

## Determination of Protective Role of Bone Powder Solution in bean seedlings exposed to NaCl toxicity

Mucip GENİŞEL<sup>\*1</sup>, Rahmi DURLUPINAR<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü TR-04100 AĞRI

<sup>2</sup>Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü TR-25240 ERZURUM

### ABSTRACT

Bone powder contains calcium and a lot of inorganic elements having an important role in plant growth. In this study, it was aimed to elucidate the effect of bone powder solution application on morphological and biochemical parameters of bean under salt stress. Plants were grown during 24 day at 20/25°C. Bone powder solution was applied to growth medium of 14-day seedlings. Afterward, 24-day plants were harvested in order to determine the growing parameters. Salinity decreased the lengths of root and stem. However, bone powder solution markedly increased the root-stem lengths, contents of protein and photosynthetic pigment. In addition to these, bone powder solutions application reduced levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and lipid peroxidation seriously increased by salt stress. In conclusion, it is said that, bone powder solution may be used to increase the growth and fertility of plants against salt stress. This study will be the first investigation in use of the organic calcium source against salt stress.

**Key Words:** Bean, salt stress, bone powder, lipid peroxidation

**Abbreviation:** (KT) Bone powder solution

### NaCl Toksitesine Maruz Kalan Fasulye Fidelerinde Kemik Tozu Solüsyonunun Koruyucu Rolünün Belirlenmesi

### ÖZET

Kemik tozu kalsiyum ve bitki gelişiminde önemli rolleri olan bir çok inorganik elementi içerir. Bu çalışmada, tuz stresi altındaki fasulyenin morfolojik ve biyokimyasal parametreleri üzerine kemik tozu solüsyonu uygulamasının etkisini aydınlatmak amaçlanmıştır. Bitkiler 24 gün boyunca 20/25°C'de yetiştirildi. 14 günlük fidelerin yetiştirme ortamlarına üç farklı konsantrasyonda (%1, %1,5 ve %2) kemik tozu solüsyonu uygulaması yapıldı. Daha sonra 24 günlük bitkiler büyüme parametrelerinin belirlenmesi için hasat edildi. Tuzluluk, kök ve gövde uzunluğunu indirgedi. Ancak kemik tozu solüsyonu kök ve gövde uzunluklarını, protein ve fotosentetik pigment içeriklerini önemli derecede arttırdı. Bunlara ilave olarak kemik tozu solüsyonu uygulaması tuz stresinin ciddi derecede artırdığı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve lipid peroksidasyon düzeyini indirgedi. Sonuç olarak, kemik tozu solüsyonunun tuzluluğa karşı bitki büyümesini ve verimliliğini artırmak için kullanılabileceği söylenebilir. Bu çalışma tuz stresine karşı organik kalsiyum kaynağının kullanılması açısından ilk araştırma olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Fasulye, tuz stresi, kemik tozu, lipid peroksidasyon

**Kısaltmalar:** (KT)Kemik tozu solüsyonu

\*Corresponding Author/ Yazışmalardan Sorumlu Yazar: Mucip GENİŞEL

Adres: Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 04100

Ağrı. e-mail: m.genisel@hotmail.com

## GİRİŞ

Tuz stresi bitki büyüme ve gelişimini negatif olarak etkileyen çevresel problemlerden biridir. Hem yüksek buharlaşma oranı hem de uygun olmayan sulama uygulamaları gün geçtikçe su ve toprak tuzluluğunu artırmaktadır (Owens, 2001; Amor vd. 2010). Bunun sonucu olarak tuz stresi topraktaki su potansiyelini düşürüp osmotik strese neden olur. Ayrıca  $\text{Na}^+$  gibi tek değerlikli iyonlar hücrede toksite sebebidir. Çünkü bu iyonlar hücrede hapsedilemezler ve diğer mineral besinlerle etkileşime girerek besin eksikliğine ve yetersizliğine sebep olurlar. (Hageman & Erdman, 1997; Hayasti & Murata, 1998). Fotosentez, protein sentezi, lipid ve enerji metabolizması gibi hayati öneme sahip olan metabolik süreçler tuz stresinden olumsuz etkilenirler (Parida & Das, 2005). Bu olaylar neticesinde moleküler bir baskılama gelişebilir ve bitki gelişiminin durmasıyla sonuçlanabilir (McCue & Hanson, 1990). Tuz stresine toleransı artırmak için yapılan bir çok çalışma da bitkilerin yetiştirme ortamına kalsiyum kaynağı eklenmesinin olumlu etki yaptığı bildirilmiştir (Hernandez vd. 2003; Elkahoui vd. 2005; Jalel vd. 2007; Tuna vd. 2007; Yan-Feng vd. 2008). Kalsiyum  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  kanallarını seçiciliğini ve  $\text{K}^+$  alımını artırır.  $\text{Ca}^{+2}$  ve  $\text{Na}^+$  iyonları arasında antagonistik bir etkileşim vardır. Böylece  $\text{Ca}^{+2}$  iyonunun alınımı  $\text{Na}^+$  iyonlarının neden olduğu negatif etkiyi azaltır (Rengel, 1992).

Dünyada, tuz stresinin bitkilerde neden olduğu zararlara karşı kimyasal uygulamaların yanında farklı çözümler gerekmektedir. Bitki gelişimini artırmak için organik atıkların değerlendirildiği bir çok çalışma mevcuttur. Örneğin bitki gelişimini teşvik etmek için balık protein hidrolizatları kullanılmıştır (Andarwulan & Shetty, 1999). Yine koç boynuzu hidrolizatları kullanılarak fasulye bitkisinin gelişimi artırılmıştır (Kurbanoglu vd. 2004). Hayvan mezbahalarından elde edilen sığır kemik tozu ise bitki gelişimi için esansiyel olan kalsiyum, fosfor, potasyum, kükürt gibi bir çok inorganik elementi doğal olarak içerir (Genişel, 2010). Son yıllardaki bir çalışmada kemik tozu kullanılarak buğday bitkisinin gelişimi artırılabilmiştir (Genisel vd. 2012). Yine başka bir çalışmada kemik tozunun bitki gelişiminde ki pozitif etkisinin sentetik kalsiyum kaynaklarından daha etkin olduğu saptanmıştır (Erdal, 2012). Bu çalışmada ise kemik tozu solüsyonu tuz stresine karşı bitki direncini artırmadaki etkisi çalışılmıştır. Bu amaçla tuz stresi altındaki fasulye bitkisinin yetiştirme ortamına kemik tozu solüsyonu ilave edilerek bitkinin morfolojik ve biyokimyasal parametreleri belirlenip sonuçları değerlendirilmiştir.

## MATERYAL ve METOD

### Kemik Tozu Solüsyonunun Hazırlanması

Sığır mezbehasından temin edilen kemikler deiyonize su ile iyice yıkandıktan sonra  $100^{\circ}\text{C}$  deki fırında kurutuldu. Daha sonra kemik parçaları homogenizatör (Wiggen Hauser D- 500) ile toz haline getirildi. Elde edilen kemik tozlarından 10 g alınarak deiyonize su hacim 100 ml olacak şekilde tamamlandı ve iyice karıştırıldı. Kemik tozundaki inorganik elementlerin deiyonize suya geçmesini sağlamak için  $96^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat süre ile inkübe edildi. Filtre edildikten sonra seyreltme yolu ile %1, %1.5 ve % 2 KT solüsyonları elde edildi.

### Bitkilerin yetiştirilmesi ve Kemik Tozu Solüsyonu Uygulamaları

Mevcut araştırmada tuz stresine hassas olduğu bilinen fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisi kullanılmıştır. Tohumlar ekilmeden önce %96'lık alkol ile kısa süreli hızlıca yıkanmış ve %5'lik sodyum hipoklorit içerisinde 5 dk yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Daha sonra

3 kez saf su ile yıkanarak, oda şartlarında saf su içerisinde yaklaşık 5 saat şişmeye bırakılmıştır. Bitkiler araştırma süresince kum kültüründe yetiştirilmiştir. Bitkiler iklim dolabında kontrol şartlarında (25/20°C sıcaklık ve 12/12 saat ışık-karanlık periyodunda 20.000 lüks, %70 nem) 24 gün süreyle büyütülmüştür. Her saksı, kesileceği güne kadar, günlük eşit miktarda saf su ve haftada bir kez de Hoagland besi çözeltisiyle sulanmıştır. On dördüncü günde bitkiler her bir grupta 4 tekrar olacak şekilde 5 gruba ayrılıp aşağıdaki uygulamalar yapılmıştır.

#### 1. Kontrol

2.150 mM NaCl

3.150 mM NaCl + %1 kemik tozu solüsyonu

4.150 mM NaCl + %1.5 kemik tozu solüsyonu

5.150 mM NaCl + %2 kemik tozu solüsyonu

Uygulamalardan 10 gün sonra bitkiler hasat edilerek morfolojik ve biyokimyasal parametrelerindeki değişimler çalışılmıştır.

### **Çözünabilir protein miktarının tayini**

Bitkilerin dokularından 0,5g'lık örnekler kullanılarak Bradford (1976) metoduna göre protein tayini yapıldı. Sonuçlar "mg protein/g taze doku cinsinden hesap edilir. Her bir muameleye ait bitkilerin, küçük parçalara ayrılmış yaprak dokusundan 0.5g alınarak 10 misli hacimdeki 0.05 M fosfat tamponunda (pH:6.5) havanda ezilerek homojenizasyon yapıldı. Homojenat dört katlı tülbentten süzüldü ve süzüntü santrifüj tüplerine alınıp, 15.000 rpm' de 20 dk. boyunca santrifüj edildi. Protein tayini için tüplerin üst kısmındaki sıvı faz (süpernatant) kullanıldı. Protein miktarı 595 nm de spektrofotometrik yolla tayin edildi.

### **Fotosentetik pigment miktarlarının belirlenmesi**

Fidelerin toplam pigment miktarlarını belirlemek için Witham vd. (1971) tarafından verilen prosedür uygulandı. Fasulye bitkisinden alınan primer yaprak örnekleri 1'er g olacak şekilde tartılmış ve parçalanarak üzerine 2 ml %80'lik aseton konarak havanda ezildi. Daha sonra filtre kağıdından süzülerek elde edilen ekstrakt %80'lik aseton ile 10 ml'ye tamamlandı. Elde edilen ekstraktların 645 ve 663 nm absorbans değeri ölçüldü. Bitki ekstraktlarının iki farklı dalga boyunda yapılan absorbans ölçümlerinden elde edilen değerlerin aşağıda verilen eşitlikte yerlerine konmasıyla, bitki yaprak dokusunun 1gramında bulunan toplam klorofil miktarları mg/doku olarak hesaplandı.

$$\text{mg toplam klorofil/g doku} = [20.2 (D645) + 8.02 (D663)] (V/1000.W)$$

Eşitliklerde: D, klorofil ekstraktının belirtilen dalga boylarındaki absorbans değerini; V, %80'lik aseton son hacmini; W, ekstre edilen dokunun gram olarak yaş ağırlığını göstermektedir.

### **LPO miktarının belirlenmesi**

LPO için 0.5 g yaprak alınarak 10 ml % 0.1'lik TCA (trikloro asetik asit) içinde homojenize edildikten sonra homojenat 15.000 rpm' de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpün süpernatant kısmından 1 ml alınarak üzerine 4 ml %0.5'lik TBA çözeltisi ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı kaynar suda 30 dakika inkübe edilmiş ve reaksiyon tüplerin buz banyosuna

alınmasıyla durdurulmuştur. Örnekler 10000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı alınmış ve 532 nm absorbands değeri ve 600 nm deki non-spesifik absorpsiyon için absorbands değeri okunmuştur (Healt & Packer, 1968).

LPO’nun hesaplanması için; 532 nm’de ölçülen absorbands değerinden 600 nm’ de belirlenen değeri çıkarılmış ve 1ml çözeltideki MDA (nmol/ml):  $[(A_{532}-A_{600})/155000] \times 10^6$  formülüyle hesaplanmıştır. Sonuçlar MDA (nmol/gram doku) şeklinde verilmiştir.

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının belirlenmesi

0.5 gram bitki dokusu alınarak 10 ml soğuk aseton içinde homojenize edildikten sonra homojenat 3.000 x g’de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra elde edilen süpernatantın 1.5 ml’sine 0.15 ml %5’lik Ti(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (tityum disülfat) ve 0.3 ml %19’luk NH<sub>4</sub>OH (amonyum hidroksit) ile karıştırılmıştır. Çökelek oluştuktan sonra karışım 4 °C’ de 3.000 x g’ de 10 dakika daha santrifüj edilmiştir. Tüpün süpernatant kısmı uzaklaştırılır ve elde edilen pelet 3 ml 1 M’lık H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (sülfürik asit) ile çözülerek absorbandsı 415 nm’de ölçülüp kaydedilmiştir. Sonuçlar standart grafiklerle oranlanarak g doku başına düşen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı (ngram/g yaprak) olarak hesaplanmıştır (He vd. 2005).

### Kemik tozu hazırlanması ve inorganik element analizi

Kemikler 50°C’ye ayarlı etüvde iyice kuruttuktan sonra, dövülerek küçük parçalara ayrılmıştır. Daha sonra küçük parçalar havanda iyice öğütüldükten sonra, toz haline gelinceye kadar homojenizatörle parçalanmıştır. Toz haline getirilen kemik tozunun inorganik element analizi için örnekler alınmış, örnekler 3 cm çapında polietilen film diskinde konulmuştur. Alüminyumdan yapılmış 3 cm çapında metal numune kabı kullanılmıştır. Örnekler WDXRF cihazına konularak yüzde oranları belirlenmiştir.

**Tablo 1.** Esas elementlerden bazıları için WDXRF çalışma şartları

Element	Çizgi	Kristal	İndirgeyici	Aralık	Dedektör	V(kV)	I(mA)
K	K $\alpha$	LiF	1-1	STD	Flow	40	90
Na	K $\alpha$	TAP	1-1	STD	Flow	30	120
P	K $\alpha$	Ge	1-1	STD	Flow	30	90
S	K $\alpha$	Ge	1-1	STD	Flow	30	120
Mg	K $\alpha$	TAP	1-1	STD	Flow	30	120
Cl	K $\alpha$	Ge	1-1	STD	Flow	30	120
Ca	K $\alpha$	LiF	1-1	STD	Flow	40	90

### İstatistiksel analiz

Çalışma içinde sunulan sonuçlar, her bir uygulamadan dört örnek (4 paralel) yapıldıktan sonra elde edilen 4 değerlerin ortalamasıdır. Sonuçların karşılaştırılması, SPSS 15.0 paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmış P<0.05 önem seviyesinde Duncan’ın Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak belirlenmiştir.

## ARAŞTIRMA BULGULARI

Mevcut araştırmada Ca kaynağı olarak kullanılan kemik tozunda % 52,5 oranında Ca iyonu bulunurken bitki metabolizmasında çeşitli fonksiyonları olan diğer inorganik elementlerinde önemli oranlarda mevcut olduğu belirlenmiştir (Tablo 2).

**Tablo 2.** Kemik tozunu inorganik element içeriği

İnorganik elementler	Yaklaşık miktarı (%)
Ca	52.5 ± 3.4
P	23.5 ± 2.1
B	7.6 ± 0.4
Si	5.5 ± 0.4
Na	3.0 ± 0.2
Cl	1.8 ± 0.1
S	1.7 ± 0.1
K	1.6 ± 0.2
Mg	1.4 ± 0.3
Al	0.4 ± 0.1
Fe	0.3 ± 0.1
Zn	0.3 ± 0.1
Mn	0.2 ± 0.1
Cu	0.2 ± 0.1

Yalnız NaCl uygulaması, kontrol grubuna göre ortalama kök uzunluğunun yaklaşık %40 gövde uzunluğunun ise %47 oranlarında düşmesine neden olmuştur ( $P < 0.05$ ). NaCl'ye ilave olarak farklı konsantrasyonlarda KT (%1, %1.5) uygulanan grupların ortalama kök uzunluklarında yalnız NaCl uygulamasına nispeten sırasıyla %40.3, %56.2 oranlarında, gövde uzunluklarında ise %46.7, %37.2 artış görülmüştür ( $P < 0.05$ ). NaCl +%2KT uygulamasının ise ortalama kök ve gövde uzunluklarında neden olduğu artış istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ( $P > 0.05$ ) (Tablo 3).

**Tablo 3.** Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin ortalama kök ve gövde uzunluğunun uygulamalara göre değişimi

Uygulamalar	Ortalama Kök Uzunluğu (cm)	Ortalama Gövde Uzunluğu (cm)
<b>Kontrol</b>	13.8 ± 1.3	39.8 ± 1.9
<b>150 mM NaCl</b>	8.28 ± 1.5	21.1 ± 2.1
<b>150 mM NaCl + %1 KT</b>	11.5 ± 1.2	31.7 ± 1.8
<b>150 mM NaCl + %1.5 KT</b>	12.9 ± 1.5	29.5 ± 1.9
<b>150 mM NaCl + %2 KT</b>	8.1 ± 1.6	23.1 ± 2.2

Fasulye bitkisinin yetiştirme ortamına NaCl uygulaması, yaprak dokusunun çözülebilir protein içeriğinde kontrol grubuna göre %24 oranında düşüşe neden olmuştur ( $P < 0.05$ ). NaCl+KT

(%1, %1.5, %2) uygulamaları yalnız NaCl uygulamasına göre protein içeriğinde sırasıyla %1.8, %17.9, %20.2 oranlarında artışa neden olmuştur (Tablo 4).

NaCl uygulaması, toplam klorofil içeriğinde kontrol grubuna göre %11.3 oranında düşüşe neden olmuştur ( $P<0.05$ ). NaCl'ye ilaveten %1 KT uygulaması, yalnız NaCl uygulamasına göre %3 artışa neden olduğu saptanmış, ancak istatistiksel olarak önemsiz kaydedilmiştir ( $P>0.05$ ). NaCl'ye ilaveten % 1.5 ve % 2 KT uygulamaları ise yalnız NaCl uygulamasına göre toplam klorofil içeriğinin sırasıyla %39.1 ve %40.6 artmasına neden oldukları belirlenmiştir ( $P<0.05$ ) (Tablo 4).

**Tablo 4.** Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin çözünebilir protein ve total pigment içeriğinin uygulamalara göre değişimi

Uygulamalar	Protein İçeriği (mg.g <sup>-1</sup> doku)	Toplam klorofil içeriği(mg.g <sup>-1</sup> doku)
<b>Kontrol</b>	5.763 ± 0.055	1.985±0.006
<b>150 mM NaCl</b>	4.401 ± 0.044	1.760 ±0.040
<b>150 mM NaCl + %1 KT</b>	4.480 ± 0.053	1.812± 0.023
<b>150 mM NaCl + %1.5 KT</b>	5.187 ± 0.015	2.449±0.026
<b>150 mM NaCl + %2 KT</b>	5.289 ± 0.171	2.475±0.020

NaCl uygulaması fasulye bitkisinin yaprak dokularının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğinde, kontrol grubuna göre %59 oranında artışa neden olduğu belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). NaCl'ye ek olarak %1, %1.5, %2 KT uygulamaları yalnız NaCl uygulamasına göre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında sırasıyla %32, %15, %24 oranlarında düşüşe neden olmuşlardır ( $P<0.05$ ) (Tablo 5).

**Tablo 5.** Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriği ve MDA miktarının uygulamalara göre değişimi

Uygulamalar	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> içeriği (ng.g <sup>-1</sup> doku)	MDA miktarı (nmol.g <sup>-1</sup> doku)
<b>Kontrol</b>	43.267±1.13	1.836±0.01
<b>150 mM NaCl</b>	68.867±2.94	2.694±0.10
<b>150 mM NaCl + %1 KT</b>	46.867±1.96	2.021±0.06
<b>150 mM NaCl + %1.5 KT</b>	58.733±1.43	2.255±0.10
<b>150 mM NaCl + %2 KT</b>	52.467±0.66	2.337±0.04

Lipid peroksidasyon düzeyi (MDA içeriği) kontrol grubuna göre 150mM NaCl uygulamasıyla %46.7 arttığı saptanmıştır ( $P<0.05$ ). NaCl grubuna ilave olarak farklı konsantrasyonlarda %1, %1.5, %2 KT uygulanan gruplar yalnız NaCl grubuna göre MDA içeriğini sırasıyla %25, %16, %13 azalttıkları belirlenmiştir ( $P<0.05$ ) (Tablo 5).

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitkilerde inorganik elementler yapısal katalitik ve elektrokimyasal olarak hayati öneme sahiptirler. Kemik tozu ise bu inorganik elementlerin çoğunu Tablo 2'de de görüldüğü gibi doğal olarak içermektedir. Bu zengin inorganik element içeriğinden dolayı daha önceki çalışmalarda buğday ve fasulye bitkilerinin gelişiminde kemik tozu kullanılarak büyüme ve

gelişmenin önemli derecede artırılabilirdiği rapor edilmiştir (Genisel vd. 2012; Erdal, 2012). Bu çalışmada ise tuz stresine karşı savunmayı artırmak için kemik tozu solüsyonu kullanılmıştır.

Tuz uygulaması fasulye bitkisinin kök uzunluğunu %40, gövde uzunluğunu ise %47 oranında azaltmıştır. Bu bulgularla uyum içinde olan bilgiler vardır. Greenway & Munns (1980) tuz stresine maruz kalan bitkilerde genel olarak karşılaşılan farklılıklar arasında kök, gövde ve sürgün uzunluğunda azalma olduğunu bildirmişlerdir. Tuza ilave olarak uygulanan KT uygulamalarının tümü kök ve gövde uzunluğunu ciddi manada artırırken en fazla artışı sırası ile %1 ve %1.5 KT uygulamalarında tespit edildi. Daha önceki çalışmalar da artan dozlarda tuz uygulamalarında domates bitkisinin kotiledon, sürgün, kök uzunluğu ve ağırlıkları üzerine tuzun oluşturduğu olumsuz etkiyi düşük dozlarda kalsiyum uygulaması ile kısmen tolere edilebildiği bildirilmiştir (Türkmen vd. 2002). Bizim çalışmamızda da tuz + KT kombinasyonları tuz stresi nedeni ile indirgenen kök-gövde uzunluklarında ciddi artışlara neden olmuştur (Tablo 3). Bu etki KT içeriğindeki  $Ca^{+2}$  iyonlarının  $Na^{+}$  iyonlarına karşı olan antagonistik etki ile  $Na^{+}$  iyonlarının alınımı azaltması sonucu büyüme baskılanmasının ortadan kalkması ile açıklanabilir.

Tuz stresi protein içeriğinde %24 oranında düşmeye neden olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4). Literatür verilerinde çalışmamızın bu sonucu ile uyum içinde çalışmaları mevcuttur. Niknam vd. (2004) tarafından yapılan çalışmada tuz stresinin *Nicotiana tabacum* bitkisinin total proteinlerini azalttığı bildirilmiştir. Benzer olarak tuzluluğun patatesin yaprak çözünebilir proteini miktarını olumsuz etkilediği saptanmıştır (Teixeira & Pereira, 2007). Tuz+KT kombinasyonları protein içeriğini yalnız tuz uygulamasına göre ciddi şekilde artırmıştır. Bu sonuç KT'nin gerek  $Na^{+}$  toksisitesini azaltması gerekse sentez reaksiyonlarını artırması sonucu gerçekleşmiş olabilir.

Protein içeriğine benzer şekilde klorofil içeriği de tuz uygulaması ile azalmıştır. Çalışmamızın sonucuna benzer şekilde farklı kaynaklarda da tuz stresinin pigment biyosentez mekanizmasını bozduğu ve bunun sonucu olarak pigment miktarında azalma görüldüğü rapor edilmiştir (Khavarinejad & Chaparzadeh, 1998; Santos, 2004; Koçer, 2007). Tuz + KT uygulamalarının tümü fotosentetik pigment içeriğini önemli oranda artırmıştır (Tablo 4). Bu bulgu KT içeriğinde bulunan bir çok elementin klorofil sentezinin artırılmasında etkili olması ile açıklanabilir. Bu sonuçlarla uyumlu şekilde buğday bitkisine uygulanan KT'nin protein ve pigment içeriğini artırdığı bildirilmiştir (Genisel vd. 2012). Başka bir çalışmada da fasulye bitkisine eksojen olarak KT uygulanmış ve klorofil miktarının artışına neden olduğu rapor edilmiştir (Erdal, 2012).

Çevresel streslerde yaprak dokusundaki  $H_2O_2$ 'nin strese cevap ile ilişkili olduğu birçok çalışma da rapor edilmiştir: Kadife çiçeği tuz stresine maruz bırakıldığında  $H_2O_2$  seviyesinin normale göre %26 arttığı gösterilmiştir (Chaparzadeh vd. 2004). Tuz stresine maruz kalan bitkilerin ortamına Ca kaynağının eklenmesi ile  $H_2O_2$  miktarının yalnız NaCl içeren gruplara göre azalma gösterdiği bildirilmiştir (Amor vd. 2010). Çalışmamızın sonuçları bu bilgilerle uyum içerisindedir. Tuz stresi  $H_2O_2$  içeriğinin artırırken kalsiyum kaynağı olarak uygulanan KT bu artışı indirmiştir (Tablo 5). Bu sonuç KT uygulamasının  $Na^{+}$  iyonlarının alınımını azaltması sonucu gerçekleşmiş olabilir.

Lipid hidroperoksitlerinin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak reaktif olan aldehitler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda, malondialdehid (MDA) meydana gelir. MDA yağ asidi oksidasyonunun

spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir, fakat lipid peroksidasyonunun derecesi ile iyi bir korelasyon gösterir. Bu sebeple organizma da oluşan lipid peroksidasyon (LPO) düzeyini ölçmek için MDA seviyelerinin ölçümü, sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Yılmaz & Ozan, 2003; Kuru, 2007). Çalışmamızda tuz stresi MDA düzeyini ciddi oranda artırmıştır (Tablo 5). Bu sonuçla uyumlu bir çok çalışma mevcuttur. Chaoui vd. (2004) tarafından yapılan çalışmalarda, tuz stresi uygulanmış fasulye bitkisinde lipid peroksidasyonunun kontrol grubuna göre yükseldiği rapor edilmiştir. Tuz + KT kombinasyonları ise MDA düzeyini indirmiştir. Bu bulgu KT içeriğindeki  $Ca^{+2}$  iyonlarının zar bütünlüğünü koruması sonucu gerçekleşmesi ile açıklanabilir. Tuzlu koşullara direnç kazandırma amaçlı olarak ilave edilen ticari  $Ca^{+2}$  çözeltilerinin LPO seviyesine etkisi ile ilgili araştırma bulguları mevcuttur. *Catharanthus roseus* bitkisine farklı konsantrasyonlarda tuz uygulandığında MDA miktarı artış göstermiş, 5 mM Ca ilave edildiğinde MDA miktarında azalmalar olduğu rapor edilmiştir (Jalel vd. 2007).

Tuz stresi altındaki bitkilere dışarıdan uygulanan Ca, K veya P içeren bileşiklerin, bitkinin yaprak ve köklerinde  $Na^{+}$  ile rekabete girerek onun alınımını azalttığı ve bitki bünyesinde Ca, K ve P iyonlarının strese karşı koyabilecek yeterli düzeylere ulaşmasıyla birlikte bitkinin strese karşı koyabilme kapasitesinin de arttığı bazı çalışmalarla bildirilmiştir (Kaya & Higgs, 2003; Yakıt & Tuna, 2006). Çalışmamızda bu inorganik elementlerin kemik tozunda da bol miktarda mevcut olduğu WDXRF analizi sonucu tespit edilmiştir (Tablo 2). Sonuçlarımız da bu çalışmadaki bulgular ile uyum içerisindedir.

Bütün sonuçlarımızın değerlendirilmesi ile sonuç olarak özellikle %1.5 KT uygulaması tuz stresinin zararlı etkilerini önemli derecede azalttığı belirlenmiştir. KT uygulamasının bu etkisi içeriğinde doğal olarak barındırdığı inorganik elementlerden özellikle  $Ca^{+2}$  iyonlarının  $Na^{+}$  iyonları ile rekabeti sonucu hücrede ki ve bitkideki toksitesini azaltması ile açıklanabilir. Ayrıca KT' nin içeriğindeki diğer inorganik elementlerde antioksidan gibi hücresel savunma mekanizmalarını daha etkin kılmış olabilir. Bu sonuçlara dayanarak tuzlu koşullarla mücadelede bitki büyümesi ve gelişimini artırmak için organik kalsiyum kaynağı olarak KT'nin kullanılabilirliği söylenebilir.

## KAYNAKLAR

- Amor, N. B., Megdiche, W., Jime'nez, A., Sevilla, F., Abdelly, C., 2010, The effect of calcium on the antioxidant systems in the halophyte *Cakile maritima* under salt stress, *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(3): 453-461.
- Andarwulan, N. and Shetty, K., 1999, Influence of acetyl salicylic acid in combination with fish protein hydrolysates on hyperhydricity reduction and phenolic synthesis in oregano (*Origanum vulgare*) tissue cultures, *Journal of Food Biochemistry*, 23(6): 619-635.
- Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Chaoui, A., Jarrar, B., Ferjani, E. E. V., 2004, Effects of cadmium and copper on peroxidase NADH oxidase and IAA oxidase activities in cell wall soluble and microsomal membrane fractions of pea roots, *Journal of Plant Physiology*, 161: 1225-1234.
- Chaparzadeh, N., D'Amico M. L., Khavari-Nejad, R. A., Izzo, R., Navari-Izzo, F., 2004, Antioxidative responses of *Calendula officinalis* under salinity conditions, *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 695-701.



- Genisel, M., Erdal, S., Turk, H., Dumlupınar, R., 2012, The availability of bone powder as inorganic element source on growth and development in wheat seedlings, *Toxicology and Industrial Health*, 28(5): 458-462.
- Genişel, M., 2010, Kemik tozu solüsyonu, CaCl<sub>2</sub> ve IAA uygulamalarının tuz stresi altındaki fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin fizyolojik parametreleri üzerine etkileri, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.
- Greenway, H. and Munns, R., 1980, Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, 31: 149-190.
- Hagemann, M., Erdmann, N., 1997, Environmental stresses. In: Rai, A.K. (Ed.), *Cyanobacterial Nitrogen Metabolism and Environmental Biotechnology*, Springer, Heidelberg, Narosa Publishing House, NewDelhi, India, 156-221.
- Hayashi, H., Murata, N., 1998, Genetically engineered enhancement of salt tolerance in higher plants. In: Sato, K., Murata, N., (Ed.), *Stress Response of Photosynthetic Organisms: Molecular Mechanisms and Molecular Regulation*, Elsevier, Amsterdam, 133-148.
- He, Y., Liu, Y., Cao, W., Huai, M., Xu, B., Huang, B., 2005, Effects of salicylic acid on heat tolerance associated with antioxidant metabolism in *Kentucky bluegrass*, *Crop Science*, 45: 988-995.
- Heath, R. L., Packer, L., 1968, Photoperoxidation in isolated chloroplast I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 25: 189-198.
- Hernandez, J. A., Aguilar, A. B., Portillo, B., López-Gómez, E., Beneyto, J. M., García-Legaz, M. F., 2003, The effect of calcium on the antioxidant enzymes from salt-treated loquat and anger plants, *Functional Plant Biology*, 30: 1127-1137.
- Jalel, C. A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Panneerselvam, R., 2007, Calcium chloride effects on salinity-induced oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus*, *Comptes Rendus Biologies*, 330: 674-683.
- Kaya, C. and Higgs, D., 2003, Supplementary Potassium Nitrate Improves Salt Tolerance in Bell Pepper Plants, *Journal of Plant Nutrition*, 26(7): 1367-1382.
- Khavarinejad, R. A. and Chaparzadeh, N., 1998, The effects of NaCl and CaCl<sub>2</sub> on photosynthesis and growth of alfalfa plants, *Photosynthetica*, 35: 461-466.
- Koçer, M. C., 2007, Tuz Stresine Maruz Bırakılan Mısır (*Zea Mays* L.) Bitkisinde, Eksojen Olarak Uygulanan Absisik Asit (ABA) ve Salisilik Asit (SA)' in Etkilerinin Belirlenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van.
- Kurbanoglu, E. B., Atici, O., Algur, O. F. ., 2004, Effect of ram horn hydrolyzate on the growth of bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Aziziye-94), *Biological Agriculture and Horticulture* 22(2): 121-131.
- Kuru, H. İ., 2007, Arseniğin insan ve bazı canlılarda oksidatif enzimler üzerine etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- McCue, K. F. and Hanson, A. D., 1990, Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression, *Trends Biotechnology*, 8: 358-362.
- Niknam, V., Bagherzadeh, M., Ebrahimzadeh, H., Sokhansanj, A., 2004, Effect of NaCl on biomass and contents of sugars, proline and proteins in seedlings and leaf explants of *Nicotiana tabacum* grown in vitro, *Biologia Plantarum*, 48: 618-615.
- Owens, S., 2001, Salt of the Earth, *EMBO reports*, 2(10): 877-879.
- Parida, A. K., Das, A. B., Mitra, B., Mohanty, P., 2004, Salt-stress induced alterations in protein profile and protease activity in the mangrove, *Bruguiera parviflora*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 59: 408-414.

- Rengel, Z., 1992, The role of calcium in salt toxicity, *Plant, Cell & Environment*, 15: 625-632.
- S. Elkahoui, Hernandez, J. A., Abdelly, C., Ghrir, R., Limam, F., 2005, Effect of salt on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Catharanthus roseus* suspension cells, *Plant Science*, 168: 607-613.
- S. Erdal, 2012, Comparative Evaluation of the Effects of Bone Powder and Calcium Phosphate on Plant Growth and Development, *Phosphorus, Sulfur and Silicon*, 187: 1017-1025.
- Santos, C. V., 2004, Regulation of chlorophyll biosynthesis, degradation by stress in sunflower leaves, *Scientia Horticulturae*, 103: 93-99.
- Teixeira, J. and Pereira, S., 2007, High Salinity and Drought Act on an Organ-Dependent Manner on Potato Glutamine Synthetase Expression and Accumulation, *Environmental and Experimental Botany*, 60: 121-126.
- Tuna, A. L., Kaya, C., Ashraf, M., Altunlu, H., Yokas, I., Yagmur, B., 2007, The effects of calcium sulphate on growth, membrane stability and nutrient uptake of tomato plants grown under salt stress, *Environmental and Experimental Botany*, 59: 173-178.
- Türkmen, Ö., Şensoy, S., Erdal, İ., Kabay T., 2002, Kalsiyum uygulamalarının tuzlu fide yetiştirme ortamlarında domates çıkış ve fide gelişimi üzerine etkileri, *Y.Y.Ü. Ziraat Fakültesi Tarım Bilgileri Dergisi*, 12 (2): 53-57.
- Witham, F. H., Blayles, D. F., Devlin, R. M., 1971, *Experiments in Plant Physiology*. Van Nostrand Reinhold Company, New York, 55-56.
- Yakit, S. ve Tuna, L., 2006. Tuz stresi altındaki mısır bitkisinde (*Zea mays* L.) Stres Parametreleri üzerine Ca, Mg ve K'nın etkileri, *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19(1): 59-67.
- Yan-Feng, X., Ling, L., Zhao-Pu1, L., Mehta, S. K., Geng-Mao, Z., 2008, Protective Role of Ca Against NaCl Toxicity in *Jerusalem artichoke* by Up-Regulation of Antioxidant Enzymes, *Soil Science Society of China*, 18(6): 766-774.
- Yılmaz, S. ve Ozan, T. S., 2003, Meme kanserli hastalarda lipid peroksidasyonu ve bazı enzim aktiviteleri arasındaki ilişkisi, *Türk Biyokimya Dergisi*, 28(4): 252-256.