



**T.C.  
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ  
SONUÇ RAPORU**

**Farklı Sıcaklıklarda Yetiştirilen Nohut Bitkisinde (*Cicer arietinum* L.) Tiyoüre Uygulamasının Ekolojik ve Fizyolojik Özelliklere Etkisinin Belirlenmesi**

**PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: Dr. Öğr. Üyesi Sema LEBLEBİCİ**

**ARAŞTIRMACILAR: Araş. Gör. Fadime DONBALOĞLU BOZCA**

**BAŞLAMA TARİHİ: 12/06/2019**

**BİTİŞ TARİHİ: 12/06/2021**

**BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ**

**BİLECİK, 2021**

## ÖZET

Bu çalışmada, sıcaklık stresine maruz kalan bitkilerde azot takviyesinin etkilerini ortaya koymak için 15, 25 ve 35°C’de yetiştirilen nohut bitkisine 5 ve 10 mM tiyoüre uygulanmıştır. Bitki örneklerinin kök-gövde uzunlukları, yaş ve kuru ağırlıkları, klorofil miktarları, stoma sayıları ve boyutları, kök ucu mitotik indeksi ile SOD, CAT, APX, NR ve GS enzim aktivitelerindeki değişimler araştırılmıştır. Kök uzunluğu, artan tiyoüre konsantrasyonuna bağlı olarak her üç sıcaklıkta önemli derecede azalırken; gövde uzunluğunun 15 ve 35°C’de kontrole göre arttığı tespit edilmiştir. Her üç deney grubunun kök ve gövde yaş ağırlığı artan tiyoüre konsantrasyonlarına bağlı olarak önemli derecede azalmıştır. Yalnızca 15°C’de 5 mM tiyoürede kontrole göre oldukça önemli bir artış görülmüştür. Stoma sayısı ve stoma boyutlarının 35°C’de 10 mM tiyoüre uygulamasında alt ve üst epidermada önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir. Her üç sıcaklıkta 10 mM tiyoüre uygulamasında mitotik indeksin önemli derecede azaldığı; kontrol ve 15°C’de 5 mM tiyoüre uygulamasında ise arttığı belirlenmiştir. Tüm sıcaklıklardaki deney grupları karşılaştırıldığında en yüksek klorofil a, b ve toplam klorofil değerlerine 35°C’de rastlanmıştır. SOD aktivitesinin her üç sıcaklıkta da kontrole göre azaldığı, CAT ve APX aktivitesinin ise arttığı tespit edilmiştir. NR ve GS aktivitesinde 25°C ve 35 °C’de her iki tiyoüre uygulamasında kontrole göre önemli bir artış belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Nohut, Sıcaklık stresi, Ekolojik özellikler, Antioksidan enzimler, Azot metabolizması

## ABSTRACT

In this study, 5 and 10 mM thiourea was applied to chickpea plant grown at 15, 25 and 35 °C and it was aimed to determine how the plant can cope with heat stress with nitrogen supplementation. Root-stem lengths, fresh and dry weights, chlorophyll amounts, stomata numbers and sizes, root tip mitotic index and changes in SOD, CAT, APX, NR and GS enzyme activities of plant samples were investigated. It was determined that the root length decreased significantly at all three temperatures depending on the increasing thiourea concentration, while the shoot length increased at 15 and 35°C compared to the control. There was a decrease in root fresh weight in all three experimental groups due to increasing thiourea concentrations. Only at 5 mM at 15°C was a highly significant increase seen over the control. It was determined that the number of stomata and the size of stomata decreased significantly in the upper and lower epidermis in the application of 10 mM thiourea at 35°C. In the application of 10 mM thiourea at all three temperatures, the mitotic index decreased significantly; it was determined that it increased in control and 5 mM thiourea application at 15°C. When the experimental groups at all temperatures were compared, the highest chlorophyll a, b and total chlorophyll values were found at 35°C. It was determined that SOD activity decreased at all three temperatures compared to the control, while CAT and APX activity increased. A significant increase in NR and GS activity was determined in both thiourea treatments at 25°C and 35 °C compared to the control.

**Keywords:** Chickpeas, Heat stress, Phenological characteristics, Antioxidant enzymes, Nitrogen metabolism

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	1
ABSTRACT.....	2
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	5
TABLolar DİZİNİ .....	6
1. GİRİŞ.....	7
1.1 Amaç.....	10
1.2 Kapsam.....	10
2. MATERYAL METOD .....	10
2.1 Bitki örneklerinin yetiştirilmesi ve abiyotik stres uygulamaları .....	10
2.2 Ekolojik Ölçümler .....	11
2.3 Klorofil Analizi .....	11
2.4 Stoma yoğunluğu ve stoma boyutlarının belirlenmesi .....	12
2.5 Mitotik İndeksin Belirlenmesi.....	12
2.6 Yaprak örneklerinin ekstraksiyonu.....	13
2.7 Toplam protein içeriğinin belirlenmesi .....	13
2.8 SOD aktivitesinin belirlenmesi.....	13
2.9 CAT aktivitesinin belirlenmesi.....	14
2.10 APX aktivitesinin belirlenmesi.....	14
2.11 NR aktivitesinin belirlenmesi .....	15
2.12 GS aktivitesinin belirlenmesi .....	15
3. BULGULAR.....	15
3.1 Bitkilerin ekolojik parametrelerine ait sonuçlar .....	15
3.2 Fotosentetik pigment miktarları .....	23
3.3 Toplam protein miktarı.....	24

3.4 Antioksidan enzim aktivitesine ait sonuçlar .....	25
3.5 Azot metabolizmasına ait enzim aktivitesini .....	28
4. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	30
5. KAYNAKLAR .....	37

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1</b> 25°C’de yetiştirilen Kontrol, 5mM ve 10mM tiyoüre uygulanan bitki örnekleri .....	11
<b>Şekil 2.2</b> 25°C’de yetiştirilen ve 5mM tiyoüre uygulanan bitkilerin stoma sayılarını gösteren örnekler a) üst epiderma, b) alt epiderma.....	12
<b>Şekil 2.3</b> 25°C’de yetiştirilen ve 5mM tiyoüre uygulanan bitkilerin stoma boyutlarına ait örnekler a) üst epiderma, b) alt epiderma.....	12
<b>Şekil 3.1</b> Tiyoüre uygulanan nohut örneklerin 15, 25 ve 35°C’deki fide canlılık indeksi. .....	17
<b>Şekil 3.2</b> Tiyoüre uygulanan nohut örneklerin kök ve gövde uzunlukları (cm).....	18
<b>Şekil 3.3</b> Tiyoüre uygulanan nohut örneklerin kök yaş ve kuru ağırlıkları (cm).....	19
<b>Şekil 3.4</b> Tiyoüre uygulanan nohut örneklerin gövde yaş ve kuru ağırlıkları (cm).....	20
<b>Şekil 3.5</b> Tiyoüre uygulanan nohut yapraklarına ait alt ve üst epiderma stoma sayıları	21
<b>Şekil 3.6</b> Tiyoüre uygulanan nohut yapraklarının alt epiderma stoma boyutları (µm)...	22
<b>Şekil 3.7</b> Tiyoüre uygulanan nohut yapraklarının alt epiderma stoma boyutları (µm)...	22
<b>Şekil 3.8</b> Nohut bitkilerinin kök ucu hücrelerine ait mitotik indeks oranları (%).....	23
<b>Şekil 3.9</b> Tiyoüre uygulanan nohut yapraklarının fotosentetik pigment miktarları (mg/ml).....	24
<b>Şekil 3.10</b> Tiyoüre uygulanan nohut yapraklarının toplam protein miktarları (µm/ml) .	25
<b>Şekil 3.11</b> Tiyoüre uygulanan nohut örneklerin SOD aktivitesi (U/mg protein).....	26
<b>Şekil 3.12</b> Tiyoüre uygulanan nohut örneklerin CAT aktivitesi (U/mg protein).....	27
<b>Şekil 3.13</b> Tiyoüre uygulanan nohut örneklerin APX aktivitesi (U/mg protein).....	28
<b>Şekil 3.14</b> Tiyoüre uygulanan nohut örneklerin NR aktivitesi (µmol NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> FM h <sup>-1</sup> ).....	29
<b>Şekil 3.15</b> Tiyoüre uygulanan nohut örneklerin GS aktivitesi (µmol λ-GH <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protein) .....	29

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 3.1</b> Tiyoüre uygulanan nohut tohumlarının 15, 25 ve 35°C'deki çimlenme oranları (%) .....	16
---	----

## 1. GİRİŞ

Günümüzde küresel ısınma, dünya genelinde sıcaklık ve kuraklık artışına sebep olmaktadır ve değişen iklim koşulları bitki verimi ve üretimi için ciddi tehdit oluşturmaktadır (Ahmad vd., 2014). Sıcaklığının optimum derecenin altında ya da üstünde olduğu durumlarda, bitkiler fizyolojik, biyokimyasal, metabolik ve moleküler değişiklikler oluşturarak kaçış, sakınım, tolerans, direnç, adaptasyon ve uyum cevaplarından herhangi birini ya da birkaçını oluştururlar (Vinocur ve Altman, 2005; Bohnert vd., 2006; Yıldız ve Terzi, 2007). Strese verilen bu cevaplar, bitkilerin stres karşısında homeostaziyi sürdürme çabası olarak açıklanmaktadır.

Yüksek sıcaklık, hücre içinde molekül hareketlerinin hızlanmasına, moleküller arası bağların gevşemesine ve hücre membranının daha akışkan olmasına sebep olur (Ahmad ve Prasad, 2012; Kabay ve Şensoy, 2018). Bunların dışında, sıcaklık 40°C'nin üstüne çıktığında bitkilerin çoğunda fotosentez seviyesini ciddi derecede etkilenir. Ayrıca protein denatürasyonuna, yıkımına, enzim inaktivasyonuna sebep olmakta ve protein mekanizmasını da olumsuz yönde etkilemektedir (Akladious, 2014). Sesil organizmalar olan bitkiler stresi tolere etmek için, yaprak yönünü değiştirmek, membrandaki lipid profilini değiştirmek, aşırı kökleşmeyi uyarmak ve transpirasyonu artırmak gibi önemli adaptasyonlar kazanmışlardır (Ahmad vd., 2014). İyon kanallarının aktive edilmesi, ısı şok proteinlerinin ve ısı şok transkripsiyon faktörlerinin konsantrasyonlarının artması, çeşitli sinyal yollarının aktivasyonu, sekonder metabolit üretimi gibi cevaplar da değişen sıcaklığa adaptasyonun bir diğer basamağı olarak sayılabilir (Wahid vd., 2007). Bazı bitkilerde dışardan eklenen azot kaynağının bitkinin sıcaklık stresiyle başa çıkmasını kolaylaştırıldığı bildirilmiştir (Akladious, 2014).

Bitkiler sadece yüksek sıcaklıktan değil düşük sıcaklıklardan da etkilenmektedir. Düşük sıcaklık stresi genelde 15°C ve altındaki sıcaklıklarda gözlenmektedir (Kumar, 2010). Soğuk stresine giren bitkiler, öz suyunda antifriz özelliği gösteren karbonhidrat ve aminoasit temelli çeşitli moleküller sentezler. Membran doymamış yağ asitlerinin arttırılması da bitkinin soğuğa karşı ürettiği bir diğer cevaptır. Bununla birlikte protein miktarında ve enzim aktivitesinde değişiklikler gerçekleşmektedir.

Hem düşük hem de yüksek sıcaklık stresi bitkide çeşitli reaktif oksijen radikallerinin birikmesine sebep olmaktadır. Bitkilerde, oluşan bu reaktif oksijen radikallerini temizleyen ve oluşan stres zararını minimuma düşüren SOD, CAT, APX

gibi koruyucu enzimler bulunmaktadır (Aslantaş vd., 2010). Bu enzimler ve gerçekleşen fizyolojik, biyokimyasal ve metabolik değişimler sayesinde bitkiler sıcaklık stresiyle başa çıkabilmektedir. Düşük ve yüksek sıcaklık stresi bitkinin hemen hemen bütün fizyolojik olaylarını ve kimyasını etkilediği gibi nitrojen metabolizmasını da etkilemektedir. Ortam sıcaklığının bitkiler tarafından azot alınımı üzerinde etkili olduğu, sıcaklık artışının  $\text{NO}^{-3}$  ve  $\text{NH}_4^+$  alınımı azalttığı yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Düşük sıcaklıkta yetişen çim bitkisinin yüksek sıcaklıkta yetişen çim bitkisine göre topraktan daha fazla amonyum absorbe ettiği tespit edilmiştir (Clarkson ve Warner, 2008). Nohut bitkisinde yüksek sıcaklık derecelerinde nodül oluşumunun azaldığı, nodül fonksiyonunun zarar gördüğü ve nodül yapısının etkilendiği bildirilmiştir. Gündüz sıcaklıklarında meydana gelen artış ( $32,5^{\circ}\text{C}$ ) nohut bitkisinde nodül oluşumunu geciktirmiş, toplam azot fiksasyonunu ve simbiyotik olarak aktif nodül popülasyonlarının ömrünün azalmasına sebep olmuştur (Rawsthorne vd., 1985).

Nişasta, vitamin ve mineral bakımından zengin bir bitki olan nohut (*Cicer arietinum* L.), dünyanın bütün kıtalarında 50'den fazla ülkede tarımı yapılan en önemli baklagillerinden biridir. Gelişmekte olan ülkelere ise nohut tarımı gıda güvenliği açısından özel bir öneme sahiptir. Yüksek miktarda protein (%20-30), karbonhidrat (%40), lif, mineral ve vitamin içermesi bakımından fasulyeden sonra en çok üretilen ikinci bakliyatır. Nohut da dahil olmak üzere baklagillerin, besin olarak tüketilmesi; yaprak, tohum ve baklalarının malik asit ve oksalik asit içermesi ve sağlık alanındaki yararlarının da fark edilmesi nohut üretimini ve uluslararası talebi oldukça artırmıştır (Senthil-Kumar, 2017; Jukanti vd., 2012).

Nohudun da üyesi olduğu baklagil bitkilerin en önemli özelliklerinden biri azot bakımında oldukça zengin olmasıdır. Azot, bitki gelişimini belirleyen temel besin maddelerinden biridir ve protein, klorofil, nükleik asit, nükleotid ve nükleosit gibi fizyolojik olaylarda rol oynayan maddelerin yapısına katıldığından dolayı bitki büyümesi için oldukça önemlidir (Esfahani vd., 2014). Karbonhidrat oluşumu ve fotosentez gibi fizyolojik faaliyetlere katılmasının yanı sıra etilen, absisik asit, oksin ve sitokinin gibi hormonların sentezini de etkilemektedir (Aktaş, 1995). Azot bitkilerde diğer besin elementlerinin alınımında ve kullanımında da etkilidir (Mengel vd., 1976). Bitkiler azotu topraktan inorganik yapıda  $\text{NO}^{-3}$  ve  $\text{NH}_4^+$  formunda alırlar. Nitrat ve amonyum toprakta organik maddenin mineralizasyonu sonucu oluşan maddelerdir ve bu

durum N-mineralizasyonu olarak adlandırılır. Toprakta inorganik yapıda alınan azot, bitkide çeşitli reaksiyonlar ile amonyağa indirgindikten sonra organik yapıya katılmaktadır (Esfahani vd., 2014). Çünkü yüksek bitkiler tarafından azotun asimilasyonunda temel olan molekül amonyaktır. Amonyak molekülü, simbiyotik azot ( $N_2$ ) fiksasyonu, kökler tarafından topraktan alınan amonyum ( $NH_4^+$ ) ve topraktan alınıp indirgenen nitrat ( $NO_3^-$ ), fotorespirasyon ile açığa çıkan amonyak ( $NH_3$ ) gibi kaynaklardan sağlanır (Marschner, 1995). Kökler tarafından alınıp ksilem aracılığı ile hedef organlara taşınan nitrat ( $NO_3^-$ ) sitosolik nitrat redüktaz (NR) ile nitrite indirgenir ve kloroplasta geçen nitrit, nitrit redüktaz ile amonyuma indirgenir. Nitrat redüktazın katalizlediği yan reaksiyonların birinde, bitki gelişimini ve abiyotik strese olan tepkileri düzenleyen bir sinyal molekülü olan azot oksit (NO) üretilir. NO kendi biyosentezini NR-S-nitrosilasyon ile nitrat asimilasyonunu kontrol eder (Frunghillo vd., 2014). Doğrudan topraktan alınan veya nitrattan dönüştürülen amonyum, glutamin sentetaz (GS)/glutamat sentaz yoluyla organik bileşiklere asimile edilmektedir.

Nohut diğer tüm bitkilerde olduğu gibi yetiştirildiği bölgeye ve zamana göre gelişiminin çeşitli evrelerinde hem düşük sıcaklık hem yüksek sıcaklık stresine maruz kalmaktadır. Vejetatif gelişim döneminde düşük sıcaklık stresine maruz kalan nohut bitkisinin membran stabilitesinde azalma, protein ve yağ miktarında değişiklik, solunum ve fotosentezde değişim; yüksek sıcaklığa maruz kalan nohut da ise membran akışkanlığı, oksidatif stres, lipid peroksidasyonu ve yine fotosentez ve solunum seviyesinde değişiklikler gözlenmiştir (Sentil ve Kumar, 2017). Düşük sıcaklık stresi vejetatif döneminin uzamasına sebep olurken, yüksek sıcaklıklar vejetatif gelişim dönemini kısaltmaktadır (Devasirvatham vd., 2015). Üreme döneminde karşılaşılan yüksek sıcaklık stresi polen verimsizliğine sebep olmakta; polen canlılığını ve anterlerin açılmasını bozmaktadır (Devasirvatham vd., 2015). Polenin canlılığını sürdürmesi ve çimlenme ihtimalinin azalması ise soğuk stresinin sebep olduğu başlıca etkilerdir. Generatif dönemde bitkinin düşük sıcaklığa maruz kalması; çiçeklerin dökülmesine, nodül oluşumunun azalmasına ve devamında verimsiz tohumların oluşmasına sebep olur. Polinizasyon sonrasında karşılaşılan soğuk stresi tohum meydana getirme oranını ve tohum gelişimini azaltmakta ve daha küçük tohum üretimine sebep olmaktadır (Kaur vd., 2008).

## 1.1 Amaç

Bu çalışmanın birinci amacı azot içeriği bakımından önemli olan Fabaceae üyesi *C. arietinum*'da yüksek ve düşük sıcaklığın meydana getirdiği eko-fizyolojik değişiklikleri araştırmaktır. Çalışmanın diğer amacı ise sıcaklık değişiminin azot metabolizmasındaki etkilerini tespit ederek, azot takviyesi ile bitkinin sıcaklık stresiyle ne düzeyde başa çıkabildiğini ekolojik ve fizyolojik özellikleri karşılaştırarak ortaya koymaktır.

## 1.2 Kapsam

Zengin protein içeriği ve insan beslenmesinde önemli bir besin maddesi olması nedeni ile *C. arietinum* çalışmanın materyali olarak belirlenmiştir. Günümüzde başta artan şehirleşme ve endüstrileşme olmak üzere olumsuz ekolojik koşullar nedeni ile oluşan küresel ısınma ve buna bağlı olarak farklı sıcaklıkların bitkilerde bazı değişiklikler meydana getirdiği bilinmektedir. Çalışmada farklı sıcaklıkların bitkide meydana getirdiği ekolojik ve fizyolojik etkiler belirlenecek, bitki sıcaklık stresine maruz bırakılırken azot takviyesi yapıldığında bu stresle nasıl baş edeceği ve azot uygulamasında bitkinin göreceği hasarda meydana gelecek değişiklikler ortaya konmuştur. Bitkinin sıcaklık stresine cevabı ve azot uygulamasının bu stresin toleransı üzerindeki etkisi bitkide oluşan ekolojik özellikler ile antioksidan enzimlerin (SOD, CAT, APX, MDA) ve azot metabolizmasında görev yapan enzimlerin (NR, GS) aktivitelerinde meydana gelen değişikliklerin belirlenmesi ile açıklanmaya çalışılmıştır.

## 2. MATERYAL METOD

### 2.1 Bitki örneklerinin yetiştirilmesi ve abiyotik stres uygulamaları

Çalışmada Nohut bitkisinin Işık-05 çeşidi Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü (EATE)'den temin edilmiştir. Tohumlar %10'luk NaClO içerisinde 5 dakika süre ile bekletilmiş daha sonra 3 kez distile sudan geçirilerek steril edilmiştir. Her saksıya 6 tohum ekilmiş ve deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Tohumlar kotiledonlar çıkana kadar sadece saf su ile daha sonra ise her saksı 100-150 ml saf su (kontrol grubu), 5 ve 10 mM olmak üzere 2 farklı tiyoüre çözeltisi ile sulanmıştır. Ekimi yapılan tohumlar 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyotta sırası ile 15/10, 25/20 ve 35/30°C'de 6-8 hafta süre ile yetiştirilmiştir.

## 2.2 Ekolojik Ölçümler

Yetiştirilen bitki örneklerinin çimlenme oranı, kök-gövde uzunlukları, kök-gövde yaş ve kuru ağırlıkları, fide canlılık indeksi belirlenmiş; her tekrardan (her saksıdan) alınan 3 farklı yaprak örneğinin alt ve üst epidermasına ait stoma sayıları ve stoma boyutlarının en-boy ölçümü gerçekleştirilmiştir. Bitkilerin kök uçlarından alınan örneklerden mitotik indeks hesaplanmıştır.



Şekil 2.1 25°C’de yetiştirilen Kontrol, 5mM ve 10mM tiyoüre uygulanan bitki örnekleri

## 2.3 Klorofil Analizi

Bitki örneklerinin klorofil içeriğinin belirlenmesinde her konsantrasyona ait taze yaprak örneği 0,05 gram tartılarak %80’lik 15 ml aseton ile homojenize edildi, filtre kâğıdından süzülde ve son hacim %80’lik aseton ile 15 ml’ye tamamlandı. Homojenatın absorbans değerleri spektrofotometrede 645 nm ve 663 nm dalga boylarında 3 tekrarlı olacak şekilde ölçüldü. Klorofil ekstraktının iki farklı dalga boyunda yapılan ölçümlerinden elde edilen değerler aşağıda verilen eşitliklerde yerine konularak bitki örneklerine ait yaprak dokusunun 0,05 gr’ında bulunan klorofil a, b ve total klorofil içeriği mg/ml olarak belirlendi (Arnon, 1949).

$$\text{Klorofil a: } [12.7 (D663) - 2.69 (D645)] (V/1000W) \quad (3.1)$$

$$\text{Klorofil b: } [22.9 (D645) - 4.68 (D663)] (V/1000W) \quad (3.2)$$

$$\text{Total Klorofil: } [20.2 (D645) + 8.02 (D663)] (V/1000W) \quad (3.3)$$

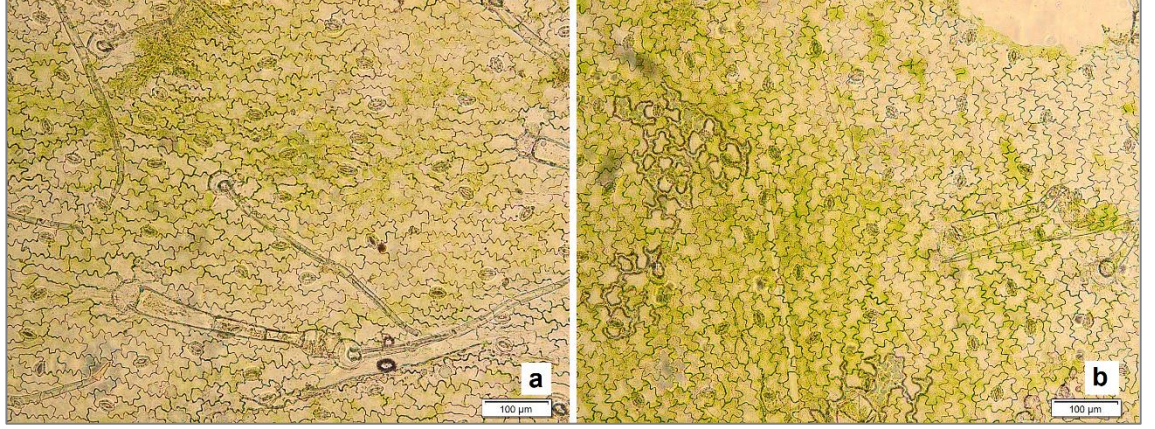
D: Klorofil ekstraktının belirtilen dalga boyundaki absorbans değeri

V: %80’lik aseton hacmi

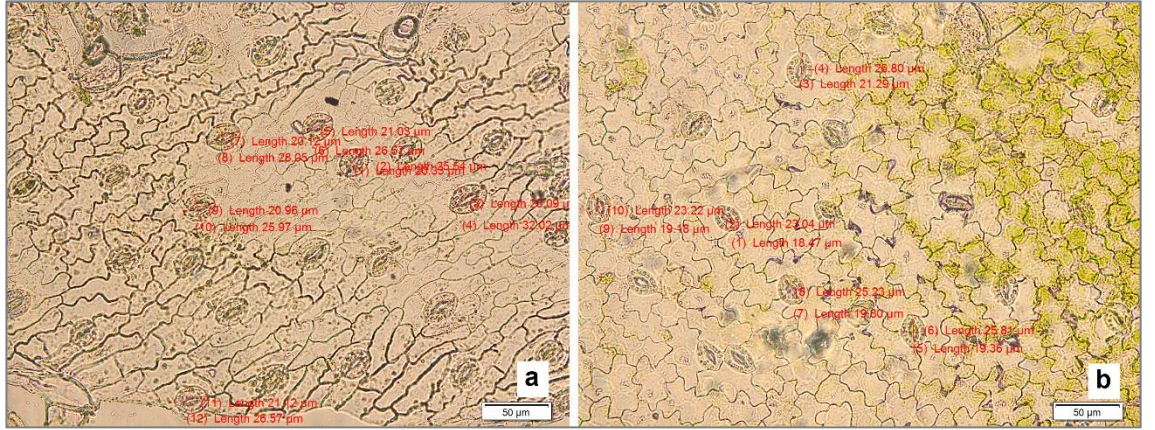
W: Ekstre edilen dokunun gr olarak yaş ağırlığı

## 2.4 Stoma yoğunluğu ve stoma boyutlarının belirlenmesi

Bitkilerin dört farklı yönünden sabah 9-11 saatleri arasında yaprak örnekleri toplanmıştır. Yaprakların alt ve üst epiderma tabakasından yaprak ucu, ortası ve yaprak sapına yakın kısım olmak üzere üçer farklı bölgeden alınan yüzeysel kesitlerde 3'er sayım yapılmıştır. Stoma sayım (4X objektifte) ve ölçümleri (40X objektifte) araştırma mikroskobu kullanılarak Stream Basic programı ile yapılmıştır.



Şekil 2.2 25°C’de yetiştirilen ve 5mM tiyoüre uygulanan bitkilerin stoma sayılarını gösteren örnekler a) üst epiderma, b) alt epiderma



Şekil 2.3 25°C’de yetiştirilen ve 5mM tiyoüre uygulanan bitkilerin stoma boyutlarına ait örnekler a) üst epiderma, b) alt epiderma

## 2.5 Mitotik İndeksin Belirlenmesi

Çimlenmiş tohumların kök uçlarından 1-2 cm kesilmiş; 3:1 oranında sırasıyla absolut etanol ve glacial asetik asit içeren solüsyon ile 24 saat boyunca 4°C’de fikse edilmiştir. İnkübasyon süresi bittikten sonra distile su ile yıkanan kök ucu örnekleri %70 EtOH’da +4°C saklanmıştır. Kökler 1N HCl ile 60°C’de 10 dakika hidrolize edilmiştir ve Feulgen boyası ile oda sıcaklığında 1,5 saat bekletilerek boyanmıştır. Kökler daha sonra dH<sub>2</sub>O ile boyası uzaklaştırılmış ve 3 kere 10’ar dakika SO<sub>2</sub> ile

yıkanmıştır. Ezilen ve boyanan kök uçları mikroskopta incelenerek mitoz bölünme evrelerinde olan hücreler sayılmıştır.

$$\text{MI (Mitotik İndeks)} = (\text{Bölünen Hücre Sayısı} / \text{Toplam Hücre Sayısı}) \times 100$$

## **2.6 Yaprak örneklerinin ekstraksiyonu**

Ekstraksiyon işlemi için yaprak örneklerinden 0,5 gr tartılarak sıvı azot ile toz haline getirilmiş ve 5 ml ekstraksiyon tamponu ile homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat 20000 g'de 20 dk +4°C'de santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı enzim aktivitesi tayini için kullanılmıştır. APX aktivitesini ölçmek için diğer enzimlerden farklı olarak ekstraksiyon tamponuna ayrıca 5 mM askorbik asit eklenmiştir (Sairam vd., 2000).

## **2.7 Toplam protein içeriğinin belirlenmesi**

Enzim aktiviteleri hesaplanırken protein miktarları kullanıldığı için elde edilen tüm yaprak ekstraktların protein içerikleri belirlenmiştir. Yaprak örneklerinin protein konsantrasyonları belirlenirken Bradford metodu (Bradford, 1976) ve sığır serum albümini (BSA) standart olarak kullanılmıştır. Protein içeriği belirlenirken 780 µl dH<sub>2</sub>O üzerine 20 µl enzim çözeltisi konulmuştur. Bu karışımın üzerine 200 µl 5X Bradford çözeltisi eklenmiş ve vortekste karıştırılmıştır. Bu karışım karanlıkta ve oda sıcaklığında 5 dk boyunca bekletilmiş, daha sonra absorbans değerleri spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda üç tekrarlı olarak okunmuştur. Standart grafiği için 0,1 mg/ml BSA stoğu kullanılmıştır. BSA stoğundan 0,1,2,3,4,5,6,7,8,9 ve 10 µg protein alınıp absorbans değerleri belirlenmiştir. Standartların absorbans değerleri kullanılarak bir grafik çizilmiştir. Grafikten elde edilen formül ( $y = 0,042x + 0,033$ ) kullanılarak konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin konsantrasyonları hesaplanmıştır.

## **2.8 SOD aktivitesinin belirlenmesi**

Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi, Nitrobluetetrazolyum'un (NBT) fotoredüksiyonunu esas alan yöntemle göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Beyer ve Fridovich, 1987). Kontrol ve stres gruplarına ait bitkilerden alınan 0,5 gr taze yapraklar sıvı azot içerisinde havanda ezildikten sonra 9 mM Tris-HCl tamponu (pH 6,8) ve %13,6 gliserol içeren 1 ml'lik tampon çözeltisine konulmuştur (Burke ve Oliver, 1992). Bu karışım +4°C'de 14000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenerek enzim içeren

süpernatant kısmı ayrılmıştır. 50 mM fosfat tamponu (pH 7.,8), 9.9 mM L-Metiyonin, 57 µM NBT ve %1 Triton X-100 ile karıştırılarak ve 20 µl süpernatant üzerine bu çözeltiden 1 ml eklenmiştir. Çözelti konulduktan sonra reaksiyonu başlatmak için üzerine 10µl riboflavin ilave edilmiştir. Karıştırma işleminden sonra tüpler  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğunda floresan ışığına maruz bırakılarak absorban değerleri köre karşı spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda okunmuştur. Toplam SOD aktivitesi ünite/mg protein olarak hesaplanmıştır.

## 2.9 CAT aktivitesinin belirlenmesi

CAT aktivitesi, hidrojen peroksitin katalaz enzimi ile su ve oksijene parçalanması sonucu absorbanstaki değişimin spektrofotometrede izlenmesi ile belirlenmiştir. 20 µl protein özütü üzerine 1 ml CAT reaksiyon tamponu (50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 30 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) eklenmiş ve pipetaj yapılarak karıştırılmıştır. Kör olarak protein özütü içermeyen reaksiyon tamponu kullanılmış ve örneklerin köre karşı 240 nm dalga boyunda 3 dk boyunca 15 sn aralıklarla kinetik ölçümü alınarak absorbanlarındaki değişim kaydedilmiştir (Tepe ve Aydemir, 2011). Toplam CAT aktivitesi belirlenirken aşağıda verilen denklem kullanılmıştır.

$$\text{CAT Aktivitesi (U/}\mu\text{g): } [(\Delta\text{Abs} \times V_{\text{toplaml}})/(\varepsilon \times t \times V_{\text{enzim}} \times l)] / \text{TP}$$

$\varepsilon$ : Ekstinksiyon katsayısı (40 mmol/L.cm)

$V_{\text{toplaml}}$ : Toplam hacim (1,020 ml)

$V_{\text{enzim}}$ : Reaksiyona konulan enzim hacmi (0.02 ml)

t: Reaksiyonun gerçekleştiği süre (3 dk)

l: Küvete ait ışık yolu (1 cm)

TP: Total protein miktarı (mg/ml)

## 2.10 APX aktivitesinin belirlenmesi

Askorbat peroksidaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde 1 ml APX reaksiyon tamponu (50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve 50 µM askorbik asit) üzerine 20 µl enzim özütü eklenerek vorteks ile karıştırılmıştır. Spektrofotometrede enzim özütü içermeyen APX reaksiyon tamponu kör olarak kullanılmış, örnekler 290 nm dalga boyunda köre karşı 3 dk boyunca 15 sn aralıklarla kinetik ölçümü alınmış ve absorbanstaki azalma değerleri kaydedilmiştir. Toplam APX aktivitesi U/µg protein

olarak hesaplanmıştır (Luis M. Cervilla vd., 2007). Toplam APX aktivitesi belirlenirken aşağıda verilen denklem kullanılmıştır.

$$\text{APX Aktivitesi (U/}\mu\text{g): } [(\Delta\text{Abs} \times V_{\text{toplaml}}) / \epsilon \times t \times V_{\text{enzim}} \times l] / \text{TP}$$

$\epsilon$ : Ekstinksiyon katsayısı (2,8 mmol/L.cm)

$V_{\text{toplaml}}$ : Toplam hacim (1,020 ml)

$V_{\text{enzim}}$ : Reaksiyona konulan enzim hacmi (0.02 ml)

t: Reaksiyonun gerçekleştiği süre (3 dk)

l: Küvete ait ışık yolu (1 cm)

TP: Total protein miktarı (mg/ml)

### 2.11 NR aktivitesinin belirlenmesi

150  $\mu$ l süpernatant üstüne 850  $\mu$ l çalışma tamponundan (40 mM NaNO<sub>3</sub>, 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH:7.5) 0,2 mM NADH) eklenmiş ve oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir. 200  $\mu$ l %1 sülfanilamid (3M HCl içinde çözülmüş) ve 200  $\mu$ l %0,05 N-(1-naftil) etilendiamid hidroklorit (dH<sub>2</sub>O'da çözülmüş) reaksiyonu durdurmak için eklenmiştir. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiş ve 540 nm dalga boyunda okunmuştur (Cervilla vd., 2009).

### 2.12 GS aktivitesinin belirlenmesi

GS aktivitesi Kaiser ve Lewis'den (1984) uyarlanan hidroksamat sentetaz deneyi ile belirlenmiştir. Süpernatant üzerine 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH:7,5), 4 mM EDTA, 1000 mM L-sodyum glutamat, 40 mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 300 mM hidroksilamin, 100 mM ATP içeren reaksiyon tamponu eklenmiştir. Biri glutamin biri hidroksilamin içermeyen iki kontrol hazırlanmıştır. 28°C'de 30 dakika inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda ferrik klorit ile reaksiyon durdurulmuş ve 540 nm dalga boyunda okunmuştur (Cervilla vd., 2009).

## 3. BULGULAR

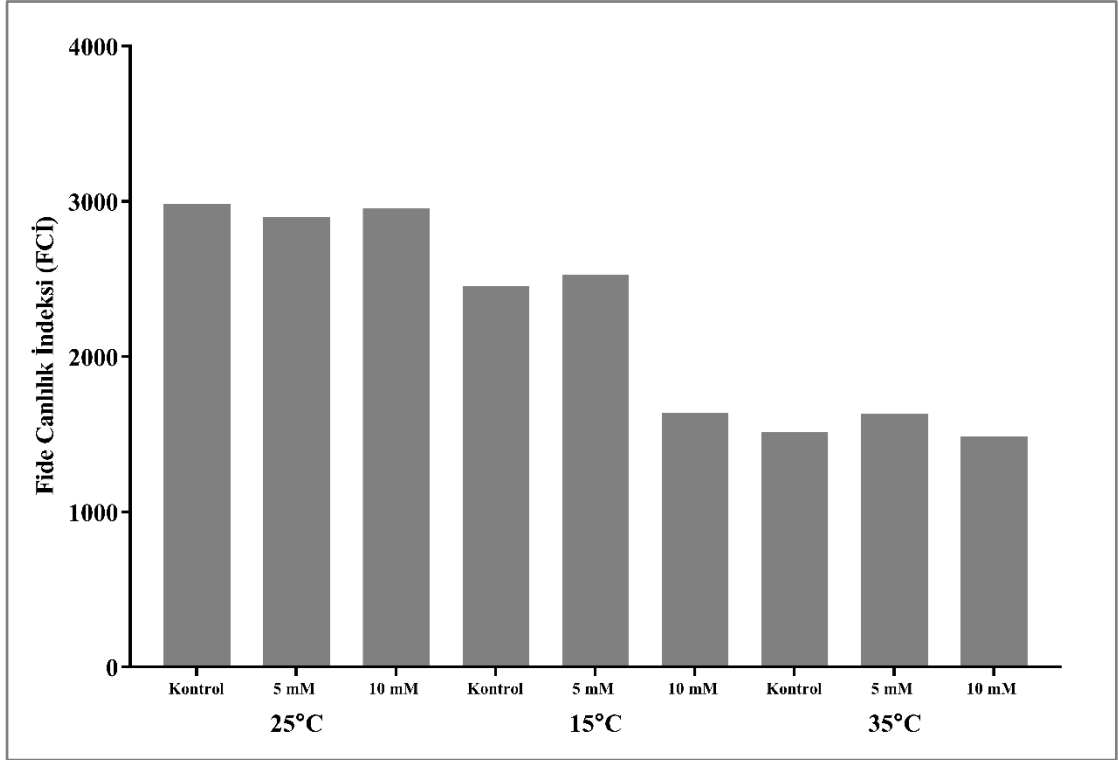
### 3.1 Bitkilerin ekolojik parametrelerine ait sonuçlar

Bitki örneklerinin % çimlenme oranı, fide canlılık indeksi, kök ve gövde uzunlukları, kök ve gövde yaş-kuru ağırlıkları alınmış; stoma yoğunlukları ile stoma boyutları ölçülmüştür.

Nohut tohumları, kontrol deney grubunda 5 ve 10 mM tiyoüre uygulamasında, 15°C sıcaklıkta kontrol ve 5 mM tiyoüre uygulamasında, 35°C’de ise kontrol grubunda %100 oranında çimlenme göstermiştir. 15°C’de 10 mM tiyoüre ve 35°C’de ise her iki tiyoüre uygulamasında %83,3 oranında çimlenme olmuştur (Tablo 1). En yüksek fide canlılık indeksi kontrol sıcaklığı olan 25°C’deki kontrol grubunda; en düşük fide canlılık indeksi ise 35°C’deki 10 mM tiyoüre uygulamasında belirlenmiştir. 15°C deney grubu kendi içinde değerlendirildiğinde 5 mM tiyoüre uygulamasının fide canlılık indeksi parametresi bakımından kontrolden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.1).

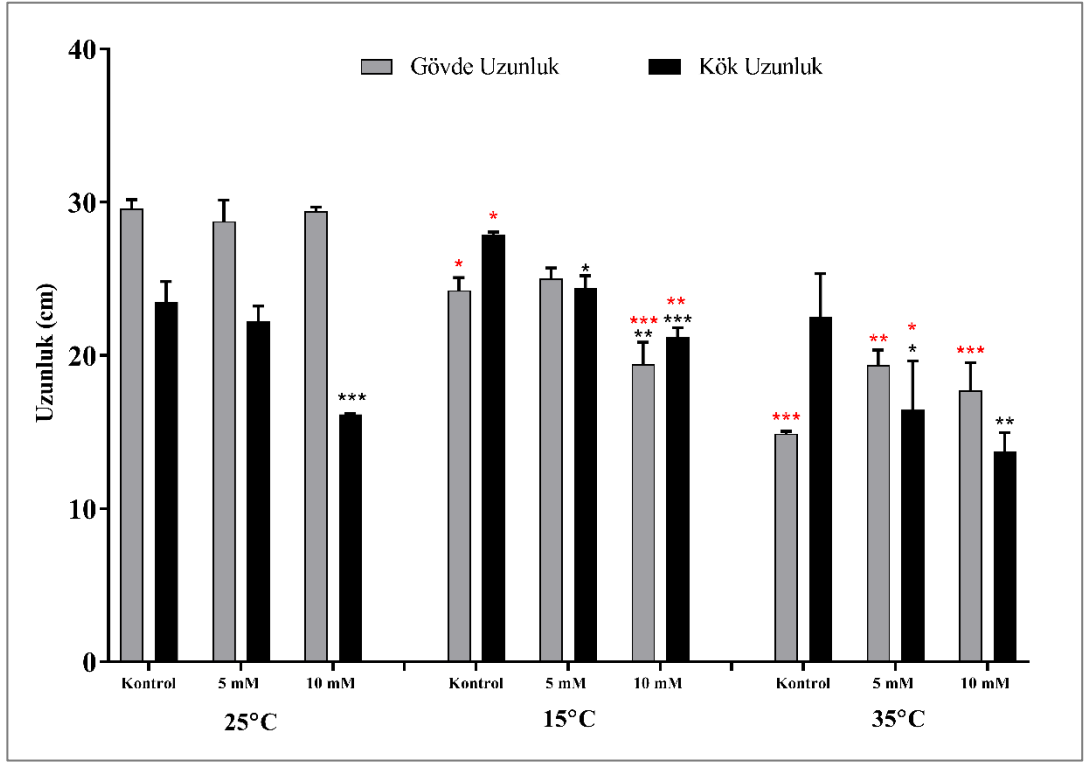
**Tablo 3.1** Tiyoüre uygulanan nohut tohumlarının 15, 25 ve 35°C’deki çimlenme oranları (%)

Sıcaklık	Tiyoüre Uygulaması	% Çimlenme
25°C	Kontrol	100
	5 mM	100
	10 mM	100
15°C	Kontrol	100
	5 mM	100
	10 mM	83,3
35°C	Kontrol	100
	5 mM	83,3
	10 mM	83,3



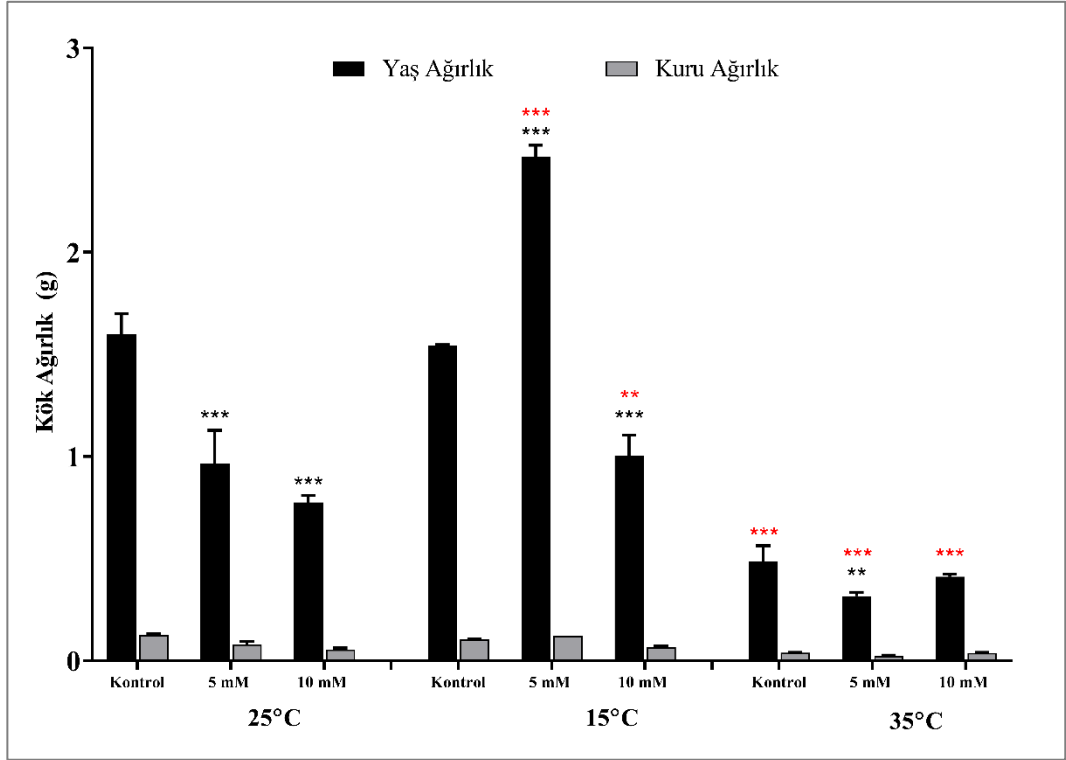
**Şekil 3.1** Tiyöüre uygulanan nohut örneklerin 15, 25 ve 35°C’deki fide canlılık indeksi.

Kontrol sıcaklığı olan 25°C’deki kök uzunlukları karşılaştırıldığında sadece 10 mM tiyöüre uygulamasında önemli bir azalma görülürken ( $p < 0,001$ ), gövde uzunluğunda istatistiksel olarak önemli bir değişiklik tespit edilmemiştir. 15°C’deki kök uzunlukları kendi içinde karşılaştırıldığında 5 ve 10 mM tiyöüre uygulamasında, gövde uzunluklarında ise sadece 10 mM tiyöüre uygulamasında önemli bir azalma belirlenmiştir (sırasıyla  $p < 0,05$ ;  $p < 0,001$ ;  $p < 0,01$ ). 35°C’de 5 ve 10 mM tiyöüre uygulamasında kök uzunluğunda istatistiksel olarak bir azalma belirlenirken, gövde uzunluğunda önemli bir değişim tespit edilmemiştir (sırasıyla  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ). Sıcaklık deney grupları kontrol sıcaklığı olan 25°C’deki bitki örnekleri ile karşılaştırıldığında 15°C’deki kontrol grubu ve 10 mM tiyöürede kök uzunluğu artarken gövde uzunluğunun azaldığı belirlenmiştir (sırasıyla  $p < 0,05$ ;  $p < 0,001$ ;  $p < 0,01$ ). 35°C’de 5 mM tiyöüre uygulamasında sadece kök uzunluğunun 25°C’deki deney gruplarına göre azaldığı ( $p < 0,05$ ); gövde uzunluğunun ise kontrol, 5 ve 10 mM tiyöüre uygulamasında önemli bir azalma gösterdiği tespit edilmiştir (sırasıyla  $p < 0,001$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ) (Şekil 3.2).



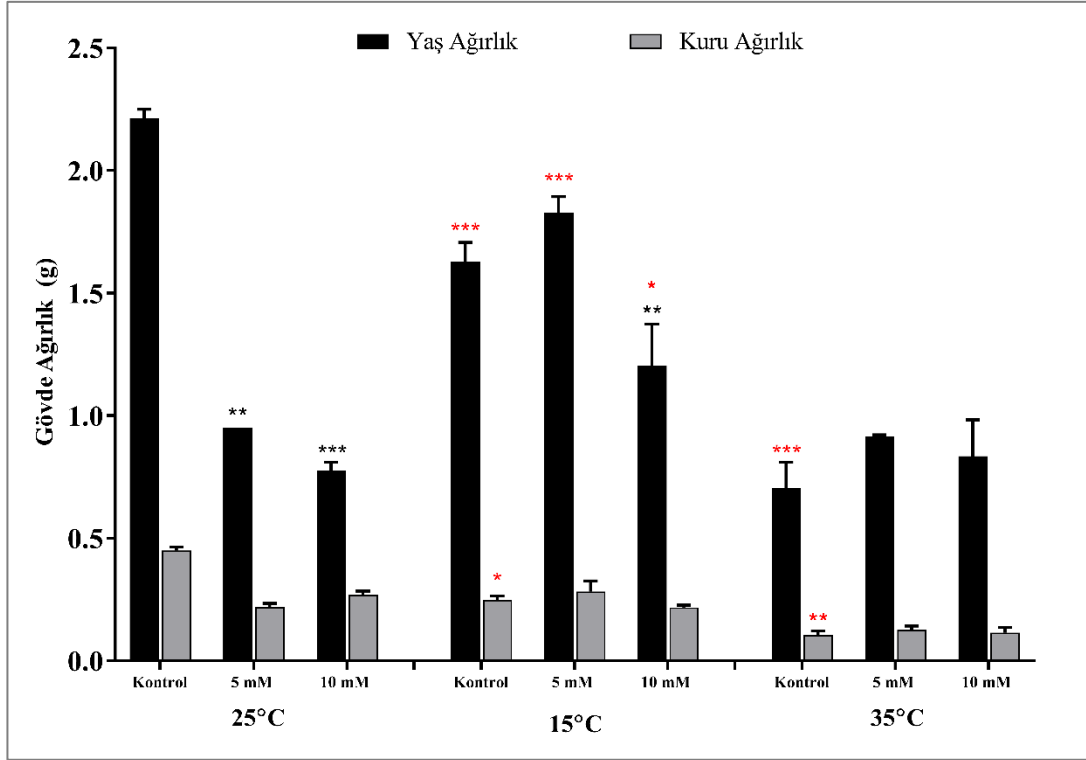
**Şekil 3.2** Tiyöüre uygulanan nohut örneklerin kök ve gövde uzunlukları (cm) (\*sıcaklıklar kendi içlerinde, \*sıcaklıklar birbirleriyle, \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001)

Üç farklı sıcaklıktaki kök yaş ve kuru ağırlıkları incelendiğinde kök yaş ağırlığının 25°C’de 5 ve 10 mM tiyöürede, 15°C’de 10 mM tiyöürede, 35°C’de ise 5 mM tiyöürede kontrol gruplarına göre önemli bir azalma gösterdiği (sırasıyla p<0,001; p<0,001; p<0,01), 15°C’de 5 mM tiyöüre uygulamasında ise önemli bir artış gösterdiği belirlenmiştir (p<0,001). Tüm deney gruplarının kök kuru ağırlıklarında istatistiksel olarak herhangi bir değişime rastlanmamıştır. Sıcaklıklar 25°C’deki deney grupları ile karşılaştırıldığında kök yaş ağırlığının 15°C’ de 5 ve 10 mM tiyöürede önemli bir artış olduğu (sırasıyla p<0,001; p<0,01), 35°C’de ise kontrol ve tiyöüre uygulamasının her ikinde de önemli bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir (p<0,001) (Şekil 3.3).



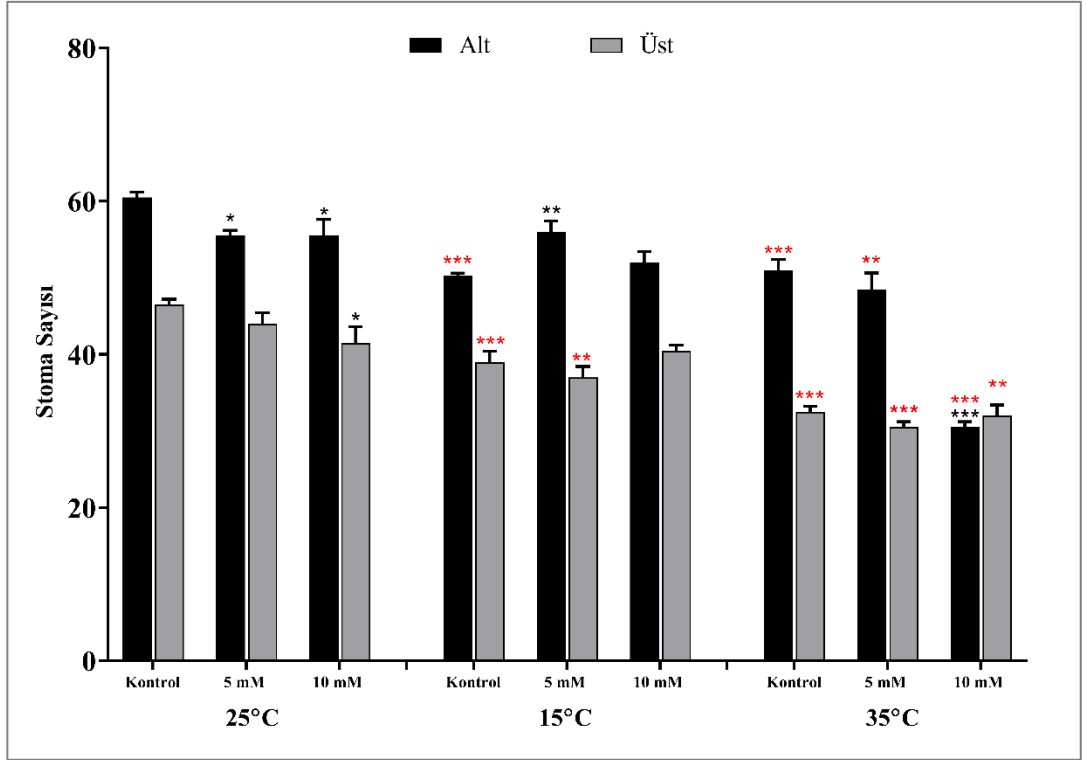
**Şekil 3.3** Tiyöüre uygulanan nohut örneklerin kök yaş ve kuru ağırlıkları (cm) (\*sıcaklıklar kendi içlerinde, \*sıcaklıklar birbirleriyle, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )

Gövde yaş ağırlıkları incelendiğinde 25°C’de 5 ve 10 mM tiyöüre uygulamasında, 15°C’de ise sadece 10 mM tiyöürede önemli bir azalma görülmüştür (sırasıyla  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ;  $p < 0,05$ ). Her üç sıcaklıkta gövde kuru ağırlığında önemli bir değişim belirlenmemiştir. Kontrol sıcaklığı olan 25°C ile diğer sıcaklıklar karşılaştırıldığında 15°C’de gövde yaş ve kuru ağırlığının kontrol grubunda azaldığı (sırasıyla  $p < 0,001$ ;  $p < 0,05$ ), 5 ve 10 mM tiyöürede sadece gövde yaş ağırlığının arttığı tespit edilmiştir (sırasıyla  $p < 0,001$ ;  $p < 0,05$ ). 35°C’de ise kontrol grubunda gövde yaş ve kuru ağırlığının önemli bir azalma gösterdiği belirlenmiştir (sırasıyla  $p < 0,001$ ;  $p < 0,01$ ) (Şekil 3.4).



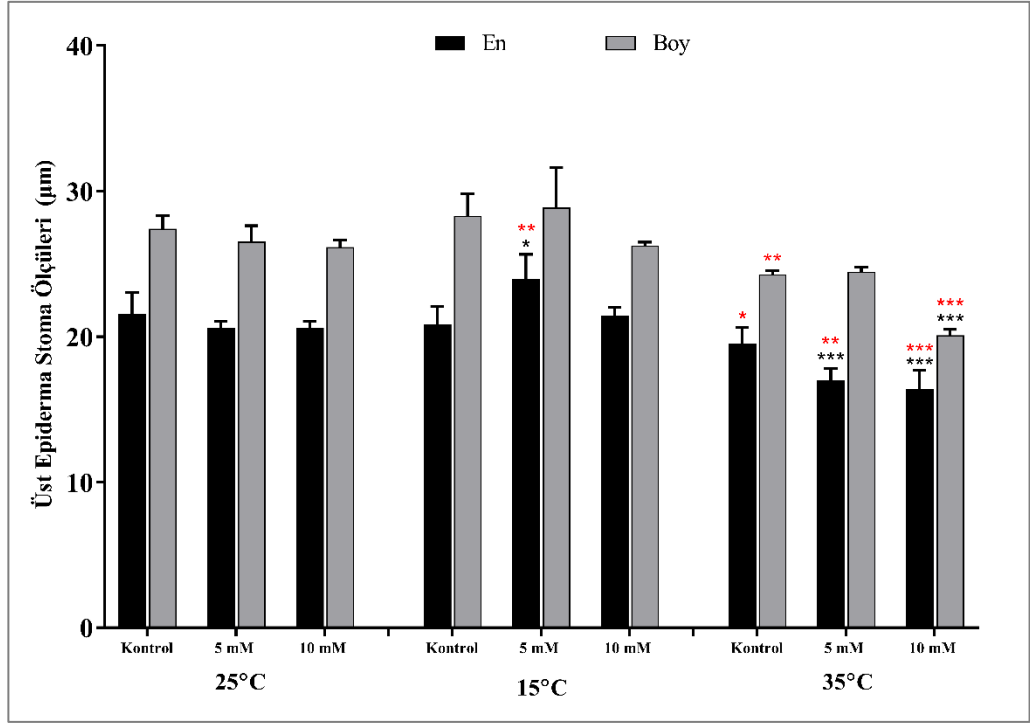
**Şekil 3.4** Tiyöüre uygulanan nohut örneklerin gövde yaş ve kuru ağırlıkları (cm) (\*sıcaklıklar kendi içlerinde, \*sıcaklıklar birbirleriyle, \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001)

Çalışmada incelenen bir diğer parametre stoma sayıları ile stomaların en ve boy uzunluklarıdır. 25°C’de 5 mM tiyöüre uygulamasında sadece alt epidermada (p<0,05), 10 mM tiyöüre uygulamasında ise hem alt ve hem üst epidermada stoma sayısında önemli bir azalma tespit edilmiştir (p<0,05). 15°C’de sadece 5 mM tiyöürede önemli bir artış görülürken, 35°C’de ise sadece 10 mM’da önemli bir azalma belirlenmiştir (sırasıyla p<0,01; p<0,001). 15°C ve 35°C’deki deney grupları kontrol sıcaklığı olan 25°C’deki deney grupları ile karşılaştırıldığında 15°C’de kontrol grubunda alt ve üst epidermada 5 mM tiyöürede ise sadece üst epidermada stoma sayısında önemli bir azalma tespit edilmiştir (sırasıyla p<0,001; p<0,01). 35°C’de ise kontrol grubu ve tiyöüre uygulamalarında hem alt hem de üst epidermada stoma sayısında önemli bir azalma gözlenmiştir (sırasıyla p<0,001; p<0,01) (Şekil 3.5).

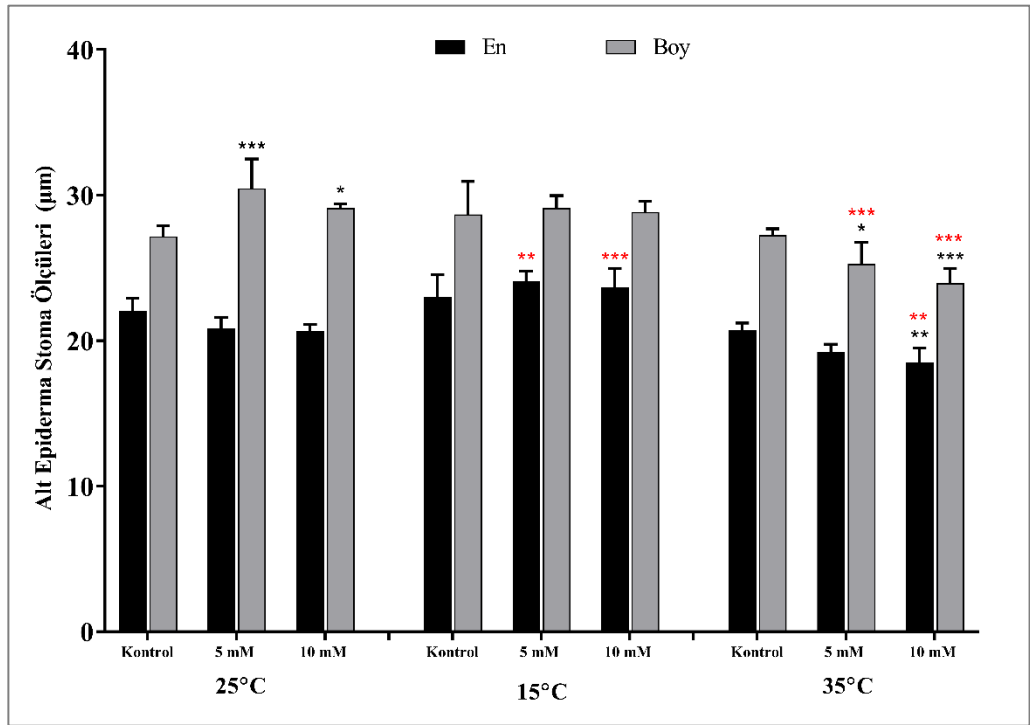


**Şekil 3.5** Tiyöüre uygulanan nohut yapraklarına ait alt ve üst epiderma stoma sayıları (\*sıcaklıklar kendi içlerinde, \*sıcaklıklar birbirleriyle, \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ )

Stoma boyutları karşılaştırıldığında üst epidermada 25°C’de önemli bir değişim görülmezken, 15°C’de 5 mM tiyöüre uygulamasında stoma en uzunluğunda önemli bir artış belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). 35°C’de 5 ve 10 mM tiyöüre uygulamasında stoma boyutlarında önemli bir azalma olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,001$ ). Sıcaklıklar 25°C’deki deney grupları ile karşılaştırıldığında 15°C’de 5 mM tiyöürede stoma en uzunluğunda önemli bir artış görülürken ( $p<0,01$ ), 35°C’de ise kontrol grubu ve her iki tiyöüre uygulamasında önemli azalma görülmüştür (sırası ile  $p<0,05$ ;  $p<0,01$ ;  $p<0,001$ ) (Şekil 3. 6). Alt epidermada stoma boyutları 25°C’de 5 ve 10 mM tiyöüre uygulamasında stoma boyunda önemli bir artış olduğu belirlenmiş, 15°C’de ise herhangi bir değişiklik görülmemiştir (sırasıyla  $p<0,001$ ;  $p<0,05$ ). 35°C’de ise 5 ve 10 mM tiyöüre uygulamasında stoma boyutlarında önemli bir azalma olduğu tespit edilmiştir (sırasıyla  $p<0,05$ ;  $p<0,01$ ;  $p<0,001$ ). Sıcaklıklar 25°C’deki deney grupları ile karşılaştırıldığında 15°C’de 5 ve 10 mM tiyöürede stoma en uzunluğunda önemli bir artış görülürken (sırasıyla  $p<0,01$ ;  $p<0,001$ ), 35°C’de ise her iki tiyöüre uygulamasında stoma boyutlarında önemli azalma görülmüştür (sırasıyla  $p<0,01$ ;  $p<0,001$ ) (Şekil 3.7).

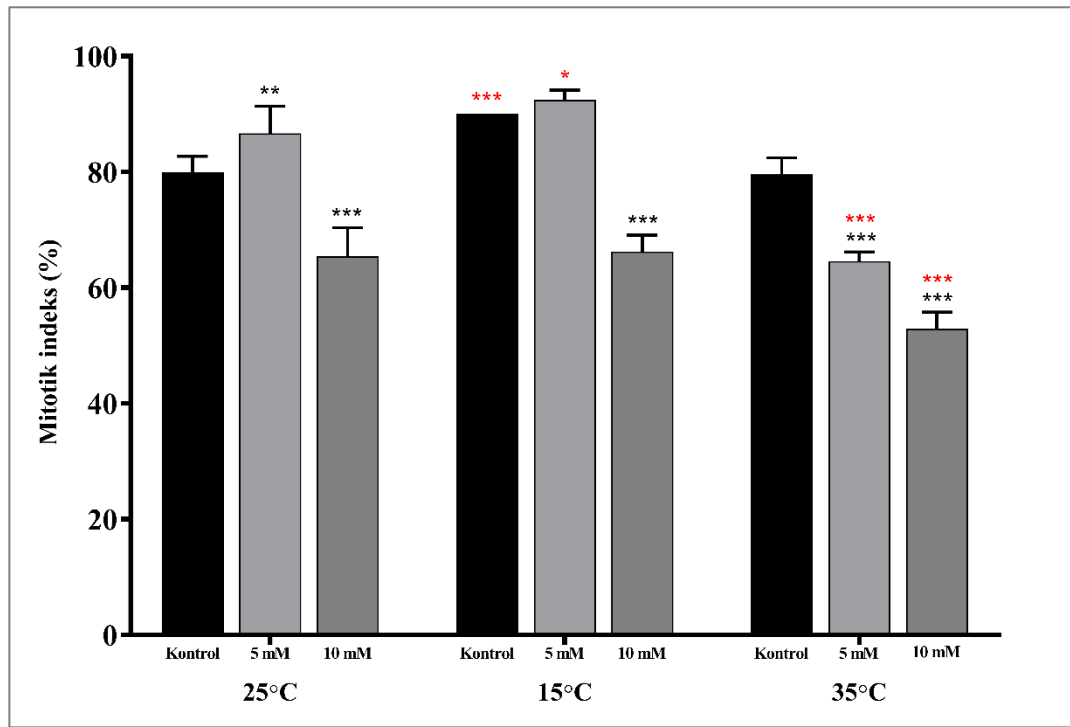


**Şekil 3.6** Tiyüre uygulanan nohut yapraklarının alt epiderma stoma boyutları (µm) (\*sıcaklıklar kendi içlerinde, \*sıcaklıklar birbirleriyle, \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001)



**Şekil 3.7** Tiyüre uygulanan nohut yapraklarının alt epiderma stoma boyutları (µm) (\*sıcaklıklar kendi içlerinde, \*sıcaklıklar birbirleriyle, \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001)

Sıcaklıklar kendi içerisinde karşılaştırıldığında 25°C’de kök ucu hücrelerine ait mitotik indeks 5 mM tiyoüre uygulamasında kontrole göre artarken, 10 mM tiyoüre uygulamasında önemli derecede azalmıştır (sırasıyla  $p<0,01$ ;  $p<0,001$ ). 15°C’de ise 10 mM tiyoüredeki azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,001$ ). 35°C’de her iki tiyoüre uygulamasında mitotik indeksin kontrole göre önemli derecede azaldığı belirlenmiştir ( $p<0,001$ ). Düşük ve yüksek sıcaklıktaki deney grupları 25°C’deki deney grupları ile karşılaştırıldığında 15°C’de kontrol ve 5 mM tiyoüre uygulamasının arttığı (sırasıyla  $p<0,001$ ;  $p<0,05$ ); 35°C’de ise 5 ve 10 mM tiyoüre uygulamasının önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir ( $p<0,001$ ).

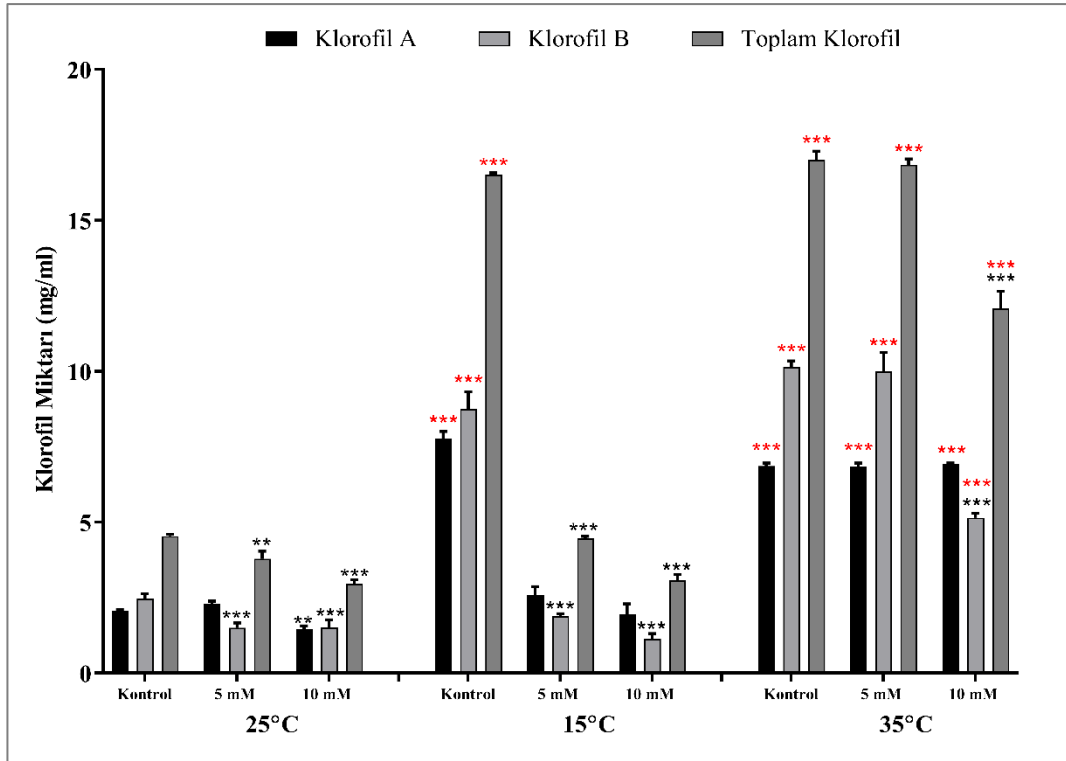


**Şekil 3.8** Nohut bitkilerinin kök ucu hücrelerine ait mitotik indeks oranları (%) (\*sıcaklıklar kendi içlerinde, \*sıcaklıklar birbirleriyle, \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ )

### 3.2 Fotosentetik pigment miktarları

25°C’de 5 mM tiyoüre uygulamasında klorofil b ve toplam klorofilde, 10 mM tiyoürede ise tüm klorofil pigmentlerinde önemli bir azalma belirlenmiştir (sırasıyla  $p<0,001$ ;  $p<0,01$ ). 15°C’de 5 ve 10 mM tiyoüre uygulamasında ( $p<0,001$ ), 35°C’de ise sadece 10 mM tiyoürede klorofil b ve toplam klorofilde önemli bir azalma tespit edilmiştir ( $p<0,001$ ). Sıcaklıklar kontrol sıcaklığıyla karşılaştırıldığında 15°C’de sadece

kontrol grubunda ( $p<0,001$ ),  $35^{\circ}\text{C}$ 'de ise kontrol, 5 ve 10 mM tiyoüre uygulamasında klorofil a, b ve toplam klorofil miktarında önemli bir artış gözlenmiştir ( $p<0,001$ ) (Şekil 3.8).

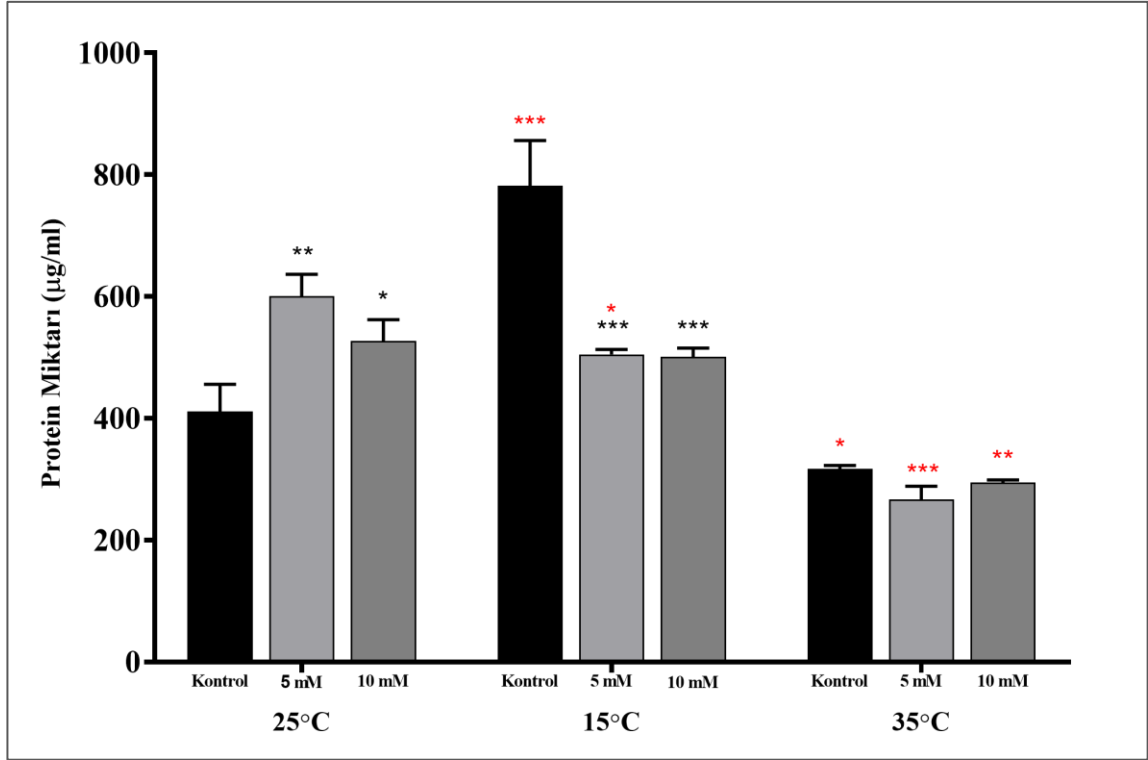


**Şekil 3.9** Tiyoüre uygulanan nohut yapraklarının fotosentetik pigment miktarları (mg/ml)

(\*sıcaklıklar kendi içlerinde, \*sıcaklıklar birbirleriyle, \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ )

### 3.3 Toplam protein miktarı

Toplam protein miktarları karşılaştırıldığında,  $25^{\circ}\text{C}$ 'de her iki tiyoüre uygulamasında önemli bir artış olduğu (sırası ile  $p<0,01$ ;  $p<0,05$ ),  $15^{\circ}\text{C}$ 'de 5 ve 10 mM tiyoüre uygulanan örneklerde kontrole göre önemli bir azalmanın olduğu belirlenmiştir ( $p<0,001$ ). 15 ve  $35^{\circ}\text{C}$ 'deki deney grupları  $25^{\circ}\text{C}$ 'deki deney grupları ile karşılaştırıldığında  $15^{\circ}\text{C}$ 'de kontrol ve 5 mM tiyoüre örneklerinde (sırası ile  $p<0,001$ ;  $p<0,05$ ),  $35^{\circ}\text{C}$ 'de ise kontrol, 5 ve 10 mM tiyoüre örneklerinde protein miktarındaki değişimin istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir (sırası ile  $p<0,05$ ;  $p<0,001$ ;  $p<0,01$ ) (Şekil 3.9).

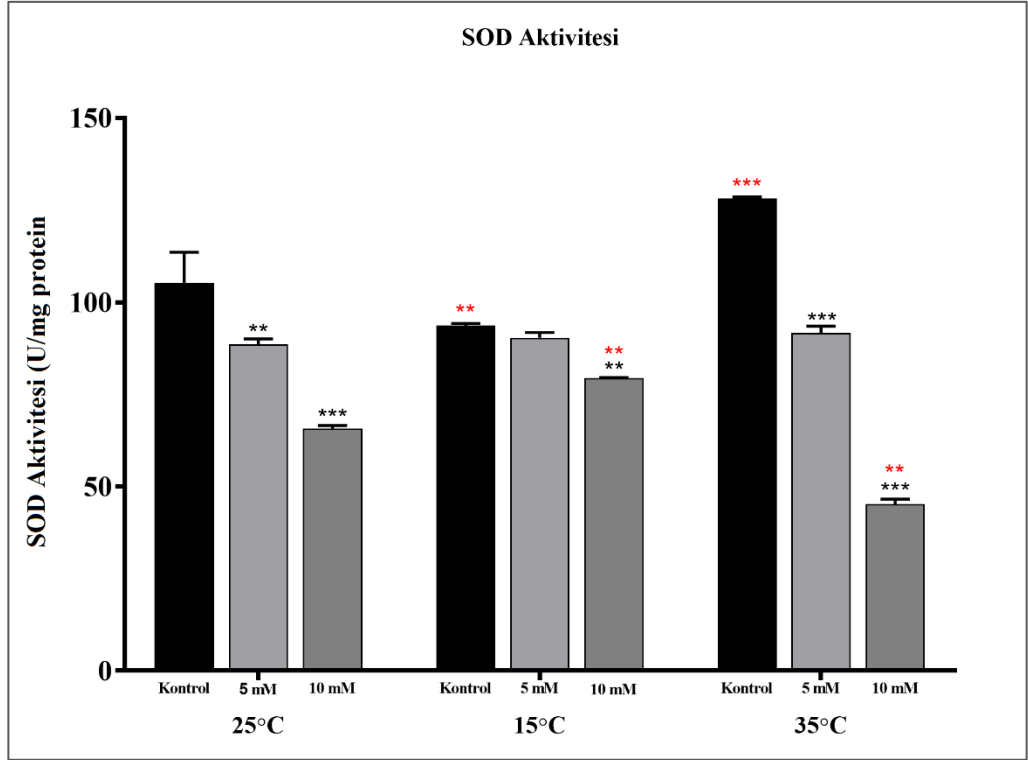


**Şekil 3.10** Tiyöüre uygulanan nohut yapraklarının toplam protein miktarları (µm/ml) (\*sıcaklıklar kendi içlerinde, \*sıcaklıklar birbirleriyle, \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001)

### 3.4 Antioksidan enzim aktivitelerine ait sonuçlar

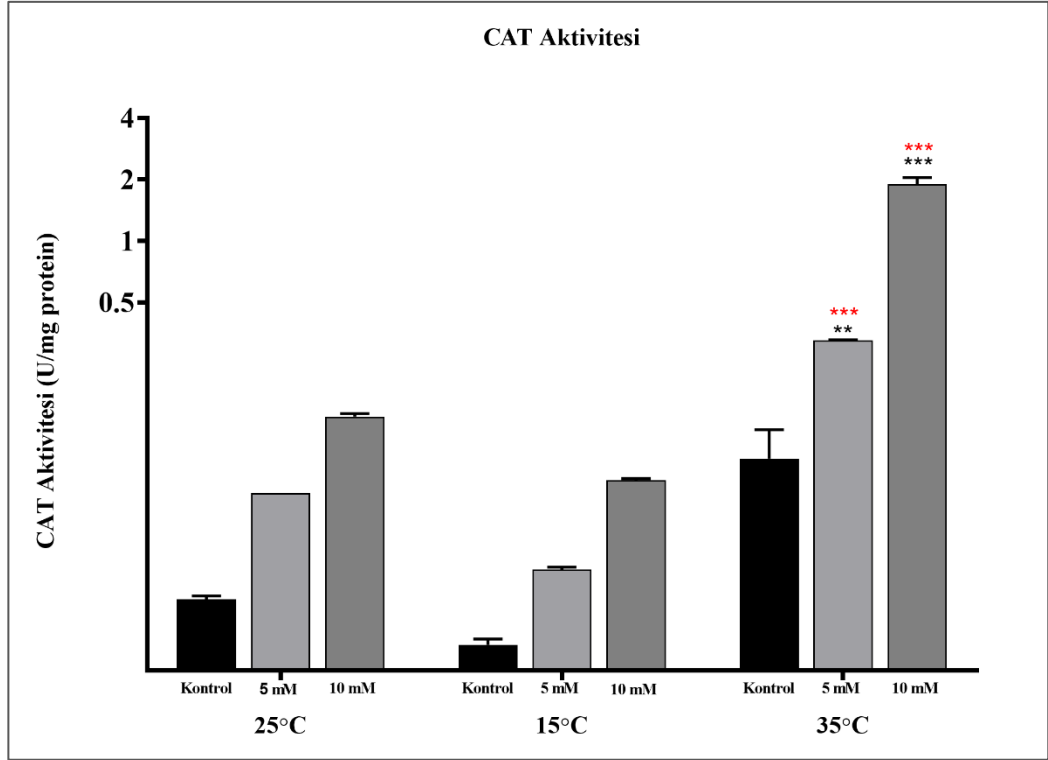
Antioksidan enzim aktiviteleri belirlenirken her üç sıcaklık yetiştirilen ve iki farklı konsantrasyonda tiyöüre uygulanan bitki örneklerine ait deney gruplar hem kendi içlerinde hem de birbirleri arasında karşılaştırılmıştır.

Örneklerin SOD aktiviteleri karşılaştırıldığında, 25°C (sırası ile p<0,01; p<0,001) ve 35°C'deki deney gruplarından (p<0,001) 5 ve 10 mM tiyöüre uygulanan örneklerde kontrol gruplarına göre SOD aktivitesinde önemli ölçüde bir azalmanın olduğu belirlenmiştir. 15°C'de sadece 10 mM tiyöüre uygulanan örneklerin SOD aktivitesinde önemli bir azalma olduğu görülmüştür (p<0,01). Sıcaklıklar kontrol sıcaklığıyla karşılaştırıldığında ise 15°C'de kontrol grubunda azalma, 10 mM tiyöüre uygulamasında artış olduğu tespit edilmiştir (p<0,01). 35°C'deki SOD aktivitesinde ise kontrol grubunda artış, 10 mM tiyöüre uygulamasında önemli bir azalma olduğu tespit edilmiştir (sırasıyla p<0,001; p<0,01) (Şekil 3.10).



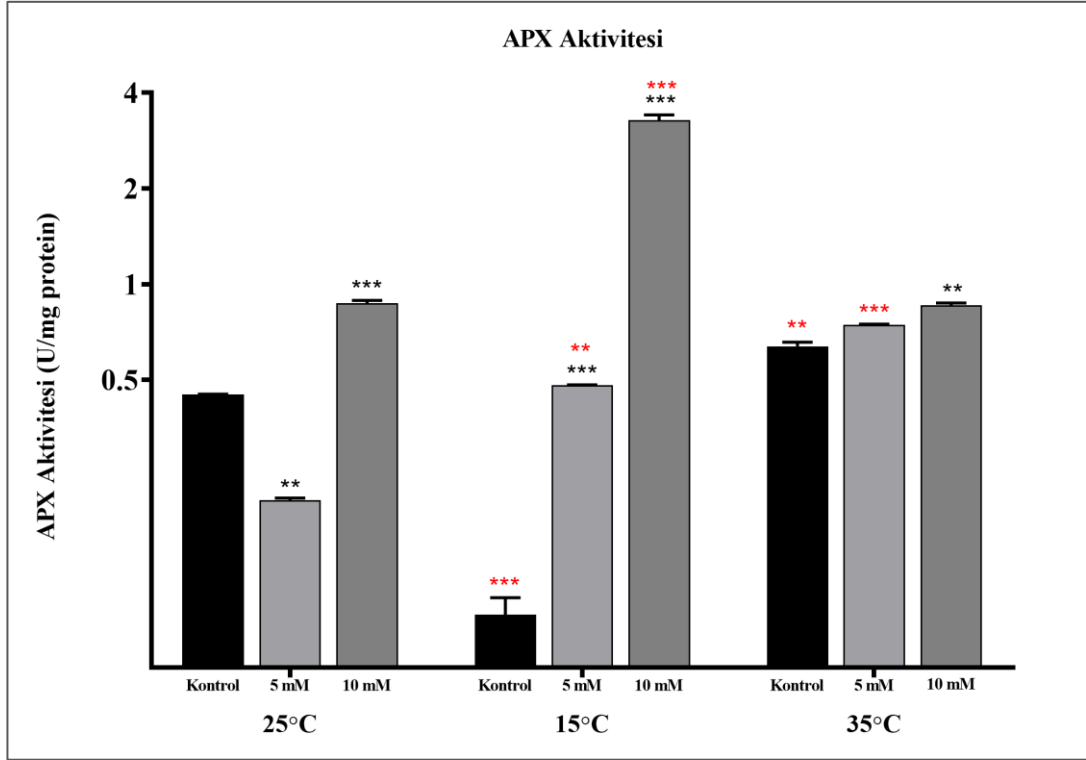
**Şekil 3.11** Tiyöüre uygulanan nohut örneklerinin SOD aktivitesi (U/mg protein) (\*sıcaklıklar kendi içlerinde, \*sıcaklıklar birbirleriyle, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )

Her üç sıcaklıkta yetiştirilen bitki grupları kendi içinde karşılaştırıldığında kontrole göre tüm sıcaklık uygulamalarında CAT aktivitesinin kontrol gruplarına göre artış gösterdiği ancak yalnızca 35°C'deki 5 ve 10 mM tiyöüre uygulanan örneklerin kontrole göre önemli ölçüde artış gösterdiği belirlenmiştir (sırasıyla  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ). Kontrol sıcaklığına ait deney grupları karşılaştırıldığında ise yine yalnızca 35°C'deki 5 ve 10 mM tiyöüre uygulanan örneklerin önemli bir artış gösterdiği tespit edilmiştir ( $p < 0,001$ ) (Şekil 3.11).



**Şekil 3.12** Tiyöüre uygulanan nohut örneklerin CAT aktivitesi (U/mg protein) (\*sıcaklıklar kendi içlerinde, \*sıcaklıklar birbirleriyle, \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ )

Deney gruplarının APX aktiviteleri kendi içlerinde karşılaştırıldığında, 25°C’de 5 mM tiyöüre uygulamasında APX aktivitesinin kontrol grubuna göre azaldığı, 10 mM tiyöüre uygulamasında ise arttığı belirlenmiştir (sırası ile  $p<0,01$ ;  $p<0,001$ ). 15°C’de 5 ve 10 mM tiyöüre uygulaması ile ( $p<0,001$ ) 35°C’deki 10 mM tiyöüre uygulamasında ( $p<0,01$ ) kontrol gruplarına göre APX aktivitesinde önemli bir artışın olduğu belirlenmiştir. 15°C’deki 5 ve 10 mM tiyöüre uygulamasında (sırasıyla  $p<0,01$ ;  $p<0,001$ ), 35°C’deki kontrol ve 5 mM tiyöüre gruplarının APX aktivitesinin (sırasıyla  $p<0,01$ ;  $p<0,001$ ) kontrol sıcaklığı olan 25°C’deki deney gruplarına göre istatistiksel olarak önemli derecede artış gösterdiği ortaya konmuştur. 15°C’deki kontrol grubunun ise 25°C’deki kontrole göre azaldığı belirlenmiştir ( $p<0,001$ ) (Şekil 3.12).

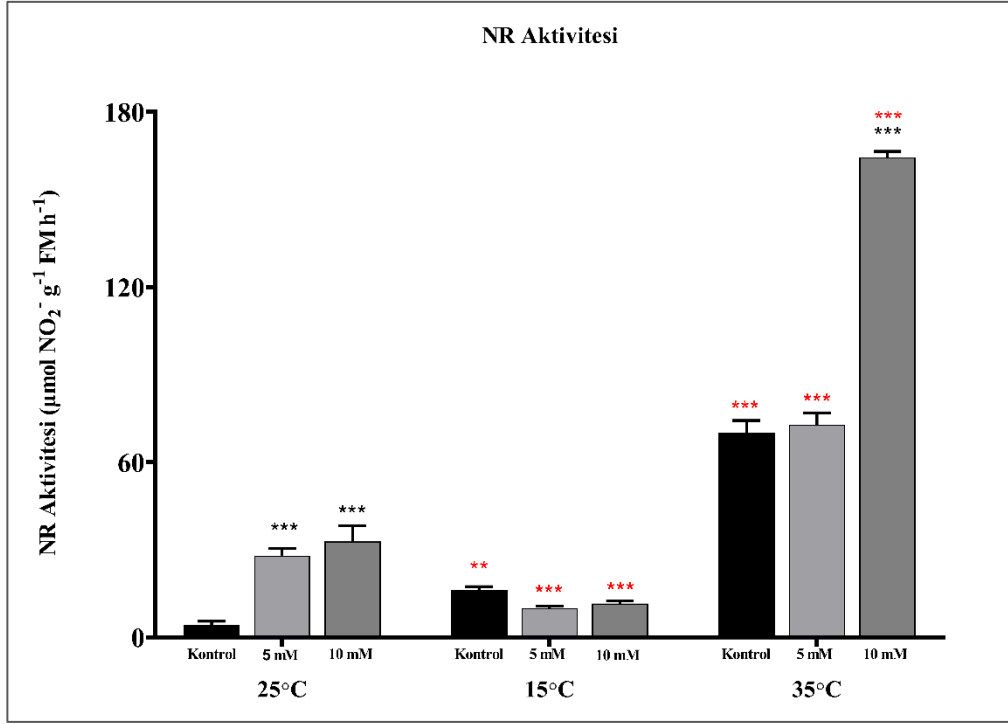


**Şekil 3.13** Tiyöüre uygulanan nohut örneklerinin APX aktivitesi (U/mg protein) (\*sıcaklıklar kendi içlerinde, \*sıcaklıklar birbirleriyle, \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ )

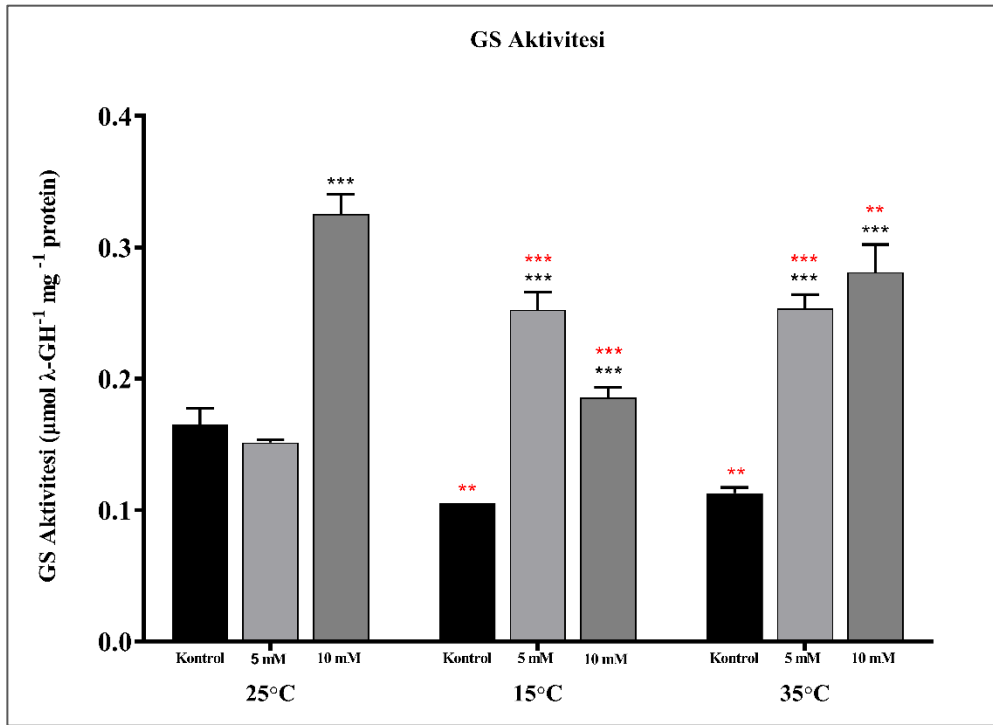
### 3.5 Azot metabolizmasına ait enzim aktiviteleri

25°C’de 5 ve 10 mM tiyöüre uygulamasında, 35°C’de ise sadece 10 mM tiyöüre uygulamasında kontrol gruplarına göre NR aktivitesinde önemli bir artış belirlenmiştir ( $p<0,001$ ). Sıcaklıklar kontrol sıcaklığı ile karşılaştırıldığında 15°C’deki kontrol grubunda NR aktivitesinde artış görülürken ( $p<0,01$ ), 5 ve 10 mM tiyöüre uygulamasında ise azalmanın olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,001$ ). 35°C’deki bitki örnekleri 25°C ile karşılaştırıldığında ise tüm deney gruplarında önemli bir artış olduğu belirlenmiştir ( $p<0,001$ ) (Şekil 3.13).

Deney gruplarının GS aktiviteleri kendi içlerinde karşılaştırıldığında, 25°C’de 10 mM tiyöüre uygulamasında ( $p<0,001$ ), 15 ve 35°C’de 5 ve 10 mM tiyöürede GS aktivitesinde kontrol gruplarına göre önemli bir artış olduğu gözlenmiştir ( $p<0,001$ ). 15 ve 35°C’deki deney grupları 25°C ile karşılaştırıldığında her iki sıcaklıkta kontrol ve 10 mM tiyöüre uygulamasında GS aktivitesinde önemli bir azalma olduğu (sırasıyla  $p<0,01$ ;  $p<0,001$ ), 5 mM tiyöürede ise önemli bir artış olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,001$ ) (Şekil 3.14).



**Şekil 3.14** Tiyoüre uygulanan nohut örneklerin NR aktivitesi ( $\mu\text{mol NO}_2^- \text{FM h}^{-1}$ ) (\*sıcaklıklar kendi içlerinde, \*sıcaklıklar birbirleriyle, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )



**Şekil 3.15** Tiyoüre uygulanan nohut örneklerin GS aktivitesi ( $\mu\text{mol } \lambda\text{-GH}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ) (\*sıcaklıklar kendi içlerinde, \*sıcaklıklar birbirleriyle, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

İklim değişikliğine bağlı olarak küresel sıcaklıktaki artış en büyük endişe kaynağıdır ve birçok tarımsal ürün üzerinde zararlı etkileri olduğu bilinmektedir. Sıcaklığa duyarlı bir bitki olan nohut hem vejetatif hem de generatif dönemlerinde sıcaklık stresinden büyük ölçüde etkilenmektedir (Yadav vd., 2018). Nohut serim iklim baklagilidir ve özellikle generatif dönemde sıcaklık stresine maruz kaldığında önemli verim kayıpları yaşanmaktadır. Nohut için 35°C'lik bir sıcaklık bitki gelişimi ve verimi için oldukça kritik bir sıcaklıktır (Gaur vd., 2014). Bu nedenle bu çalışmada yüksek sıcaklık stresi uygulaması için 35°C seçilmiştir. Bu çalışmada yüksek sıcaklık stresi uygulanan örneklerde fide canlılık indeksi, stoma yoğunluğu ve boyutları, kök-gövde uzunluk ve yaş-kuru ağırlıkları, toplam protein miktarı, GS aktivitesi kontrol sıcaklığı olan 25°C'ye göre azalmıştır. Klorofil a, b ve toplam klorofil miktarı, SOD, CAT, APX ve NR aktivitesi ise artmıştır. Literatürde nohut ve diğer bitki çeşitleri ile ilgili yüksek sıcaklık stresini konu alan çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin bu çalışmadan farklı olarak nohutla yapılan bir çalışmada bitkilere 35, 40, 45°C olmak üzere üç farklı sıcaklık stresi uygulanmıştır. Sıcaklık stresinin kök-gövde uzunluğunu ve toplam klorofil içeriğini azalttığı bildirilmiştir. 35 ve 40°C'de SOD ve APX aktivitesinin arttığı, 45°C'de ise azaldığı belirlenmiştir. CAT aktivitesinin ise tüm sıcaklıklarda kontrole göre arttığı tespit edilmiştir (Kaushal vd., 2011). Kaushal ve arkadaşlarının (2013) yapmış olduğu çalışmada bu çalışmadan farklı olarak yüksek sıcaklık stresi (39°C) uygulanan nohut bitkisinde klorofil miktarının azaldığı bildirilmiştir (Kaushal vd., 2013). Yapılan bir diğer çalışmada 35, 38, 40 ve 42°C'de yetiştirilen iki çeşit nohut bitkisinin sıcaklık artışına bağlı olarak biyokütle ve toplam klorofil miktarının azaldığı; SOD, CAT ve APX aktivitelerinin ise arttığı belirtilmiştir (Bhandari vd., 2020). Awasthi ve arkadaşlarının (2017) yapmış oldukları çalışmada nohut bitkileri 37°C'de yetiştirilmiş ve sıcaklık stresi uygulanmıştır. Sıcaklık stresinin bitkilerin biyokütlesini ve toplam klorofil miktarını kontrol grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir. SOD, CAT ve APX aktivitesinin ise sıcaklık stresi ile birlikte arttığı bildirilmiştir (Awasthi vd., 2017). Fasulye ile yapılan bir çalışmada 37°C'de yetiştirilen yüksek sıcaklığa duyarlı genotiplerde klorofil a, b ve toplam klorofil miktarında önemli bir azalma olduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmada dirençli genotiplerde duyarlı genotiplere göre SOD, CAT ve APX aktivitelerinin arttığı tespit edilmiştir (Kabay ve Şensoy, 2017). Üç çeşit pirinç ve

iki çeşit mısır ile yapılan bir çalışmada, bitkilere 35, 40, 45°C’de sıcaklık stresi uygulanmıştır. Sıcaklık stresi uygulanan tüm pirinç ve mısır çeşitlerinin her üç sıcaklıkta da kök-gövde uzunluğu ile toplam klorofil miktarının azaldığı belirtilmiştir. Sıcaklık stresiyle birlikte SOD, CAT ve APX aktivitesinin hem tüm pirinç hem de tüm mısır çeşitlerinde kontrole göre arttığı bildirilmiştir (Kumar vd., 2012).

Işık, CO<sub>2</sub> konsantrasyonu, ortam sıcaklığı ve bağıl nem gibi çevresel faktörler küresel iklim değişikliğinin bitki gelişimi üzerindeki etkisini anlamada önemli bir rol oynar. Stoma gelişimi, yoğunluğu ve boyutları hem kısa hem de uzun vadede çevresel koşullardan önemli ölçüde etkilenir. Değişen koşullar altında fotosentez ve su kullanım verimliliği arasında yeni bir dengenin bulunması gerektiğinden, mevcut iklim değişikliği stoma tepkilerini etkilemektedir (Costa vd., 2021; Driesen vd., 2020). Çalışmamızda 15°C’de 5 mM tiyoüre uygulamasında alt epidermadaki stoma sayısının arttığı, 35°C’de 10 mM tiyoüre uygulamasında ise stoma sayısının kontrol grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir. 35°C’de her iki tiyoüre uygulamasında stoma en ve boy uzunluğunun hem alt hem de üst epidermada kontrole göre azaldığı; 15°C’de ise sadece 5 mM tiyoüre uygulamasında önemli bir artışın olduğu belirlenmiştir. Stoma ile ilgili parametrelere ait literatürdeki çalışmalar bulgularımızla paralellik göstermektedir. İki farklı buğday çeşidi ile (Gladius ve Paragon) yapılan bir çalışmada 36/32°C gündüz/gece sıcaklığı uygulanmıştır. Gladius çeşidinde sıcaklık stresi uygulanan örneklerin üst epidermasındaki stoma yoğunluğunun kontrol grubuna göre fazla olduğu, Paragon çeşidinde ise önemli bir farklılığın olmadığı belirtilmiştir. Stoma en ve boy uzunluğu ile stoma alanının çeşitler arasında farklılık göstermediği ifade edilmiştir (Mendanha vd., 2018). *Calendula officinalis* L.’nin Candyman, Zen, Indian Prince ve Pacific Beauty olmak üzere 4 çeşidine 21 gün boyunca ortalama 35-42°C sıcaklık stresi uygulanmıştır. Stoma yoğunluğunun en fazla olduğu Indian Prince çeşidinin sıcaklık stresine en dayanıklı çeşit olduğu belirtilmiştir (Nazdar vd., 2019).

Çalışmanın temel konusu olan küresel ısınma, yüksek sıcaklıklara olduğu kadar ani gelişen düşük sıcaklıklara da sebep olmaktadır. Düşük sıcaklıklar tıpkı yüksek sıcaklıklarda olduğu gibi bitkilerin morfolojisinde ve veriminde değişikliklere sebep olmaktadır. Bazı bitkiler özellikle çimlenme ve erken fide gelişiminde soğuğa son derece duyarlı olmaktadır. Soğuk stresi çimlenmeyi önemli derecede bozmakta ve fide

canlılığını azaltmaktadır. Düşük sıcaklık stresi aynı zamanda kök-gövde uzunluğunu ve biyokütlesini düzenleyerek büyümeyi kısıtlamaktadır (Aslantaş vd., 2010; Croser vd., 2003; Hussain vd., 2018). Bu çalışmada 15°C’de yetiştirilen örneklerin fide canlılık indeksi, stoma sayısı, gövde uzunluğu, gövde yaş-kuru ağırlığı, SOD, APX NR, GS aktivitelerinin azaldığı; kök uzunluğu, klorofil a, b, toplam klorofil miktarları ile toplam protein miktarının arttığı tespit edilmiştir. Literatürde birçok bitki türünün materyal olarak kullanıldığı gerek benzerlik gerekse farklılık gösteren düşük sıcaklık stresi ile ilgili çalışmalara rastlanmıştır. Nohutla yapılan bir çalışmada bitki örneklerine 12°C soğuk stresi uygulanmıştır. Düşük sıcaklığın kök ve gövde uzunluğu, toplam kuru ağırlık ve toplam proteinin azalttığı tespit edilmiştir (Kaur vd., 2008). Turan ve Ekmekçi (2011)’nin yapmış oldukları çalışmada Gökçe ve Canitez-87 olmak üzere iki çeşit nohut bitkileri önce 25°C’de yetiştirilmiştir. Bu bitki örneklerinin bir kısmı 10°C’de yetiştirilerek soğuğa alıştırılmış, bir kısmı ise 25°C’de yetiştirilmeye devam etmiştir. Sonra her iki deney grubunda bulunan örnekler iki gruba ayrılarak bir grup örnek 2°C’de diğer grup ise 4°C’de yetiştirilmiştir. Soğuğa alıştırılan deney grubunun her iki çeşidinde de gövde uzunluğunun, yaş ve kuru ağırlığının, toplam klorofil içeriği ve APX aktivitesinin azaldığı; SOD aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir (Turan ve Ekmekçi, 2011). AKN-87 ve AKN-290 olmak üzere iki çeşit nohut kullanılan bir başka çalışmada ise bitki örneklerine önce 10°C uygulanmış ve bu bitkiler iki deney grubuna ayrılmıştır. Deney gruplarından birine 2°C, diğerine ise 4°C soğuk stresi uygulanmıştır. Tüm deney gruplarında gövde uzunluğu, gövde yaş ve kuru ağırlığı, toplam klorofil içeriği ve APX aktivitesinin azaldığı; SOD aktivitesinin ise arttığı belirlenmiştir (Turan ve Ekmekçi, 2014). Arslan ve arkadaşlarının (2018) üç farklı nohut çeşidi ile (İnci, Işık-05, Sarı-98) yaptıkları çalışmada bitki örneklerini -3 ve -5°C’de 2 saat süre ile tutularak soğuk stresi uygulamışlardır. Tüm çeşitlerde klorofil a, b ve toplam klorofil miktarlarının azaldığı; SOD ve APX aktivitesinin ise arttığı, CAT aktivitesinin ise azaldığı görülmüştür (Arslan vd., 2018). Karami-Moalem ve arkadaşlarının (2018) dirençli ve duyarlı olmak üzere iki farklı nohut çeşidi ile yaptıkları çalışmada fideler 6 gün boyunca 4°C de tutulmuştur. Dirençli çeşitte stres uygulandığı süre boyunca SOD aktivitesinin arttığı, duyarlı çeşitte ise önce arttığı sonra azaldığı rapor edilmiştir. CAT aktivitesinin her iki çeşitte kontrol grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir. APX aktivitesinin ise her iki türde 3. güne kadar azaldığı, 3. günden 6. güne kadar arttığı

belirlenmiştir (Karami-Moalem vd., 2018). Nohutla ilgili bir diğer soğuk stresi çalışmasında bitki örnekleri 10°C’de 5 gün süre ile tutulmuş ve sonrasında -10°C’de yetiştirilerek soğuk stresi uygulanmıştır. Sonuçta toplam protein miktarının arttığı, SOD ve CAT aktivitesinin azaldığı belirtilmiştir (Kazemi-Shahandashti vd., 2014). Nazari ve arkadaşlarının (2012) nohutla yaptıkları çalışmada dirençli ve duyarlı iki çeşide ait bitki örneklerini 25°C’de üç hafta boyunca yetiştirmişlerdir. Bu aşamadan sonra bir deney grubunun sıcaklığı önce 0°C’den aşamalı olarak -10°C ye düşürülmüştür. Diğer deney grubu ise 25°C’nin devamında 10°C’de yetiştirilmiştir. Her iki deney grubunda hem direnç hem de duyarlı nohut çeşidinde CAT ve APX aktivitesinin kontrol grubuna göre arttığı belirtilmiştir (Nazari vd., 2012). Yousefi ve arkadaşlarının (2018) 25°C’de 3 hafta boyunca yetiştirdikleri 12 farklı nohut çeşidi 12 saat 5°C’de soğuğa alıştırmış daha sonra iki gruba ayrılmıştır. Bir grup 24 diğer grup ise 48 saat 0°C’de tutulmuştur. CAT ve APX aktivitesinin çoğu genotipte arttığı, SOD aktivitesinde ise herhangi bir değişimin olmadığı rapor edilmiştir (Yousefi vd., 2018).

Stres azaltıcı bazı kimyasal maddelerin bitkiye verilmesi ile bitkiye stres toleransı kazandırılabilir. Stres azaltıcı bileşikler arasında bulunan tiyoüre; oksidatif stres yanıtı olan “tiyol” ile abiyotik stres koşullarında azot gereksinimini kısmen karşılayan “imino” olmak üzere iki fonksiyonel gruba sahip önemli bir moleküldür. Suda çözünmesi ve canlı dokularda kolayca emilmesi nedeni ile abiyotik streslere karşı tolerans sağlamaktadır (Akladios, 2014; Wahid, 2007). Bu nedenle çalışmamızda da sıcaklık stresinin bitkiler üzerindeki etkilerini hafifletmede ya da ortadan kaldırmada tiyoürenin rolü araştırılmış; sıcaklık stresi ve azot takviyesinin nohut bitkisindeki kombine etkileri ortaya konmuştur. Çalışmamızda 5 mM tiyoüre uygulamasının 15 ve 35 C’de fide canlılık indeksini artırdığı 10 mM’da azalttığı tespit edilmiştir. Stoma yoğunluğu ve boyutlarının 35C’de 10 mM tiyoüre uygulamasında azaldığı belirlenmiştir. Benzer şekilde düşük ve yüksek sıcaklıkta her iki tiyoüre uygulamasında da kök ve gövde uzunluğunun azaldığı görülmüştür. 15°C’de 5 mM tiyoüre uygulamasında kök-gövde yaş ağırlığının arttığı 10 mM’da ve 35°C’nin tüm tiyoüre uygulamalarında kök-gövde yaş ağırlığının azaldığı belirlenmiştir. 35°C’de her iki tiyoüre uygulamasında klorofil miktarlarının arttığı tespit edilmiştir. Toplam protein miktarı düşük ve yüksek sıcaklıktaki her iki tiyoüre uygulamasında artan konsantrasyona bağlı olarak azalmıştır. Hem düşük hem de yüksek sıcaklıkta tiyoüre

uygulamasının SOD aktivitesini azalttığı; CAT ve APX aktivitesini ise artırdığı görülmüştür. 35°C’de her iki tiyoüre uygulamasında NR ve GS aktivitelerinin arttığı belirlenmiştir. 15°C’de ise NR aktivitesi her iki tiyoüre konsantrasyonunda azalırken, GS aktivitesinin 5 mM’da arttığı, 10 mM’da ise azaldığı tespit edilmiştir. Literatürde sadece tiyoüre uygulamasının bitkiler üzerindeki etkilerini ortaya koyan ve çalışmamızın sonuçlarını destekleyen çalışmalar mevcuttur. Choudhary ve arkadaşlarının (2020) nohut ile yaptıkları çalışmada bitki örneklerinin sulama suyuna (500 ppm) ve sprej ile püskürtme yoluyla (1000 ppm) iki farklı şekilde tiyoüre uygulanmıştır. Her iki uygulamada da bitki toplam ağırlığının ve bitki uzunluğunun kontrole göre arttığı bildirilmiştir (Choudhary vd., 2020). Nohut ile yapılan diğer bir çalışmada bitkilere 20 ve 100 kg ha<sup>-1</sup> olmak üzere iki farklı azot uygulaması yapılmıştır. Örneklerin kök ve gövde kuru ağırlığının her iki azot uygulamasında da kontrole göre azaldığı belirtilmiştir (Kurdali, 1996). Kahve ile yapılan bir çalışmada ise üç farklı N uygulaması (0, 150, 300 kg ha<sup>-1</sup>) kullanılmış ve meyve gelişiminde NR ve GS aktivitesinin, toplam proteinin azaldığı bildirilmiştir (Reis vd., 2009).

Abiyotik streslerden bazıları bitki kök uçlarında kolşisin etkisine benzer bir etki göstererek mitoz bölünme sırasında sitotoksik etkiler yaratmaktadır. Bu etkilerin ortaya konmasında yapılacak en temel çalışma mitotik indeks ve kromozom anormalliklerinin belirlenmesidir. Çalışmamızda sıcaklık stresi ile birlikte tiyoüre uygulamasının nohut örneklerine ait kök ucu mitotik indeks oranları araştırılmış, 15°C ve 35°C’de 5 ve 10 mM tiyoüre uygulamasının mitotik indeksi azalttığı tespit edilmiştir. 25°C’de 5 mM tiyoüre uygulamasında mitotik indeksi artırdığı, 10 mM’da ise azalttığı görülmüştür. Literatürde çalışmamızı destekler nitelikte yüksek konsantrasyonda azot takviyesinin mitotik indeksi olumsuz yönde etkilediğine dair çalışmalar mevcuttur. Buğdayla yapılan bir çalışmada bitki örneklerine 3,3 ve 6,6 mM azot takviyesi uygulanmış, mitotik indeks ve kök uzama miktarı kontrol edilmiştir. 3,3 mM azot uygulamasında diğer azot takviyesine göre mitotik indeks ve kök uzamasının %25 daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Williams, 1968). *Vicia hybrida* L.’ de yapılan bir çalışmada bitki örneklerine 1, 10, 50, 100, 250, 500 ve 1000 µM konsantrasyonlarında amonyum sülfat ve potasyum sülfat takviyesi yapılmıştır. Her iki bileşiğin 50 µM’si mitotik indekste önemli bir artışa yol açmıştır. Kontrol grubuna göre çimlenen tohumların kök uçlarındaki mitotik indeks, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile çimlenen tohumlarda 1 µM’de

0,15; 10  $\mu$ M'de 0,20 ve 50  $\mu$ M'de 0,25 olarak belirlenmiştir.  $K_2SO_4$  uygulanan tohumların mitotik indeksi kontrolde 0,16; 1  $\mu$ M'de 0,17; 10  $\mu$ M'de 0,18 ve 50  $\mu$ M'de 0,23 olarak bildirilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda ise mitotik indeksin kademeli düşümlere neden oldu ve çeşitli kromozom anormalliklerinin gözlemlendiği rapor edilmiştir (Tabur ve Oney, 2009). Neves ve arkadaşlarının (2021) yapmış oldukları çalışmada çavdar fidelerine 4 saat boyunca 40°C sıcaklık uygulanmıştır. Bu örneklerde hem interfaz aşamasında hem de mitotik hücrelerde sayı ve mikrotübül oluşumunda anormallikler görüldüğü belirtilmiştir. Ayrıca sıcaklık stresi ortadan kaldırıldığında kök ucu hücrelerinin tekrar normale dönmeye başladığını ve bu tepkilerin köklerdeki sıcaklık stresi ile başa çıkmak için oluşan geçici bir durum olduğunu bildirmişlerdir (Neves vd., 2021).

Literatürde sadece sıcaklık stresi ya da sadece azot takviyesi ile ilgili çalışmalar bulunmakta iken, sıcaklık stresi ve tiyoürenin kombine etkisini konu alan oldukça sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Nohut ile ilgili rastladığımız tek makale olan Laurie ve Stewart (1993) çalışmalarında 40 gün boyunca yüksek sıcaklık stresi uygulanan bitki örneklerinde nitrat takviyesi (1 mol m<sup>-3</sup>) yapmışlardır. Çalışma sonunda bitkinin toplam kuru ağırlığının 15. güne kadar arttığı ancak devamında azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca bitki büyüme oranının çalışmanın başlangıcında en yüksek seviyede olduğu ve giderek azaldığı, çalışma sonunda örneklerin en düşük bitki büyüme oranına sahip olduğu belirlenmiştir. Gövde ve yapraklardaki yaş-kuru ağırlık oranının azaldığı, kökte ise arttığı tespit edilmiştir. Yüksek sıcaklıkta azot takviyesi ile yapraklarda NR aktivitesinin arttığı belirtilmiştir (Laurie ve Stewart, 1993). Buğdayla yapılan bir çalışmada tohumlara 6 mmol tiyoüre ile ön uygulama yapılmıştır. Sonrasında bitkilere kontrol, 50, 100 ve 150 mmol/L NaCl uygulamış ve tiyoürenin tuz stresi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Sonuçta tiyoürenin 100 ve 150 mmol NaCl tuz uygulamasında bitki örneklerinin gövde uzunluğu, yaprak alanı, gövde yaş-kuru ağırlığını, SOD, CAT ve APX aktivitesini artırdığı belirtilmiştir (Baqer vd., 2020). Khanna ve arkadaşları (2017) yaptıkları çalışmada tiyoüre ve sıcaklık stresinin kombine etkisi araştırmışlardır ve materyal olarak mısır kullanmışlardır. Örnekleri 40°C'de yetiştirmişler ve 2-20 mM tiyoüre uygulamışlardır. Yüksek sıcaklık stresi altındaki örneklerde tiyoüre uygulamasının kök ve gövde uzunluğu, kök ve gövde kuru ağırlığı, kök ve gövde CAT ve SOD aktivitesini artırdığı; kök ve gövde APX aktivitesinin ise azaldığı tespit

edilmiştir (Khanna vd., 2017). İki farklı mısır çeşidi (DK 5783 ve APEX 836) ile yapılan bir başka çalışmada bitki örneklerine 100 mM NaCl uygulanarak tuz stresi tabi tutulmuştur. Stres oluşturulmuş örneklere 400 ve 500 mg/L olmak üzere iki farklı konsantrasyonda tiyoüre uygulanmıştır. Her iki çeşitte de iki konsantrasyondaki tiyoüre uygulamasının bitki örneklerinin yaş ağırlık ve klorofil miktarını azalttığı tespit edilmiştir (Kaya vd., 2015). İki farklı maş fasulyesi çeşidi (NM 2006 ve NM 2011) ile yapılan bir çalışmada bitkiler 4 hafta süre ile 75 mM NaCl'de tutulmuş ve tuz stresi uygulanmıştır. Daha sonra bitki örneklerine 0, 10, 20 mM tiyoüre ile muamele edilmiştir. Tuz stresine maruz kalan ve tiyoüre uygulanan her iki çeşitte de kök ve gövde uzunluğu, kök ve gövde yaş-kuru ağırlıkları, klorofil a, b ve toplam klorofil, toplam protein ve CAT aktivitesinin pozitif kontrole göre (sadece NaCl uygulanmış örnekler) artış gösterdiği belirlenmiştir (Perveen vd., 2016). Kuraklık stresi altındaki buğday ile yapılan bir çalışmada bitki örneklerine 2,5 ve 5 mM tiyoüre uygulanmıştır. Kuraklık stresine sahip olan bitki grubu ile stres olmayan bitki grubuna ait örneklerin her ikisinde de tüm tiyoüre uygulamaları SOD ve CAT aktivitesini artırırken APX aktivitesini azaltmıştır (Hassanein vd., 2015). Akladious (2014)'un ayçiçeği ile yaptığı çalışmada 25°C sıcaklıkta bitki tohumlarına 10 ve 20 mM tiyoüre emdirilmiş ve 14 gün boyunca çimlendirilmeye bırakılmıştır. 14 günün sonunda bitkiler üç gruba ayrılmış, 1. grup 35°C'de, 2. grup 45°C'de kontrol grubu ise 25°C'de yetiştirilmiştir. 35 ve 45°C'deki örneklerde her iki tiyoüre uygulamasında da kök-gövde uzunluk, yaprak alanı ve sayısı, kök-gövde yaş ve kuru ağırlığı, gövde çapı, klorofil a, b ve toplam klorofil miktarı, SOD, CAT ve NR aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir (Akladious, 2014).

Sonuç olarak protein bakımından zengin bir baklagil olan nohutta düşük sıcaklık ve yüksek sıcaklıklarda tiyoüre uygulamasının etkileri karşılaştırıldığında azot takviyesinin düşük sıcaklıkta bitki gelişiminde ve soğuk stresinin tolere edilmesinde daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Özellikle 15°C'de çalışmada düşük tiyoüre uygulaması olan 5 mM'ın gerek ekolojik gerek fizyolojik parametreler göz önüne alındığında bitki gelişimini olumlu etkilediği belirlenmiştir. Böylelikle bir serin iklim tahılı olan nohudun ihtiyaç duyduğu optimum sıcaklıktan daha düşük sıcaklığa sahip alanlarda da düşük konsantrasyonda azot takviyesi ile daha fazla tarımsal üretiminin yapılabileceği düşünülmektedir. Yüksek sıcaklık uygulaması olan 35°C'de 5 ve 10 mM

tiyoüre uygulamasının her ikisinin de bitkinin sıcaklık stresini tolere etmesinde herhangi bir etkisinin olmadığı ortaya konmuştur. Yüksek sıcaklık stresinin tolere edilmesinde azot takviyesinin etkilerini ortaya koyabilmek için yapılacak başka bir çalışmada Fabacea familyasına ait farklı bitki türleri ve farklı azot kaynakları kullanılabilir.

## 5. KAYNAKLAR

- Ahmad, P., Wani, M.R., Azooz, M.M., & Tran, L. 2014. "Improvement of Crops in the Era of Climatic Changes". Springer New York.
- Ahmad, P., Prasad, M. N. V. 2012. "Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change". Springer New York.
- Akladios, S. A. 2014. "Influence of thiourea application on some physiological and molecular criteria of sunflower (*Helianthus annuus L.*) plants under conditions of heat stress". *Protoplasma*, 251(3), 625–638.
- Aktaş, M. 1995. "Bitki Besleme ve Toprak Verimliliği". Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü, Yayın no:142, Ders Kitabı:43, 345 s.
- Arnon, D. L. 1949. "Copper Enzymes In Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase In *Beta Vulgaris*". *Plant Physiology*, 24(1), 549–557.
- Arslan, Eyidoğan, F., Ekmekçi, Y. 2018. "Freezing tolerance of chickpea: biochemical and molecular changes at vegetative stage". *Biologia Plantarum*, 62(1), 140–148.
- Aslantaş, R., Karakurt, H., Karakurt, Y. 2010. "Bitkilerin Düşük Sıcaklıklara Dayanımında Hücresel ve Moleküler Mekanizmalar". Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 41(2), 157–167.
- Awasthi, R., Gaur, P., Turner, N. C., Vadez, V., Siddique, K. H. M., Nayyar, H. 2017. "Effects of individual and combined heat and drought stress during seed filling on the oxidative metabolism and yield of chickpea (*Cicer arietinum*) genotypes differing in heat and drought tolerance". *Crop and Pasture Science*, 68(9), 823–841.
- Baqer, R. A., Al-Kaaby, H. K., Adul-Qadir, L. H. 2020. "Antioxidant responses in wheat plants (*triticum aestivum L.*) treated with Thiourea". *Plant Archives*, 20(January), 717–722.
- Beyer, W. F. and Fridovich, I. 1987. "Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions", *Anal Biochem.*, 161 (2): 559-566.
- Bhandari, K., Sita, K., Sehgal, A., Bhardwaj, A., Gaur, P., Kumar, S., Nayyar, H. 2020. "Differential heat sensitivity of two cool-season legumes, chickpea and lentil, at the reproductive stage, is associated with responses in pollen function, photosynthetic ability and oxidative damage". *Journal of Agronomy and Crop Science*, 206(6), 734–758.

- Bohnert, H. J., Gong, Q., Li, P., Ma, S. 2006. "Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms - Getting genomics going". *Curr Opin Plant Biol.* 9: 180–188.
- Bradford, M. M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- Burke, J. J., Oliver, M. J. 1992. "Differential temperature sensitivity of pea superoxide dismutases", *Plant Physiol.*, 100: 1595–1598.
- Cervilla, L. M., Blasco, B., Ríos, J. J., Rosales, M. A., Rubio-Wilhelmi, M. M., Sánchez-Rodríguez, E., ... Ruiz, J. M. 2009. "Response of nitrogen metabolism to boron toxicity in tomato plants.". *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, 11(5), 671–677.
- Cervilla, Luis M., Blasco, B., Ríos, J. J., Romero, L., Ruiz, J. M. 2007. "Oxidative stress and antioxidants in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants subjected to boron toxicity". *Annals of Botany*, 100(4), 747–756.
- Choudhary, R. N., Suthar, K. J., Patel, N. J. 2020. "Effect of Seed Priming and Foliar Spray of Bio-regulators on Yield and Yield Attributes of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) under Conserved Moisture Condition". *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9(11), 2051–2057.
- Clarkson, D. T., Warner, A. J. 2008. "Relationships between Root Temperature and the Transport of Ammonium and Nitrate Ions by Italian and Perennial Ryegrass (*Lolium multiflorum* and *Lolium perenne*)". *Plant Physiol.* 64: 557–561.
- Costa, M. V. J. Da, Ramegowda, Y., Ramegowda, V., Karaba, N. N., Sreeman, S. M., Udayakumar, M. 2021. "Combined Drought and Heat Stress in Rice: Responses, Phenotyping and Strategies to Improve Tolerance". *Rice Science*, 28(3), 233–242.
- Croser, J. S., Clarke, H. J., Siddique, K. H. M., Khan, T. N. 2003. "Low-temperature stress: Implications for chickpea (*Cicer arietinum* L.) improvement". *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(2), 185–219.
- Devasirvatham, V., Tan, D. K. Y., Gaur, P. M., Trethowan, R. M. 2015. "Chickpea and temperature stress: An overview". *Legum under Environ Stress Yield, Improv Adapt.* 81–90.
- Driesen, E., Van den Ende, W., De Proft, M., Saeys, W. 2020. "Influence of environmental factors light, co2, temperature, and relative humidity on stomatal opening and development: A review". *Agronomy*, 10(12).
- Frunghillo L., Skelly M.J., Loake G.J., Spoel S.H., Salgado I. 2014. "Snitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway". *Nat Communication.* 5:5401.
- Gaur, Pooran, M., Jukanti, A. K., Samineni, S., Chaturvedi, S. K., Basu, P. S., Babbar, A., Gowda, L. 2014. "Climate Change and Heat Stress Tolerance in Chickpea". *Içinde Climate Change and Plant Abiotic Stress Tolerance*, (ss. 839–855).

- Hassanein, R. A., Amin, A. B. A. E. S., Rashad, E. S. M., Ali, H. 2015. "Effect of thiourea and salicylic acid on antioxidant defense of wheat plants under drought stress". *International Journal of ChemTech Research*, 7(1), 346–354.
- Hussain, H. A., Hussain, S., Khaliq, A., Ashraf, U., Anjum, S. A., Men, S., Wang, L. 2018. "Chilling and drought stresses in crop plants: Implications, cross talk, and potential management opportunities". *Frontiers in Plant Science*, 9(April), 1–21.
- Jukanti, A. K., Gaur, P. M., Gowda, C. L. L. , Chibbar, R. N. 2012. "Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): A review". *Br J Nutr*.108.
- Kabay, T., Şensoy, S. 2017. "Yüksek Sıcaklığın Fasulyede Enzim, Klorofil ve İyon Değişimine Etkisi". *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, (December 2017), 429–437.
- Kaiser, J. J., Lewis, O. A. M. 1984. "Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in leaves and roots of nitrate-fed *Helianthus annuus* L." *Plant Soil*. 1984;77: 127–130.
- Karami-Moalem, S., Maali-Amiri, R., Kazemi-Shahandashti, S. S. 2018. "Effect of cold stress on oxidative damage and mitochondrial respiratory properties in chickpea". *Plant Physiology and Biochemistry*, 122(September 2017), 31–39.
- Kaur, G., Kumar, S., Nayyar, H., Upadhyaya, H. D. 2008. "cold stress injury during the pod-filling phase in chickpea (*Cicer arietinum* L.): Effects on quantitative and qualitative components of seeds". *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194(6), 457–464.
- Kaushal, N., Awasthi, R., Gupta, K., Gaur, P., Siddique, K. H. M., Nayyar, H. 2013. "Heat-stress-induced reproductive failures in chickpea (*Cicer arietinum*) are associated with impaired sucrose metabolism in leaves and anthers". *Functional Plant Biology*, 40(12), 1334–1349.
- Kaushal, N., Gupta, K., Bhandhari, K., Kumar, S., Thakur, P., Nayyar, H. 2011. "Proline induces heat tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) plants by protecting vital enzymes of carbon and antioxidative metabolism". *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 17(3), 203–213.
- Kaya, C., Sönmez, O., Ashraf, M., Polat, T., Tuna, L., Aydemir, S. 2015. "Exogenous application of nitric oxide and thiourea regulates on growth and some key physiological processes in maize (*Zea mays* L.) plants under saline stress.". *Toprak SDergisi*, 0(0), 61–66.
- Kazemi-Shahandashti, S. S., Maali-Amiri, R., Zeinali, H., Khazaei, M., Talei, A., Ramezanzpour, S. S. 2014. "Effect of short-term cold stress on oxidative damage and transcript accumulation of defense-related genes in chickpea seedlings". *Journal of Plant Physiology*, 171(13), 1106–1116.
- Khanna, P., Kaur, K., Gupta, A. K. 2017. "Root Biomass Partitioning, Differential Antioxidant System and Thiourea Spray are Responsible for Heat Tolerance in Spring Maize". *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B -*

- Biological Sciences, 87(2), 351–359.
- Kumar, S., Gupta, D., Nayyar, H. 2012. "Comparative response of maize and rice genotypes to heat stress: Status of oxidative stress and antioxidants". *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(1), 75–86.
- Kumar, S., Cold, Y. 2010. "Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review ". *Agron Sustain Dev.* 30: 515–527.
- Kurdali, F. 1996. "Nitrogen and phosphorus assimilation, mobilization and partitioning in rainfed chickpea (*Cicer arietinum* L.)". *Field Crops Research*, 47(2–3), 81–92.
- Laurie, S., Stewart, G. R. 1993. "Effects of nitrogen supply and high temperature on the growth and physiology of the chickpea". *Plant, Cell & Environment*, 16(6), 609–621.
- Marschner, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants*. 2nd Print, Academic Press. London.
- Mendanha, T., Rosenqvist, E., Hyldgaard, B., Ottosen, C. O. 2018. "Heat priming effects on anthesis heat stress in wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) with contrasting tolerance to heat stress". *Plant Physiology and Biochemistry*, 132, 213–221.
- Mengel, K., Viro, M. and Hehl, G. 1976. "Effect of Potassium on Uptake and Incorporation of Ammonium-nitrogen of Rice Plants". *Plant and Soil*. 44:547-558.
- Nasr Esfahani, M., Sulieman, S., Schulze, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Tran, L. S. 2014. "Approaches for enhancement of N<sub>2</sub> fixation efficiency of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under limiting nitrogen conditions". *Plant Biotechnology Journal*, 12(3), 387–397.
- Nazari, M., Maali Amiri, M., Mehraban, F. H., Khaneghah, H. Z. 2012. "Change in antioxidant responses against oxidative damage in black chickpea following cold acclimation". *Russian Journal of Plant Physiology*, 59(2), 183–189.
- Nazdar, T., Tehranifar, A., Nezami, A., Nemati, H., Samiei, L. 2019. "Physiological and anatomical responses of calendula (*Calendula officinalis* L.) cultivars to heat-stress duration". *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 94(3), 400–411.
- Neves V., Viegas W., Caperta A. D. 2021. "Effects of high temperature on mitotic index, microtubule and chromatin organization in rye (*Secela cereale* L.) root-tip cells". *Caryologia*. 73 (4). 55-63.
- Perveen, S., Farooq, R., Shahbaz, M. 2016. "Thiourea-induced metabolic changes in two mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] (Fabaceae) varieties under salt stress". *Revista Brasileira de Botanica*, 39(1), 41–54.
- Rawsthorne, S., Hadley, P., Roberts, E. H., Summerfield, R. J. 1985. "Effects of supplemental nitrate and thermal regime on the nitrogen nutrition of chickpea (*Cicer arietinum* L.) - I. Growth and development". *Plant Soil*. 1985;83: 265–277.

- Reis, A. R., Favarin, J. L., Gallo, L. A., Malavolta, E., Moraes, M. F., Junior, J. L. 2009. "NITRATE REDUCTASE AND GLUTAMINE SYNTHETASE ACTIVITY IN COFFEE LEAVES DURING FRUIT DEVELOPMENT". *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 33(6), 315–324.
- Sairam, R. K., Srivastava, G. C., Saxena, D. C. 2000. "Increased antioxidant activity under elevated temperatures: A mechanism of heat stress tolerance in wheat genotypes". *Biologia Plantarum*.
- Senthil-Kumar M. 2017. "Plant tolerance to individual and concurrent stresses". *Plant Toler to Individ Concurr Stress*. 1–178.
- Tabur, S., Oney, S. 2009. "Effect of Artificial Fertilizers on Mitotic Index and Chromosome Behaviour in *Vicia Hybrida L.*". *J. Agric. Res*, 47(1), 1–9.
- Tepe, M., Aydemir, T. 2011. "Antioxidant responses of lentil and barley plants to boron toxicity under different nitrogen sources". *African Journal of Biotechnology*, 10(53), 10882–10891.
- Turan, Ö., Ekmekçi, Y. 2011. "Activities of photosystem II and antioxidant enzymes in chickpea (*Cicer arietinum L.*) cultivars exposed to chilling temperatures". *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(1), 67–78.
- Turan, Ö., Ekmekçi, Y. 2014. "Chilling tolerance of cicer arietinum lines evaluated by photosystem ii and antioxidant activities". *Turkish Journal of Botany*, 38(3), 499–510.
- Vinocur, B, Altman, A. 2005. "Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: Achievements and limitations". *Curr Opin Biotechnol*. 16: 123–132.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M. R. 2007. "Heat tolerance in plants: An overview". *Environ Exp Bot*. 61: 199–223.
- Wahid, A. 2007. "Physiological implications of metabolite biosynthesis for net assimilation and heat-stress tolerance of sugarcane (*Saccharum officinarum*) sprouts". *Journal of Plant Research*, 120(2), 219–228.
- Williams, W. M. 1968. "Effects of two levels of nitrate on cell-division rates in roots of wheat seedlings". *New Zealand Journal of Botany*, 6(1), 25–32.
- Yadav, S. K., Tiwari, Y. K., Singh, V., Patil, A. A., Shanker, A. K., Jyothi Lakshmi, N., Maheswari, M. 2018. "Physiological and Biochemical Basis of Extended and Sudden Heat Stress Tolerance in Maize". *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 88(1), 249–263.
- Yousefi, V., Ahmadi, J., Sadeghzadeh-Ahari, D., Esfandiari, E. 2018. "Influence of long-term cold stress on enzymatic antioxidative defense system in chickpea (*Cicer arietinum L.*)". *Acta Agrobotanica*, 71(3), 1–11.
- Yıldız, M., & Terzi, H. 2007. "Bitkilerin Yüksek Sıcaklık Stresine Toleransının Hücre Canlılığı Ve Fotosentetik Pigmentasyon Testleri İle Belirlenmesi". *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 23(1), 47-60.

