

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ KOORDİNATÖRLÜĞÜNE

Proje Türü : Hızlandırılmış Destek Projesi (HDP)
Proje No : 15H0447003
Proje Yöneticisi : Doç. Dr. Oğuz Can Turgay
Proje Başlığı : Nikel-hiperakümülatör Bitkilerde Ubikitin Protein Yolağı Mekanizmasının Rolü

Yukarıda bilgileri yazılı olan projemin sonuç raporunun e-kütüphanede yayınlanmasını;

İSTİYORUM

İSTEMİYORUM GEREKÇESİ:



07 / 04 / 2017
Doç. Dr. Oğuz Can Turgay

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
SONUÇ RAPORU

Proje Başlığı

Nikel-hiperakümülatör Bitkilerde Ubikitin Protein Yolağı Mekanizmasının Rolü

Proje Yürüttücünün İsmi

Doç. Dr. Oğuz Can Turgay

Araştırmacıların İsmi

Prof. Dr. Ali Ergül, Doç. Dr. Ahmet Emre Yaprak, Doç. Dr. Douglas Van Hoewyk, Araş. Gör Mehmet Burak Taşkın

Proje Numarası

15H0447003

Başlama Tarihi

30.12.2015

Bitiş Tarihi

30.12.2016

Rapor Tarihi

07.04.2017

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri

Ankara - " 2017 "



RAPOR FORMATI

Projenin Türkçe Adı: Nikel-hiperakümülatör Bitkilerde Ubikitin Protein Yolağı Mekanizmasının Rolü

Projenin İngilizce Adı: Role of Ubiquitin Proteasome Pathway in Ni Hyperaccumulating Plants

Projenin Türkçe Özeti:

Yüksek düzeyde Nikel (Ni) biriktirme yeteneğine sahip hiperakümülatör bitkiler (NiH^+) çoğu durumda yüksek Ni düzeylerine genetik olarak evrilerek adapte oldukları serpantin topraklarda gelişirler. Tarım ve Ni biriktirmeyen pekçok yabani bitki türünde Ni oksidatif stresse bağlı olarak proteinlerin yanlış katlanması neden olur. Proteozomlar bu yanlış katlanmış proteinleri stres boyunca ortadan kaldırarak suretiyle hücresel homeostaz (hücre içindeki normal şartların devamlılığı) koşullarını düzenlerler. Stresse olan tolerans proteozomal proteoliz ile ilgili olmakla birlikte stres düzeyinin yüksek ve sürekli olması bitkideki proteozom fonksiyonunu bozabilir. Aslında laboratuvar ve sera denemeleri Ni'in proteozom aktivitesini engellediğini göstermiştir. Bu araştırmada Türkiye koşullarında gelişen Ni hiperakümülatör *Alyssum* bitkilerinde Ni biriminin proteozom aktivitesini değiştirip-değiştirmediği test edilmiştir. Proteozom aktivitesi hem farklı düzeylerde Ni içeren Serpantin Topraklarda doğal olarak gelişen *Alyssum* Bitkilerinde ve hem de iklim odası koşullarında farklı düzeylerde Ni içeren topraksız (hidroponik) deneysel koşullarda geliştirilen *Alyssum* bitkilerinde analiz edilmiştir. Elde edilen bulgular serpantin topraklarda doğal olarak gelişen bitkilerde proteozom aktivitesinin bitki Ni düzeyleri ile zayıf bir korelasyon içinde olduğunu başka bir ifade ile Ni hiperakümülatör bitkilerde proteozom fonksiyonunun yüksek düzeyde Ni alımı ve biriminden zarar görmediğini göstermiştir. Diğer yandan deneysel koşullarda farklı düzeylerde Ni uygulanan *Alyssum* bitkisinde ise artan düzeyde nikelin proteozom aktivitesini azalttığı görülmüştür ki bu durum Ni hiperakümülatörü bitkilerin deneysel ve doğal koşullarda farklı proteom aktiviteleri sergileyebileceğini göstermektedir. Elde edilen sonuçlara dayanarak proteozom aktivitesinin bitkide Ni toleransını ve hiperakümlasyonunu destekleyip-desteklemediği tartışılmıştır.

Projenin İngilizce Özeti:

Nickel hyper-accumulating plants are often endemic to serpentine soils where they have evolved mechanisms to avert the toxicity of nickel uptake observed in most plants. In crops and other non-hyper-accumulators, nickel can induce oxidative stress, which oxidizes and misfolds proteins. Proteasomes maintain cellular homeostasis during stress by removing these damaged proteins. Although stress tolerance is mediated by proteasomal proteolysis, severe and prolonged stress can impair proteasome function in plants. In fact, both in planta and in vitro experiments demonstrate that nickel inhibits proteasome activity. We tested whether or not proteasome activity is altered in nickel hyper-accumulating *Alyssum* species in Turkey. This has been checked either in the plants naturally growing in Serpentine soils in Central and Aegean Turkey or those in experimentally grown in hydroponic conditions with increasing Ni concentrations. In plants growing in their natural habitat (e.g. serpentine soil), levels of nickel were very weakly correlated with proteasome activity, suggesting that proteasome function was not impaired in plants that accumulated the highest concentration of nickel. In contrast, nickel treatment decreased proteasome activity in *Alyssum* grown in a growth chamber, highlighting the differences in proteasome activity in these plants in their natural habitat versus controlled conditions. We discuss if maintained proteasome activity might underpin nickel



tolerance and its hyper-accumulation in plants.

Amaç ve Kapsam

Cevrelerinde bulunan aynı ya da benzer toprak koşullarında yetişen diğer bitkilere kıyaslandığında, herhangi bir olumsuz etki olmaksızın adı geçen elementleri 100-1000 kat daha fazla biriktirebilen bu sıradışı bitkiler “hiperakümülatör” olarak adlandırılmaktadır. Dünya üzerinde son derece sınırlı bir yayılıma sahip ve Türkiye'nin de dahil olduğu birkaç ülkede bulunan serpantin topraklar oldukça zengin bir hiperakümülatör bitki florasına sahiptir. Metal hiperakümülatörü bitkiler, fitoremidasyon (su/toprak/sediment kaynaklarının organik ve inorganik kirleticilerden metal biriktiren bitkiler yetiştirmesi ile arındırılması) olarak bilinen bilim dalının gelişmesiyle 2000'li yılların başından itibaren artan bir popülerite kazanmıştır. Pek çok araştırma yeni hiperakümülatör bitkilerin ve metal biriktirme kapasitelerinin literatüre kazandırılması üzerine odaklanmışken hiperakümülasyon özelliğini yöneten bitki-içi mekanizmalar hakkında bildiklerimiz oldukça sınırlıdır. Hiperakümülatör bitkilerin neden ve nasıl metal biriktirdiği sorularının cevaplanması, ağır metallerce kirlenmiş toprakların fitoremidasyonu ve metallerce zengin serpantin topraklardan fito-ekstraksiyon yaklaşımı ile metallerin ayırtırılması gibi teknolojiler açısından son derece önemlidir.

Yakın zamanda yapılan araştırmalar yüksek düzeyde selenyum içeren stres koşullarında bitki selenyum toleransının selenyumdan zarar görmüş proteinlerin Ubikitin Proteozom Yolu (UPY) adı verilen bir fizyolojik mekanizma kullanılarak bitkiden uzaklaştırılması ile oluştuğunu göstermiştir. UPY ökaryotik hücrelerde hasarlı, yanlış katlanmış ve kısa-ömürülü proteinlerin yıkımında önemli rol oynayan yüksek seçiciliğe sahip ATP bağımlı proteolitik bir yıkım yoludur.

Diğer yandan adı geçen fizyolojik mekanizmanın diğer ağır metallere dayaklısı ve veya metal biriktiren hiperakümülatör bitkilerde de devreye girip-girmediği henüz bilinmemektedir. Dünyada ölçüngünde bu konuda yapılmış çok az çalışma mevcutken genellikle serpantin toprak koşullarında yaşam süren hiperakümülatör bitkilerin nikel biriktirme sürecinde aynı fizyolojik mekanizmayı kullanıp-kullanmadığına dair hiçbir bilgi mevcut değildir. **Bu araştırmanın amacı, Türkiye serpantin toprak koşullarında gelişen nikel hiperakümülasyonu bitkilerde UPY mekanizmasının nikel direnci ve biriktirme kapasitesi ile ilişkisini irdelemektir.**

Araştırmanın dayandığı hipotez, Ni hiperakümülatör bitkilerin (NiH^+); Ni hiperakümülatörü olmayan NiH^- bitkilere kıyasla yüksek UPY düzeyleri sergileyeceği veya NiH^- bitkilerin diğer ağır metallere için ispatlanmış olduğu gibi zayıf bir UPY mekanizmasına sahip olacağı şeklinde ifade edilebilir. Bu hipotezi test etmek amacıyla Türkiye serpantin toprak koşullarında yaşam süren Brassicaceae familyasına ait NiH^+ bitkilerdeki UPY mekanizması, aynı familyada yer alan NiH^- türlerin UPY mekanizması ile kıyaslanmıştır. Ayrıca mümkün olduğu Türkiye serpantin alanlarında yaşam süren Brassicaceae familyasına ait *Alyssum* türü bitkilerin NiH^+ ve NiH^- özelliklerinin bitki UPY mekanizmasının düzenlenmesine dayandığı tahmin edilmektedir.

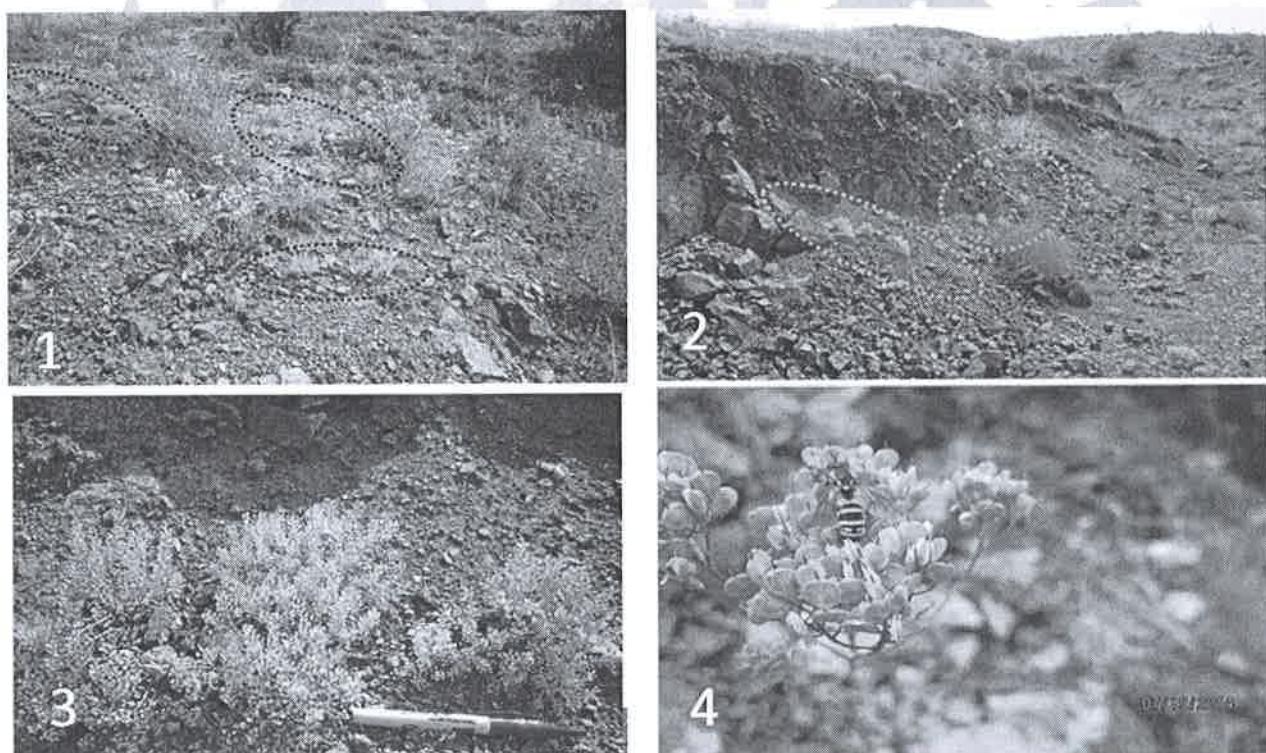
Yukarıda ifade edilen önceki bilimsel bulgular, mevcut bilgi eksikliği ve hipoteze dayanarak Coastal Carolina Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Douglas Van Hoewyk ve Ankara Üniversitesi Öğretim Üyeleri Doç. Dr. Oğuz Can Turgay ve Doç. Dr. Ahmet Emre Yaprak tarafından hazırlanan proje önerisi A.B.D.-Türkiye Kültürel Mübadele Komisyonu Fulbright'a sunulmuş ve Dr. Hoewyk 2015-2016 eğitim/öğretim döneminde adı geçen öğretim üyeleri ile birlikte Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Laboratuvarları koşullarında Prof. Dr. Ali Ergül gözetiminde

çalışmak üzere Fulbright desteği layık görülmüş 1 Eylül 2015 tarihinden itibaren 9 ay süre ile Ankara Üniversitesi koşullarında bulunmuştur. Fulbright araştırmacının yolculuk ve Türkiyede bulunduğu süre boyunca yaşam masaraflarını karşılamakla birlikte araştırma desteği içermemektedir. Araştırma için gerekli bütün ekipman ve cihazlar Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü ve Ziraat Fakültesi Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü koşullarında bulunmaktadır. Diğer yandan NiH(+) ve NiH(-) bitkilerin toplanması, deneysel koşullarda geliştirilebilmesi, UPY ve nikel analizlerinin gerçekleştirilebilmesi gibi aşamalar için gereken maddi destek Ankara Üniversitesi BAP Hızlı Destek Programı tarafından karşılanmıştır.

1.Materyal ve Yöntem

Proje öneri metninde de ifade edildiği üzere Temmuz-Ağustos 2014 döneminde İç Anadolu ve Ege bölgesinde yer alan serpantin alanlarından tohum, bitki ve toprak örneklemeye amaçlı arazi çalışmaları yapılmıştır. Toplanan toprak ve bitki örneklerinin Ni içeriği Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü ICP-OES Laboratuvarında belirlenmiş ve Analiz ve Bulgular kısmında Tablo-1'de verilmiştir.

Fotoğraf 1. Temmuz-Ağustos 2014 Arazi Çalışması



Ankara Beynam (1-3) ve Kırıkkale Bölgesi (2-4) bitki teşhis, tohum materyali toplama ve Ni içeriği belirleme amaçlı arazi çalışması (*A. sibiricum*, *A. hirsutum*, ve *A. murale* türlerinin toplandığı alanlar)

1.1 Deneysel Koşullarda Yapılan Çalışmalar;

Düşük düzeyde Nikel içeren İç Anadolu Bölgesi (Ankara ve Kırıkkale) serpantin alanlarından toplanmış Brassicaceae familyasına ait bitkiler (*Alyssum murale*, *A. sibiricum* ve *A. hirsutum*) ile

[Handwritten signature]

nispeten yüksek düzeyde Nikel içeren Ege Bölgesi (Muğla-Köyceğiz) serpantin alanlarından toplanmış olan bitkilerin (*A. caricum* ve *A. masmaneum*) tohumları toprakta çimlendirilerek hidroponik, agarlı besiyeri ve saksı toprağı gibi farklı koşullarda gelişime alınmıştır. Araştırma açısından en uygun NiH(+) ve NiH(-) bitkileri ve gelişme ortamının belirlenmesi denemeleri iklim odası koşullarında gerçekleştirılmıştır.

Denemeye alınan farklı *Alyssum* türleri arasında sadece *A. masmaneum* saksı toprağı ve hidroponik ortamlarda köklenmiş ve gelişme sağlamıştır. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarı iklim odası koşullarında (25°C , 16/8 saat gece/gündüz ışık uygulaması) steril saksı toprağında gelişim sergileyen *A. masmaneum*, çimlenmeyi takip eden 35 günlük periyod boyunca haftada üç kere Ni solüsyonu (1 mM NiCl_2) ile sualanmıştır. Kontrol bitkilerine Ni uygulanmamıştır. Gelişmenin 35. gününde bitkiler hasat edilerek proteozom analizine alınmıştır.

İkinci deneyde ise nikelin kısa süreli etkilerini belirlemek amacıyla 6 ve 14 gün süreyle aynı iklim odası koşullarında topraksız (hidroponik) şartlarda geliştirilen *A. masmaneum* bitkisine 30 ve $150\text{ }\mu\text{M NiCl}_2$ uygulanmıştır.

1.2 Arazi Çalışmaları

Alyssum bitki türlerinin farklı düzeylerde Ni içeren doğal yaşam ortamlardaki proteozom mekanizmalarının anlaşılması için Türkiye'nin Orta Anadolu (Ankara Beynam) ve Ege (Muğla, Marmaris) Bölgelerinde yoğun olarak bulunan ultramafik kayaçlar üzerinde oluşmuş serpantin alanlarda toprak ve bitki örneklemeleri gerçekleştirılmıştır.

1.2.1 Ankara Beynam Bölgesi Arazi Çalışması

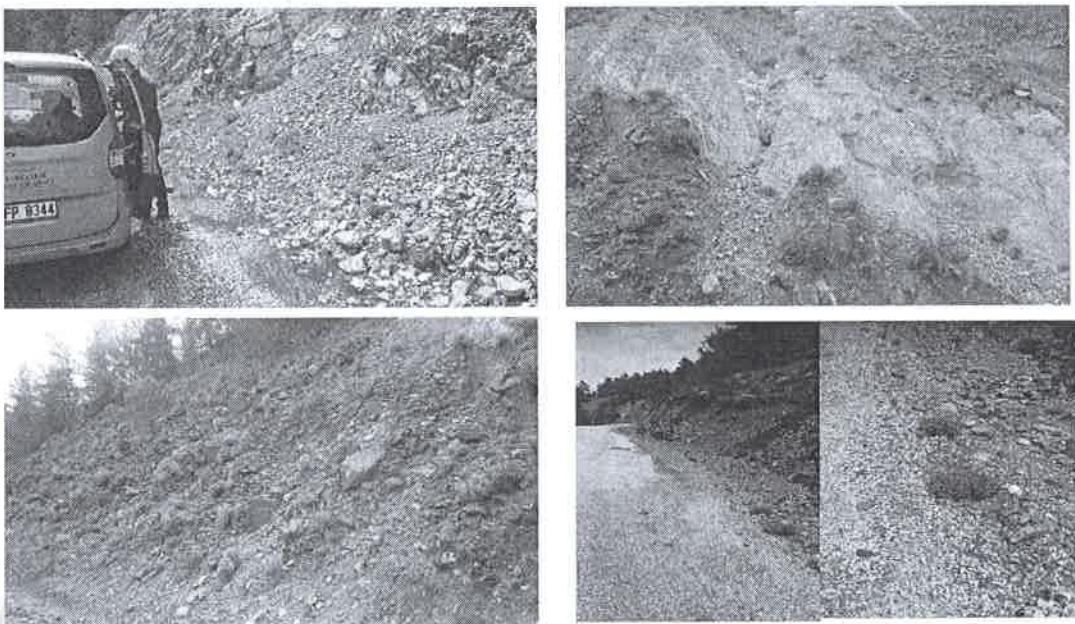
İlk arazi çalışması, Mayıs 2016 döneminde daha önce *Alyssum* bitki türlerinin belirlenmesi ve tohum toplama amaçlı ziyaret edilen Ankara Beynam Bölgesinde gerçekleştirılmıştır. Bu arazi çalışması sırasında eğimli bir alanda birbirine komşu, Serpantin olan ve serpantin olmayan iki alanda hem *Alyssum* ve hem de Ni akümüle etmediği bilinen *Festuca* ve *Astragalus* türü bitkiler olduğu fark edilmiştir. Bu noktada proje önerisinde yer almamakla birlikte Ni biriktirdiği (*Alyssum*) ve biriktirmediği (*Festuca*) literatürden bilinen ancak serpantin olan ve olmayan farklı toprak koşullarında gelişen bitkilerin proteozom aktivitelerini karşılaştırma düşüncesi doğumuştur. Başka bir ifade ile separtin toprakta gelişen *Alyssum* ve *Festuca* bitkilerinin, serpantin olmayan toprakta gelişen aynı bitkilere kıyasla daha yüksek proteozom aktivitesine sahip olabileceği olasılığı değerlendirilmek istenmiştir. Bu nedenle *Alyssum* bitkileri ve ek olarak Ni akümüle etmediği bilinen *Festuca* ve *Astragalus* türü bitkiler toplanarak Ni ve proteozom analizleri yapılmıştır. Ayrıca bitki örneklerinin alındığı yerlerden toprak numunesi alınarak Ni analizi yapılmıştır.

1.2.2 Muğla Bölgesi Arazi Çalışması

İkinci arazi çalışması, Mayıs 2016 döneminde farklı düzeylerde Ni içeren serpantin alanlardan farklı düzeylerde Ni biriktiren *Alyssum* türlerinin toplanması için Muğla Bölgelerinde gerçekleştirılmıştır. Örnekleme alanlarının yaklaşık lokasyonlarının belirlenmesinde Adıgüzel and Reeves (2012) ve "Kimi

brassicaceae türlerinin nikel ve kadmiyum biriktirme özelliklerinin belirlenmesi” başlıklı TÜBİTAK projesi (TOVAG, 2009, 105O635) referans alınmıştır.

Fotoğraf 3. Mayıs 2016 Muğla Bölgesi Ni biriktiren (*Alyssum*) bitki türlerinin toplandığı alanlar.



Muğla Bölgesinden toplam 17 lokasyondan *Alyssum* bitki ve toprak numuneleri toplanarak Ni ve proteozom analizleri yapılmıştır. Proteozom analizi için toplanan bitki örnekleri arazi çalışması boyunca kuru buz içeren özel buz kutuları içinde muhafaz edilmiş ve laboratuvara getirilmiştir.

Fotoğraf 4. Mayıs 2016 Muğla Bölgesi Ni biriktiren (*Alyssum*) bitki örneklemeleri.



1.3 Proteazom Analizi

Deneysel koşullarda geliştirilen *A. masmaneum* bitkisine 30 ve 150 μM NiCl_2 uygulanarak 6 ve 14 günlerde proteozom analizi yapılmıştır. Bitkilerdeki ubikitinlenmiş protein düzeyleri 0.1% Dimetil

sülfoksit (DMSO) de çözünmüş proteazom inhibitörü MG132 uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda Van Hoewyk tarafından bildirildiği gibi (Sabbagh ve Van Hoewyk, 2012) belirlenmiştir. Buna göre proteinler denatüre şartlarda protein ekstraksiyon tampon çözeltisinde ekstrakte edilecek %8'lik SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate – Poly Acrylamide Jel Elektroforez) jel üzerinde koşturulmuştur. Ubikitinlenmiş proteinler deney faresinde elde edilmiş primer ubikitin-antibadi ve yaban turpu peroksidaz enziminden konjuge edilen sekonder antibadi kullanılarak belirlenmiştir. İkinci aşamada ubikitinleşmiş protein düzeylerinin proteazom aktivitesi ile eşleşip eşleşmediğini belirlemek için bitki örneklerindeki proteazom aktivitesi ölçülmüştür. Bu enzimatik analiz için proteinler denature olmayan koşullarda ekstrakte edilmiştir. Reaksiyon potasyum fosfat tamponu, florojenik peptid Suc-LYV-AMC ve enzim ekstraktından oluşmuştur. Ölçümler Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Laboratuvarında yer alan spektrofotometre cihazı kullanılarak MG132 inhibitörü uygulanmış ve proteazomal olmayan aktiviteyi belirlemek üzere MG132 uygulanmamış örneklerdeki rölatif AMC salınımının ölçülmesi ile belirlenmiştir.

1.4 Nikel Analizleri

DTPA ile Ekstrakte Edilebilir Nikel düzeyi Lindsay ve Norvell (1978) tarafından açıklandığı gibi, toprak-çözelti oranı 1:2 olacak şekilde 0,005 M DTPA (dietilen triamin penta asetik asit) + 0.01 M CaCl₂ + 0.1 M TEA (trietanolamin) karışım çözeltisi (pH: 7.3) ile 2 saat çalkalanarak ekstrakte edilen süzükte Ni miktarı Perkin Elmer Optima 2100 DV ICP-OES cihazı ile belirlenmiştir. Bitki toplam Nikel içeriği, bitki örneklerinin kuru yakma yöntemine göre yakılmasıyla elde edilen çözeltideki toplam nikel konsantrasyonu Perkin Elmer Optima 2100 DV ICP-OES cihazı ile Budic ve Klemenc (2000) tarafından bildirildiği gibi analiz edilmiştir.

2. Analiz ve Bulgular

2.1 Bitki Ni İçeriği Değerlendirme ve Tohum Toplama Amaçlı Ön Arazi Çalışması Bulguları

Temmuz-Ağustos 2014 döneminde İç Anadolu ve Ege bölgesinde yer alan serpantin alanlarından elde edilen tohum, bitki ve toprak örneklerinin analiz sonuçları İç Anadolu bölgesi serpantinlerinin nikel içeriğinin Ege Bölgesi serpantin topraklarına kıyasla düşük olduğu ve bitki nikel içeriği verilerinin de bu duruma paralel olduğu göstermiştir (Tablo XX). İlgili literatürde de Ege Bölgesi serpantin alanlarından gelişen Alyssum türlerinin yüksek düzeyde nikel içeriği kaydedilmiştir (Turgay ve ark. 2012; Adığüzel ve Reeves, 2012). Bu nedenle elde edilen verilere ve önceki bilgilere dayanarak bu araştırmada *Alyssum murale*, *A. sibiricum* ve *A. hirsutum* NiH(-) bitki; ve *A. caricum* ve *A. masmaneum* bitkileri ise NiH(+) olarak kabul edilmiş ve Ni hiperakümülatör bitki ekofiziolojisiniin UPY mekanizması ile ilgili olup olmadığını test etmek için hem deneyel hem de doğal koşullarda çalışmalar yürütülmüştür.

Tablo 1. İç Anadolu ve Ege Bölgeleri serpentin alanlarından toplanan *Brassicaceae* familyasına ait *Alyssum* türü bitkiler ve geliştiği serpentin topraklarının nikel içerikleri

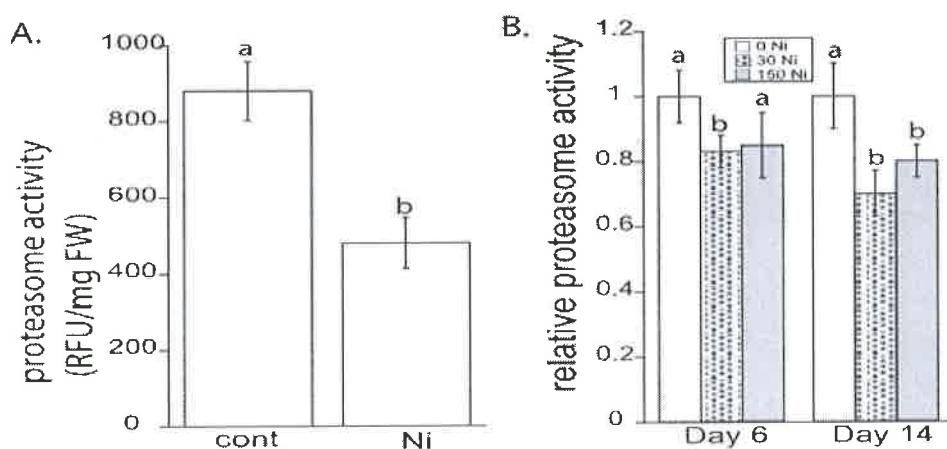
LOKALİTE	FAMILYA	CİNS	TÜR	Bitki Ni (ppm)*	SS**	Toprak Ni (ppm)*	SS
Beynam-1	<i>Brassicaceae</i>	<i>Alyssum</i>	<i>sibiricum</i>	0,13	±0,03	3,94	±0,1
Beynam-2			<i>murale</i>	2,92	±0,31	4,42	±0,14
Kırıkkale-1			<i>sibiricum</i>	0,04	±0,011	0,34	±0,02
Kırıkkale-3			<i>hirsutum</i>	0,17	±0,087	3,11	±0,3
Köyceğiz-1			<i>masmaneum</i>	4,74	±0,36	2,1	±0,26
Köyceğiz-2			<i>caricum</i>	16,36	±1,25	11,26	±0,97

*: 3 tekerrürlü örnek ekstraksiyonun analiz edilmiş ortalamasıdır, **standart sapma

2.2 Deneysel Koşullarda Elde Edilen Bulgular

Denemeye alınan farklı *Alyssum* türleri arasında sadece *A. masmaneum* saksi toprağı ve hidroponik ortamlarda köklenmiş ve gelişme sağlamıştır. Ni uygulaması bitki gelişimini etkilememiştir ancak topraklı koşullarda 35.gün sonunda gerçekleştirilen analizler, Ni uygulamasının *A. masmaneum*'un proteozom aktivitesini %45 azalttığını göstermiştir (Şekil 1-A). Benzer şekilde hidroponik koşullarda geliştirilen ve deneysel olarak Ni uygulanan *A. masmaneum* koşullarında da proteozom aktivitesinin %15-30 düzeyinde azalduğu belirlenmiştir (Şekil 1-B). Topraklı ve topraksız koşullarda elde edilen sonuçlar birbirine paralellik göstermiştir.

Şekil 1. İç Anadolu ve Ege Bölgeleri serpentin alanlarından toplanan *Brassicaceae* familyasına ait *Alyssum* türü bitkiler ve geliştiği serpentin topraklarının nikel içerikleri



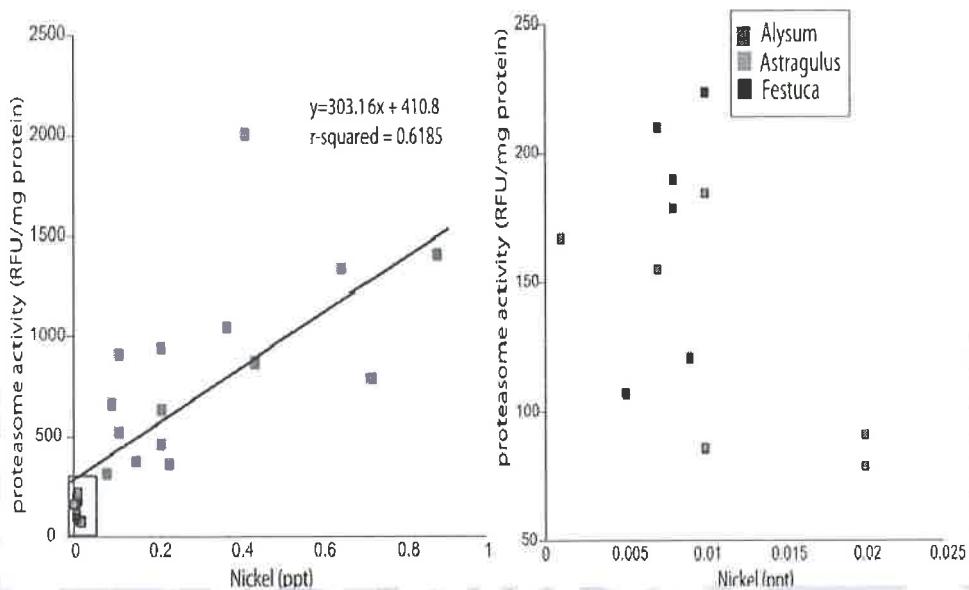
2.3 Arazi Çalışmaları Sonrasında Elde Edilen Bulgular

2.3.1 Ankara Beynam Bölgesi Arazi Çalışmasından Elde Edilen Bulgular

[Handwritten signature]

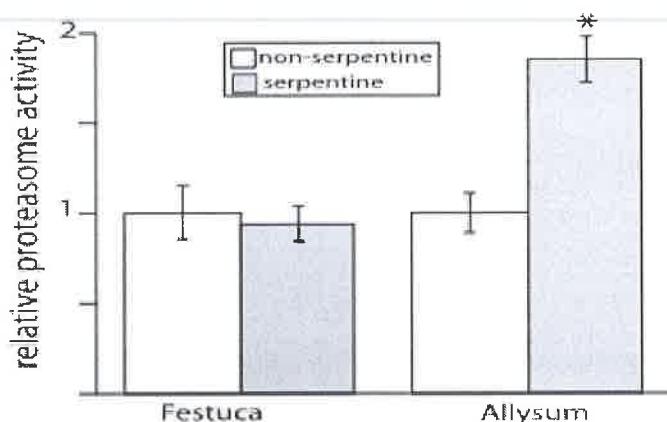
Ankara Beynam Bölgesinde yer alan serpantin olan ve olmayan farklı lokasyonlarda gelişen Ni biriktiren bitkilerde Ni içeriği ile proteozom aktivitesinin pozitif bir korelasyon içinde olduğu (Şekil 2) ($r^2 = 0.62$) belirlenmiştir. Beklenildiği üzere *Festuca* ve *Astragalus* bitkileri *Alyssum sibiricum*'a kıyasla daha düşük Ni içereği göstermiştir. Toplanan *Alyssum sibiricum* bitkilerinin Ni içeriği 0,1% olan hiperakümülyasyon eşiği (Kramer 2010)ının altında kaldığından NiH⁺ olarak değerlendirilmemiştir.

Şekil 2. Ankara Beynam Bölgesinde Toplanan Bitki Örneklerinin Ni-Proteozom Aktivitesi İlişkileri



Ankara Beynam Bölgesi serpantin toprağında gelişen *Alyssum sibiricum*, *Festuca* ve *Astragalus* bitkilerinin, bitişik serpantin olmayan toprakta gelişen aynı bitkilere kıyasla daha yüksek proteozom aktivitesine sahip olacağı hipotezine istinaden elde edilen sonuçlar beklenenin aksine *Festuca* bitkisine ait proteozom aktivitesi ve Ni içeriğinin serpantin olan ve olmayan koşullarda aynı düzeyde olduğunu (Şekil 3). Diğer yandan serpantin toprakta gelişen *A. sibiricum* bitkisi, serpantin olmayan toprak koşullarında gelişen *A. sibiricum* bitkisine kıyasla 2 kat daha fazla proteroteozom aktivitesi sergilemiştir (Şekil 3). Araziden toplanan *Astragalus* bitki örneklerinde proteozom aktivitesinin belirlenmesine imkan verecek (yüksek) düzeyde protein izole edilemediğinden sonuç ve yorumlara dahil edilmemiştir.

Şekil 3. Beynam Bölgesi Serpantin olan ve Olmayan Toprak Koşullarında Bitki Proteozom Aktiviteleri



2.3.2 Muğla Bölgesi Arazi Çalışmasından Elde Edilen Bulgular

Muğla Bölgesinden yer alan 17 lokasyondan toplanan *Alyssum* türü bitkilerin teşhis sonuçları, bitki ve toprak Ni içerikleri Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Muğla Bölgesi serpantin alanlarından toplanan Brassicaceae familyasına ait *Alyssum* türü bitkiler ve geliştiği serpantin topraklarının nikel içerikleri

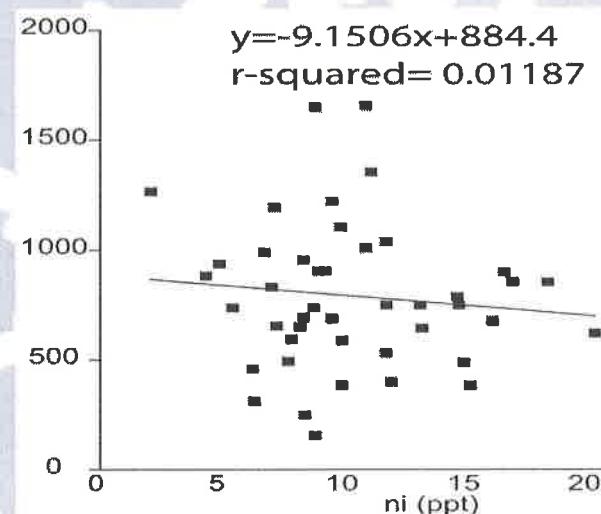
LOKALİTE	FAMİLYA	CİNS	TÜR	Bitki Ni (ppm)*	SS**	Toprak Ni (ppm)*	SS
Muğla-2	<i>Brassicaceae</i>	<i>Alyssum</i>	<i>caricum</i>	13407,13	±2807,94	21,23	±5,16
Muğla-3			<i>caricum</i>	16626,42	±3235,72	42,17	±4,71
Muğla-4			<i>caricum</i>	8872,87	±1132,67	17,09	±3,63
Muğla-5			<i>caricum</i>	9314,78	±3553,26	50,63	±2,96
Muğla-6			<i>caricum</i>	15484,89	±3967,33	32,62	±0,61
Muğla-7			<i>masmaneum</i>	7271,27	±2341,46	80,49	±40,87
Muğla-8			<i>caricum</i>	10960,29	±2006,27	38,08	±7,25
Muğla-9			<i>caricum</i>	10242,51	±1429,62	36,45	±7,38
Muğla-10			<i>caricum</i>	9553,44	±3567,11	68,88	±45,8
Muğla-11			<i>masmaneum</i>	12895,13	±3889,3	21,56	±1,78
Muğla-13			<i>caricum</i>	7854,87	±1394,72	23,86	±3,83
Muğla-14			<i>caricum</i>	7832,33	±986,22	48,78	±28,63
Muğla-15			<i>caricum</i>	8251,44	±1084,98	10,52	±0,37
Muğla-16			<i>caricum</i>	4550,02	±2517,41	33,60	±40,74
Muğla-18			<i>caricum</i>	11240,64	±4901,73	25,87	±11,41
Muğla-20			<i>caricum</i>	13194,80	±4791,59	42,34	±2,48
Muğla-21			<i>sp.</i>	10564,51	±3292,91	96,62	±71,91

*: 3 tekerrürlü örnek ekstraksiyonun analiz edilmiş ortalamasıdır, **standart sapma

Toplanan bitki örneklerinin büyük bir çoğunluğu *A. caricum* olarak teşhis edilmiştir. Tablo XX da görüldüğü üzere (literatüre paralel olarak) Muğla Serpantin Alanları koşullarındaki *Alyssum* türlerinin 0,1% olan hiperakümülyasyon eşiği (Kramer 2010) üzerinde Ni biriktirdiği ve Beynam Bölgesi ile kıyaslandığında Muğla Bölgesi *Alyssum* türlerinin NiH+ olduğu görülmektedir. Diğer yandan proteozom aktivites ile Ni hiperakümülyasyonu arasında oldukça zayıf bir korelasyon olduğu ($r^2=0.01187$) saptanmıştır. Bu durum proteozom aktivitesinin bitki Ni içeriğine bağlı olarak değişmediğini

göstermektedir (Şekil 4).

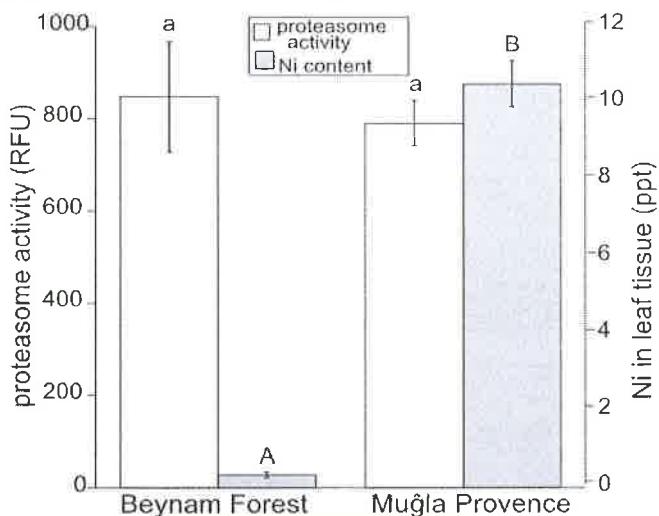
Şekil 4. Muğla Bölgesi Serpantin Toprak Koşullarında Bitki Ni İçeriği ve Proteozom Aktivitesi İlişkisi



Ayrıca Beynam ve Muğla Bölgeleri Serpantin Topraklarında gelişen *Alyssum* türü bitkilerin proteozom aktiviteleri ve Ni içeriği karşılaştırıldığında Muğla Bölgesi *Alyssum* türlerinin Beynam Bölgesi türlerine kıyasla çok yüksek Ni düzeylerine sahip olmalarına rağmen proteozom aktivitesinin iki bölge arasında büyük bir değişim sergilemediği tespit edilmiştir (Şekil 5).

Şekil 5. Muğla ve Beynam Bölgesi Serpantin Toprak Koşulları Açısından Bitki Ni İçeriği ve Proteozom Düzeylerinin Karşılaştırılması

(Signature)



3. Sonuç ve Öneriler

Bildığımız kadarıyla bu araştırma metal hiperakümülatörü bitkilerde proteozom aktivitesinin belirlenmesi üzerine ilk rapordur. Yukarıdaki bulgular genel olarak değerlendirildiğinde *Alyssum* bitkisine (*A. masmaneum*) deneyel olarak Ni uygulandığı hidroponik ve toprak koşullarda arazi koşullarına kıyasla protezom aktivitesinin azaldığı görülmektedir. Bu durumun bir nedeni *A. masmaneum*'un doğal olarak düşük Ni içeren serpentin toprak koşullarında da düşük düzeyde Ni biriktiren bir *Alyssum* türü olarak iklim odası koşullarında da oldukça yavaş bir gelişim göstererek düşük düzeyde proteozom aktivitesi sergilemesi olabilir. Ayrıca deneyel koşullarda kullanılan saksı toprağının doğal koşullarda bitkinin rizosferinde bulunan ve Ni alımı ve toleransı mekanizmalarını yönlendiren rizosfer mikrobiyel çeşitliliğinden yoksundur (Lucisine ve ark., 2014). NiH⁺ bitkilerinin çeşitli ağır metallere tolerans açısından özgün bir rizosfere sahip olduğu bilinmektedir (Turgay ve ark., 2012; Durand ve ark., 2016). Bu nedenle kullanılan deneyel saksı toprağının Ni alımı, toleransı ve biriktirilmesi açısından gerçek koşulları yansıtmadığı ve bu durumun proteozom mekanizmasını da etkilediği ifade edilebilir.

Beynam ve Muğla Bölgesi serpentin toprak koşullarında doğal olarak gelişen *Alyssum* türlerinin Ni birikimleri ile proteozom aktiviteleri arasında bir korelasyon bulunamamıştır. Muğla Bölgesindeki *Alyssum* türlerinin NiH⁺ olmasına rağmen Beynam Bölgesindeki türler ile yakın düzeylerde protezom aktivitesi göstermişlerdir. Bu durum proteozomların NiH⁺ bitkilerdeki yüksek Ni düzeylerinden zarar görmediğine işaret etmektedir. Elde edilen sonuçlar Ni uygulanmış ayçiçeği bitkisinde proteozom aktivitesinin %80-93 düzeyinde azaldığını ortaya koymuş olan Pena ve ark. (2008) ile çelişmektedir. Bu çalışmada azalan proteozom aktivitesi artan derecede okside olan ve ubikitinlenen protein düzeyi ile uyumludur ki bu tip proteinlerin akümülasyonu, proteozomal bozulmanın ve zarar gören bu proteinlerin sitozol (hücre oplazmasının sıvı kısmı)'den elimin edilememesinin bir sonucu olarak yorumlanabilir.

Bu araştırmanın sonuçları açısından serpentin topraklarda gelişen NiH⁺ *Alyssum* türlerindeki Ni biriminin neden proteozom aktivitesini etkilemediği ile ilgili iki yorum getirilebilir. Proteozomlar protein sentezinin sürdürülebilir olarak devam etmesi için gerekli olan amino asitlerin yeniden

kazanımını sağlar. Bazı stres faktörleri metabolizma ve de novo protein sentezini azaltarak (Dubey, 1999) proteozom aktivitesi üzerinde negatif etki yaratabilir. Ni hiperakümüle eden *Alyssum* bitkilerindeki proteozom aktivitesinin değişmeden devam etmesi bu bitkilerin strese girmedigini ve bunedenle metabolik proseslerinde bir değişikliğe ihtiyaç duymadıkları şeklinde yorumlanabilir.

İkinci olarak, henüz deneyel olarak test edilmemiş olmakla birlikte, *Alyssum* bitkilerindeki proteozom aktivitesi Nikel bağlı strese daha dirençli olabilir. İnsandan izole edilen proteozoma düşük düzeyde Ni ($5 \mu\text{M}$ NiCl_2) uygulamasının 3. saatinde proteozom aktivitesinin sadece %20 düzeyinde azaldığı tespit edilmiştir (Frezza ve ark., 2009). Yakın zamanda Li ve ark (2015) çeltik proteozom subunitlerindeki genetik varyasyonların bitkide farklı düzeylerde sıcaklık toleransı oluşmasına neden olduğunu rapor etmiştir. Bu bulgu proteozomal subunitlerdeki evrimleşmenin adaptasyonla ilgili olabileceğine ve proteozom aktivitesinin bitki sağlığı ve aşırı zor şartlardaki dağılımı üzerinde belirleyici olabileceğine işaret etmektedir. Henüz *Alyssum* bitkisinden izole edilen proteozomların kendilerini Ni'ye karşı koruyacak doğal bir mekanizmaya sahip olup olmadığı bilinmemektedir.

Bitkide hasar görmüş proteinlerin proteozomal giderimi stres koşulları altında hücresel yaşamın devamı açısından çok önemli olmakla birlikte enerji tüketimi açısından bitkiye olan maliyeti yüksektir. Metal hiperakümülatörü bitkiler genellikle yavaş gelişen bitkilerdir ki bu özellik yüksek proteozom aktivitesi ve de novo sentezi gibi mekanizmalarla protein kalite kontrolüne oldukça yüksek masraf yapıldığının bir işaretti olarak görülebilir.

4. Geleceğe İlişkin Öngörülen Katkılar

Bu araştırma kapsamında Beynam Bölgesi serpentin toprak koşullarında *Alyssum* bitkisi proteozom aktivitesinin *Festuca* bitkisine kıyasla yüksek olduğu belirlenmiştir. Ancak farklı serpentin toprak koşullarında gelişen farklı *Alyssum* türlerinin proteozom aktivitelerinin Ni içeriği veya diğer faktörler ile ilgisi hakkında somut bir düşünce geliştirilememiştir. Metal hiperakümülatör bitkilerin ağır metalleri tolere etmesi ve yüksek düzeylerde biriktirmesi mekanizmalarının anlaşılması sorunlu toprakların yeşil ıslah (fitoremidasyon) yolu ile iyileştirilmesi bilimin gelişimi açısından son derece önemlidir. Bu nedenle bitkide proteozom mekanizmaları ile ilgili araştırma kulvarı geliştirilmeli ve ileriki çalışmalar metal hiperakümülatör bitkilerin proteozom aktivitesi ile ekofiziolojisi arasındaki ilişkiler üzerine odaklanmalıdır.

5. Sağlanan Altyapı Olanakları ile Varsa Gerçekleştirilen Projeler

6. Sağlanan Altyapı Olanaklarının Varsa Bilim/Hizmet ve Eğitim Alanlarındaki Katkıları

7. Kaynaklar

1946

Adıgüzel, N., & Reeves, R. D. (2012). Important serpentinite areas of Turkey and distribution patterns of ser-pentine endemics and nickel accumulators. Bocconeia 24, 7-17.

Budić, B./ Klemenc, S. Determination of trace elements in heroin by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry using ultrasonic nebulisation. Spectrochimi Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 55(2000), 681–688.

Dubey, R. S. 1999. "Protein synthesis by plants under stressful conditions". In Handbook of plant and crop stress , 2nd ed., Edited by: Pessarakli, M. 365–397. New York: Marcel Dekker. revised and

expanded

Durand A, Piutti S, Rue M, Morel JL, Echevarria G, Benizri E. Improving nickel phytoextraction by co-cropping hyperaccumulator plants inoculated by plant growth promoting rhizobacteria. *Plant and Soil.* 2016 Feb 1;399(1-2):179-92.

Frezza M, Hindo SS, Tomco D, Allard MM, Cui QC, Heeg MJ, Chen D, Dou QP, Verani CN. Comparative Activities of Nickel (II) and Zinc (II) Complexes of Asymmetric [NN' O] Ligands as 26S Proteasome Inhibitors. *Inorganic chemistry.* 2009 Jun 4;48(13):5928-37.

Krämer, U. 2010. Metal hyperaccumulation in plants. *Annual review of plant biology,* 61, 517-534.

Li XM, DY Chao, Y Wu, X Huang, K Chen, LG Cui. 2015. Natural alleles of a proteasome [alpha] 2 subunit gene contribute to thermotolerance and adaptation of African rice. *Nature Genetics.* Jul2015, Vol. 47 Issue 7, p827-833.

Lindsay, W.L., W.A. Norvell. 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 42, pp. 421-428

Lucisine, P., Echevarria, G., Sterckeman, T., Vallance, J., Rey, P. and Benizri, E., 2014. Effect of hyperaccumulating plant cover composition and rhizosphere-associated bacteria on the efficiency of nickel extraction from soil. *Applied Soil Ecology*, 81, pp.30-36.

Penar LB, Zawoznik MS, Tomaro ML, Gallego SM. 2008. Heavy metals effects on proteolytic system in sunflower leaves. *Chemosphere* 72: 741-746.

Sabbagh M, Van Hoewyk D. 2012. Malformed selenoproteins are removed by the ubiquitin-proteasome pathway in *Stanleya pinnata*. *Plant Cell and Physiology* 53: 555-564.

Turgay, O.C., Görmez, A. and Bilen, S., 2012. Isolation and characterization of metal resistant-tolerant rhizosphere bacteria from the serpentine soils in Turkey. *Environmental monitoring and assessment*, 184(1), pp.515-526.

8. Ekler

- a. Mali Bilanço ve Açıklamaları
Ekte verilmiştir.
- b. Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar
Bulunmamaktadır.
- c. Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar
Yoktur.
- d. Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar) (**Altyapı ve Yönlendirilmiş Projeler için uygulanmaz**)
Yoktur.
- e. Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler (**Altyapı ve Yönlendirilmiş Projeler için uygulanmaz**)
Henuz bulunmamaktadır.

NOT: Verilen sonuç raporu bir (1) nüsha olarak ciltsiz şekilde verilecek, sonuç raporu Komisyon onayından sonra ciltlenerek bir kopyasının yer aldığı CD ile birlikte sunulacaktır. Sonuç raporunda proje sonuçlarını içeren, ISI'nn SCI veya SSCI veya AHCI dizinleri kapsamında ve diğer uluslararası dizinlerce taranan hakemli dergilerde yayınlanmış makaleler, III. Materyal ve Yöntem ve IV. Analiz ve Bulgular bölümleri yerine kabul edilir.



A handwritten signature in blue ink is located in the bottom right corner of the page.

Bütge Yılı		Detaylar									
Bütge Kodu	Açıklama	Önceki Yıldan Devir	Başlangıç Ödeneği	Eklenen Aktarma	Düşülen Aktarma	Eklenen Ödenek	Net Ödenek	Harcanan	Bloke Edilen (Avans)	Bloke Edilen (Diğer)	Kalan
2015 03.2	TÜKETİME YÖNELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI	0,00	10.000,00	0,00	0,00	0,00	10.000,00	0,00	0,00	0,00	10.000,00
	Toplam	0,00	10.000,00	0,00	0,00	0,00	10.000,00	0,00	0,00	0,00	10.000,00
Bütge Kodu	Açıklama	Önceki Yıldan Devir	Başlangıç Ödeneği	Eklenen Aktarma	Düşülen Aktarma	Eklenen Ödenek	Net Ödenek	Harcanan	Bloke Edilen (Avans)	Bloke Edilen (Diğer)	Kalan
2016 03.2	TÜKETİME YÖNELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI	10.000,00	0,00	0,00	0,00	0,00	10.000,00	9.676,00	0,00	0,00	324,00
	Toplam	10.000,00	0,00	0,00	0,00	0,00	10.000,00	9.676,00	0,00	0,00	324,00

