeki azalmanın nedeni olasılıkla bakır kanyonları gibi ağır metal iyonlarının katalazın yarışmalı olmayan inhibitörleri gibi davranıp enzim aktivitesini durdurmasındandır. CAT aktivitesindeki önemli orandaki düşüş ve peroksidaz enziminin yeterli düzeyde çalışmaması *T. barbuloides*'in Cu uygulanan örneğindeki H₂O₂ birikimini açıklamaktadır.

T. barbuloides'in Cr uygulanan örneğinde CAT, APX ve GR aktivitesinde önemli bir değişim olmazken, SOD ve POX aktiviteleri önemli derecede azalmıştır. Askorbat miktarı ve total glutatyon miktarı önemli derecede artmıştır.

Prolin birçok ağır metal stresine cevap olarak bitki dokularında yüksek miktarlarda birikmektedir. *T. barbuloides*'in Ni ve Pb uygulanan örneklerindeki prolin miktarı kontrole göre artarken, Cu ve Cr uygulanan örneklerinde anlamlı bir değişim

olmamıştır. *T. barbulooides*'in Ni ve Pb uygulanan örneklerindeki prolin artışı bu metallerin bitkideki tolerans mekanizması ile ilişkilidir.

P. squarrosa'nın prolin miktarları kontrolle kıyaslandığında Ni ve Pb uygulanmış örneklerinde kontrole göre bir değişim belirlenmezken, Cu ve Cr uygulanan örneklerinde azaldığı belirlenmiştir. Prolin miktarındaki azalma prolin degradasyonu, biyosentezinin inhibisyonu veya prolin kullanımındaki artıştan kaynaklanabilir.

Antioksidan kapasitenin belirlenmesi amacıyla yapılan antiradikal aktivite sonuçları incelendiğinde, *P. squarrosa*'da Ni, Pb ve özellikle Cu ve Cr uygulanan örneklerde azaldığı belirlenmiştir. *T. barbulooides*'te antiradikal aktivitenin Ni ve Pb uygulanan örneklerde artarken, yine Cu ve Cr uygulanan örneklerde azaldığı belirlenmiştir.

P. squarrosa ve *T. barbulooides*'te de Cu ve Cr antiradikal aktivitenin önemli derecede azalmasına sebep olmuştur. Bu metallerin uygulandığı örneklerde OH⁻ ve H₂O₂ birikimi de bu sonuçlara paralellik göstermektedir. Bu sonuçlar Cu ve Cr'nin her iki türde de yüksek derecede oksidatif hasar meydana getirdiğinin ve enzimlerin aktivitelerinde azalma ya da inhibisyonu yoluyla, oluşan oksidatif hasarın üstesinden gelecek olan antioksidant mekanizmayı etkisiz hale getirdiğinin bir göstergesidir.

T. barbulooides'te Ni ve Pb uygulanan örneklerde antiradikal aktivitenin artması bu metal uygulanan örneklerde metal stresinin sebep olduğu oksidatif strese karşı, antioksidant mekanizmanın etkin çalıştığı, dolayısıyla bu metallerin zararlı etkilerinin bertaraf edilebildiğinin bir kanıtıdır. Bu da *T. barbulooides*'in Ni ve Pb'ye olan toleransının bir göstergesini oluşturabilir. Ayrıca *T. barbulooides*'in toksik etkileri bilinmesine rağmen nikeli ve kurşunu fazla miktarda biriktirmesi ve bu metallerin kuru ağırlığı azaltmaması, pigment degradasyonuna sebep olmaması ve lipid peroksidasyonunda etkili olmaması bu toleranslı destekleyen paralel sonuçlardır.

Bu tez çalışmasında iki biryofit türü üzerinde Ni, Pb, Cu ve Cr gibi ağır metallerin toksik etkileri; oksidatif stres ve antioksidant mekanizma yönüyle detaylı olarak irdelenmiştir. Çalışma sonuçlarımıza göre *P. squarrosa*'nın *T. barbulooides*'e göre uygulanan ağır metal stresine daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. Ancak çalışılan

her iki biryofitin birbirlerine göre değişen derecelerde gösterdiği tolerans ve hızlı fizyolojik cevaplar açısından farklar, tolerans mekanizmasının diğer yönleriyle incelenmesi ve bu metallerin detoksifikasyon yollarının aydınlatılması ardışık çalışmalar için önemli bir soruyu ortaya koymaktadır. Ayrıca toleransın bitki türüne hatta aynı türün genotiplerine, stres faktörüne, strese maruz kalma süresine ve strese maruz kalan doku veya organın yapısına göre büyük değişiklikler göstermesi bu tip çalışmaların çok sayıda farklı tür üzerinde yapılmasını zorunlu hale getirmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda stres faktörlerine maruz bırakılan biryofitlerde reaktif oksijen türlerini detoksifiye edici sistemin aktivitesindeki değişikliklere veya ROT seviyesindeki etkilerine dair bilgiler çok yetersiz olduğundan bu grupta yapılan çalışmalara tür sayısı artırılarak devam edilmelidir.

KAYNAKLAR

- Abraham, E., Rigó, G., Székely, G., Nagy, R., Koncz, C., and Szabados, L. 2003. Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, 51: 363-372.
- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H. S., Jain, S. K., Athar, M. 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus*) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochimica Biophysica Acta-General Subjects**, 1523: 37–48.
- Ali, S., Bai, P., Zeng, F., Cai, S., Shamsi, I.H., Qui, B., Wu, F., Zhang, G. 2011. The Ecotoxicological and interactive effects of chromium and aluminum on growth, oxidative damage and antioxidant Enzymes on two barley genotypes Differing in Al Tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, 70: 185-191.
- Alia, P., Pardha, S.P. 1991. Proline accumulation under heavy metal stress. **Journal of Plant Physiology**, 138:554–558.
- Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S. 2002. Role of superoxide dismutases in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, 53: 1331-1341.
- Artan, R. O. 2007. Ağır Metal İçeren Atık Suların İleri Arıtımında Su Mercimeği (*Lemna* sp.) Bitkisinin Kullanılması. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, Adana.
- Asada, K., Takahashi, M. 1987. Production and scavenging of active oxygen radicals in photosynthesis. In: Kyle, D.J., Osmond, C.B., Charles, J. Arntzen (Eds.) *Photoinhibition*, Elsevier, pp. 227-297.
- Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase - hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, 85: 235-241.

- Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 85: 235-241.
- Ashraf, M., Foolad, M.R. 2007. Roles of glycine betain and proline in improving plant a gabeyotic stres resistance. **Enviromental and Experimental Botany**, 59:206-216.
- Assche, V., Clijsters, H. 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. **Plant Cell Environment**, 13: 195-206.
- Avcı, E. 2005. Zonguldak İl Merkezindeki Ağır Metal Birikimini Biyoindikat r Olan Karayosunları  zerinden Araştırılması. Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak.
- Baek, K.H., Skinner, D.Z. 2003. Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. **Plant Science**, 165 (6): 1221-1227.
- Baker, A.J.M., Brooks, R.R. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements–A review of their distribution. **Ecology and Phytochemistry, Biorecovery**, 1:81-126.
- Basile, A., Sorbo, R., Aprile, G., Conte, B., Castaldo, C., Cobianchi, R. 2008. Comparison of the heavy metal bioaccumulation capacity of an epiphytic moss and an epiphytic lichen. **Environmental Pollution**, 151(2):401-7.
- Bassi, R., Sharma, S.S. 1993. Changes in proline content accompanying the uptake of zinc and copper by *Lemna minor*. **Annals of Botany**, 72:151–154.
- Bassi, P., Basile, A., Stefenini, A., Vosa, C. B., Maffei, M., Giordano, S. 1995. Effects of lead on nuclear repetitive DNA of the moss *Funaria hygrometrica* (Bryophyta). **Protoplasma**, 188: 104–108.
- Bates, L.S. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, 39:205-207.
- Bazzas, F.A., Carlson, R.W., Rolfe, G.L. 1974. The effect of heavy metals on plants. **Environmental Pollution**, 7: 241-246.

- Beauchamp, C., Fridovich, I. 1970. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, 44: 276–287.
- Benavides, M.P., Gallego, S.M., Tomaro, M.L. 2005. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 17(1): 21-34.
- Bergmeyer, J., Grabl, M. 1983. Methods of Enzymatic Analysis. 190-302. Germany
- Boswell, C., Sharma, N.C., Sahi, S.V. 2002. Copper tolerance and accumulation potential of *Chalamydomonas reinhardtii*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 69:546–553.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-254.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie/Food Science and Technology**, 28: 25-30.
- Bridgewater, L.C., Manning, F.C., Woo, E.S., Patierno, S.R. 1994. DNA polymerase arrest by aducted trivalent chromium. **Molecular Carcinogenesis**, 9: 22- 133.
- Briggs, D. 1972. Population differentiation in *Marchantia polymorpha* L. in various lead pollution levels. **Nature**, 238: 166–167.
- Brooks, R.R. 1998. General Introduction. In: Brooks, R.R. (ed.). Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals: Their Role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral Exploration and Phytomining. CAB International, pp.1-14. New York.
- Brown, D.H., Buck, G.W. 1985. The cellular location of metals in two bryophytes and a lichen. **Cryptogamie: Bryologie et Lichenologie**, 6:279–286.

- Brown, P.H., Welch, R.M., Madison, J. 1990. Effect of nickel deficiency on soluble anion, amino acid and nitrogen levels in barley. **Plant and Soil**, 125: 19-27.
- Bruns, I., Sutter, K., Menge, S., Neumann, D., Krauss, G.J. 2001. Cadmium lets increase the glutathione pool in bryophytes. **Journal of Plant Physiology**, 158: 79-89.
- Bubb, J.M., Lester, J.N. 1991. The impact of heavy metals on lowland rivers and the implications for man and the environment. **Science of The Total Environment**, 100: 207-233.
- Burton, G.W., Ingold, K.U. 1984. β -carotene: an unusual type of lipid antioxidant. **Science**, 224: 569-573.
- Burton, M.A.S., Peterson, P.J. 1979. Studies on Zn localization in aquatic bryophytes. **Bryologist**, 82: 594-598.
- Caretto, S., Paradiso, A., D'Amico, L., De Gara, L. 2002. Ascorbate and glutathione metabolism in two sunflower cell lines of differing -tokoferol biosynthetic capability. **Plant Physiology and Biochemistry**, 40: 509-513.
- Carlberg, I., Mannervik, B. 1985. Glutathion reductase. **Methods in Enzymology**, 113: 484-490.
- Carreras, H. A., Pignata, M. L. 2007. Effects of heavy metals Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , And Zn^{2+} on some physiological parameters of the lichen *Usnea ambyloclada*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 67: 59-66.
- Caspi, V., Droppa, M., Horvath, G., Malkin, S., Marder, J.B., Raskin, I. 1999. The effect of copper on chlorophyll organization during greening of barley leaves. **Photosynthesis Research**, 62: 165-174.
- Cherubini, A., Ruggiero, C., Polidori, M.C., Mecocci, C. 2005. Potential markers of oxidative stress in stroke. **Free Radical Biology & Medicine**, 39: 841 - 852.

- Chettri, M.K., Cook, C.M., Vardaka, E., Sawidis, T., Lanaras T. 1998. The Effect of Cu, Zn And Pb on the chlorophyll content of the lichens *Cladonia convoluta* and *Cladonia rangiformis*. **Environmental and Experimental Botany**, 39: 1-10.
- Cho, U.H., Park, J.O. 2000. Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. **Plant Science**, 156: 1-6.
- Choudhury, N.K., Behera, R.K. 2001. Photoinhibition of photosynthesis: role of carotenoids in photoprotection of chloroplasts. **Photosynthetica**, 39: 481-488.
- Choudhury, S., Panda, S.K. 2005. Toxic effects, oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth under chromium and lead phytotoxicity. **Water Air Soil Pollution**, 167: 73–90.
- Clemens, S. 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. **Biochimie**, 88: 1707-1719.
- Clijsters, H., Cuypers, A., Vangronsveld, J. 1999. Physiological responses to heavy metals in higher plants; defence against oxidative stress. **Z Naturforsch.** 54c: 730–734.
- Cnubben, N.H.P., Rietjens, I.M.C.M., Wortelboer, H., Van-Zanden, J., Van Bladeren, P.J. 2001. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 10: 141- 152.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B, Del Río L.A. 2001. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. **Trends Plant Science**, 6: 145–150.
- Cove, D. J., Knight, C.D., Lamparter, T. 1997. Mosses as model systems. **Trends in Plant Sciences**, 2: 99–105.

- Cuypers, A., Vangronsveld, J., Clijsters, H. 1999. The chemical behaviour of heavy metals plays a prominent role in the induction of oxidative stress. **Free Radical Research**, 31: 839–843
- Çakmak, I., Horst, W.J. 1991. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, 83: 463-468.
- Çepel, N. 1997. Toprak Kirliliği Erozyon ve Çevreye Verdiği Zararlar. TEMA Vakfı Yayınları, İstanbul, 111s.
- Dazy, M., Masfaraud, J.F., Ferard, J.F. 2009. Induction of oxidative stress biomarkers associated with heavy metal stress in *Fontinalis antipyretica* Hedw. **Chemosphere**, 75: 297-302.
- Darrall, N. M. 1989. The effect of air pollutants on physiological processes in plants. **Plant Cell and Environment**, 12: 1–30.
- De Filippis, L., Pallaghy, C. 1994. Heavy metals: sources and biological effects. **Algae and Water Pollution**, In: Rai L.C., Gaur J.P., Soeder C.J., Eds, Advances in Limnology. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nagele U. Obermilles), pp. 31-77.
- Del Rio, L.A., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Gomez, M., Barroso, J.B. 2002. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **Journal of Experimental Botany**, 53:1255-1272.
- Del Rio, L.A., Sandalio, L.M., Altomare, D.A., Zilinskas, B.A. 2003. Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. **Journal of Experimental Botany**, 54: 923-933.
- Demirevska, K., Simova-Stoilova, L., Fedina, I., Georgieva, K., Kunert, K. 2010. Response of oryzacystatin transformed tobacco plants to drought, heat and light stress. **Journal of Agronomy and Crop Science**, 196: 90-99

- Demming Adams, B., Adams, W.W. 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 43: 599-626.
- Devi, S.R., Prasad, M.N.V. 1998. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (coontail), a free floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants. **Plant Science**, 138: 157-165.
- Didierjean, L., Frendo, P., Nasser, W., Genot, G., Marivet, J., Burkard, G. 1996. Heavy metal-responsive genes in maize: identification and comparison of their expression upon various forms of abiotic stress. **Planta**, 199: 1-8.
- Doncheva, S., Nicolov, B., Ogneva, V. 1996. Effect of copper excess on the morphology of the nucleus in maize root meristem cells. **Physiology Plantarum**, 96:118-122.
- Dürüst, N., Dürüst, Y., Tuğrul, D., Zengin, M. 2004. Heavy metal contents of *Pinus radiata* trees of İzmit (Turkey). **Asian Journal of Chemistry**, 16(2): 1129-1134.
- Ellis, D.R., Salt, D.E. 2003. Plants, selenium and human health. **Current Opinion in Plant Biology**, 6: 273-279.
- Eyidogan, F., Öktem, H.A., Yücel, M. 2003. Superoxide dismutase activity in salt stressed wheat seedlings. **Acta Physiologia Plantarum**, 25: 263-269.
- Fang, W.C., Kao, C.H. 2000. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in responses to excess iron, copper and zinc. **Plant Science**, 158: 71-76.
- Fargasova, A. 1994. Effect of Pb, Cd, Hg, As and Cr on germination and root growth of *Sinapis alba* seeds. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 52: 452-456.
- Fernandez, J.A., Ederra, A., Nunez, E., Martinez-Abaigar, J., Infante, M., Heras, P. 2002. Biomonitoring of metal deposition in northern Spain by moss analysis. **Science of The Total Environment**, 300:115-127.

- Ferreira, R.R., Fornazier, R.F., Vitória, A.P., Lea, P.J., Azevedo, R.A. 2002. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. **Journal of Plant Nutrition**, 25:327–342.
- Folkeson, L., Andersson-Bringmark, E. 1988. Impoverishment of vegetation in a coniferous forest polluted by copper and zinc. **Canadian Journal of Botany**, 66: 417–428.
- Foy, C.D., Chaney, R.L., White, M.C. 1978. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, 29: 511–566.
- Foyer, C.H., Halliwell, B. 1976. The presence of glutathione, glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic metabolism. **Planta**, 133: 21-25.
- Foyer, C.H. 1993. Ascorbate. In: Alscher, R.G. and Hess, J.L. (Eds.), *Antioxidants in Higher Plants*, CRC Press, pp.31-52, Boca Raton.
- Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunert, K.J. 1994. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, 92: 696-717.
- Fridovich, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, 64: 97-112.
- Gajewska, E., Sklodowska, M. 2005. Antioxidative responses and proline level in leaves and roots of pea plants subjected to nickel stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, 27 (3): 329-339.
- Gajewska, E., Skodowska, M., Slaba, M., Mazur, J. 2006. Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. **Biologia Plantarum**, 50: 653–659.
- Gallego, S.M., Benavides, M.P., Tomaro, M.L. 1996. Effects of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidences for involvement of oxidative stress. **Plant Science**, 121: 151-159.

- Ganesh, K.S., Baskaran, L., Chidambaram, A.L.A., Sundaramoorthy, P. 2009. Influence of chromium stress on proline accumulation in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genotypes. **Global Journal of Environmental Research**, 3(2): 106-108.
- Garcia-Hernandez, M., Murphy, A., Taiz, L. 1998. Metallothioneins 1 and 2 have distinct but overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, 118: 387–397
- Garcia-Limones, C., Hervás, A., Navas-Cortés, J.A., Jiménez-Díaz, R.M., Tena, M. 2002. Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 61: 325–337.
- Gechev, T., Willekens H., Van Montagu, M. 2003. Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. **Journal of Plant Physiology**, 160: 509-515
- Ghosh, M., Singh, S.P. 2005. A Review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its by products. **Applied Ecology and Environmental Research**, 3: 1-18.
- Girotti, A.W. 1985. Mechanism of lipid peroxidation. **Journal of Free radicals in Biology and Medicine**, 1: 87-95.
- Glime, J. 2007. Economic and ethnic uses of bryophytes, Flora of North America. Bryophytes: Mosses, Part 1, 27:14–41.
- Griffith, O.W. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-Vinylpyridine. **Analytical Biochemistry**, 106: 207-212.
- Griffith, O.W. 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free Radical Biology And Medicine**, 27: 922-935.
- Guerinot, M.L. 2000. The ZIP Family of metal transporters. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1465: 190-198.

- Gülçin, I., Oktay, M., Küfrevioğlu, Ö., Aslan, A. 2002. Determinations of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L) **Ach. Journal of Ethnopharmacology**, 79: 325-329.
- Halliwell, B. 1978. Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplast. **Chemistry and Physics of Lipids**, 44: 327-340.
- Halliwell, B. 1981. Free radicals, oxygen toxicity and aging, In: Sohal RS, ed. Age Pigments, Elsevier, pp. 1-62.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemical Journal**, 219: 1-14.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1989. Free radicals in biology and medicine, 2nd ed. Clarendon Press, Oxford Univ., pp. 416-494, London/New York.
- Hartmut, K.L., Hak, R., Rinderle, U. 1990. The chlorophyll fluorescence ratio F690/F730 in leaves of different chlorophyll content. **Photosynthesis Research**, 25: 295-598.
- Hausladen, A., Alscher, R. G. 1993. Glutathione. - In Antioxidants in Higher Plants (R. G. Alscher and J. L. Hess, eds), CRC Press, pp. 1-30. Boca Raton.
- Havaux, M., Kloppstech, K. 2001. The protective functions of carotenoid and flavanoid pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in *Arabidopsis* Npq and Tt Mutants. **Planta**, 213: 953-966.
- Hayakawa, T., Kanematsu, S., Asada, K. 1984. Occurrence of Cu-Zn-superoxide dismutase in the intrathylakoid space of spinach-chloroplasts. **Plant & Cell Physiology**, 25: 883-889.
- Heath, R. L. 1994. Possible Mechanisms for the inhibition of photosynthesis by ozone. **Photosynthesis Research**, 39: 439- 451.
- Henderson, D.M. 1961. Contributions to the Bryophyte flora of Turkey: IV. **Notes Royal Botanic Garden Edinburgh**, 23: 263-278.

- Hernandez, J.A., Ferrer, M.A., Jimenez, A., Barcelo, A.R., Sevilla, F. 2001. Antioxidant systems and O_2^- / H_2O_2 production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt induced necrotic lesions in minor veins. **Plant Physiology**, 127: 817-831.
- Herzog, V., Fahimi, H.D. 1973. A new sensitive colorimetric assay for peroxidase, using 3,3- Diaminobenzidine as hydrogen donor. **Analytical Biochemistry**, 55:554–562.
- Iturbe-Ormaetxe, I., Escuredo, P.R., Arres-Igor, C., Becana, M. 1998. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. **Plant Physiology**, 116: 173-181.
- Jefferies, H., Coster, J., Khalil, A., Bot, J., Mccauley, R. D., Hall, J. C. 2003. Glutathione. A. N. Z. **Journal of Surgery**, 73: 517-522.
- Jimenez, A., Hernandez, J.A., Del Rio, L.A., Sevilla, F. 1997. Evidence for the presence of ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. **Plant Physiology**, 114: 275-284.
- Jones, G.L., Masters, C.J. 1976. On the comparative characteristics of mammalian catalases. **Biochemistry and Molecular Biology**, 55(4) : 511-518.
- Kacar, B., Katkat, V. 2006. Bitki Besleme. Nobel Yayın No:849.
- Kacar, B., İnal, A. 2008. Bitki Analizleri. Nobel yayıncılık Yayım No= 1241
- Kampfenkel, K., Van Montagu, M., Inzé, D. 1995. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. **Analytical Biochemistry**, 225: 165-167.
- Kastori, R., Petrovic, M., Petrovic, N. 1992. Effects of excess lead, cadmium copper and zinc on water relations in sunflower. **Journal of Plant Nutrition**, 15: 2427- 2439.
- Kastori, R., Petrovic, N., Arsenijevic- Maksimovic, L. 1997. Heavy metals and plants. In: Kastori, R, Ed. Heavy Metals in The Environment. Novi Sad: Feljton, pp. 195- 257.

- Kavas, G. 1990. Serbest Radikaller Ve Organizma Üzerine Etkileri, **Türkiye Klinikleri**, 9: 1–8.
- Keleş, Y. 2000. Bazı Çevresel Streslerin Etkisinde Kalan Buğday (*Triticum Aestivum* L. ve *Triticum Durum* Desf.) Fidelerinde Çeşitli Fizyolojik ve Biyokimyasal Değişimlerin İncelenmesi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
- Kennedy, C.D., Gonsalves, F.A.N. 1987. The action of divalent zinc, cadmium, mercury, copper and lead on the trans-root potential and efflux of excised roots. **Journal of Experimental Botany**, 38: 800-817.
- Kılınç, K. 1985. Oksijen radikalleri, üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri. **Biyokimya dergisi**, 10:60-89.
- Kırmacı, M. 2012. Adnan Menderes Üniversitesi. Fen Edebiyat Fakültesi. Biyoloji Bölümü. mkirmacı@adu.edu.tr
- Kimbrough, D.E, Cohen, Y, Winer, A.M., Creelman, L., Mabuni, C. 1999. A critical assessment of chromium in the environment. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**. 29: 1-46.
- Kramer, U., Cotter-Howells, J.M., Charnock, J.M., Baker, A.J.M., Smith, A.C. 1996. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. **Nature**, 379:635-638.
- Klapheck, S. 1988. Homoglutathione: isolation, quantification and occurrence in legumes. **Physiologia Plantarum**, 74:727-732.
- Lamb, C., Dixon, R.A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 48: 251-275.
- Landberg, T., Greger, M. 2002. Differences in oxidative stress in heavy metal resistant and sensitive clones of *Salix viminalis*. **Journal of Plant Physiology**, 159: 69-75.
- Lanir, A., Schejter, A. 1975. On the sixth coordination position of beef liver catalase. **FEBS Lett**, 15, 55 (1): 254–256.

- Larson, R.A. 1988. The antioxidant of higher plants **Phytochemistry**, 27: 969-978.
- Lemaire, S., Keryer, E., Stein, M., Schepens, I.I, Issakidis-Bourguet, E., Grand-Hirne, C., Miginiac-Maslow, M., Jacquot, J.P. 1999. Heavy-metal regulation of thioredoxin gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiology**, 120: 773-778.
- Leonardis, D.S., Dipierro, N, Dipierro, S. 2000. Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria. **Plant Physiology and Biochemistry**, 38:773-779.
- Lidon, F.C., Ramalho, J., Henriques, F.S. 1993. Copper inhibition of rice photosynthesis. **Plant Physiology**, 142:12-1.
- Liu, D., Zou, J., Meng, Q., Zou, J., Jiang, W. 2009. Uptake and accumulation and oxidative stress in garlic (*Allium Sativum* L.) under lead phytotoxicity. **Ecotoxicology**, 18: 134–143.
- Lozano, R., Azcon, R., Palma, J.M. 1996. SOD and drought stress in *Lactua sativa*. **New Phytologist**, 136:329-331.
- Malhotra, S. S., Khan, A. A. 1984. Biochemical and physiological impact of major pollutants. In M. Treshow (Ed.) Air Pollution and Plant Life, pp.113–157, Wiley.
- Markert, B., Herpin, U., Siewers, U., Berlekamp, J., Lieth, H.1996. The German heavy metal survey by means of mosses. **The Science of the Total Environment**, 182:159–168.
- Mathis, P., Kleo, J. 1973. The triplet state of β -carotene and analog polyenes of different length. **Photochemistry and Photobiology**, 18:343-346.
- Maxwell, D.P., Wang Y., McIntosh L. 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 96: 8271–8276.

- Mazhoudi, S., Chaoui, A., Habil Ghorbal, M. and El Ferjani, E. 1997. Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). **Plant Science**, 127(2); 129-137.
- McKersie D. B., Leshem Y.Y. 1994. Stress and Stress Coping in Cultivated Plants. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- McKersie,D.B.1996.Oxidativestress,
www.agronomy.psu.edu/Courses/AGRO518/Oxygen.htm.
- Milner, M.J., Kochian, L.V. 2008. Investigating heavymetal hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a model System. **Annals of Botany**, 102: 3-13.
- Minibaeva, F. V., Gordon, K.L. 2003. Superoxide production and activity of extracellular peroxidase in plant tissues under stress conditions. **Russian Journal of Plant Physiology**. 50(3): 411-416.
- Miranda, M.G., Ilangovan, K. 1996. Uptake of lead by *Lemna gibba* L. influence on spesific growth rate and basic biochemical changes. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 56: 1000-1007.
- Mitler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**,7: 405-410.
- Mobin, M., Khan., N.A. 2007. Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. **Journal of Plant Physiology**, 164: 601-610.
- Mohan, B.S., Hosetti, B.B. 1997. Potential phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* grown in the sewage stabilization ponds. **Environmental Pollution**, 2:133-238.
- Monni, S., Uhling, C., Hansen, E., Magel, E. 2001. Ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to heavy metal pollution. **Environmental Pollution**, 112: 121- 129.

- Munné-Bosch, S., Penuelas, J. 2004. Drought-induced oxidative stress in strawberry tree (*Arbutus Unedo* L.) growing in mediterranean field conditions. **Plant Science**, 166:1105-1110.
- Munzuroğlu, Ö., Geçkil, H. 2002. Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*, **Environmental Contamination and Toxicology**, 43: 203-213.
- Nash, E.H. 1972. Effect of effluents from a Zinc smelter on mosses. Rutgers University, Ph. D. Thesis, Nishio.
- Nicholls, P., Fita, I., Loewen, P.C. 2000. Enzymology and structure of catalases. **Advances in Inorganic Chemistry**, 51: 51-106.
- Nikookar, K., Moradshahi, A., Hosseini, L. 2005. Physiological responses of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* to copper toxicity. **Biomolecular Engineering**, 22 (4): 141-146.
- Nishio, A., Uyeki, E. M. 1985. Inhibition of DNA synthesis by chromium compounds. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, 15:237-244.
- Niyogi, K.K. 1999. Photoprotection revisited: genetic and molecular approach. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 50: 333-359.
- Nussbaum, S., Shemutz, D., Brunold, C. 1988. Regulation of assimilatory sulfate reduction by cadmium *Zea mays* L. **Plant Physiology**, 88:1407-1410.
- Ogawa, K. Kanematsu, S., Asada, K. 1997. Generation of superoxide anion and localization of Cu/Zn-superoxide dismutase in the vascular tissues of spinach hypocotyls: their association with lignification. **Plant Cell Physiology**, 38: 1118-26.
- Ohkawa, H., Ohishii, N., Yagi, Y. 1979. Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, 95:51-58.

- Öncel, I., Keleş, Y., Üstün, A.S. 2000. Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings. **Environmental Pollution**, 107: 315-320.
- Özbek, H., Kaya, Z., Gök, M., Kaptan, H. 1995. Toprak Bilimi. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fak., Genel Yayın No: 73, Ders Kitapları Yayın No:16, Adana.
- Öztürk, İ., Ubay, G., Samsunlu, A., Eroğlu.V. 1992. Türkiye'deki Belediyelerin Çevre Mühendisliği Altyapı Meselelerinin Boyutları. Türk Devletleri Arasında I. İlimi İşbirliği Konferansı Tebliğler Kitabı, Lefkoşe, KKTC.
- Parida, A.K., Das, A.B., Mitra, B. 2004. Effects of salt on growth, ion accumulation, photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflor*. **Trees**, 18:167-174.
- Panda, S.K., Choudhury S. 2005. Changes in nitrate reductase activity and oxidative stress in the moss *Polytrichum commune* subjected to chromium, copper and zinc toxicity. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 17: 191-197.
- Pandey, N., Sharma, C.P. 2002. Effect of heavy metals Co, Ni, and Cd on growth and metabolism of cabbage. **Plant Science**, 163:753-758.
- Pandolfini, T., Gabrielli, R., Comparini, C. 1992. Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* . **Plant Cell and Environment**, 15: 719-725.
- Patterson, B.D., Elspeth, A., Ferguson, I.B. 1984. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using Titanium (IV). **Analytical Biochemistry**, 139: 487-92.
- Peter H. Proctor, Ph.D., M.D., Edward S. Reynolds, M.D.1984. Free radicals and disease in man. **Physiological Chemistry and Physics**, 16: 175–195.
- Porcel, R., Barea, J. M., Ruiz, J. M. 2003. Antioxidant activities in mycorrhizal soybean plants under drought stress and their possible relationship to the process of nodule senescence. **New Phytologist**, 157(1):135–143.

- Poschenrieder, C.H., Gunse, B., Barcelo, J. 1989. Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance, and abscisic acid content in expanding bean leaves. **Plant Physiology**, 190:1365-1371.
- Prasad, K.V.S.K., Paradha-Saradhi, P., Sharmila, P. 1999. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*, **Environmental and Experimental Botany**, 42: 1-10.
- Price, A., Lucas, P.W., Lea, P.J. 1990. Age dependent damage and glutathione metabolism in ozone fumigated barley: A leaf section approach. **Journal of Experimental Botany**, 41: 1309-1317.
- Ouzounidou, G., Eleftheriou, E.P., Karataglis, S. 1992. Ecophysical and ultrastructural effects of copper in *Thlaspi ochroleucum* (Cruciferae). **Canadian Journal of Botany**, 70: 947-957.
- Ouzounidou, G. 1994. Root growth and pigment composition in relationship to element uptake in *Silene compacta* plants treated with copper. **Journal of Plant Nutrition**, 17:933-943.
- Rai, L.C., Gaur, J. P., Kumar, H. D. 1981. Phycology and heavy- metal pollution. **Biological Reviews**, 56: 99- 151.
- Rascio, N., Navari-Izzo, F. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? and What makes them so interesting? **Plant Science**, 180: 169-181.
- Rao, K.V.M., Stresty, T.V.S. 2000. Antioxidative parameters in seedlings of pigeonpea (*Cajanus Cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. **Plant Science**, 157: 113-128.
- Raskin, I., Smith, R.D., Salt, D.E. 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. **Current Opinion in Biotechnology**, 8:221-226.

- Reeves, R.D. 2006. Hyperaccumulation of trace elements by plants. In: Morel, J.L., Echevarria, G. ve Goncharova, N. (Eds.). *Phytoremediation of Metal Contaminated Soils*, NATO Science Series: IV: Earth and Environmental Sciences, Springer, pp. 1-25.
- Reski, R. 1997. Development, genetics and molecular biology of mosses. **Botanica Acta**, 111: 1–15.
- Robertson, D. 2004. Catalases. U.S.P. No: 20040005655.
- Romero-Putertas, M.C., McCarthy, I., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Corpas, F.J., Gomez, M., Del Rio, L.A. 1999. Cadmium toxicity and oxidative metabolism of pea leaf peroxisomes. **Free Radical Research**, 31: 25-31.
- Roy, S., Hänninen, O. 1995. Use of aquatic plants in ecotoxicology monitoring of organic responses. In M. Richardson (Ed.) *Environmental Ecotoxicology Assessment*, pp. 97-109, London.
- Ruis-Jiménez, J., Luque-García, J.L., Luque de Castro, M.D. 2003. Dynamic ultrasound-assisted extraction of cadmium and lead from plants prior to electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 480: 231-237.
- Salt, D.E., Rauser, W.E. 1995. MgATP-Dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. **Plant Physiology**, 107: 1293-1301.
- Samecka-Cymerman, A., Kolon, K., Kempers, A.J. 2002. Heavy metals in aquatic bryophytes from the Ore Mountains (Germany). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 52:203–210.
- Samecka-Cymerman, A., Kolon, K., Kempers, A., Jansen, J., Bonen, B. 2005. Bioaccumulation of elements in bryophytes from serra da estrela, portugal, and veluwezoom, The Netherlands. **Environmental Science and Pollution Research** 12(2):71–79.
- Sandmann, G., Boger, O. 1980. Copper-mediated lipid peroxidation processes in photosynthetic membranes. **Plant Physiology**, 66:797– 800.

- Satake, K., Soma, M., Seyama, H., Uehiro, T. 1983. Accumulation of mercury in the liverwort *Jungermannia vulcanicola* Steph. in an acid stream Kashiranashigawa in Japan. **Archive Fuèr Hydrobiologie**, 99: 80-92.
- Satake K., Miyasaka K. 1984. Evidence of high mercury accumulation in the cell wall of the liverwort *Jungermannia vulcanicola* Steph. to form particles of a mercury-sulphur compound. **Journal of Bryology**, 13: 101-105.
- Sawidis, T., Zachariadis, G., Stratis, J., Ladoukakis, E. 1993. Mosses as biological indicators for monitoring of heavy metal pollution. **Fresenius Environmental Bulletin**, 2:193–199.
- Scebba, F., Arduini, I., Ercoli, L., Sebastiani, L. 2006. Cadmium effects on growth and antioxidant enzymes activities in *Miscanthus sinensis*. **Biologia Plantarum**, 50:688-692.
- Schickler, H., Caspi, H. 1999. Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. **Physiologia Plantarum**, 105(1): 39-44.
- Schumaker, K.S., Dietrich, M.A. 1998. Hormone induced signaling during moss development. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 49: 501–523.
- Schutzendubel, A., Polle, A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. **Journal of Exprimental Botany**, 53 (372): 1351-1365.
- Shakya, K., Chettri, M.K., Sawidis, T. 2004. Appraisal of some mosses for biomonitoring air borne heavy metals in Kathmandu valley. **Ecoprint**, 2(1):35–49.
- Shakya, K., Chettri, M. K., Sawidis, T. 2008. Impact of heavy metals (copper, zinc, and lead) on the chlorophyll content of some mosses. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 54(3): 412-421.

- Shanker, A.K. 2003. Physiological, Biochemical and Molecular Aspects of Chromium Toxicity and Tolerance in Selected Crops and Tree Species. Coimbatore: Tamil Nadu Agricultural University, Ph.D. Thesis, India.
- Sharma, P., Dubey, R.S. 2005. Lead toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 17(1):35-52.
- Sheng, L., Zheng, X., Tong, H., Liu, S., Du, J., Liu, Q. 2004. Purification and characterization of cytosolic isoenzyme III of Cu, Zn- Superoxide Dismutase from tobacco leaves. **Plant Science**, 167 (6): 1235-1241.
- Siefermann-Harms, D. 1987. The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. **Plant Physiology**, 69:561-568.
- Singh, O.V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R., Jain, R.K. 2003. Phytoremediation: An overview of metallic ion decontamination from soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 61:405-412.
- Sinha, S., Gupta, A.K. 2005. Translocation of metals from fly ash amended soil in the plant of *Sesbania cannabina* L Ritz: effect on antioxidants. **Chemosphere**, 61: 1204-1214.
- Sinha, S., Saxena, R. 2006. Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and non-enzymatic antioxidants and bacoside-a content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. **Chemosphere**, 62:1340–1350.
- Siripornadulsil, S., Train, S., Verma, D.P.S., Sayre, R.T. 2002. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. **Plant Cell**, 14: 2837–2847.
- Smith, A.J.E. 2004. The moss flora of Britain and Ireland. 2nd edition. Cambridge.
- Solomanson, P.L., Barber, M. J. 1990. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 41: 225- 253.
- Solomon, M., Belenghi, B., Delledonne, M., Menachem, E., Levine, A. 1999. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **Plant Cell**, 11: 431-444.

- Somashekaraiah, B.V., Padmaja, K., Prasad, A.R.K. 1992. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*) involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. **Physiology Plantarum**, 85: 85-89.
- Sossé, B.A., Genet, P., Dunand-Vinit, F., Toussaint, L.M., Epron, D., Badot, P.M. 2004. Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. **Plant Science**, 166:1213-1218.
- Stevenson, R., Bothwell, L., Lowe, L. 1996. Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems.
- Sun, S.Q., Wang, D.Y., He, M., Li, X.Y., Zhang, Ch. 2007. Retention capacities of several bryophytes for Hg (II) with special reference to the elevation and morphology of moss growth. **Environmental Monitoring and Assessment**, 133: 399–406.
- Sun, S.Q., He, M., Cao, T., Zhang, Ch., Han W. 2009. Response mechanisms of antioxidants in bryophyte (*Hypnum plumaeforme*) under the stress of single or combined Pb and/or Ni. **Environmental Monitoring and Assessment**, 149: 291–302.
- Sun, S.Q., Wang, G.X., He, M., Cao, T. 2011. Effects of Pb and Ni stress on oxidative stress parameters in three moss species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 74: 1630-1635
- Taiz, L., Zieger, E. 2002. Plant Physiology, 3rd edn., Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.
- Tamas, L., Simonovicova, M., Huttova, J., Mistrík, I. 2004. Aluminium stimulated hydrogen peroxide production of germinating barley seeds. **Environmental and Experimental Botany**, 51, 281- 288.
- Taulavuori, E., Hellstrom, E.K., Taulavuori, K., Laine, K. 2001. Comparison of two methods used to analyse lipid peroxidation from *Vaccinium myrtillus* (L.) during snow removal, reacclimation and cold acclimation. **Journal of Experimental Botany**, 52(365): 2375-2380.

- Taylor, O.C. 1984. Organismal responses of higher plants to atmospheric pollutants: photochemical and other. In M. Treshow (Ed.) *Air Pollution and Plant Life*.
- Tewari, R.K., Kumar, P., Sharma, P.N., Bisht, S.S. 2002. Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt. **Plant Science**, 162: 381-388.
- Thomas, W. 1983. Über die Verwendung von Pflanzen zur Analyse räumlicher Spurenschubstanz-immissionsmuster. **Staub Reinhalt**, 43: 141–148.
- Turner, R.G., Marshall, C. 1971. The accumulation of Zn by root homogenates of Zn-tolerant and non-tolerant clones of *Agrostis tenuis* Sibth. **New Phytologist**, 70: 539-54.
- Tremper, A.H., Agneta, M., Burton, S., Higgs, D.E.B. 2004. Field and laboratory exposures of two moss species to low level metal pollution. **Journal of Atmospheric Chemistry**, 49(1–3):111–120.
- Tyler, G. 1989. Uptake, retention and toxicity of heavy metals in lichens. **Water, Air, & Soil Pollution**, 47:321–333.
- Tyler, G. 1990. Bryophytes and heavy metals: A Literature Review. **The Botanical Journal of the Linnean Society**, 104:231–253.
- Van Breusegem, F., Dat, J.F. 1998. Reactive oxygenspecies in plant cell death. **Plant Physiology**, 141: 384-390.
- Van Camp, W., Van Montagu. 1998. H₂O₂ and NO: redox signals in disease resistance. **Trends Plant Science**, 3: 330-334.
- Verbruggen, N., Hermans, C. 2008. Proline accumulation in plants: A Review, **Amino Acids**, 35:753-759.
- Verma, S., Dubey, R.S. 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Science**, 164: 645–655.

- Vernay, P., Gauthier-Moussard, C., Jean, L., Bordas, F., Faure, O., Ledoigt, G., Hitmi, A. 2008. Effect of chromium species on phytochemical and physiological parameters in *Datura innoxia*. **Chemosphere**, 72: 763-771.
- Vukojević, V., Sabovljević, M., Jovanović S. 2005. Mosses accumulate heavy metals from the substrata of coal ash. **Archives of Biological Sciences**. 57(2): 101-106.
- Wellburn, A.R. 1994. The spectral determination of chlorophyll *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, 144: 307-313.
- Wen-Chi, Hou. 2004. Detection of glutathione reductase after electrophoresis on native or sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, 25: 2926– 2931.
- Williams, L.E., Pittman, J.K., Hall, J.L. 2000. Emerging mechanisms for heavy metal transport in Plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1465:104-126.
- Wolterbeek, H., Kuik, P., Verburg, T.G., Herpin, U., Markert, B., Thoni, L. 1995. Moss interspecies comparisons in trace element concentrations. **Environmental Monitoring and Assessment**, 35:263–286.
- Xiang, C., Oliver, D.J. 1998. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, 10:1539-1550.
- Xing, W., Huang, W., Liu, G. 2010. Effect of excess iron and copper on physiology of aquatic plant *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid. **Environmental Toxicology**, 25(2):103-12.
- Yoshida, Y., Kiyosue, T., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 1997. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. **Plant Cell Physiology**, 38: 1095-1102.
- Zacchini, M., Rea, E., Tullio, M., De Agazio, M. 2003. Increased antioxidative capacity in Maize calli during and after oxidative stress induced by a long lead treatment. **Plant Physiology and Biochemistry**, 41: 49–54.

- Zechmeister, H.G. 1998. Annual growth of four pleurocarpous moss species and their applicability for biomonitoring heavy metals. **Environmental Monitoring and Assessment**, 52:441–451.
- Zechmeister, H. G., Hohenwallner, D., Riss, A., Hanus-Illnar, A. 2003. Variations in heavy metal concentrations in the moss *Abietinella abietina* (Hedw.) Fleisch. according to sampling within site variability and increase in biomass. **Science of Total Environment**, 301: 55–65.
- Zengin, F., K., Munzuroğlu, Ö. 2003. Fasulye Fidelerinin (*Phaseolus vulgaris* L.) Kök, Gövde ve Yaprak Büyümesi Üzerine Kadmiyum (Cd^{++}) ve Civa (Hg^{++})’nın Etkileri. C.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi .Cilt 24 Sayı 1.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Serap AYDOĞAN

Doğum Yeri ve Tarihi : Nizip 01.07.1980

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi

Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Makaleler (Hakemli Dergi Makaleleri)

Erdağ B., Emek Y.Ç., **Aydoğan S.K.** 2010. Clonal Propagation of *Dorystoechas hastata* via axillary shoot proliferation. **Turkish Journal of Botany**, 34:233-240.

Aydoğan S.K., Erdağ B. 2009. In vitro germination and axillary shoot propagation of *Centaurea zeybekii*. **Biologia-Section Botany**, 64 (1):97-101.

b) Bildiriler (Ulusal)

Aydoğan S.K., Erdağ B., Aktaş L.Y. 2010. Impact of Heavy Metals on lipid peroxidation and Pigment Contents in some bryophytes, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi 21-25 Haziran 2010 Denizli.

Aydoğan S.K., Erdağ B., Karagözler A.A., Uygun M. 2008. *Centaurea zeybekii* Wagenitz (Asteraceae) nin antioksidan aktivitesi üzerine bir araştırma. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi.

Erdağ B., Emek Y., **Aydoğan S.K.** 2006. *Dorystoechas hastata* Boiss.& Heldr. ex Bentham'nın in vitro çimlenmesi ve fide gelişimi üzerine araştırmalar, 18. Ulusal Biyoloji Kongresi.

Aydoğan S.K., Erdağ B. 2006. *Centaurea zeybekii* Wagenitz (Asteraceae) 'nin in vitro sürgün rejenerasyonu üzerine bir araştırma, 18.Ulusal Biyoloji Kongresi .

Aydoğan K.S., Erdağ B. 2005. In vitro germination and seedling development of *Centaurea zeybekii* Wagenitz, II. International Environmental Protection Symposium.

c) Katıldığı Projeler

Dorystoechas hastata Boiss. & Heldr. ex Bentham'ın Doku Kültürü Teknikleri Kullanılarak Çoğaltımı. 2008. Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, FEF 06014 (Münferit Proje), 2008.

Centaurea solstitialis L. (Çakır Dikeni, Asteraceae) Türünün İstilacı Özelliğini Tetikleyen Etkenlerin Araştırılması TÜBİTAK, 2007.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl :

İLETİŞİM

E-posta Adresi : sekurt@adu.edu.tr

Tarih :27.08.2012