



**T.C.**

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**



**FARKLI KURAKLIK TOLERANSINA SAHİP İKİ NOHUT (*Cicer  
arietinum* L.) ÇEŞİDİNDE MAGNEZYUM NOKSANLIĞININ  
ANTIOKSİDAN ENZİM YANITLARINDA NEDEN OLDUĞU  
DEĞİŞİMLER**

**Sabina BİNALI**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**ÇANAKKALE**

**T.C.**  
**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FARKLI KURAKLIK TOLERANSINA SAHİP İKİ NOHUT (*Cicer arietinum* L.) ÇEŞİDİNDE MAGNEZYUM NOKSANLIĞININ ANTIOKSİDAN ENZİM YANITLARINDA NEDEN OLDUĞU DEĞİŞİMLER**

**Sabina BİNALİ**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Tezin Sunulduğu Tarih: 10/01/2018**

**Tez Danışmanı:**

**Prof. Dr. Okan ACAR**

**ÇANAKKALE**

Sabina BİNALİ tarafından Prof. Dr. Okan ACAR yönetiminde hazırlanan ve 10/01/2018 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Farklı Kuraklık Toleransına Sahip İki Nohut (*Cicer arietinum* L.) Çeşidinde Magnezyum Noksanlığının Antioksidan Enzim Yanıtlarında Neden Olduğu Değişimler**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

**JÜRİ**

Prof. Dr. Okan ACAR .....

**Başkan**

Prof. Dr. Cüneyt AKI .....

**Üye**

Doç. Dr. Hediye SEKMEN .....

**Üye**

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje Numarası: FYL-2017-1203

## İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



**Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.**

Sabina BİNALİ

## TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Okan ACAR'a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarında her türlü yardımı gösteren, bilgisi ve öğrettikleri ile bana yol gösteren Yrd. Doç. Dr. Sefer DEMİRBAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Analizler konusunda bana büyük destek veren ve laboratuvar cihazlarının kullanımını sağlayan Ege Üniversitesinden Doç. Dr. Hediye SEKMEN'e ve ekibi Uzman Biyolog Azime GÖKÇE, Çağlar CANDAN ve Osman DELİAVCI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Doku kültürü ve genetiği laboratuvarında cihaz kullanımı ve her türlü destek için Prof. Dr. Cüneyt AKI'ya teşekkürlerimi sunarım. Ç.O.M.Ü. Biyoloji Bölümünün bölüm laboratuvarları ve cihaz kullanımı için teşekkür ederim.

Çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen çalışma arkadaşlarım Ozan Barış KÜRTÜR, Uzman Biyolog Buşra ÇALIK, Uzman Biyolog Eda GÜNAY, Uzman Biyolog Mehmet Selim ÇOBANOĞLU ve Uzman Biyolog Müge TEKER'e teşekkürlerimi sunarım

Hayatımın her evresinde bana destek olan sevgili babam Halim BİNALİ, annem İrem BİNALİ, ağabeylerim Ensar BİNALİ ve Rüstem BİNALİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, araştırmamız Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koodinasyon Birimince FYL-2017-1203 proje numarasıyla desteklenmiştir. Bu nedenle adı geçen kuruma çok teşekkür ederim.

Sabina BİNALİ  
Çanakkale, Ocak 2018

## SİMGELER VE KISALTMALAR

ROT	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
CAT	Katalaz
POX	Peroksidaz APX Askorbat peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
MDHAR	Monodehidroaskorbat redüktaz
DHAR	Dehidroaskorbat redüktaz
GPX	Glutasyon peroksidaz
GOPX	Guaiokol peroksidaz
GTS	Glutasyon-S-trasnsferaz
ASH	Askorbik asit
GSH	Glutasyon
BSİ	Bağl Su İçeriği
Mg	Magnezyum

## ÖZET

### FARKLI KURAKLIK TOLERANSINA SAHİP İKİ NOHUT (*Cicer arietinum* L.) ÇEŞİDİNDE MAGNEZYUM NOKSANLIĞININ ANTIOKSİDAN ENZİM YANITLARINDA NEDEN OLDUĞU DEĞİŞİMLER

Sabina BİNALİ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman : Prof. Dr. Okan ACAR

10/01/2018, 27

Magnezyum, gerek klorofil molekülünde merkez atom olması gerekse de fizyolojik ve biyokimyasal birçok proseste önemli enzimlere kofaktör olması nedeniyle diğer bitki besleme maddelerinden farklıdır. Bu araştırmada kuraklığa toleransları farklı iki nohut çeşidinde (duyarlı çeşit cv.Akçin ve dayanıklı çeşit cv.Uzunlu) Mg eksikliği ve kuraklık stresinin ayrı ayrı ve birlikte etkileri araştırılmıştır. 21 günlük fidelerde kısa süreli stres etkilerini fizyolojik (kök – gövde uzunluğu, klorofil miktarı, BSİ) ve biyokimyasal parametreler (Protein miktarı, enzim aktiviteleri (SOD, POX, CAT)) temelinde belirlenmiştir.

Sonuçlarımız göstermiştir ki, Uzunlu çeşidinde kök ve gövde uzunluğu, klorofil miktarı ve antioksidan aktiviteler co-stress etkisiyle değişmemektedir. Buna karşın, Akçin çeşidinde kök ve gövde uzunluğu ile klorofil miktarı azalmış, antioksidan enzim aktiviteleri artmıştır. Sonuçlarımız Uzunlu'ya kıyasla Akçin'de büyümenin daha çok sınırlandığına işaret etmektedir. Diğer yandan, Uzunlu'ya kıyasla Akçin'in Mg eksikliği ve kuraklık ile daha fazla indüklenmesi, Akçin'in hassas doğasıyla ilgili olabilir.

Sonuçta, kuraklık Mg eksikliği problemiyle birleşerek duyarlı nohut çeşitlerinde antioksidan savunmayı teşvik etsede yetersiz antioksidan savunma nedeniyle büyüme de sınırlanacaktır.

**Anahtar sözcükler:** Mg-Eksikliği, Kuraklık Stresi, Nohut, *Cicer arietinum*, SOD, POX

## ABSTRACT

### MAGNESIUM DEFICIENCY INDUCED CHANGES IN THE ANTIOXIDANT ENZYME RESPONSES IN TWO CHICKPEA (*Cicer arietinum* L.) VARIETIES WITH DIFFERENT DROUGHT TOLERANCE

Sabina BİNALI

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Thesis in Biology

Advisor : Prof. Dr. Okan ACAR

10/01/2018, 27

Magnesium is a central atom in the chlorophyll molecule, but it is different from other plant nutrients because many physiological and biochemical processes are cofactors to important enzymes. In this study, we investigated the effect of Mg deficiency and drought stress separately and together in two chickpea varieties (cv.Akçin and cv.Uzunlu), which have different tolerance to drought. We determined short-term stress effects based on physiological (root-shoot lengths, chlorophyll amounts, RWC) and biochemical parameters (Protein amounts, enzyme activities (SOD, POX, CAT))

Our results show that root and stem lengths, chlorophyll content and antioxidant activities was not change with the effect of co-stress in Uzunlu variety. On the other hand, root and stem length and chlorophyll content decreased in Akçin variety, and antioxidant enzyme activities was increased. Our results indicate that the growth in Akçin is more limited than in Uzunlu. On the other hand, the fact that Akçin is more induced by Mg deficiency and drought compared to Uzunlu, may be related to Akçin's sensitive nature.

As a result, drought combined with the Mg deficiency problem induces antioxidant defense in sensitive chickpea varieties, but growth will be limited due to inadequate antioxidant defense.

**Keywords:** Mg-Deficiency, Drought Stress, Chickpea, *Cicer arietinum*, SOD, POX

## İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU .....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI .....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1. Nohut Bitkisinin Önemi .....	1
1.2. Stresin Tanımı.....	1
1.3. Besin Elementleri.....	2
1.4. Magnezyum .....	2
1.5. Reaktif Oksijen Türleri.....	3
BÖLÜM 2	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	4
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	9
3.1. Bitki Materyali.....	9
3.2. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi .....	9
3.3 Fiziyojik Parametreler .....	10
3.3.1. Gövde-Kök Uzunluğu.....	10
3.3.2. Klorofil Analizi .....	10
3.3.3. Bağlı Su İçeriği.....	10
3.4. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	11
3.4.1. Toplam Protein Miktarı.....	11
3.4.2. Katalaz (CAT; EC 1.11.1.6).....	11
3.5.İzoenzim Profillerinin Belirlenmesi.....	11
3.5.1. İzoenzim Profilleri .....	11
3.5.2. Süperoksit Dismütaz (SOD) İzoenzim Profili.....	12
3.5.3. Peroksidaz (POX) izoenzim profili .....	12
3.5.4. Katalaz (CAT) izoenzim tayini .....	12
3.6. İstatistiksel Analiz.....	12



BÖLÜM 4	
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....	13
4.1. Büyüme Parametreleri.....	13
4.1.1. Gövde Uzunluğu.....	13
4.1.2. Kök Uzunluğu .....	14
4.1.3. Toplam Klorofil İçeriği.....	15
4.1.4. Bağlı Su İçeriği.....	16
4.2. Biyokimyasal Parametreler.....	17
4.2.1. SOD İzoenzim Aktiviteleri .....	17
4.2.2. CAT Aktivitesi .....	18
4.2.3. CAT İzoenzim Aktivitesi .....	18
4.2.4. POX İzoenzim Aktivitesi.....	19
4.3. İstatistiksel Bulgular.....	19
BÖLÜM 5	
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	21
KAYNAKLAR .....	24
ÖZGEÇMİŞ .....	I

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 3.1. Uygulama gruplarının gösterildiği deneme deseni ((+)Mg (-)D: Kontrol, (+)Mg (+)D: Kuraklık uygulaması, (-)Mg (-)D: Magnezyum eksikliği uygulaması, (-)Mg (+)D: Magnezyum eksikliği + Kuraklık uygulaması) .....	9
Şekil 3.2. Bitki gövde ve kök uzunluklarının belirlenmesi .....	10
Şekil 3.3. Protein standart grafiği.....	11
Şekil 4.1. Akçın çeşidinin gövde uzunluğundaki değişimler (cm) .....	13
Şekil 4.2. Uzunlu çeşidinin gövde uzunluğundaki değişimler (cm) .....	13
Şekil 4.3. Akçın çeşidinin kök uzunluğundaki değişimler (cm).....	14
Şekil 4.4. Uzunlu çeşidinin kök uzunluğundaki değişimler (cm).....	14
Şekil 4.5. Akçın çeşidinin toplam klorofil içeriğindeki değişimler (mg/kg).....	15
Şekil 4.6. Uzunlu çeşidinin toplam klorofil içeriğindeki değişimler (mg/kg).....	15
Şekil 4.7. Akçın çeşidinin BSI'de meydana gelen değişimler (%).....	16
Şekil 4.8. Uzunlu çeşidinin BSI'de meydana gelen değişimler (%).....	16
Şekil 4.9. Akçın ve Uzunlu çeşitlerinin SOD izoenzim profilleri. ....	17
Şekil 4.10. Akçın çeşidinin CAT aktivitesindeki değişimler (ünite/mg) .....	18
Şekil 4.11. Uzunlu çeşidinin CAT aktivitesindeki değişimler.....	18
Şekil 4.12. Akçın ve Uzunlu POX izoenzim profilleri.....	19

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 4.1. 7. gün Akçin ve Uzunlu çeşitlerinde incelenen parametrelerin verilerine ait tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları. ....	20
--	----



# BÖLÜM 1

## GİRİŞ

### 1.1. Nohut Bitkisinin Önemi

Ülkemizde tarımı yapılan baklagillerde, üçüncü sırada yer alan nohut (*Cicer arietinum L.*), değişik toprak tiplerinde yetişebilen bir kültür bitkisidir. Türkiye aynı zamanda nohut bitkisinin anavatanı olarak bilinmektedir. Protein, mineral maddeler ve vitaminler yönünden çok zengin olması nedeniyle, insan beslenmesinde önemli role sahiptir. Günümüzde fasulye ve mercimekten sonra tarımı en fazla yapılan baklagil olarak bilinmektedir.

Nohut kökleri toprağı havalandırmakta, toprak sıkışmasını önlemekte, toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini iyileştirerek toprak verimliliğine de katkı sağlamaktadır (Şehirli, 1988; Ton ve ark., 2014). Sağlık ekonomik açıdan yararları gittikçe daha fazla tanınan önemli bir protein kaynağıdır ve tahıllarla yapılan rotasyonlarda azot fiksasyonuna katkıda bulunur (Venn ve Mann, 2004, Rubiales ve Mikic, 2015). Her ne kadar daha çok kurak bölgeler için elverişli bir bitki olduğu bilinse de iklim değişiklikleri; artan sıcaklık, azalan nem ve düzensiz yağış rejiminin bir sonucu olarak kuraklık önemli ve güncel bir sorun olarak tarla bitkilerini ve doğal olarak da baklagilleri etkileyecektir (Erskine, 1993).

### 1.2. Stresin Tanımı

Çevresel değişikliklerin canlıların fizyolojisinde meydana getirdikleri değişimler stres olarak ifade edilmektedir. Stres koşulları canlıların neden olduğu (yabancı ot, herbivor vb.) biyotik veya çevresel etmenlerin (herbisitler, kuraklık, tuzluluk vb.) neden olduğu abiyotik stresler olarak gruplandırılmaktadır (Taiz ve Zieger, 2002). Stres koşulları altında bitkilerde aşırı ROT üretilir ve bunun sonucunda “oksidatif stres” meydana gelir.

Stres faktörleri içerisinde bir abiyotik stres olan kuraklık dünyada bitkisel üretimi sınırlandıran en önemli faktörlerden birisidir (Boyer, 1982). Dünya üzerindeki kullanılabilir alanlar stres faktörlerine göre sınıflandırıldığında kuraklık stresi % 26'lık payla en büyük dilimi içeren kuraklık nohut verimliliğini ciddi şekilde etkilemektedir (Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005, Kashiwagi ve ark.2015). Kuraklık hücrenin iyonik ve ozmotik dengesini bozarak zararlı etkisini gösterir. Bitkiler yaşamları boyunca biyotik ve abiyotik streslere maruz kalmaktadır (Günay, 2016).

Streslerin tarımda verimliliği azaltmasının yanı sıra dünya nüfusu endişe verici bir oranda artmaktadır. 2050 yılının sonuna kadar dünya nüfusunun yaklaşık 6 milyar'a ulaşması beklenmektedir (FAO, 2005). Artan gıda gereksinimlerinin karşılanması ve kayıpların en aza indirilmesi için strese dayanıklı bitkiler geliştirmek önemlidir.

### 1.3. Besin Elementleri

Bitkiler büyüme ve gelişmelerini tamamlayabilmeleri için buldukları ortamdan yeterince su ve besin elementlerini almak zorundadır. Bunlar makro ve mikro besin elementleri olmak üzere iki gruba ayrılırlar.

Makro besin elementleri karbon(C), hidrojen(H), oksijen(O), azot(N), fosfor (P), kükürt(S), potasyum(K), kalsiyum(Ca), ve magnezyum (Mg) olarak bilinmektedir. Bitkiler makro elementleri nispeten fazla barındırmaktadırlar. Mikro besin elementleri demir (Fe), manganez (Mn), çinko (Zn), bakır (Cu), boron (B), ve molibden (Mo) olarak bilinmektedir ve bitkilerde daha az miktarda bulunmaktadır (Tucker, 1999).

Bitkiler 16 besin elementine ihtiyaç duymaktadır. C, H ve O elementlerini su ve atmosferden karşılamaktadır. Geriye kalan 13 element ise topraktan alınmaktadır (Uchida, 2000). Toprak normal şartlarda bünyesinde yeterli miktarda bitki besin elementlerini bulundurur. Ancak zamanla meydana gelen değişimlerle birlikte besin elementlerinde azalmalar söz konusu olur. Bitki besin elementleri bitki tarafından yeterli miktarda alınmadığı koşullarda bitki fizyolojik faaliyetleri, bitki büyüme gelişme yönünde ilerleme sağlayacak şekilde olmayacaktır. Bitki besin elementleri eksikliğinin çeşitli sebepleri olabilir: 1) Topraktaki mutlak eksiklik 2) Topraktan alınımın ve kullanımın zorlanması 3) Alınımı zorlaştıran toprak ve çevresel etmenler. Bitki besin elementlerinden en önemlilerden birisi de Mg'dır.

### 1.4. Magnezyum

Magnezyum pek çok enzim aktivitesine ve dokuların yapısal stabilizasyonuna katılan en önemli besleyicilerden biridir. Bitkilerdeki Mg eksikliği bugüne kadar bir sorun olarak görülmemiştir. Ancak son çalışmalar, şaşırtıcı bir şekilde, tahıl tohumlarındaki Mg içeriğinin belirgin bir şekilde azaldığını ve gelişmiş ülkelerde incelenen insanların üçte ikisinin günlük minimum Mg gereksiniminden daha az aldığını göstermiştir. Bitki büyümesi için Mg ihtiyacı vejetatif kısımlarda kg başına 1.5-3.5 g, toprak çözeltilerindeki Mg konsantrasyonu ise bitki büyümesini desteklemek için yeterli olan miktar  $125 \mu\text{mol L}^{-1}$  ve  $8.5 \text{ mmol L}^{-1}$  dur ve Özellikle, uzun vadeli dengesiz tahıl gübrelenmesi (NPK),  $\text{Mg}^{2+}$

tükenmesine, katyon rekabetine ve daha sonra  $Mg^{2+}$  eksikliğine neden olur. Bu değişiklikler, bitkilerde  $Mg^{2+}$  bulunabilirliğini düşürür, tohumlarda Mg birikiminde azalma, bitki büyümesinin engellenmesi, yaşlanmanın hızlanması ve tarım, bahçecilik ve ormancılıkta verimlilik ve kalitede azalma ile sonuçlanır. Bu sonuçlar toprakların kimyasal ve fiziksel özelliklerinin, bitkiler tarafından  $Mg^{2+}$ 'nin bulunabilirliği açısından önemli faktörlerden biri olduğunu göstermektedir. (Guo ve ark 2016.)

$Mg^{2+}$  bitkilerdeki sekonder metabolizmayı da etkiler. Bununla birlikte, Mg'nin bitki ikincil metabolizmasındaki rolleri hakkında çok az şey bilinmektedir. Ayrıca bitkilerde klorofil molekülünün merkezi atomu mg elementidir. Bu da Mg elementi eksikliğinde bitkinin fotosentez mekanizmasını etkileneceği üzerinde düşündürmektedir.

### **1.5. Reaktif Oksijen Türleri**

Bitkiler, solunum süreçlerinde oksijenli solunumun sonucu olarak mitokondri, kloroplast yada fotorespirasyon süreçlerinde süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ), singlet oksijen ( $^1O^2$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) gibi reaktif oksijen türlerini (ROT) üretirler (Foyer ve Noctor, 2009; Parida ve Das, 2005). Biyotik (yabancı ot, herbivor vb.) ve abiyotik (herbisitler, kuraklık, tuzluluk vb.) stres koşullarının neden olduğu ROT'nin üretimi "oksidatif stres" ile sonuçlanır. Ortaya çıkacak zararın önlenmesi süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POX), askorbat peroksidaz (APX), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), dehidro askorbat redüktaz (DHAR) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimatik, olmayan antioksidanların başında indirgenmiş glutatyon (GSH) ve askorbat (ASA) gibi enzimatik olmayan antioksidanlar ile sağlanmaktadır (Foyer ve Noctor, 2009). Araştırmamızda kuraklık stresine farklı toleransa sahip iki nohut çeşidinde (Akçin ve Uzunlu) mg eksikliği durumunda antioksidan savunma sisteminin nasıl çalıştığıyla ilgili veri toplanacaktır. Böylece bu streslerin savunma mekanizmalarında Mg eksikliğinin nohut genotiplerinde neden olduğu SOD, CAT, POX izoenzim profillerinde neden oldukları değişim araştırılacaktır.

## BÖLÜM 2 ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Gürbüz ve ark (2008), Nohut ekimi, genelde kurak ve yağışın olmadığı dönemde yapıldığı için, kuraklık verimini ve gelişimini olumsuz etkilediğini göstermiştir. Kuraklık büyüme dönemindeki bitkilerin ürün verimini kısıtlar (Vadez ve ark., 2011) Billard ve ark. (2016), Brassica napus'un Mg tükenmesini kullanarak, Mg'nin eski yapraklardan genç sürgün dokularına yeniden harekete geçirildiğini ve Mg tükenmesinin özellikle Zn ve Mn'nin besin alımını değiştirdiklerini gösterdiler. Ayrıca, eski yaprakların (Mg kaynağının) karşılaştırmalı proteomik analizi diğer sonuçların yanında işlevsellikleri için Mg gerektiren bazı proteinlerin (örneğin izositrat dehidrogenaz) arttığı ve proteazların azaldığı, eski yapraklardan Mg'nin taşınımının senesens ile ilişkili olmadığını ifade etmişlerdir.

Magnezyum (Mg) eksikliği gövde ve kökler arasında kuru madde ve karbonhidratların dağılımında büyük bir etkiye sahiptir. Bitkilerin Mg eksikliği stresine karşı çok erken reaksiyonlarından biri, özellikle sükroz ve nişasta kaynaklı yapraklarda büyük miktarda karbonhidrat birikimi ile ilişkili olan kurak kök kuru ağırlık oranının belirgin artışıdır. Mg-eksikliği bulunan yapraklardaki bu yüksek karbonhidrat konsantrasyonları, gövdeden köke kuru ağırlığa eşlik eden artış ile birlikte, kaynak yapraklardan fosfamidlerin floem ihracında ciddi bir bozukluğun bir göstergesidir. Fasulye ve şeker pancarı bitkileri ile yapılan araştırmalar, Mg'nin sükroz yüklemesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Mg eksikliğinin çok erken bir safhasında, sükrozun floemden çıkışı ciddi şekilde bozulmuş; bu, filizlenme, klorofil konsantrasyonunda veya fotosentetik aktivitede gözle görülür değişikliklerden önce oluşan bir etkendir. Bu bulgular, Mg eksikliğindeki yapraklarda karbonhidrat birikiminin doğrudan Mg eksikliği stresine neden olduğunu ve azalmış havuz aktivitesinin sonucu olmadığını ortaya koymaktadır. Floem yükleme işleminde Mg'nin rolü spesifik gözükmemektedir; Mg eksikliği bulunan bitkilere Mg'yi 12 ila 24 saat süreyle yeniden ikame etmek, sükroz ihracatının hızlı bir şekilde toparlanmasına neden olmuştur. Karbonhidratların büyük birikimi ve Mg eksikliği bulunan yapraklardaki fotosentetik CO<sub>2</sub> fiksasyonundaki ilgili bozulmanın fotosentetik elektron taşıma zincirinde aşırı derecede reaktif O<sub>2</sub> türünün (ROS) üretimini güçlendiren aşırı bir azalmaya neden olduğu görülüyor. Bitkiler, özellikle yüksek ışık yoğunluğunda, yaprakların antioksidatif kapasitesinde belirgin artışlarla Mg eksikliği stresine tepki verirler; bu da ROS üretiminin kloroplastlarda Mg eksikliği ile uyarılır. Buna göre, Mg eksik bitkiler yüksek ışık yoğunluğuna karşı çok hassas olduğu bulunmuştur. Mg eksikliği

olan bitkilerin yüksek ışık yoğunluğuna maruz kalması, yaprak klorozunu ve nekrozu tetikler, bu da yaprak bıçağının kısmen gölgelendirilmesiyle etkili bir şekilde geciken bir sonuçtur; ancak yaprak yüzeyinin farklı kısımlarındaki Mg konsantrasyonları gölgelenmeden etkilenmez. Sonuçlar, fototoksitatif hasarın, Mg eksikliği altında yaprak kloroz gelişimine katkıda bulunduğunu, yüksek ışık koşullarındaki bitkilerin, Mg için daha yüksek fizyolojik bir gereksinime sahip olduğunu düşündürdüğünü göstermektedir. Dolayısıyla, bitkilerin yüksek bir Mg beslenme durumunun idame ettirilmesi, özellikle yüksek ışık koşullarında şekerlerin inhibe edilen floem ihracatı ve CO<sub>2</sub> fiksasyonunda bozulma pahasına ortaya çıkan ROS oluşumundan kaçınmak için önemlidir (Çakmak ve Kirkby, 2008).

Chou ve ark. (2011) 12 günlük Pirinç fidelerinde Mg eksikliğinin etkisini araştırdıkları bir çalışmada, Mg eksikliğinin özellikle kök dokusunda Mg miktarını azalttığını belirlemişlerdir. Buna ek olarak kök ve gövde kuru ve yaş ağırlığında Mg eksikliğinin fark yaratmadığı da belirlenmiştir. Diğer yandan, pirinç fidelerinin gövdelerinde Mg eksikliğiyle askorbik asidin (Asa) arttığı, Asa/Dha oranının etkilenmediği, kökte GSh ve GSH/GSSG oranının arttığı saptanmıştır. Ek olarak yaprakta, SOD APX GR ve CAT aktivitelerinin de anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir.

Da Silva ve ark. (2014)'nın yaptığı bir başka çalışmada Mg eksikliği, yaprakta karbonhidrat birikimi ile ilişkili olabilecek sürgün / kök kuru ağırlık oranındaki bir artış ile karakterize edilmiştir. Bu birikim muhtemelen indirgeyici eşdeğerlerin tüketiminde bir azalmanın tetiklenmesinden sorumludur ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşturulması için uygun koşullar sağlar. ROS üretimindeki artış, Asa konsantrasyonundaki ve antioksidan metabolizmanın enzim aktivitesindeki artışlarla birlikte olmuştur. Sonuçta Catuaí çeşidi kahve bitkileri, Acaiá çeşidine göre Mg eksikliğine karşı daha duyarlıdır. Magnezyum eksikliğine maruz kaldığında, Catua çeşitleri büyümeyi azaltmış ve antioksidan metabolizması ROS temizlenmesinde daha az etkili olmuştur.

Guo ve ark. (2015) tarafından yayınlanan bir makalede MgTR'lerin (magnezyum transportörleri) işlevlerinin belirsiz olduğu ve Mg eksikliğine yanıt olarak bitkilerde artmış Mg'yi ispatlayabilen deneysel kanıtların hala eksik olduğu ifade edilmektedir. Bununla birlikte, bitkilerdeki Mg'nin fonksiyonel gizemlerini çözme çabalarını sınırlayan bazı zorluklar olduğu, potasyum, fosfat ve demir gibi diğer iyonların aksine, birkaç Arabidopsis mutantının Mg eksikliğine tepki verdiği bulunmuştur. Dahası, Mg'nin biyolojik rolleri hakkındaki mevcut bilgilerle, Mg eksikliğine yanıt olarak sinyal yollarını düzenleme faktörlerinin ayırt edilemediği ifade edilmiştir. Aynı araştırmacılar, Mg eksikliğinin floemle

şeker taşınmasını önleyip yaprakta nişasta birikimini teşvik ettiğine vurgu yapmışlardır. Ayrıca, Mg eksikliğine tepki olarak nişasta birikimi ve yapraklardaki nişastanın MgT altında bozunması doğrudan fotosentezi engeller veya fotosentez sırasında enerji kaybına neden olabilir, bu da hücrelerde ROT birikmesine neden olabilir. Diğer yandan, ROT'ların bitkilerde Mg eksikliğini yanıtlayan subselüler organellerin bozulmasına neden olabilecek sinyaller üretebilecekleri ifade edilmiştir.

Guo ve ark. (2016), Mg eksikliğini dikkate almayan botanikçiler ve ziraatçilerin bitkilerde ciddi bir sağlık problemi olduğunu vurgulamaktadırlar. Bununla birlikte, şaşırtıcı bir şekilde, tarihi tahıl tohumlarındaki Mg içeriğinin belirgin bir şekilde azaldığı ve gelişmiş ülkelerde incelenen insanların üçte ikisinin günlük minimum Mg gereksiniminden daha az aldıkları ifade edilmektedir. Araştırmacılar bu nedenle, Mg eksikliğine tepki mekanizmalarını ve bitkilerdeki Mg içeriğini artırma yollarını belirlemenin, acil problemler olduğunu işaret etmişlerdir. Aynı çalışmada, fenotipik ve fizyolojik değişiklikler, Mg<sup>2+</sup> taşıyıcıları ile hücre Mg<sup>2+</sup> homeostaz kontrolü, magnezyum eksikliği sinyalleme, Mg<sup>2+</sup> ve diğer iyonlar arasındaki etkileşimler ve bitki ikincil metabolizmasında Mg<sup>2+</sup>'nin rolleri gibi bitkilerdeki magnezyum eksikliğinin çeşitli yönleri tartışılmaktadır.

Fotosentetik CO<sub>2</sub> fiksasyonunun bozulması, kloroplastta kullanılmayan elektronların birikmesine neden olur ve bu da klorofil ve kloroplast membran lipidlerine ROS üretimi ve foto-oksidatif hasar verir. Bu nedenle, yaprak klorozu gibi magnezyum eksikliği semptomları, yüksek ışık yoğunluğuyla şiddetlenir. Bu işlem, PSII'nin klorofil-a'sından kloroplasttaki PSI'in klorofil-a'sına veya düşük PSI içeriğinden dolayı uyarma enerjisinin (veya elektronların) transferinin engellenmesine bağlıdır. Elektronlar protoporfirin'e, muhtemelen ışığa bağımlı ROS üretimi ile bağlantılı olarak transfer edilir ve özellikle magnezyum eksikliği ve yüksek ışık yoğunluğu altında dokulardaki protoporfirin IX aşırı birikimini takiben yaprak klorozuna neden olur. Buna ek olarak Mg eksikliği, sınırlı ATP ve Mg<sup>2+</sup> varlığında Mg chelataz (MgCH) aktivitesini azaltabilir. MgCH, klorofil biyosentetik yolunda ilk kararlı basamak olan Mg-protoporfirin'i üretmek için protoporfirin'e ATP'ye bağlı olarak Mg<sup>2+</sup> eklenmesini katalize eder. Bu şekilde, protoporfirin, hücrelerde aşırı birikim gösterir (Guo ve ark., 2016).

Ceppi ve ark. (2012), nohutta (AKN 87, AKN 290) (14 günlük fidelere, 20 gün boyunca 200 mM NaCl) ve bezelyede (cv Ambassador) tuz stresi, arpada (14 günlük fidelere, cv. La, cv. Ab) kuraklık stresi (20 gün kuraklık) uygulamışlar. Ama bizim

çalışmamızdan farklı olarak klorofil floresansındaki değişimleri araştırmışlar. Buna göre; bezelye ve nohut bitkileri için deney sırasında yapraklarda yaşlanmanın kayda değer ömrü olduğunu ve bunun sonucunda hem kontrol yaprakları için hem  $\Delta VIP$  hem de  $\Delta I_{max} / \Delta I_{tot}$ 'un önemli miktarda kaybedildiği belirlenmiştir. Tekli uygulamaların zaman bağımlılıklarını karşılaştırmak için, tuz uygulanmış nohut hattı AKN 290 ve AKN 87, bezelye yaprakları ve iki arpa çeşidinin (La ve Ab) kuraklık stresli yapraklarında  $\Delta VIP$ 'in nispeten güçlü bir şekilde etkilendiği gözlemlendi.

Tränkner ve ark. (2016), arpada su kıtlığı ve farklı Mg konsantrasyonlarının su kullanım etkenliğine (yaprak ve biyomas seviyesinde) etkisini araştırmışlar. Su kullanım etkenliği (WUE), klorofil miktarı,  $H_2O_2$  ve antioksidan enzimlerin (APX, GR, SOD) aktivitelerini belirlemişlerdir. Buna göre, Mg eksikliği arpa bitkilerinde kuru madde üretimi önemli ölçüde azalmıştır (kontrolle karşılaştırıldığında %34). Mg eksikliği ayrıca yaprak Mg konsantrasyonlarını ve klorofil konsantrasyonlarını belirgin bir şekilde düşürdü ancak  $H_2O_2$  konsantrasyonlarında (kontrol ile karşılaştırıldığında %55'e kadar) ve antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırdı. Şiddetli Mg eksikliği, biyomas-WUE'yi %20 oranında düşürdü, bu da yaprak-WUE için yansıtılmadı. Yaprak-WUE Mg eksikliği altında önemli ölçüde azalmıştır. Mg eksikliği, oksidatif stresi artırarak karbon kazanımında bozulma olduğunu ve biyokütle-WUE'de azalma olduğunu gösterdi. Araştırmacılar biyokütle-WUE'deki azalmanın öncelikle fotosentezle ilgili süreçlerden etkilenmediğini, ancak gece süresince transpirasyon, solunum ya da kök sızıntısı üzerine Mg'nin etkilerine bağlı olabileceğini önermektedir. Aynı çalışmada gelecekte, kuraklığın görülme sıklığı ve süresi artacağı ve tarımsal üretim ve verim istikrarı açısından risk oluşturacağı tahmin edilmektedir. Mg eksikliği çeken bitkilerin kuraklığa karşı daha duyarlı olduğu ve kuraklık durumlarında optimal verim oluşumu için yeterli Mg arzına ihtiyaç duyulduğu düşünülmektedir. Diğer yandan antioksidan aktivite sonuçlarına göre; 13 ve 33 günlük uygulama düşük Mg seviyelerinde  $H_2O_2$ , APX, GR ve SOD aktivitelerinin anlamlı artışı neden olmuş. Ayrıca düşük Mg miktarının (0,01 mg) ilk 7 günde az da olsa ılımlı ve yüksek Mg konsantrasyonlarına kıyasla daha düşük klorofil miktarına neden olduğu gösterilmiş. Bu azalışlar 33. Güne doğru her üç konsantrasyon için kademeli olarak devam etmiştir. Araştırmacılar sonuç olarak; ROS temizleme enzimlerinin APX, GR ve SOD aktiviteleri en yüksek olmasına rağmen, Mg düşük bitkilerde  $H_2O_2$  konsantrasyonlarını arttırdığını, orta düzeyde Mg eksikliği çeken bitkiler ile yeterli miktarda Mg ile işlem gören bitkilerde  $H_2O_2$  seviyesinin kontrol edilebildiğini ifade ederek; bu nedenle, antioksidan makinenin ROS'u detoksifiye etme kapasitesinin sadece ciddi Mg eksikliği

koşulları altında oluştuğuna karar vermişlerdir.



## BÖLÜM 3

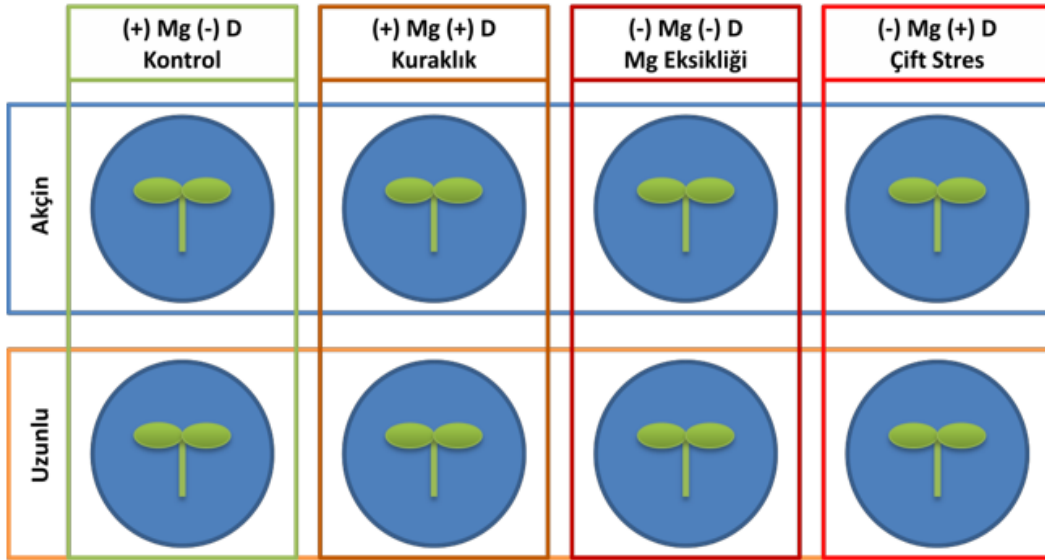
### MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada Türkiye’de yetiştirilen iki farklı nohut varyetesi (Duyarlı çeşit *Cicer arietinum* cv Akçin ve dayanıklı çeşit *Cicer arietinum* cv Uzunlu) kullanılmıştır. Çeşitler Ankara Tarla Bitkileri Enstitüsü’nden Nisan 2017’de temin edilmiştir.

#### 3.2. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi

Tohumlar %5 sodyum hipoklorit çözeltisi ile sterilize edildikten sonra 1 hafta boyunca steril pamuk kullanılarak petride çimlendirilmiştir. Çimlenmenin ardından fideler perlit içeren saksılara aktarılmıştır. Saksılar iki farklı gruba ayrılarak kontrol grubu magnezyum içeren(4.9000 g), magnezyum stresi uygulanan grup ise magnezyum içermeyen Hoagland besin solüsyonu ile sulanmıştır.14. günün sonunda kuraklık stresi besin solüsyonu ile sulama yapılmaksızın uygulanmıştır. 0. ve 7. günde örnekler hasat edilmiştir.



Şekil 3.1. Uygulama gruplarının gösterildiği deneme deseni ((+)Mg (-)D: Kontrol, (+)Mg (+)D: Kuraklık uygulaması, (-)Mg (-)D: Magnezyum eksikliği uygulaması, (-)Mg (+)D: Magnezyum eksikliği + Kuraklık uygulaması)

### 3.3 Fizyolojik Parametreler

#### 3.3.1. Gövde-Kök Uzunluğu

Bitkilerin kök kısmına kadar olan yeşil kısım gövde, kalan kısmı kök olacak şekilde cetvel (cm) ile ölçülerek gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Bitki gövde ve kök uzunluklarının belirlenmesi

#### 3.3.2. Klorofil Analizi

Yetiştirilen bitkilerin toplam klorofil içerikleri klorofil metre cihazı (Minolta SPAD-502, Osaka, Japan) her grubun farklı yapraklarından 15 tekrarlı okuma ile belirlenmiştir (Peryea ve Kammereck, 1997).

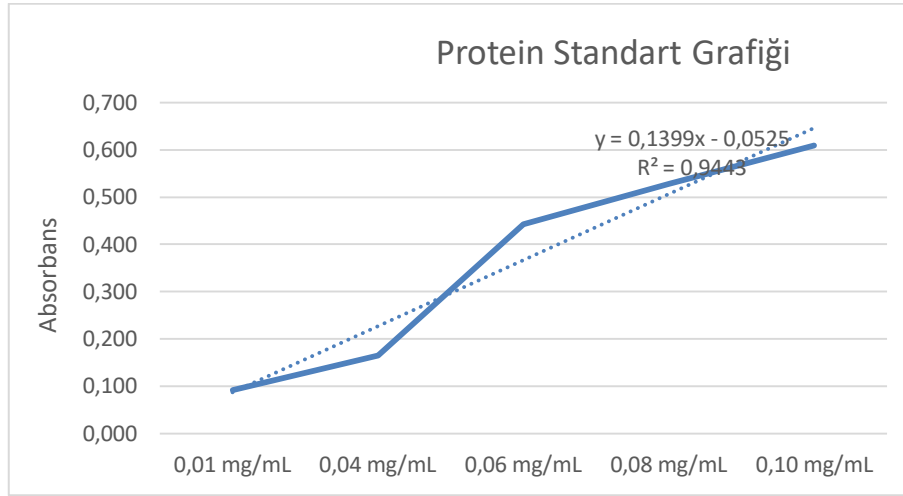
#### 3.3.3. Bağlı Su İçeriği

Bitkilerin farklı yaprakları alınarak yaş ağırlıkları belirlenmiştir. Ardından bitkiler saf su içerisine konularak 4 saat süresince yaprakların su alması sağlanmış ve turgid ağırlıkları belirlenmiştir. Ardından örnekler etüvde 70C° 24 saat bekletilerek kuru ağırlıkları alınmış ve bağlı su içerikleri (%) hesaplanmıştır (Smart ve Bingham 1974).

### 3.4. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

#### 3.4.1. Toplam Protein Miktarı

1 mM EDTA içeren 50 mM Na-P (pH:7,8) tamponu ile bitki dokuları homojenize edildikten sonra santrifüjlenmiştir. 0,1 g Comassie Brilliant Blue G 250, 50 mL etanol ve 100 mL ortofosforik asit içeren protein reaktifi örnek süpernatantı ile tüp içerisinde soğuk zincir bozulmadan vorteks ile karıştırılmıştır. Spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda okunarak toplam protein miktarı ( $\text{mg g}^{-1}$ ), standart grafik (Şekil 3.3.) üzerinden hesaplanmıştır (Bradford,1976).



Şekil 3.3. Protein standart grafiği

#### 3.4.2. Katalaz (CAT; EC 1.11.1.6)

Enzim aktivitesi dakikada tüketilen  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  miktarının 240 nm'de meydana gelen absorbans düşüşü ile hesaplanmıştır. Enzim ünitesi  $\text{mg protein}^{-1} \text{ g}$  olarak belirtilmiştir. (Bergmeyer,1970).

### 3.5 .İzoenzim Profillerinin Belirlenmesi

#### 3.5.1. İzoenzim Profilleri

0,1 mM EDTA, 10% triton X, 1 mM PMSF ve %2 PVP içeren 50 mM Tris-HCl (pH:7,8) tamponu ile doku örnekleri homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat santrifüjlenerek süpernatantların protein içerikleri Bradford (1976) yöntemine göre hesaplanarak jel kuyucuklarına yüklenecek protein miktarları tespit edilmiştir. Bu miktar POX için 30 mg, SOD için 55 mg olarak belirlenmiştir. Ardından izoenzim profilleri Native-Page poliakrilamid jel yöntemi ile belirlenmiştir (Laemmli, 1970). Jel bantlarının hesaplanmasında BioCapt 11.02 programı kullanılmıştır.

### **3.5.2. Süperoksit Dismütaz (SOD) İzoenzim Profili**

Elektroforetik ayırma %12.5'lik ayırma (separating) ve %4'lük hizalama (stacking) jelinde gerçekleştirilmiştir. Beauchamp ve Fridovich'e (1971) göre hazırlanan riboflavin ve nitro blue tetrazolium (NBT) içeren boya ile 60 dk çalkalanarak jel boyanmıştır. Riboflavinin ışıkla birlikte süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ) üretmesi ile NBT'nin oksitlenmesi sağlanarak mavi-mor renkte formazan oluşumu ile meydana gelen beyaz bantlar hesaplanmıştır.

### **3.5.3. Peroksidaz (POX) İzoenzim Profili**

Elektroforetik ayırma %10'luk ayırma jeli ve %4' lük hizalama jeli kullanılmıştır. POX izoenzimlerinin boyanması Seevers *ve ark.* (1971)'e göre yapılmıştır. 1.3 mM DAB ve %3  $H_2O_2$  içeren 200 mM sodyum asetat (pH 5.0) tamponu ile boyama yapıldıktan sonra %7'lik asetik asitte fikse edilmiştir.

### **3.5.4. Katalaz (CAT) İzoenzim Tayini**

Elektroforetik ayırma için %7.5'lik ayırma jeli kullanılmıştır. Jeller 5 dk. %0.01  $H_2O_2$  solusyonunda bekletilmiştir. Daha sonra %1  $FeCl_3$  ve %1  $K_3Fe(CN)_6$  den oluşan boya solusyonunda 2 dk bekletilmiştir. Bant oluşumunun ardından jeller deiyonize su ile yıkanmıştır (Orendi *ve ark.*, 2001).

### **3.6. İstatistiksel Analiz**

Verilerin istatistiksel analizi tek yönlü varyans analizi ANOVA yöntemiyle IBM SPSS Statistics 21 programında yapılmıştır.

## BÖLÜM 4

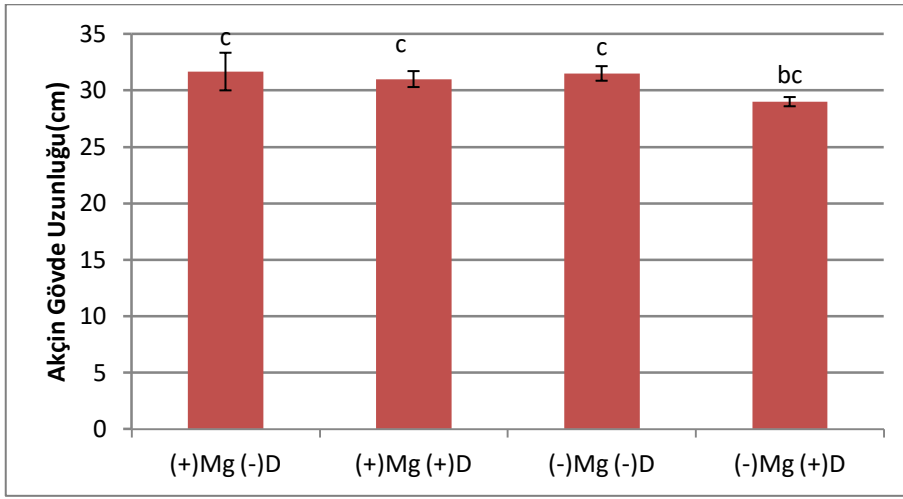
### ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

#### 4.1. Büyüme Parametreleri

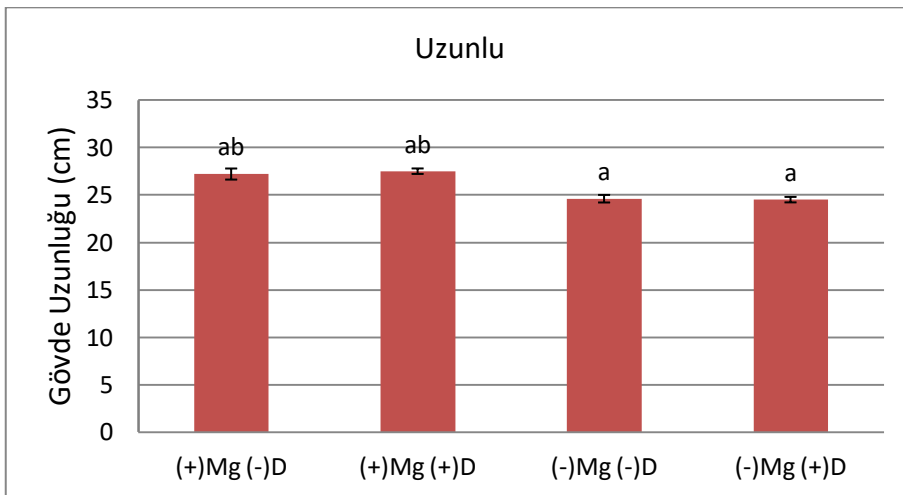
##### 4.1.1. Gövde Uzunluğu

Uygulamanın 7. gününde Akçin (+)Mg (+)D grubunda %2, (-)Mg (+)D grubunda %8'lik azalma belirlenmiştir (Şekil 4.1.).

Uygulamanın 7. Gününde Uzunlu (+)Mg (+)D grubunda %1'lik artış, (-)Mg (-)D ve (-)Mg (+)D gruplarında %10'luk azalma belirlenmiştir (Şekil 4.2.).



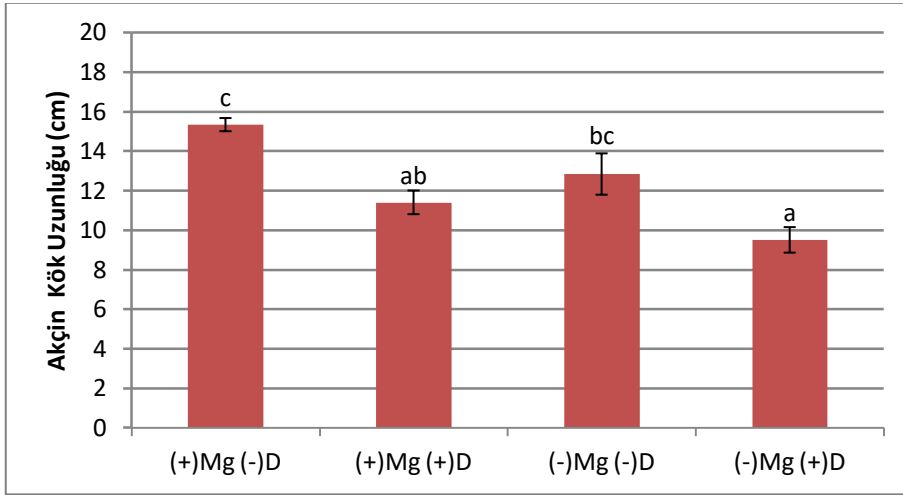
Şekil 4.1. Akçin çeşidinin gövde uzunluğundaki değişimler (cm)



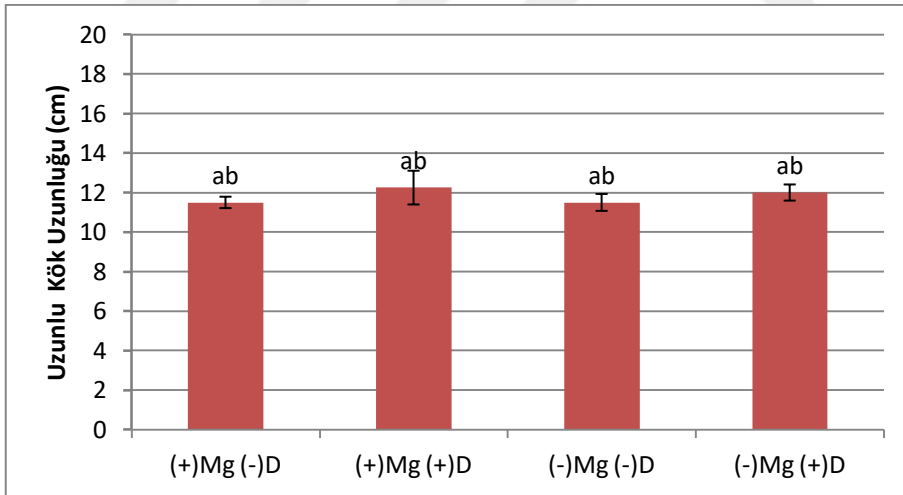
Şekil 4.2. Uzunlu çeşidinin gövde uzunluğundaki değişimler (cm)

#### 4.1.2. Kök Uzunluğu

Uygulamanın 7. Gününde Akçin (+)Mg (+)D grubunda %26, (-)Mg (-)D grubunda %16, (-)Mg (+)D grubunda %38'lik azalma belirlenmiştir (Şekil 4.3.). Uygulamanın 7. gününde Uzunlu (+)Mg (+)D grubunda %7, (-)Mg (+)D gruplarında %4'lük artış belirlenmiştir (Şekil 4.4.).



Şekil 4.3. Akçin çeşidinin kök uzunluğundaki değişimler (cm)

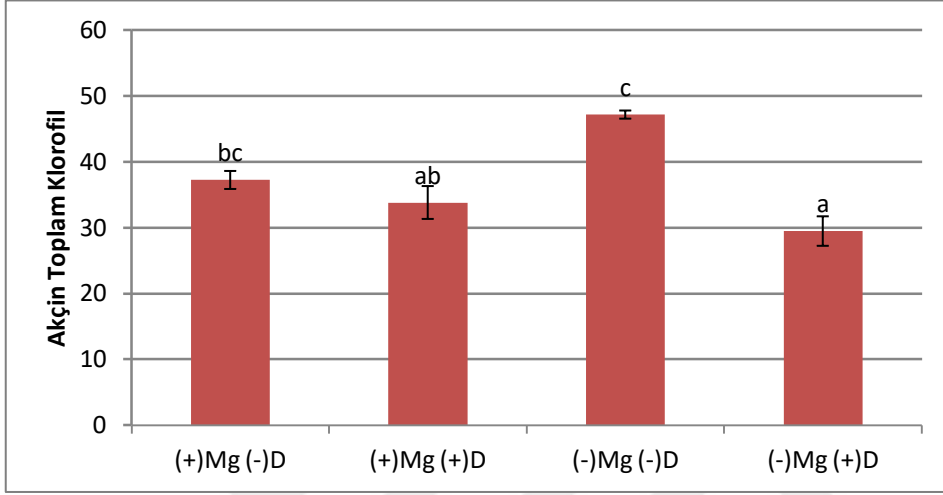


Şekil 4.4. Uzunlu çeşidinin kök uzunluğundaki değişimler (cm)

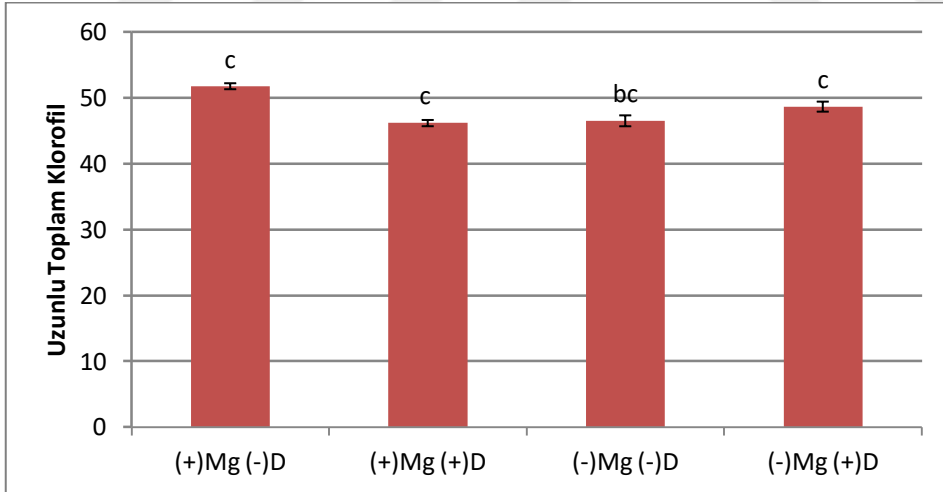
#### 4.1.3. Toplam Klorofil İçeriği

. Uygulamanın 7. gününde Akçın (+)Mg (+)D grubunda %21, (-)Mg (+)D grubunda %31'lik azalma, (-)Mg (-)D grubunda %3'lük artış belirlenmiştir (Şekil 4.5.).

Uygulamanın 7. gününde Uzunlu (+)Mg (+)D grubunda %13, (-)Mg (-)D grubunda %15, (-)Mg (+)D grubunda %14'lük azalma belirlenmiştir (Şekil 4.6.).



Şekil 4.5. Akçın çeşidinin toplam klorofil içeriğindeki değişimler (mg/kg)

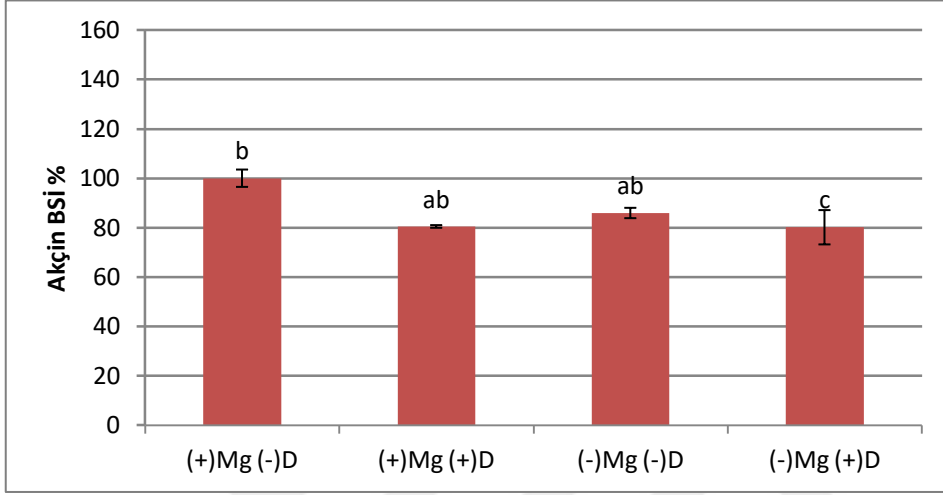


Şekil 4.6. Uzunlu çeşidinin toplam klorofil içeriğindeki değişimler (mg/kg)

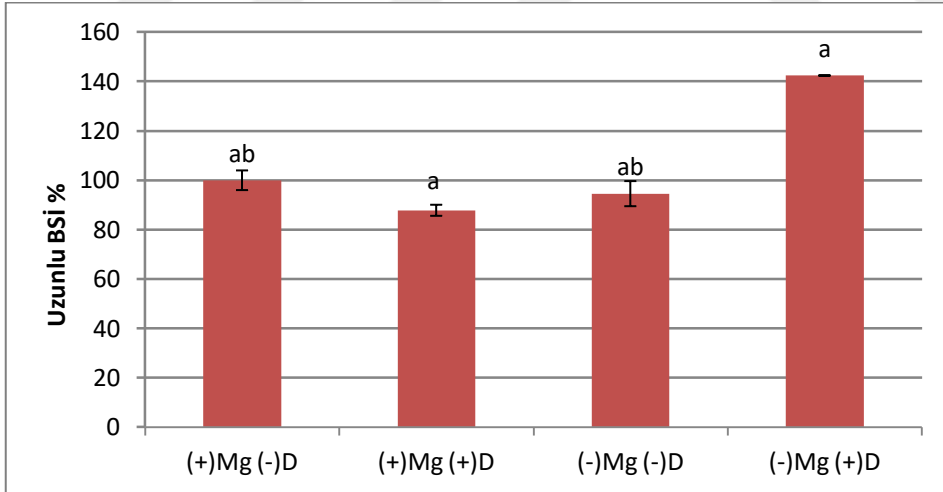
#### 4.1.4. Bağıl Su İçeriği

Uygulamanın 7. Gününde Akçın (+)Mg (+)D grubunda %20, (-)Mg (-)D grubunda %14, (-)Mg (+)D grubunda %20'lik azalma belirlenmiştir (Şekil 4.7.).

Uygulamanın 7. Gününde Uzunlu (+)Mg (+)D grubunda %20, (-)Mg (-)D grubunda %14, (-)Mg (-)D grubunda %20'lik azalma belirlenmiştir (Şekil 4.8.).



Şekil 4.7. Akçın çeşidinin BSI'de meydana gelen değişimler (%)



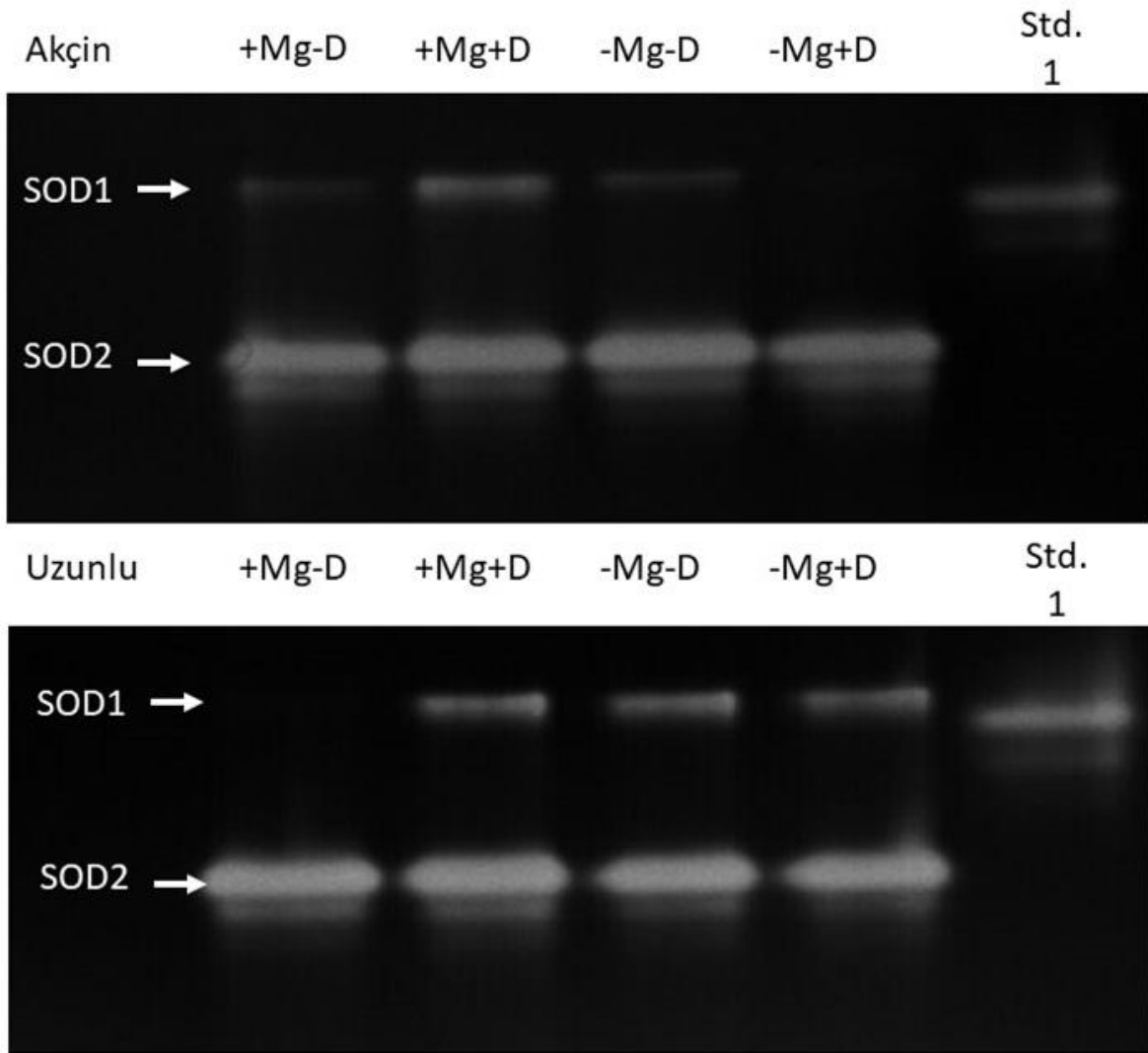
Şekil 4.8. Uzunlu çeşidinin BSI'de meydana gelen değişimler (%)

## 4.2. Biyokimyasal Parametreler

### 4.2.1. SOD İzoenzim Aktiviteleri

Akçin ve Uzunlu çeşitlerinde iki adet aktivite bandı (izozim) belirlenmiştir. Akçin çeşidinde SOD1 bant yoğunluğunun sadece kuraklık uygulaması ile arttığı, buna karşın SOD2 bandının ise hem kuraklıkla hem de magnezyum eksikliğiyle arttığı, çift stres uygulamasıyla değişmediği belirlenmiştir.

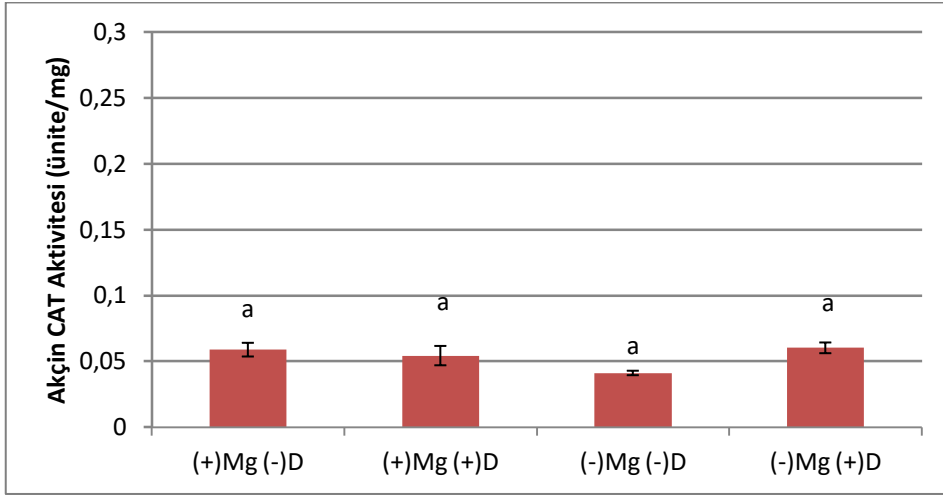
Uzunlu çeşidinde SOD1 bant yoğunluğu kontrole kıyasla kuraklık uygulaması, magnezyum eksikliği ve çift stres uygulamasında saptanmıştır. SOD2 bantı ise tüm uygulamalarda belirlenmiş ancak aralarında fark olmadığı saptanmıştır.



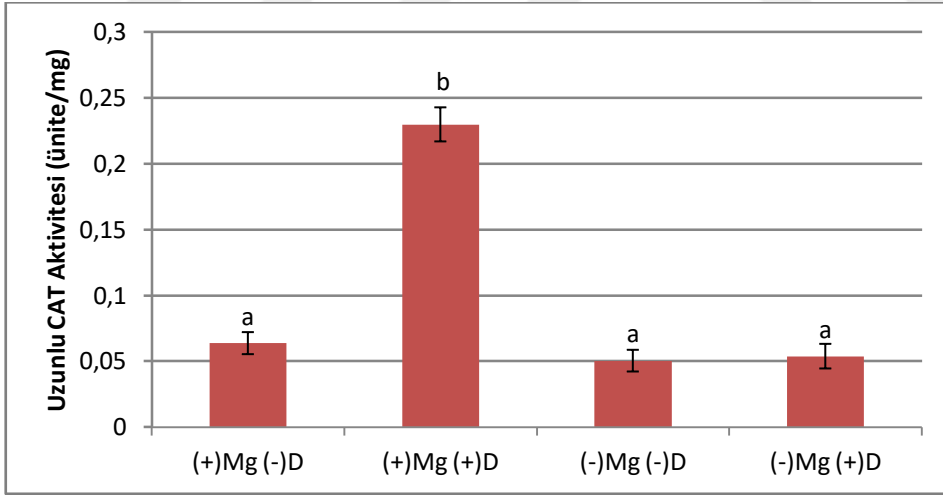
Şekil 4.9. Akçin ve Uzunlu çeşitlerinin SOD izoenzim profilleri

#### 4.2.2. CAT Aktivitesi

Uygulamanın 7. gününde Akçın (+)Mg (+)D grubunda %8, (-)Mg (-)D grubunda %30'luk azalma, (-)Mg (+)D grubunda %2'lik artış belirlenmiştir (Şekil 4.11.). Uygulamanın 7. Gününde Uzunlu (+)Mg (+)D grubunda 3,6 kat artış, (-)Mg (-)D grubunda %21, (-)Mg (+)D gruplarında %16'lık azalma belirlenmiştir (Şekil 4.12.).



Şekil 4.10. Akçın çeşidinin CAT aktivitesindeki değişimler (ünite/mg)



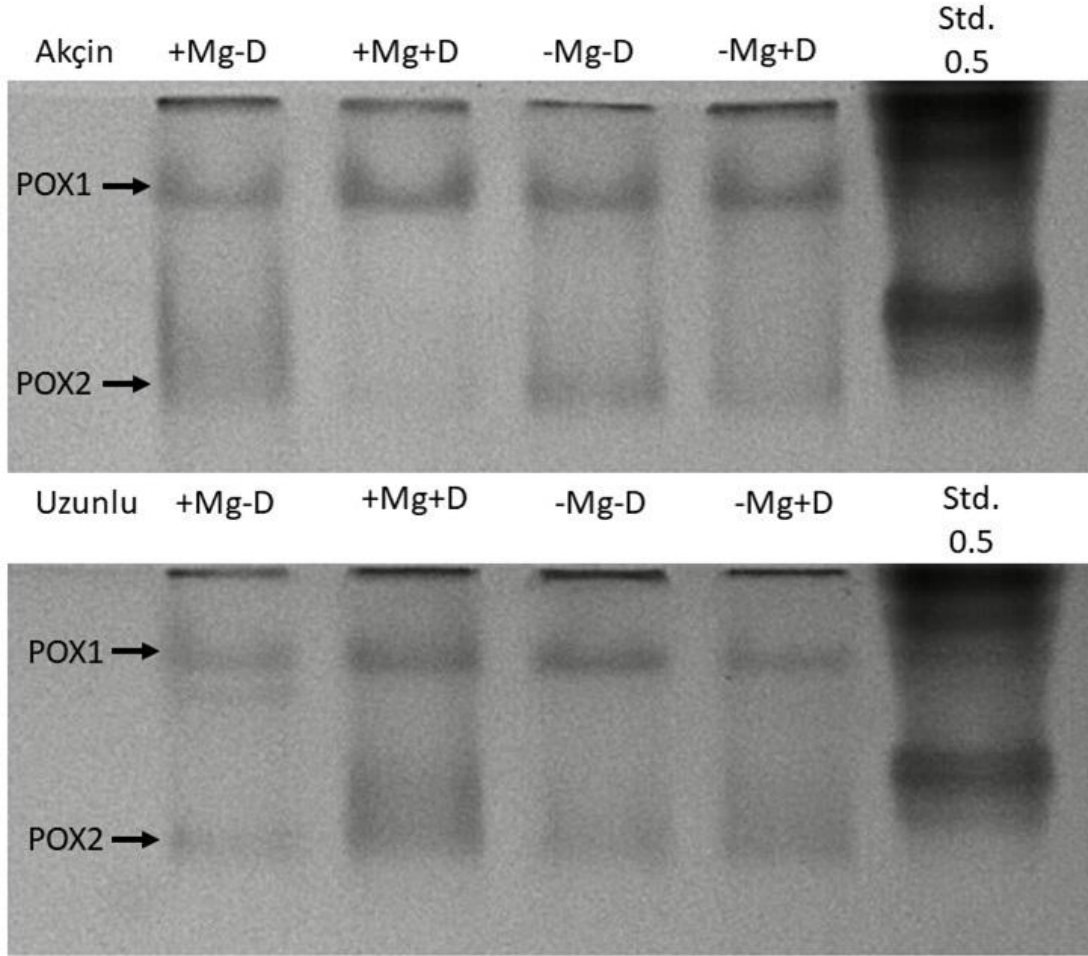
Şekil 4.11. Uzunlu çeşidinin CAT aktivitesindeki değişimler (ünite/mg)

#### 4.2.3. CAT İzoenzim Aktivitesi

CAT izoenzim aktivitesi, CAT enzim aktivitelerinin düşük oluşu ve yeterli protein elde edilememesi nedeniyle sonuç elde edilememiştir.

#### 4.2.4. POX İzoenzim Aktivitesi

Akçin ve Uzunlu çeşitlerinde iki adet aktivite bandı (izozim) belirlenmiştir. Deneme sonunda Akçin çeşidinde POX1 bant yoğunluğunun kontrole kıyasla kuraklık uygulamasında, magnezyum eksikliğinde ve çift stres uygulamasında arttığı, POX2 bandının ise sadece kuraklık uygulamasında olmadığı saptanmıştır. Benzer şekilde, Uzunlu çeşidinde POX1 bant yoğunluğunun tüm gruplarda arttığı, POX2 bant yoğunluğunun ise sadece kuraklık uygulaması ile arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Akçin ve Uzunlu çeşitlerinin POX izoenzim profilleri

#### 4.3. İstatistiksel Bulgular

İncelenen parametrelerin istatistiksel bulguları Çizelge 4.1-4.2'de verilmektedir.

Çizelge 4.1. 7. gün Akçın ve Uzunlu çeşitlerinde incelenen parametrelerin verilerine ait tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları

Parametreler		Kareler Toplamı	df	Ortalama Kare	F	Sig.
Gövde Uzunluğu	Gruplar Arası	239,848	7	34,264	20,558	,000
	Gruplar İçi	41,667	25	1,667		
	Toplam	281,515	32			
Kök Uzunluğu	Gruplar Arası	98,742	7	14,106	6,664	,000
	Gruplar İçi	65,617	31	2,117		
	Toplam	164,359	38			
Klorofil	Gruplar Arası	4820,108	7	688,587	18,096	,000
	Gruplar İçi	2473,392	65	38,052		
	Toplam	7293,500	72			
BSİ	Gruplar Arası	5581,266	7	797,324	23,445	,000
	Gruplar İçi	680,177	20	34,009		
	Toplam	6261,443	27			
Protein	Gruplar Arası	199,076	7	28,439	,682	,687
	Gruplar İçi	2669,732	64	41,715		
	Toplam	2868,808	71			
CAT	Gruplar Arası	,162	7	,023	54,899	,000
	Gruplar İçi	,016	37	,000		
	Toplam	,178	44			

## BÖLÜM 5

### SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmada kuraklığa toleransları farklı iki nohut çeşidinde (cv.Akçin ve cv.Uzunlu) Mg eksikliği ve kuraklık stresinin ayrı ayrı ve birlikte etkisini araştırdık. 21 günlük fidelerde kısa süreli stres etkilerini fizyolojik (gövde-kök uzunluğu, klorofil miktarı, BSİ) ve biyokimyasal parametreler (protein miktarı, enzim aktiviteleri (SOD, POX, CAT)) temelinde belirledik.

Magnezyum, gerek klorofil molekülünde merkez atom olması gerekse de fizyolojik ve biyokimyasal birçok süreçte önemli enzimlere kofaktör olması nedeniyle diğer bitki besleme maddelerinden farklıdır (Çakmak ve Kirkby, 2008). Bitkilerin Mg eksikliği stresine karşı çok erken reaksiyonlarından biri, özellikle sükröz ve nişasta kaynaklı yapraklarda büyük miktarda karbonhidrat birikimi ile ilişkili olan kök kuru ağırlık oranının belirgin artışıdır (Çakmak ve Kirkby, 2008; Guo ve ark., 2016). Mg eksikliğinin tuz stresiyile nohut'ta, kuraklık stresiyile arpa'da klorofil flüoresansını azalttığı gösterilmiştir (Ceppi ve ark., 2012). Bununla birlikte, Mg eksikliğinin bitkilerde ROT kaynaklı oksidatif hasarın neden olduğu klorozu başlattığı ve bunun fotosentetik verimliliği kısıtladığı da bilinmektedir (Çakmak ve Kirkby, 2008; Guo ve ark., 2015; Tränkner ve ark., 2016). Diğer yandan, 21 günlük iki nohut çeşidinde 12 günlük kuraklığın klorofil a ve b miktarlarını azalttığı ve bunun antioksidan savunma sistemiyle ilişkisi gösterilmiştir (Çalık, 2016)

Araştırma sonuçlarımız, tüm uygulamalarda Uzunlu çeşidinin klorofil miktarının deneme sonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişime sahip olmadığını göstermiştir. Akçin çeşidinde ise toplam klorofil miktarının Mg eksikliği veya kuraklık ile değişmezken çift stres etkisiyle anlamlı şekilde azaldığını göstermektedir. Temel olarak sadece Mg veya sadece kuraklık ile 10 günden daha uzun süren uygulamalar klorofil içeriğinde belirgin düşümlere işaret etmektedir (Chou ve ark. 2011; Tränkner ve ark. 2016). Bu durum Akçin çeşidinde tek başına stres faktörlerinin klorofil miktarını azaltmada neden etkili olmadığını açıklamaktadır. Şaşırtıcı şekilde, aynı süre içerisinde çift stres uygulanan fidelerde ise anlamlı azalma belirlenmiştir. Bu durum Guo ve ark. (2015) tarafından sadece Mg eksikliği ile açıklanan mekanizmanın ikinci bir stres faktörüyle çok daha kısa sürede aktifleşerek klorozu başlatacağına işaret etmektedir. Aslında, Mg eksikliğinin floeme sukroz yüklenmesini 12-24 saat içinde azaltarak süreçleri başlattığı dikkate alınırsa (Çakmak ve Kirkby, 2008), sükröz taşınımı kesildiği için nişasta biriktiren yapraklarda bir yandan da fotosistemlerde transferi engellenen elektronlar protoporfirine, muhtemelen

ışığa bağımlı ROS üretimi ile bağlantılı olarak transfer edilir ve özellikle magnezyum eksikliği ve yüksek ışık yoğunluğu altında dokulardaki protoporfirin'in aşırı birikimini takiben yaprak klorozuna neden olurlar (Guo et al., 2016). Çift stresle bu sürecin hızlandığı bilgisi, bu araştırmayla ilk defa gösterilmiştir.

Pirinç fidelerinde kök ve gövde kuru ve yaş ağırlığı üzerine Mg eksikliğinin etki etmediği rapor edilmiştir (Chao ve ark.2011). Bununla birlikte, şiddetli Mg eksikliğinin oksidatif stresi artırarak karbon kazanımını bozduğu ve böylece biyomasa etki eden su kullanım etkenliğini %20 oranında düşürdüğü gösterilmiştir. Bu azalmanın öncelikle fotosentezle ilgili süreçlerden etkilenmediğini, ancak gece süresince transpirasyon, solunum ya da kök sızıntısı üzerine Mg'nin etkilerine bağlı olabileceği önerilmiştir (Tränkner ve ark. 2016). Diğer yandan, kurağa hassas nohut fidelerinde kuraklığın özellikle kök uzunluğunu azalttığı, gövde uzunluğunda duyarlı ve toleranslı çeşitler arasında fark olmadığı gösterilmiştir (Çalık, 2016). Sonuçlarımıza göre, Akçin çeşidinde gövde uzunluğu sadece çift stres etkisiyle azalırken, Uzunlu çeşidinde hem Mg eksikliği hem de çift stres uygulamasıyla azalmaktadır. Deneme sonunda kök uzunlukları Uzunlu'da değişmezken Akçin'de tüm uygulamalarla azalmaktadır. Ayrıca stres uygulamaları karşısında Uzunlu çeşidi Akçin'den daha yüksek BSI'ye sahip bulunmuştur. Bu bağlamda verilerimiz Çalık (2016) ve Tränkner ve ark. (2016)'nin bulgularıyla uyumaktadır ve Uzunlu'ya kıyasla Akçin'de büyümenin daha çok sınırlandırıldığına işaret etmektedir.

Yapraklardaki Mg moleküllerinin %75'i protein sentezine katılırken, %15-20'si klorofil moleküllerinin yapısına katılır, geri kalanlarda vakuolde depolanırlar (Karley and White 2009). Doğal olarak, pek çok enzim aktivitesine ve dokuların yapısal stabilizasyonuna katılan en önemli besleyicilerden biri olan Mg'un (Guo ve ark. 2016) eksikliğine maruz bırakılan bitkilerde, artan oksidatif stresin bastırılması için antioksidan savunma sistemi enzimlerinin indüklendiği bilinmektedir (Tränkner ve ark. 2016). Pirinç (Chou ve ark. 2011) ve kahve çeşitlerinde (Da Silva ve ark. 2014) Mg eksikliğiyle artan ROT konsantrasyonlarının temizlenmesinde artan antioksidan enzim aktiviteleri rapor edilmiştir. Ayrıca fotosentetik CO<sub>2</sub> fiksasyonunun bozulması, kloroplastta kullanılmayan elektronların birikmesine neden olur ve bu da klorofil ve kloroplast membran lipidlerine ROT üretimi ve foto-oksidatif hasar verir (Guo ve ark. 2016). SOD izoenzim aktiviteleri Akçin'de Mg eksikliği ve kuraklık stresiyle ayrı ayrı artarken, çift stres etkisiyle azalmıştır. Uzunlu'da ise deneme sonuna kadar değişmemiştir. CAT aktiviteleri ise her iki çeşitte gerek Mg eksikliği ve gerekse çift stres uygulamalarıyla değişmezken sadece kuraklık ile Uzunlu çeşidinde artmıştır. Benzer şekilde POX aktiviteleri de Uzunlu çeşidinde sadece

kuraklıkla artarken, Akçin'de sadece çift stres uygulaması aktiviteyi arttırmaktadır. Deneme sonunda POX izoenzim aktiviteleri Akçin'de değişmezken, Uzunlu'da çift stres etkisiyle anlamlı şekilde azalmıştır. Tüm bu veriler, Mg eksikliğiyle artan antioksidan savunma bilgisiyle uyumlu olmakla birlikte Akçin çeşidinin Uzunlu'ya kıyasla daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ve SOD ve POX aktivitelerinin önemli rol oynadığını göstermiştir. ROT'ların abiyotik stres koşullarında sinyal moleküller olarak rol oynadıkları ve SOD'un antioksidan savunmanın ilk hattı olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimini başlattığı iyi bilinmektedir (Choudhury ve ark. 2017). Bu bağlamda Uzunlu'ya kıyasla Akçin'in Mg eksikliği ve kuraklık ile daha fazla uyarıldığı ve bunun Akçin'in hassas doğasına işaret ettiği söylenebilir. Araştırmamızda seçilen abiyotik faktörlerin Uzunlu çeşidinde gerek kök-gövde uzunluğu ve gerekse klorofil miktarı gibi büyüme parametreleri üzerine olumsuz etkilerinin daha sınırlı oluşu, bu çeşidin Akçin'e kıyasla bu stres faktörlere daha toleranslı olduğuna işaret etmektedir. Antioksidan aktiviteler ise Akçin'in Uzunlu'ya kıyasla daha duyarlı olduğunu desteklemektedir.

Mg eksikliğinin bitkilerde ciddi bir sağlık problemi olduğu, bunu dikkate almayan botanikçiler ve ziraatçılar tarafından göz ardı edilmiştir. Bununla birlikte, son çalışmalar, şaşırtıcı bir şekilde, tarihi tahıl tohumlarındaki Mg içeriğinin belirgin bir şekilde azaldığını ve gelişmiş ülkelerde incelenen insanların üçte ikisinin günlük minimum Mg gereksiniminden daha az aldığını göstermiştir. Bu nedenle, magnezyum eksikliğine tepki mekanizmaları ve bitkilerdeki Mg içeriğini artırma yolları, acil pratik problemlerdir (Guo ve ark. 2016). Ayrıca gelecekte, kuraklığın görülme sıklığı ve süresi artacağı ve tarımsal üretim ve verim istikrarı açısından risk oluşturacağı tahmin edilmektedir. Mg eksikliği çeken bitkilerin kuraklığa karşı daha duyarlı olduğu ve kuraklık durumlarında optimal verim oluşumu için yeterli Mg arzına ihtiyaç duyulduğu düşünülmektedir (Tränkner ve ark., 2016).

Biz de bu araştırmayla ülkemizde yetiştirilen iki nohut çeşidi arasında Mg eksikliğinin ve kuraklığın ayrı ayrı ve birlikte etkisini araştırdık. Sonuçta, ileride artacağı tahmin edilen kuraklık duyarlı nohut çeşitlerinde Mg eksikliği problemiyle birleşerek duyarlı çeşitlerde antioksidan savunmayı indüklese de yetersiz antioksidan savunma nedeniyle büyüme de sınırlanacaktır.

## KAYNAKLAR

- Beauchamp C., Fridovich I. 1971. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*, 44: 276-287.
- Bergmeyer N. 1970. *Methoden der Enzymatischen Analyse*, Akademia Verlag. Berlin, 1: 636-647.
- Billard V., Maillard A., Coquet L., Jouenne T., Cruz F., Mina J.M.G., Yvin J.C., Ourry A., Etienne, P. 2016. Mg Deficiency Affects Leaf Mg Remobilization and The Proteome in *Brassica Napus*. *Plant Phys Chem* 107: 337-343.
- Botella M.A., Rosado R.A., Hasegawa P.M., 2005. *Plant Adaptive Responses to Salinity Stress*. *Plant Abiotic Stres.*, Blacwell Publishing Ltd, 270 p
- Boyer J.S., 1982. *Plant Productivity and Environment*. *Scienc.*, 218(4571): 443-448
- Bradford M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for The Quantization of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of The Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Ceppi M.G., Oukarroum A., Çiçek N., Strasser R.J., Schansker G., 2012. The IP-Amplitude of The Fluorescence Rise OJIP is Sensitive to Changes in The Photosystem I Content of Leaves; A Study on Plants Exposed to Magnesium and Sulfate Deficiencies, Drought Stress and Salt Stress. *Physiol Plant* 144: 277-288
- Chou T., Chao Y., Huang W., Hong C., Huei Kao C., 2011. Effect of Magnesium Deficiency on Antioxidant Status and Cadmium Toxicity in Rice Seedlings. *J of Plant Physiol*, 168: 1021–1030.
- Choudhury FK, Rivero RM, Blumwald E, Mittler R., 2017. Reactive Oxygen Species, Abiotic Stress and Stress Combination. *Plant J.*, 90(5): 856-867.
- Çakmak İ., Kirkby E.A. 2008. Role of Magnesium in Carbon Partitioning and Alleviating Photooxidative Damage. *Physiologia Plantarum*, 133: 692–704.
- Çalık B. 2016. Kuraklık stresi ve *Orobanche crenata* Enfeksiyonuna Maruz Bırakılan Kuraklığa Toleransları Farklı Nohut (*Cicer arietinum L.*) Çeşitlerinde Antioksidan Savunma Yanıtları. Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale-Türkiye.

- Da Silva D.M., Brandão I.R., Alves J.D., de Santos M.O., de Souza K.R.D., de Silveira H.R.O. 2014. Physiological and Biochemical Impacts of Magnesium-Deficiency in Two Cultivars of Coffee. *Plant and Soil*, 382(1): 133–150.
- Erskine W., Tufail M., Russell A., Tyagi M. C., Rahman M. M., Saxena M. C., 1993. Current and Future Strategies in Breeding Lentil for Resistance to Biotic and Abiotic Stresses, *Euphytica*, 73: 127-135.
- FAO. 2005. *FAO Land and Plant Nutrition Management Service*. [http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert\\_paper/How\\_to\\_Feed\\_the\\_World\\_in\\_2050.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf)
- Foyer C.H., Noctor G. 2005. Redox Homeostasis and Antioxidant Signalling: a Metabolic Link Between Stress Perception and Physiological Responses. *Plant Cell*, 17: 1866–1875.
- Foyer C.H., Noctor G. 2009. Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications, 11(4): 861-905
- Günay E., 2016 Kurağa Dayanıklı Ve Duyarlı İki Mercimek Çeşidinde Biyotik Stresin (Orobanche Crenata) Antioksidan Savunma Sistemine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Türkiye
- Gürbüz Y., Kaplan M., Davies D.R. 2008. Effect of Condensed Tannin Content on Digestibility and Determination of Nutritive Value of Selected Some Native Legumes Species. *J. Anim. Vet. Adv*, 7(7): 854-562.
- Guo W., Chen S., Hussain N., Cong Y., Liang Z., Chen K.M. 2015, Magnesium Stress Signalling in Plant: Just a Beginning. *Plant Signaling & Behavior*, 10:3.
- Guo W., Nazim H., Liang Z., Yang D. 2016. Magnesium Deficiency in Plants: An Urgent Problem. *The Crop Journal*, (4): 83-91.
- Kalefetoğlu T., Ekmekçi Y. 2005. The Effect of Drought on Plants and Tolerance Mechanism. *G.U. Journal of Science*, 18(4): 723-740
- Karley A.J., White P.J. 2009. Moving Cationic Minerals to Edible Tissues: Potassium, Magnesium, Calcium. *Curr Opin Plant Biol* 12: 291-298.
- Kashiwagi J., Krishnamurthy L., Purushothaman R., Upadhyaya H.D., Gaur P.M., Gowda

- C.L.L., Ito O., Varshney R.K. 2015. Scope for Improvement of Yield Under Drought Through The Root Traits in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). 170: 47-54
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of The Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Orendi G., Zimmermann P., Baar C., Zentgraf U. 2001. Loss of Stress Induced Expression of Catalase3 During Leaf Senescence in *Arabidopsis thaliana* is Restricted to Oxidative Stress. *Plant Science*, 161: 301-314.
- Parida A.K., Das A.B. 2005. Salt Tolerance and Salinity Effects on Plant: A Review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60: 324-349.
- Peryea F.J., Kammereck R. 1997. Use of Minolta SPAD-502 Chlorophyll Meter to Quantify The Effectiveness of Mid-Summer Trunk Injection of Iron on Chlorotic Pear Trees. *Journal of plant nutrition*, 20(11): 1457-1463.
- Rubiales D., Mikic A. 2015. Introduction: Legumes in Sustainable Agriculture. *Crit Rev Plant Sci*, 34(1-3):2-3.
- Seevers F.M., Daly J.M., Catedral F.F. 1971. The Role of Peroxidase Isozymes in Resistance to Wheat Stem Rust. *Plant Physiol*, 48: 353-360.
- Şehirli S. 1988. Yemelik Tane Baklagiller. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 435 s.
- Smart R.E., Bingham G.E. 1974. Rapid Estimates of Relative Water Content. *Plant Physiology*, 53:258-260
- Sorunları ve Çözüm Önerileri. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 2(4): 175-180.
- Taiz L, Zeiger E (eds). 2002 *Plant physiology*, 3rd edn (Chapter: Stress physiology). Sinauer Associates, Sunderland, MA
- Ton A., Karaköy T., Anlarsal A.E., 2014. Türkiye’de Yemelik Tane Baklagiller Üretiminin
- Tränkner M., Jákli B., Tavakol E., Geilfus Ch., Cakmak I., Dittert K., Senbayram M. 2016. Magnesium Deficiency Decreases Biomass Water-Use Efficiency and Increases Leaf

- Water-Use Efficiency and Oxidative Stress in Barley Plants. *Plant Soil*, 406 (1–2): 409– 423.
- Tucker M. R. 1999. Essential Plant Nutrients: Their Presence in North Carolina Soils and Role in Plant Nutrition. Department of Agriculture and Consumer Services, Agronomic Division.
- Uchida R. 2000. Essential Nutrients for Plant Growth: Nutrient Functions and Deficiency Symptoms. *Plant Nutrient Management in Hawaii's soils*, 31-55.
- Vadez V., Kholova J., Choudhary S., Zindy P., Terrier M., Krishnamurth L., Kumar P.R. ve Turner N.C. 2011. Whole Plant Response to Drought Under Climate Change. In: *Crop Adaptation to Climate Change*. (Eds S.S. Yadav, R. Redden, J.L. Hatfield, H. Lotze-Campen, A.E. Hall). Chichester-Wiley-Blackwell.
- Venn B.J., Mann J.I. (2004). Cereal Grains, Legumes and Diabetes. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58(11): 1443-1461.
- Woodbury W., Spencer A.K., Stahmann M.A. 1971. An Improved Procedure Using Ferricyanide for Detecting Catalase Isozymes. *Analytical Biochemistry*, 443: 301– 305.

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Sabina BİNALİ

Doğum Yeri : Bakü\ AZERBEYCAN

Doğum Tarihi : 09.06.1991

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri  
Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI -Diğer

Binali S., Acar O., "Effect of Magnesium Deficiency on Growth and Chlorophyll Content in Two Chickpeas Varieties under Drought Condition ", ISEEP-2017 VIII. International Symposium on Ecology and Environmental Problems, ÇANAKKALE, TÜRKİYE, 4-7 Ekim 2017, pp.212-212

Binali S., Acar O., "Effect of Drought Stress and Magnesium Deficiency on Some H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Scavenger Enzymes in Two Chickpeas Varieties", ISEEP-2017 VIII. International Symposium on Ecology and Environmental Problems, ÇANAKKALE, TÜRKİYE, 4-7 Ekim 2017, pp.211-211

Acar O., Kürtür O.B., Binali S., Çobanoğlu M.S., "Türkiye'de Yetiştirilen Bazı Nohut Çeşitlerinde Kuraklık Toleransının Belirlenmesi.", II. Ulusal Bitki Fizyolojisi Sempozyumu, İÇEL, TÜRKİYE, 31 Ağustos-3 Eylül 2016, ss.82-82

b) Katıldığı Projeler: BAP FYL-2017-1203

### İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl: BURSA KARYA VETERİNERLİK (Staj)

### İLETİŞİM

E-posta Adresi : sabina\_binali\_@hotmail.com