



Savrun Ispanak (*Spinacia oleracea* L.) Çeşidinin Bazı Abiyotik Stres Faktörlerine Tepkisi

Nezahat Turfan *

Kastamonu Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 37150 Kastamonu, Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

Araştırma Makalesi

Geliş 12 Aralık 2016
Kabul 24 Ocak 2017

Anahtar Kelimeler:
Abiyotik stres
Dayanıklılık
Ispanak

* Sorumlu Yazar:
E-mail: nturfan@kastamonu.edu.tr

ÖZET

Bu çalışmada Savrun ıspanak (*Spinacea oleracea* L.) çeşidinde tuz, ağır metal, kuraklık ve kireç stresine dayanıklılık mekanizması araştırılmıştır. Bu amaçla kontrollü koşullarda iklim dobında yetiştirilen, 5-6 yapraklı fideler dört hafta süresince tuz (75, 150 ve 225 mM NaCl), ağır metal (%0,2 FeCl₃, NiCl₂ ve ZnCl₂), kurak (%50) ve kireç (%0,2 CaCO₃) stres uygulamalarına maruz bırakılmıştır. Çalışma sonucunda Savrun ıspanak çeşidinde klorofil a, b, toplam klorofil ve karotenoit, β-karoten ve likopen içeriği kuraklık ve CaCO₃ stres uygulamalarında artış göstermiştir. Toplam çözünür protein ve GuPX tüm stres uygulamalarında, prolin NiCl₂, 75 ve 150 mM NaCl uygulamalarında yüksektir. APX aktivitesi 75 mM NaCl ve ZnCl₂; CAT 150 mM NaCl ve kuraklık hariç diğer stres uygulamalarında; SOD aktivitesi ise kuraklık, CaCO₃ ve 225 mM NaCl stres uygulamalarında yüksek bulunmuştur. MDA içeriği ise FeCl₃ hariç diğer uygulamalarda düşük ve H₂O₂ ise 225 mM NaCl ve kuraklık uygulamasında düşük diğer uygulamalarda yüksektir. Sonuç olarak Savrun ıspanak çeşidinin CaCO₃ ve kuraklık uygulamalarına toleransı yüksek, 225 mM NaCl, ZnCl₂ ve FeCl₃ uygulamalarına ise duyarlılığı yüksek bulunmuştur. Çeşidin NiCl₂ ve 75 mM NaCl uygulamalarına ise orta derecede toleranslı olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte strese tolerans parametreleri oldukça değişkenlik göstermiştir.

Turkish Journal Of Agriculture - Food Science And Technology, 5(6): 660-667, 2017

Effect of Some Abiotic Stress Factories on Savrun Spinach (*Spinacea oleracea* L.)

ARTICLE INFO

Research Article

Received 12 December 2016
Accepted 24 January 2017

Keywords:
Abiotic stress
Spinach
Resistance

* Corresponding Author:
E-mail: nturfan@kastamonu.edu.tr

ABSTRACT

In this study were investigated that resistance to salinity, heavy metals, drought and calcerous stress in Savrun (*Spinacea oleracea* L.) spinach. For this aim, 5-6 leafed seedlings were exposed to NaCl (75, 150 and 225 mM); heavy metals (Fe, Ni and Zn 0.2 mg/L), drought (50%) and 0.2% CaCO₃ applications for four weeks half-weekly which plants grown under controlled conditions. Depends on result chlorophyll a, chlorophyll b, total celorophyll, carotenoids, β-caroten and lycopen increased in drought and CaCO₃ treatments. Total soluble protein and GuPX activity were found higher in all stress treatments, proline content increased in NiCl₂, 75 ve 150 mM NaCl treatments. While APX activity was higher in 75 mM NaCl and ZnCl₂; CAT was higher in 150 mM NaCl and others stres treatments except drought. SOD activity were noted higher in drought, CaCO₃ and 225 mM NaCl stresses groups. MDA content was lower in all treatments except FeCl₃ and, H₂O₂ were lower in 225 mM NaCl and drought while it was higher in others. As a result, it was found that tolerance of Savrun spinach is higher to CaCO₃ and drought but sensitivity of it is higher to 225 mM NaCl, ZnCl₂ and FeCl₃. Also it was determined that Savrun genotype is moderate tolerance to NiCl₂ and 75 Mm NaCl. However parameters of tolerance to stress that treated on spinach seedling showed variability in Savrun spinach.

Giriş

Ispanak, kışlık sebzeler içerisinde tüketiciler tarafından en çok tercih edilen ve yetiştiriciliği yapılan sebzelerin başında ıspanak yer almaktadır. Çeşitli mineraller, vitaminler, antioksidan özellikle karoten, likopen ve zeaksantin gibi pigmentler ve lif açısından oldukça zengin bir sebzedir (Bergquist ve ark., 2007; Kansal ve ark., 1981). Türkiye’de ıspanak üretim miktarı yılda 225,343 ton olup, kişi başına 2,7 kg ıspanak tüketilmektedir (TUİK, 2010). Ispanak yetiştiriciliğinde iklim şartları önemli rol oynar. Serin iklim sebzesi olduğu için soğuklara genellikle dayanıklı olmakla beraber, çeşit özelliğine bağlı olarak üzeri karla kaplı olmadığı durumlarda soğuktan zarar görürler. Ispanak bütün topraklarda kolaylıkla yetiştirilebilir, ancak toprağın asitli olması üretimi olumsuz yönde etkiler. Kaliteli ürün elde etmek için toprak pH’sının 6,5-7,5 arasında olması istenir. Topraktaki mineral madde ve organik madde miktarı da yetiştiriciliğin başarısı açısından önemlidir. Bu nedenle birim alandan kaliteli yüksek verim elde etmek için iklim şartları, toprak özellikleri ve ayrıca çevresel değişimlere, kıraç ve verimsiz toprak şartlarına dayanıklı çeşitlerin seçilmesi ıspanak yetiştiriciliğinde önemli yer tutmaktadır.

Bilindiği gibi hem doğal hem de tarımsal koşullar altında bitkiler, yaşamları süresince eş ya da farklı zamanlarda kuraklık, tuzluluk, aşırı sulama, toprağın kimyasal ve fiziksel özelliklerinin bozulması, mineral eksikliği, ağır metal kirliliği, yüksek/ düşük sıcaklık gibi stres faktörü ile karşılaşabilmektedir (Mutlu ve ark., 2016). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, Dünya ve Türkiye topraklarında mikro besin elementleriyle ilgili yaygın beslenme problemlerinin olduğu, Türkiye topraklarının %27’sinde demir noksanlığı görüldüğü (Eyüpoğlu ve ark., 1998) bildirilmektedir. Olumsuz çevre koşulları bitkilerde büyüme ve gelişmeyi engelleyerek verim ve kaliteyi azaltmaktadır. Ispanakta tüketilen kısım yaprak olduğu için yaprak özellikleri büyük önem taşımaktadır (Briemer, 1982; Berquist, 2007). Yaprak özellikleri ve yaprağın kimyasal kompozisyonu çeşitlere göre değişmekle birlikte toprağın mineral içeriği, toprak pH’sı, kuraklık, tuzluluk, ağır metal kirliliği gibi çevresel faktörlerden ve hasat öncesi ve sonrası koşullardan önemli ölçüde etkilenmektedir (Elia ve ark., 1999; Toledo ve ark., 2003; Turfan ve ark., 2016). Yapılan çalışmalarda stres koşullarında bitkilerde fotosentetik pigmentler, prolin, glisin, betain, ve protein gibi azotlu bileşiklerin, toplam çözünür şekerler, toplam fenolik bileşikler, flavonoidler, β -karoten ve likopen gibi nonenzimatik antioksidanların ve askorbat peroksidaz, guaiakol peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve süperoksit dismutaz gibi enzimatik antioksidanların değiştiği ve ayrıca toleranslı türlerde söz konusu bileşiklerin duyarlı türlere oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Koca ve ark., 2007; Smirnoff, 2005). Dünyada enerji ve protein gereksinimi bakımından 800 milyon insanın yetersiz beslenmesine karşın, 2 milyara yakın insan “gizli açlık” olarak isimlendirilen ve yetersiz seviyede mikro element (demir, çinko, selenyum ve bor vb.) ve vitamin noksanlığı çekmektedir (Çakmak, 2002; Welch, 2002). Bu nedenle bitkisel üretimde verimi ve kaliteyi artırmak gerekmektedir. Bunun da yolu stres koşullarına dayanıklı

tür ve çeşitlerin belirlenmesinden geçmektedir.

Bu çalışmada savrun ıspanak çeşidinde farklı tuz konsantrasyonları (75, 150 ve 225 mM NaCl), ağır metal (FeCl_3 , NiCl_2 ve ZnCl_2), kuraklık ve CaCO_3 stres uygulamalarının yapraklarda fotosentetik pigmentler, β -karoten, likopen, prolin, toplam protein miktarları ve antioksidant enzimlerden katalaz, askorbat peroksidaz, guaiakol peroksidaz ve süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri üzerine etkileri incelenmiş ve çeşidin bu stres uygulamalarına tolerans durumu belirlenmeye çalışılmıştır.

Materyal ve Metot

Araştırmada Savrun çeşidi (*Spinaceae oleraceae* L.) kullanılmıştır. Savrun çeşidi, ıspanak mildiyösüne ve düşük sıcaklıklara dayanıklı, orta derecede dik, kısa saplı, koyu yeşil renkte büyük ve etli yapraklara sahip, kırılmalıya, uzun mesafeye, nakliye ve bozulmadan beklemeye mukavemeti yüksek bir çeşittir. Tohumlar %5’lik sodyum hipoklorat ile 10 dk sterilize edilmiş ve daha sonra içerisinde steril toprak karışımı (%40 torf, %40 toprak, %10 kum, %10 mil) içeren 3 L hacmindeki plastik saksılara ekilmiştir. Tohumlar iklim dolabında kontrollü koşullarda ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) çimlenmeye bırakılmıştır. Dört hafta sonra fideler 4-5 yapraklı safhada iken 75, 150 ve 225 mM NaCl, %0,2 FeCl_3 , %0,2 NiCl_2 , %0,2 ZnCl_2 , %0,2 CaCO_3 ve %50 kurak (145 ml) stres uygulamalarına başlanmıştır. Deneme her uygulama için 3 tekrarlamalı ve her tekrarlama 3 bitki olacak şekilde kurulmuştur. Uygulamalar haftada iki kez olmak üzere dört hafta süresince gerçekleştirilmiştir. Tuz, ağır metal ve kireç uygulamalarında fidanlar çeşme suyu içerisinde farklı dozlarda çözündürülmüş tuz (75, 150 ve 225 mM NaCl), ağır metal (2 mg/L FeCl_3 , NiCl_2 ve ZnCl_2) ve kireç (2 g/L CaCO_3) solüsyonları ile sulanmıştır. %50 kurak uygulamasında çeşme suyu kullanılmış olup, su eksikliği toprak su kapasitesine göre 125 ml olarak gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu fideler ise sadece çeşme suyu ile sulanmıştır. Beşinci haftada tam gelişmiş düzgün yapraklardan alınan örneklerde fotosentetik pigment, prolin, toplam çözünür protein, lipit peroksidasyonu (malondialdehit) miktarları, H_2O_2 konsantrasyonu ve katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), süperoksit dismutaz (SOD) ve guaiacol peroksidaz (GuPX) aktiviteleri ölçülmüştür.

Klorofil miktarının belirlenmesi için 0,5 gr taze yaprak doku sıvı azot içerisinde iyice ezilmiş ve üzerine 4°C ’de %80’lik aseton çözeltisinden 5 ml ilave edilerek homojenize edilmiştir. Homojenat 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiş ve alınan süpernatantın spektrofotometrede 450, 645, 663 nm’de ölçümleri üç tekrarlı yapılmıştır. Toplam klorofil miktarının belirlenmesinde Arnon denklemi (Arnon, 1949) kullanılmış karotenoid miktarı ise Jaspars formülüne göre belirlenmiştir (Witham ve ark., 1971).

$$\text{Klorofil a} = 12,7 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645}$$

$$\text{Klorofil b} = 22,9 \times A_{647} - 4,68 \times A_{663}$$

$$\text{Klorofil a+b} = 20,2 \times A_{645} + 8,02 \times A_{663}$$

$$\text{Karotenoid} = (4,07 \times A_{450} - (0,0435 \times \text{Klorofil a} + 0,367 \times \text{Klorofil b}))$$

Karoten ve likopen miktarı Nagata ve Tamashita (1992) methoduna göre yapılmıştır. 100 mg örnek 10 ml aseton-hekzan (92:3) karışımında 1 dk homojenize edilmiş ve süzölmüştür. Süzöntünün 453, 505 ve 663 nmde absorbansı kaydedilmiştir. β -Karoten ve Likopen miktarının hesaplanmasında aşağıdaki formüller kullanılmıştır.

$$\text{mg } \beta\text{-Karoten}/100 \text{ mg}=0,0458 \times A_{663} + 0,372 A_{505} - 0.0806 \times A_{453}$$

$$\text{mg Likopen}/100 \text{ mg}=0,216 \times A_{663} - 0,304 \times A_{505} + 0,452 \times A_{453}$$

Yaprak örneklerindeki prolin miktarı Bates ve ark. (1973), protein miktarı Bradford (1976), Lipid peroksidasyonu (MDA) Lutts ve ark. (1996) ve H_2O_2 ekstraksiyonu Velikova ve ark. (2000) tarafından kullanılan yöntemlere göre belirlenmiştir. Enzim ekstraktların hazırlanması amacıyla tohumlardan 0,5 g alınmış, örnek içinde 0,1 mM Na-EDTA bulunan 50 mM'lık (pH 7,6) fosfat tampon çözeltisi ile (5 ml) homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekler 15 dk süre ile 15000 g ve $+4^\circ\text{C}$ 'de santrifüj edildikten sonra, elde edilen süpernatantta enzim aktiviteleri ölçülmüştür (SOD, APX, GuPX ve CAT). Askorbat peroksidaz aktivitesi (APX) spektrofotometrik olarak Nakano ve Asada (1981) tarafından uygulanan yöntemle göre 290 nm'de ($E = 2,8 \text{ mM cm}^{-1}$) askorbatın oksidasyon hızı ölçülerek, katalaz aktivitesi (CAT) spektrofotometrik olarak Bergmeyer (1974) tarafından uygulanan yöntemle göre, süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi ise Çakmak (2002) tarafından uygulanan yöntemle göre, guaiakol peroksidaz enzim (GuPX) aktivitesi ise modifiye yöntemle (Chance ve Maehley, 1995)'e göre belirlenmiştir.

Verilerin İstatistiksel Analizi

Çalışma sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS 20 programı kullanılarak %95 güven aralığında ANOVA ve Tukey testlerine göre yapılmıştır.

Bulgular

Tuz (75, 150, 225 mM NaCl) ağır metal (%0,2 FeCl_3 , NiCl_2 , ZnCl_2), kireç (%0,2 CaCO_3) ve kurak (%50) uygulamalarının Savrun ıspanak çeşidinde klorofil a, klorofil b, toplam klorofil, karotenoid, β -karoten, likopen, prolin, toplam çözünür protein miktarı, hidrojen peroksit (H_2O_2) konsantrasyonu, lipit peroksidasyonu seviyesi (malondialdehit-MDA), askorbat peroksidaz (APX), guaiakol peroksidaz (GuPX), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitelerine ilişkin veriler Tablo 1 ve Tablo 3'te verilmiştir. Uygulamaların fotosentetik pigment, β -karoten, likopen, prolin, toplam çözünür protein, hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarı, lipit peroksidasyonu seviyesi (malondialdehit-MDA), askorbat peroksidaz (APX), guaiakol peroksidaz (GuPX), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerine etkileri, uygulamanın çeşidi ve konsantrasyonuna bağlı olarak farklılık sergilemiştir (Tablo 1, Tablo 3).

Bulgulara göre ve %0,2 CaCO_3 ve %50 kuraklık uygulamaları klorofil a (kl a), klorofil b (kl b), toplam klorofil ve karotenoid miktarını kontrol ve diğer uygulama gruplarına göre artırmıştır ($P<0,05$, Tablo 2). Bununla birlikte %0,2 NiCl_2 ve 75 mM NaCl uygulamaları da kl a, %0,2 NiCl_2 ise toplam karotenoid miktarında kısmi bir yükselişe neden olmuştur. 150 mM tuz, %0,2 ZnCl_2 ve 225 mM tuz uygulamaları kl a, kl b, toplam klorofil ve karotenoid içeriklerini istatistiksel olarak önemli ölçüde düşürmüştür ($P<0,05$, Tablo 1). %0,2 FeCl_3 ve 75 mM tuz uygulamaları pigment miktarında azalmaya neden olmuştur ancak istatistiksel önemi yoktur.

Uygulamaların β -karoten ve likopen miktarları üzerine etkileri klorofil pigmentlerine benzer şekilde olmuştur. β -karoten miktarı %50 kurak (%5,84) ve %0,2 CaCO_3 'ta (%2,42) kontrole göre artış gösterirken, 150 (%38,3) ve 225 mM NaCl (%34,11) ile %0,2 ZnCl_2 (%32,71) uygulamalarında azalmıştır (Tablo 1).

Tuz, ağır metal, kireç ve kuraklık uygulamaları toplam çözünür protein miktarını artırmıştır. Kontrole göre en yüksek protein artışı sırasıyla %50 kuraklıkta %74,21, %0,2 CaCO_3 'ta %53,85, 150 mM NaCl'de %50,87, %0,2 ZnCl_2 'de %26,33, %0,2 NiCl_2 'de %16,76 ve 75 mM NaCl'de ise %15,56'dır ($P<0,05$, Tablo 2). Prolin miktarı en çok %0,2 NiCl_2 (%7,9) ve 75 mM NaCl'de (%4,9) en yüksek, %0,2 CaCO_3 (%50,46) ve %0,2 ZnCl_2 (%29,52) uygulamalarında en düşüktür ($P<0,05$, Tablo 2). Kuraklık, FeCl_3 , 225 ve 150 mM NaCl uygulamalarında kontrole göre prolin miktar değişimi istatistiksel olarak önemsizdir (Tablo 2).

Malondialdehit konsantrasyonu (MDA) sadece %0,2 FeCl_3 uygulamasında kontrole göre artış göstermiştir ancak bu miktarın istatistiksel önemi yoktur. Kontrole göre en düşük MDA sırasıyla %0,2 NiCl_2 (%78,76), %0,2 ZnCl_2 (%77,97), 225 mM (%69,38) ve 75 mM NaCl'de (%54,6) saptanmıştır ($P<0,05$, Tablo 2). Hidrojen peroksit (H_2O_2) konsantrasyonu 225 mM NaCl (%46) ve %50 kuraklık uygulamasında H_2O_2 içeriği kontrole göre azalmış, diğer uygulamalarda artış göstermiştir. H_2O_2 , %0,2 FeCl_3 'de kontrole göre 2 kat, %0,2 NiCl_2 'de %68,45 ve %0,2 ZnCl_2 'de ise %56,52 daha yüksek bulunmuştur ($P<0,05$, Tablo 2).

APX aktivitesi, 75 mM NaCl %42,44 ve %50 kuraklık uygulamasında ise %5,51 oranında kontrole göre daha düşük bulunmuştur. Enzim aktivitesi FeCl_3 (%92), CaCO_3 (%89,7), kuraklık (%74,2), NiCl_2 (%55,89) ve 150 mM NaCl'de (%52,53) en yüksek değerdedir ($P<0,05$, Tablo 3). CAT aktivitesi, %50 kuraklık ve 150 mM NaCl uygulamalarında düşüktür ancak enzim aktivitesindeki azalışın istatistiksel önemi yoktur. Kontrole göre en yüksek enzim aktivitesi sırasıyla FeCl_3 (%27,6), ZnCl_2 (%19,3), NiCl_2 (%15,4) ve 225 mM NaCl (%11,25)'te kaydedilmiştir ($P<0,05$, Tablo 3).

GuPX aktivitesi kontrole göre tüm uygulama gruplarında yüksektir. Özellikle de FeCl_3 (%85,4), NiCl_2 (%83,2), ZnCl_2 (%75), 75 mM NaCl (%55,8) ve 225 mM NaCl'de (%43,9) enzim aktivitesi maksimum seviyededir ($P<0,05$). SOD aktivitesi kuraklık, CaCO_3 ve 150 mM NaCl uygulamalarında düşüktür. Kontrole göre en yüksek SOD aktivitesi 75 mM NaCl ve ZnCl_2 uygulamalarında belirlenmiştir ancak istatistiksel olarak önemsizdir (Tablo 3).

Tablo 1 Tuz (75,150 ve 225 mM), ağır metal (FeCl₃, NiCl₂ ve ZnCl₂), CaCO₃ ve kuraklık uygulanmış Savrun ıspanak çeşidinde klorofil a, klorofil b, toplam klorofil, toplam karotenoid, β-karoten ve likopen miktar değişimleri (P<0,05).

Uygulama Grupları	Klorofil a mg/g	Klorofil b mg/g	Toplam Klorofil mg/g	Toplam Karotenoid mg/g	β-karoten mg/g	Likopen mg/g
Kontrol	25,16±0,04 ^{a*}	19,40±0,08 ^c	17,23±0,07 ^e	14,36±0,15 ^d	1,28±0,001 ^d	0,90±0,001 ^d
75 mM	26,34±0,02 ^d	18,76±0,06 ^d	16,67±0,05 ^d	13,77±0,02 ^d	1,10±0,008 ^d	0,98±0,010 ^e
150 mM	12,23±0,06 ^a	8,17±0,05 ^a	7,27±0,05 ^a	8,13±0,01 ^a	0,79±0,020 ^a	0,44±0,003 ^a
225 mM	21,90±0,02 ^c	15,21±0,03 ^c	13,52±0,03 ^b	12,02±0,01 ^b	0,84±0,003 ^b	0,80±0,001 ^b
FeCl ₃	24,84±0,04 ^d	17,52±0,06 ^d	15,57±0,05 ^c	13,39±0,08 ^d	1,28±0,002 ^d	0,93±0,001 ^d
NiCl ₂	26,42±0,04 ^e	19,40±0,06 ^e	17,23±0,05 ^e	14,38±0,02 ^d	1,07±0,004 ^c	1,00±0,001 ^e
ZnCl ₂	18,79±0,03 ^b	14,06±0,02 ^b	12,49±0,02 ^b	10,50±0,03 ^c	0,86±0,002 ^b	0,72±0,001 ^c
CaCO ₃	33,49±0,20 ^g	27,83±0,07 ^g	24,70±0,06 ^g	17,46±0,04 ^f	1,31±0,003 ^e	1,19±0,00 ^f
Kuraklık	31,07±0,04 ^f	24,98±0,06 ^f	22,18±0,06 ^f	16,49±0,06 ^e	1,35±0,002 ^e	1,27±0,001 ^f

*: Aynı sütunda aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık önemli değildir (P<0,05).

Tablo 2 Tuz (75,150 ve 225 mM), ağır metal (FeCl₃, NiCl₂ ve ZnCl₂), CaCO₃ ve kuraklık uygulanmış Savrun ıspanak çeşidinde prolin, toplam çözünür protein, malondialdehit ve hidrojen peroksit miktar değişimleri

UG	Protein mg/g	Prolin μmol/g	MDA μmol/g	H ₂ O ₂ μmol/g
Kontrol	4,89±0,05 ^{a*}	350,97±1,30 ^e	39,35±0,001 ^g	61,46±0,001 ^c
75 mM	5,65±0,13 ^b	368,00±0,30 ^f	17,87±0,001 ^c	72,67±0,001 ^d
150 mM	7,37±0,08 ^d	352,69±0,17 ^e	27,80±0,005 ^d	80,89±0,005 ^e
225 mM	5,56±0,11 ^b	323,61±0,30 ^d	12,05±0,001 ^b	33,19±0,004 ^a
FeCl ₃	5,41±0,05 ^b	325,33±0,17 ^d	40,37±0,001	133,45±0,001 ^h
NiCl ₂	5,71±0,08 ^b	379,71±0,46 ^g	8,36±0,001 ^a	106,41±0,030 ^g
ZnCl ₂	6,17±0,08 ^c	247,37±0,46 ^b	8,67±0,001 ^a	96,19±0,004 ^f
CaCO ₃	7,52±0,10 ^d	173,88±0,30 ^a	32,69±0,006 ^f	103,53±0,001 ^g
Kuraklık	8,51±0,26 ^c	315,17±0,46 ^c	27,59±0,001 ^e	56,33±0,001 ^b

UG: Uygulama Grupları. *: Aynı sütunda aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık önemli değildir (P<0,05).

Tablo 3 Tuz (75,150 ve 225 mM), ağır metal (FeCl₃, NiCl₂ ve ZnCl₂), CaCO₃ ve kuraklık uygulanmış Savrun ıspanak çeşidinde askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT), guaiakol peroksidaz (GuPX) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivite değişimleri (EU/mg Protein)

UG	APX	CAT	GuPX	SOD
Kontrol	0,514±0,001 ^{c*}	0,643±0,0001 ^b	0,483±0,002 ^a	119,03±0,01 ^b
75 mM	0,300±0,002 ^a	0,654±0,0001 ^b	0,753±0,001 ^e	123,80±0,01 ^d
150 mM	0,785±0,001 ^e	0,631±0,0001 ^c	0,635±0,001 ^c	120,19±0,02 ^c
225 mM	0,623±0,001 ^d	0,716±0,0003 ^c	0,695±0,002 ^d	118,16±0,03 ^b
FeCl ₃	0,988±0,001 ^h	0,821±0,0002 ^e	0,896±0,001 ^g	119,94±0,02 ^b
NiCl ₂	0,817±0,001 ^f	0,742±0,0002 ^d	0,886±0,002 ^g	119,40±0,08 ^b
ZnCl ₂	0,486±0,002 ^b	0,767±0,0002 ^d	0,846±0,002 ^f	120,63±0,04 ^c
CaCO ₃	0,976±0,002 ^h	0,700±0,0003 ^c	0,627±0,001 ^c	115,85±0,05 ^a
Kuraklık	0,896±0,002 ^g	0,597±0,0003 ^a	0,567±0,002 ^b	115,57±0,06 ^a

UG: Uygulama Grupları. *: Aynı sütunda aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık önemli değildir (P<0,05).

Tartışma

Savrun ıspanak çeşidinde yapılan çalışmada tuz, ağır metal, kireç ve kurak uygulamalarının fotosentetik pigmentler, β-karoten ve likopen, prolin, toplam çözünür protein, lipid peroksidasyonu seviyesi, hidrojen peroksit konsantrasyonu ve antioksidan enzim aktivitelerinin değişimine önemli seviyede etki ettiği saptanmıştır.

Stres altındaki bitkilerde klorofil a, klorofil b, toplam klorofil ve karotenoidler olarak gruplandırılan fotosentetik pigment miktarları türe, stresin çeşidi, süresi, bitkinin yaşam döngüsü içerisindeki safhasına, stresin konsantrasyonu gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Araştırmacılar bu değişimin klorofil biyosentezi ve sentezden sorumlu enzimlerin inhibisyonu, kloroplast zar bütünlüğünün bozulması sonucu pigmentlerin degradasyonu ve diğer metabolik faaliyetlerin aksamasından kaynaklandığını bildirmektedirler (Foyer ve Shigeoka, 2011; Hortensteiner, 2006; Lutts ve ark.,

1996; Halliwell, 1987; Dhindsa ve ark., 1981). Karotenoidler yapraklarda klorofille birlikte bulunan, fotosentezde dolaylı olarak iş gören, antioksidant özelliğe sahip moleküllerdir (Keyvan, 2010; Smirnov, 2005; Nagata ve Yamashita, 1992).

Uygulamalar, Savrun ıspanak çeşidinde pigment miktarlarını konsantrasyona ve stres tipine bağlı olarak farklılıklara neden olmuştur. CaCO₃ ve kuraklık uygulamasında klorofil a, b, toplam klorofil ve karotenoid miktarı kontrol ve diğer stres uygulama gruplarına göre yüksektir. Ayrıca NiCl₂ ve 75 mM NaCl uygulamaları kl a miktarında çok az bir artışa neden olmuştur (Tablo 1). Pigment miktarının en fazla azalış gösterdiği uygulamalar sırasıyla 150 mM NaCl, ZnCl₂, 225 mM tuz ve FeCl₃ uygulamalarıdır. β-karoten ve likopen miktarları üzerine etkileri klorofil pigmentlerine benzer şekilde sonuçlanmıştır. Kuraklık ve CaCO₃ uygulamalarında β-

karoten ve likopen en yüksek değerde bulunmuştur. Pigmentlerin uygulamalardan etkilenme derecesi sırasıyla 150 mM, ZnCl₂, 225mM NaCl, FeCl₃ ve 75 mM NaCl olarak saptanmıştır. Likopen içeriğinin stres uygulamalarından, β-karotene göre daha az etkilendiği belirlenmiştir. β-karotenin uygulamalardan etkilenme derecesi 150 ve 225 mM NaCl, ZnCl₂, NiCl₂ ve 75 mM NaCl; likopenin etkilenme derecesi ise 150 mM NaCl, ZnCl₂ ve 225 mM NaCl uygulamaları şeklinde olmuştur.

Savrun ıspanak çeşidinde CaCO₃ ve kuraklıkta pigmentlerin artış göstermesi, ıspanağın kireç ve kurak stresine dayanıklı olmasıyla ilişkilendirilmiştir. Smirnoff (2005), Türkan ve ark. (2004), Mittova ve ark. (2002), Cornic ve Fresneasu (2002) toleranslı türlerde pigment içeriğinin duyarlı olanlara göre daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Tuz ve ağır metallerin pigmentlere etkisi olumsuz olmuştur. Kurnaz (2016), Zheng ve ark. (2011), Zengin ve Munzuroğlu (2006), Çakmak (2002), Hernandez ve ark. (1995) mineral yetersizliği, kuraklık, tuz, ışık, sıcaklık ve kirlilik gibi stres faktörlerinin bitkiler üzerindeki etkilerinin spesifik olduğu gibi, bazı semptomların benzer olduğunu bildirmektedir. Zengin ve Munzuroğlu (2006) ayçiçeğinde, Çiçek ve Çakırlar (2002) mısırdaki, Öncel ve Keleş (2002) buğdayda tuz stresinin, Dürüst ve ark. (2004) çamda, Zengin ve Munzuroğlu (2005) fasulyede, Stobart ve ark. (1985) Ni, Cu, Cd, Fe ve Hg gibi ağır metallerin, Zheng ve ark. (2011) *Lysimachia minoricensis* bitkisinde kuraklığın, klorofil biyosentezi ve sentezden sorumlu enzimlerin inhibisyonu, kloroplast zar bütünlüğünün bozulması sonucu ve serbest radikallerin pigmentleri parçalanması (Hernandez ve ark. 1995; Dhinsa ve ark., 1981) gibi olayların pigment içeriğinde azalmalara neden olduğunu ifade etmişlerdir.

Tuz, kuraklık, metal toksisitesi, mineral eksikliği ve toprak karakteristikleri gibi faktörler bitkilerde nükleik asit metabolizmasını etkileyerek protein metabolizmasını değiştirmektedir. Bu koşullarda protein parçalanması sonucu hücrelerde aminoasitler, amitler ve çeşitli metabolitler aşırı derecede birikerek, bitkilerde taşınma olaylarını ve enzim aktivitelerini de engellemektedir (Kurnaz ve ark., 2016; Parida ve ark., 2004; Cornic ve Fresneau, 2002).

Stres koşullarında protein içeriğinin artması, antioksidant enzimlerin uyarılması sonucu stres proteinlerinin sentezlenmiş olmasından kaynaklanmaktadır. Bu proteinler, hücrelerin sitoplazmik akışkanlığı ve ozmotik düzenlemesini koruyarak ve ayrıca azot kaynağı oluşturarak türlerin savunma mekanizmasını artırmakta buna mukabil aynı proteinlerin miktarının azalması durumunda ise genotipin duyarlılığının artmasına neden olmaktadır (Yıldız ve Terzi, 2008; Zhen ve Wang, 1989). Ispanak yapraklarının protein içeriği tüm uygulama gruplarında kontrole göre artmıştır (Tablo 2). Özellikle de kuraklık, CaCO₃, 150 mM NaCl ve ZnCl₂ uygulamalarında protein değeri en yüksek seviyededir. Uygulamaların protein içeriğine etkisi sırasıyla kuraklık, CaCO₃, 150 mM NaCl, ZnCl₂, NiCl₂, 75 ve 225 mM NaCl ve FeCl₃ şeklinde olmuştur. Çalışmada toplam çözünür protein miktarının artmasında Savrun ıspanak çeşidinin dayanıklı bir genotip olabileceğini düşündürmüştür. Zira stres faktörlerinin bitkilerde protein içeriğine etkisinin belirlenmesine yönelik çalışmalarda tolerant türlerde protein miktarının yüksek olduğu

saptanmıştır. Lamhamdi ve ark. (2013) kurşun uygulanmış ıspanaklarda protein içeriğinin yükseldiğini, El-Enany (1997), Dubey ve Rani (1989) tuzlulukta protein sentezinin arttığını; Aksu ve Yıldız (2004), Koç ve ark. (2012) çinkonun biberde protein içeriğini artırdığını bildirmişlerdir. Wang ve ark. (2010) soya fidelerinin kök hücrelerinde, farklı büyüme evrelerinde ve çiçeklenme ve bakla doldurma dönemlerinde çözünebilir şeker ve serbest aminoasit içeriğinin kuraklığa tolerant çeşitlerde maksimuma ulaştığını ancak duyarlı genotiplerde ise azaldığını ve Manivasagaperumal ve ark. (2011)'de, *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub'da uygulanan düşük Zn konsantrasyonlarında proteinin içeriğinin yüksek olduğunu, Zn düzeyindeki artışa bağlı olarak ise protein miktarında azalma olduğunu tespit etmişlerdir.

Stres koşullarında miktarı artan bir diğer bileşik prolin dir. Bu nedenle araştırmacılar, bitkilerde prolin birikimi ve strese tolerans arasında pozitif ilişki olduğunu, prolinin hücre içi ozmotik dengenin sağlanması, radikallerin temizlenmesi, membran bütünlüğü, protein ve DNA yapısının korunması, kullanılabilir azot birikimi gibi biyolojik olaylarda önemli rol oynadığını ve ayrıca tolerant türlerde daha fazla prolin biriktiğini bildirmektedirler (Keyvan, 2010; Koca ve ark., 2007). Ispanakta NiCl₂, 75 ve 150 mM NaCl'de prolin miktarı kısmi bir artış görülmüştür. CaCO₃ ve ZnCl₂ ise prolin miktarını çok düşürmüştür (Tablo 2). Sultana ve ark. (2016) bitki büyüme düzenleyicileri uygulanmış ıspanaklarda prolin miktarının düştüğünü; Lamhamdi ve ark. (2013) kurşun uygulanmış ıspanaklarda prolin miktarının azaldığını bildirmişlerdir. Prolin miktarındaki azalmanın, protein miktarının yüksek olmasından ve ayrıca uygulamaların prolin sentezini baskılamış olmasından kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır. Araştırmacılar bitki dokularında protein miktarının korunduğu koşullarda prolin kullanımının arttığını ve bu nedenle de hücrelerde prolin içeriğinin düştüğünü bildirmişlerdir (Kim ve ark., 2004; Galston ve ark., 1999; Dubey, 1994).

Malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyonunun son ürünüdür. Hücrelerde yüksek seviyede MDA birikimi, hücre düzeyinde stres faktörlerinin neden olduğu aşırı lipid peroksidasyonunu göstermektedir (Türkan ve ark., 2004; McDonald ve Archbold, 1998; Lutts ve ark., 1996). Ispanak yapraklarında MDA içeriği sadece FeCl₃'te yüksek bulunmuştur. Diğer uygulamalarda MDA oldukça düşük değerlerdedir. Uygulamaların MDA içeriğine etkisi sırasıyla NiCl₂, ZnCl₂, 225 mM, 75 mM NaCl, kuraklık, 150 mM NaCl ve CaCO₃ uygulamaları şeklinde olmuştur (Tablo 2). MDA verileri Savrun ıspanak çeşidinin oldukça tolerant bir çeşit olduğunu göstermektedir. Çünkü araştırmacılar, MDA kendi başına çok güçlü bir radikal üretici bileşik olduğunu, bitki hücre ve dokularında MDA miktarı düşük ise o türün etkili bir radikal temizleme mekanizması olduğunu ve aynı zamanda toleransının yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Yıldız ve Terzi, 2008; Zengin ve Munzuroğlu, 2006). Nitekim Terzi ve ark. (2010) kuraklık koşullarında tolerant türlerde MDA miktarının çok düşük olduğunu; Perez ve ark. (2009), Shalata ve ark. (2001) tuzlu koşullarda tolerant türlerde MDA miktarının duyarlı olanlara oranla daha düşük olduğunu saptamışlardır. MDA konsantrasyonunun FeCl₃

uygulanmasında artmasında ise membranların zarar görmesi ve bu uygulamada oldukça yüksek H₂O₂ içeriğinden kaynaklanmış olabileceği sonucuna varılmıştır.

Hidrojen peroksit (H₂O₂), metabolik yollarla oluşabilen, düşük konsantrasyonları strese dayanım ya da savunma ile ilgili genlerin uyarılmasında, savunma cevaplarının oluşmasında rol oynayan, yüksek konsantrasyonları membran lipitlerinin de dahil olduğu biyomoleküllere hasar vererek oskidatif stresin ve dolayısıyla da ROS oluşumuna neden olan bir bileşiktir (Cruz ve ark., 2013; Bolwell ve ark., 2002; Velikova ve ark., 2000; Halliwell, 1987). Çalışmada FeCl₃, NiCl₂ ve CaCO₃ stres uygulamalarında H₂O₂ en yüksek, 225 mM NaCl ve kuraklık uygulamalarında ise en düşük değerde bulunmuştur. Analiz sonuçlarına göre Savrun ıspanak çeşidi 75 ve 225 mM NaCl, kuraklık, ZnCl₂, NiCl₂ uygulamalarına tolerans, FeCl₃ ve CaCO₃ uygulamalarına ise duyarlılık göstermiştir. Kavas ve ark. (2013), kuraklık koşullarında kavun fidelerinde H₂O₂ içeriğinin azaldığını, Burzynski ve Klobus (2004) ağır metallerin H₂O₂ içeriğini konsantrasyona bağlı olarak değiştirdiğini gözlemlemişlerdir. Vinod ve ark. (2012), Singh ve Malik (2011) yüksek konsantrasyonlarda ağır metal uygulamalarının H₂O₂ içeriğini artırdığını bildirmişlerdir.

Biyotik ve abiyotik stres bitki hücrelerinde birçok karışık savunma mekanizmasını harekete geçirmektedir. Savunmada biyokimyasal mekanizmalarda askorbat peroksidaz (APX), guaiakol peroksidaz (GuPX), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan moleküller görev almaktadır (Kavas ve ark., 2013; Foyer ve Shigeoka, 2011; Koca ve ark., 2007). Ispanakta APX aktivitesi, 75 mM NaCl ve ZnCl₂ uygulamasında düşük, diğer uygulamalarda yüksek bulunmuştur. APX aktivitesi en yüksek FeCl₃, CaCO₃, %50 kurak, NiCl₂ ve 150 mM NaCl uygulamalarında saptanmıştır (Tablo 3). GuPX, tüm uygulama gruplarında kontrole göre artış göstermiştir. GuPX aktivitesi FeCl₃, ZnCl₂, NiCl₂ ve 225 mM NaCl uygulamalarında diğer uygulamalara göre daha yüksek bulunmuştur (Tablo 3). CAT aktivitesi %50 kurak ve 150 mM NaCl uygulamalarında düşüktür, ancak enzim aktivitesindeki bu azalışın istatistiksel önemi yoktur. CAT aktivitesi de FeCl₃, NiCl₂, ZnCl₂, 75 ve 225 mM NaCl uygulamalarında oldukça yüksektir (Tablo 3). Uygulamalarda SOD aktivitesi, kuraklık, CaCO₃ ve 225 mM NaCl uygulamalarında en düşük, 75 mM NaCl, ZnCl₂ ve 225 mM NaCl uygulamalarında en yüksektir (Tablo 3). Enzim aktivite verilerine göre ıspanakta her üç enzim aktivitesi FeCl₃ ve NiCl₂ uygulamalarında yüksektir. 75 mM NaCl ve ZnCl₂'de CAT, GuPX ve SOD aktivitesi ve 225 mM NaCl ve CaCO₃'te APX, CAT ve GuPX ve kuraklık uygulamasında ise APX ve GuPX aktiviteleri yüksektir. Enzim aktivite bulguları, stres koşullarında enzim aktivite değişimlerini araştıran araştırmacıların bulgularıyla örtüşmektedir. Birçok araştırmacı kuraklık, tuz, ağır metal toksisitesi, mineral stresi, ışık, sıcaklık, toprağın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin bozulması gibi abiyotik stres faktörlerinin CAT, SOD, GuPX, GR ve APX gibi enzim aktivitelerini bitkilerin genetik yapılarına bağlı olarak değişim gösterdiklerini ifade etmişlerdir (Prasad ve ark., 2014; Mittova ve ark., 2002). Yine Koç ve ark. (2012) biberde Zn, Doğanlar ve ark. (2012) lemnada Ni, Oidaire ve ark. (2000) çeltikte tuz

uygulamalarının APX aktivitesini artırdığını; Shalata ve ark. (2001), tuz stresinin CAT aktivitesini artırdığını, Polesskaya ve ark. (2006) ise bu CAT aktivitesinin tuzlu koşullarda düştüğünü; Lee ve Lee (2000) tuzluluğun SOD; Shalata ve ark. (2001) ve Doğan ve ark., (2010) tolerant türlerde SOD aktivitesinin tuzlu koşullarda duyarlı olanlara göre yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca ağır metal uygulamalarının buğdayda CAT aktivitesini artırdığı (Ergün ve ark., 2011), ağır metal uygulamalarının ıspanakta APX, SOD ve POD aktivitesini artırırken CAT aktivitesini düşürdüğü (Pandey ve ark., 2009; Pandey ve Pathak, 2006), Cu, Ni ve Zn uygulanmış sahil ayrığı bitkisinde SOD aktivitesinin her üç metal uygulamasında yüksek, CAT aktivitesinin ise Zn ve Cu uygulamalarında yüksek olduğu (Rastgoo ve ark., 2014) belirlenmiştir.

Sonuç

Çalışma sonucunda, *Spinacea oleacea* L. Savrun ıspanak çeşidinde, klorofil a, b, toplam klorofil ve karotenoid CaCO₃ ve kuraklık, β-karoten kuraklık ve CaCO₃, toplam çözünür protein tüm stres uygulama gruplarında, prolin NiCl₂, 75 ve 150 mM NaCl; APX aktivitesi 75 mM NaCl ve ZnCl₂, CAT 150 mM NaCl ve kuraklık hariç diğer uygulamalarda; GuPX tüm uygulama gruplarında; SOD aktivitesi ise kuraklık, CaCO₃ ve 225 mM NaCl uygulamalarında yüksek bulunmuştur. MDA konsantrasyonu FeCl₃ hariç diğer uygulamalarda düşük, H₂O₂ ise 225 mM NaCl ve kuraklık uygulamasında düşük diğer uygulamalarda yüksek olduğu anlaşılmıştır. Tüm veriler göz önünde bulundurulduğunda ise Savrun ıspanak çeşidi CaCO₃, kuraklık ve NiCl₂ uygulamalarına toleranslı, 225 mM NaCl, ZnCl₂ ve FeCl₃ uygulamalarına ise duyarlı ve 75 mM tuz uygulamasına ise orta derecede toleranslı bulunmuştur. Toleransın belirlenmesinde APX, CAT, GuPX ve SOD enzimlerin uyarıcı etkisi yanında fotosentetik pigmentler, karoten ve likopenler, protein, MDA miktarları da pozitif yönde antioksidant aktivitelerini etkileyerek Savrun ıspanak çeşidinde kireç, kuraklık ve nikel uygulamalarına strese karşı tolerans artırıcı etki yapmıştır.

Teşekkür

Proje dışı bir çalışma olarak yürütülen ve hazırlanan bu makale, KÜBAP-01/2013-17 ve KÜBAP-01/2014-21 projelerinin imkânları kullanılarak yürütülmüştür. Teşekkürü borç biliriz.

Kaynaklar

- Aksu E, Yıldız N. 2004. Heavy Metal Stress and Tolerance of Plants. International Soil Congress on Natural Resource Management for Sustainable Development. Erzurum.
- Arnon DI. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplast. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology, 24: 1-10.
- Bates LS, Waldern RP, Teare ID. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil, 39: 205-207.
- Bergmeyer HU. 1974. Methods of Enzymatic Analysis. New York, Academic Press. Biol. Plant. 39: 303-308.

- Bergquist AM, Gertsson UE, Nordmark YG, Olsson ME. 2007. Ascorbic Acid, Carotenoids, and Visual Quality of Baby Spinach as Affected by Shade Netting and Postharvest Storage. *J. Agric. Food Chem.* 55: 8444-8451.
- Bolwell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt, VS, Davies, DR, Gardner SL, Gerrish C, Minibayeva F. 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a tree component system. *J. Exp. Bot.* 53: 1367-1376.
- Bradford MM. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72: 248.
- Briemer T. 1982. Environmental factors and culture measures affecting the nitrate content of spinach. *Fertility Residual.* 3: 191-291.
- Chance B, Maehly SK. 1995. Assay of catalase and peroxidase. *Methods Enzymol.* 2: 764-775.
- Cornic G, Fresneau C. 2002. Photosynthetic carbon reduction and oxidation cycles are the main electron sinks for photosystem II activity during a mild drought. *Ann. Bot.* 89: 887-94.
- Cruz FJR, Castro, GLS, Silva JDD, Festucci-Buselli RA, Pinheiro HA. 2013. Exogenous glycine betaine modulates ascorbate peroxidase and catalase activities and prevent lipid peroxidation in mild water-stressed *Carapa guianensis* plants. *Photosynthetica*, 51: 102-108.
- Çakmak İ. 2002. Plant nutrition Research: Priorities to Meet Human Needs for Food in Sustainable Ways. *Plant and Soil*, 247: 3-24.
- Çiçek N, Çakırlar H. 2002. The Effect of Salinity on Some Physiol. Parameters in two Maize Cult..Bulg. *J.Plant Physiol.* 28(1-2): 6674.
- Dhindsa RS, Plumb DP, Thorpe TA. 1981. Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.* 32: 93-101.
- Doğan M, Tıprıdamaz R, Demir Y. 2010. Salt Resistance of Tomato Species Grown in Sand Culture, *Plant Soil Environment*, 56 (11): 499-507.
- Doğanlar ZB, Cakmak S, Yanik T. 2012. Metal Uptake and Physiological Changes in Lemna gibba Exposed to Manganese and Nickel. *I J Biol.* 4(3): 148-157.
- Dubey RS and Rani M. 1989. Influence of NaCl salinity on growth and metabolic status of protein amino acids in rice seedling. *J. Agron. Crop Sc.* 162: 97-106.
- Dubey RS. 1994. Protein synthesis by plants under stressful conditions. pp.277-299. In: M. Pessarakli (Ed.), *Handbook of Plant and Crop Stress*, Macel Dekker Inc., New York.
- Dürüst N, Dürüst Y, Tuğrul D, Zengin M. 2004. Heavy Metal Contents of *Pinus Radiata* Trees of İzmit (Turkey). *Asian Journal of Chemistry*, 16(2): 1129-1134.
- El-Enany AE. 1997. Shoot regeneration and protein synthesis in tomato tissue cultures. *Biol.Plant*, 39: 303-308.
- Elia A, Santamaria P, Serio F. 1999. Nitrogen Nutrition, Yield and Quality of Spinach. *Journal of Food Science and Agriculture*, 76: 341-346.
- Ergün N, Mutlu A, Özçubuk S. 2011. Sıcaklık-Ağır Metal (Cr ve Cu) Etkileşimlerinin Buğday Fidelerinde Büyüme ve Katalaz Aktivitesi Üzerine Etkileri. *C. U. Fen Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, Cilt 32, No:1.
- Eyüpoğlu F, Kurucu N, Talaz S. 1998. Türkiye Topraklarının Bitkiye Yarayışlı Mikroelementler Bakımından Genel Durumu. T.C. Başbakanlık Köy Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Toprak ve Gübre Araştırma Ens. Müd. Genel Yayın: 217, Seri No: R-133, Ankara.
- Foyer CH, Shigeoka S. 2011. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiology*, 155: 93-100.
- Galston AW, Kaur-Sawhney R, Atabella T, Tiburcio AF. 1999. Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. *Bot. Acta*, 110: 197-207.
- Halliwell B. 1987. Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. *Chem. Phys. Lipids*, 44: 327-340.
- Hernandez JA, Olmos E, Corpas FJ, Sevilla F, Del Rio IA. 1995. Salt-Induced Oxidative Stress in Chloroplasts of Pea Plants. *Plant Sci.* 105: 151-167.
- Kansal BD, Singh B, Bajaj KL, Kaur G. 1981. Effect of Different Levels of Nitrogen and Farmyard Manure on Yield and Quality of Spinach (*Spinacea oleracea* L.). *Qual. Plant. Plant Foods Hum. Nutr.* 31: 163-70.
- Kavas M, Baloğlu MC, Akça O, Köse F, Gökçay D. 2013. Effect of drought stress on oxidative damage and antioxidant enzyme activity in melon seedlings. *Turkish Journal of Biology*, 37: 491-498.
- Keyvan S. 2010. The effects of drought stress on yield, relative water content, proline, soluble carbohydrates and chlorophyll of bread wheat cultivars. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 8(3): 1051-1060.
- Kim TH, Lee BR, Jung WJ, Kim KY, Avice JC, Qurry A. 2004. Denovo protein synthesis in relation to ammonia and proline accumulation in water stressed white clover. *Funct. Plant Biol.* 31: 847-855.
- Koca H, Bor M, Özdemir F, Türkan İ. 2007. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 60: 344-351.
- Koç E, Üstün SA, Arıcı YK. 2012. Biber (*Capsicum annum* L.) Fidelerinde Farklı Çinko Konsantrasyonlarının Total Protein, Hidrojen Peroksit İçeriği ve Peroksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi. *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 13(2): 205-212.
- Kurnaz A, Mutlu E, Uncumusaoğlu AA. 2016. Determination of Water Quality Parameters and Heavy Metal Content in Surface Water of Çiğdem Pond (Kastamonu/Turkey). *Turkish Journal of agriculture –Food Science and Technology*, 4(10): 907-913.
- Kurnaz A. 2016. First Detailed Measurements of Environmental Radioactivity and Radiation Hazard Assessment for Gerze-Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 25(1): 153-162.
- Lamhamdi M, Galiou Q, Bakrim A, No'voa-Mun' oz JC, Arias-Este'vez M, Aarab A, Lafont R. 2013. Effect of lead stress on mineral content and growth of wheat (*Triticum aestivum*) and spinach (*Spinacia oleracea*) Seedlings. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 20: 29-36.
- Lee DH, Lee CB. 2000. Chilling Stres-induced Changes of Antioxidant Enzymes in the Leaves of Cucumber in Gel Enzyme Activity Assays. *Plant Science*, 159: 75-85.
- Lutts S, Kinet JM, Bouharmont J. 1996. NaCl-Induced Senescence in Leaves of Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars Differing in Salinity Resistance. *Annals of Botany*, 78: 389-398.
- Manivasagaperumal R, Balamurugan S, Thiyagarajan G, Sekar J. 2011. Effect of Zinc on Germination, Seedling Growth and Biochemical Content of Cluster Bean (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub). *Curr. Bot.* 2: 11-15.
- McDonald S, Archbold D. 1998. Membrane competence among and within *Fragaria* species varies in response to dehydration stress. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 123(5): 808-813.
- Mittova V, Tal M, Volokitta M, Guy M. 2002. Salt Stress Induces Up-regulation of an Efficient Chloroplast Antioxidant System in the SALT-tolerant wild Tomato Species *Lycopersicon pennellii* but not in the Cultivated Species. *Physiologia Plantarum*, 115: 393-400.
- Mutlu E, Uncumusaoğlu AA. 2016. Kuruçay Deresinin Su Kalitesinin Fiziko- Kimyasal Analizi. *Türk Tarm-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 4(11): 991-998.
- Nagata M, Yamashita I. 1992. Simple Method for Simultaneous Determination of Chlorophyll and Carotenoids in Tomato Fruit. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish*, 39 (10): 925-928.

- Nakano Y, Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 21: 1295-1307.
- Oidaire H, Sano S, Koshiha T, Ushimaru T. 2000. Enhancement of Antioxidative Enzyme Activities in Chilled Rice Seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 156: 811-813.
- Öncel I, Keleş Y. 2002. Tuz Stresi Altındaki Buğday Genotiplerinde Büyüme, Pigment İçeriği ve Çözünür Madde Kompozisyonunda Değişmeler. C.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi, 23(2): 9-16.
- Pandey N, Pathak GC, Pandey KD, Pandey R. 2009. Heavy Metals, Co, Ni, Cu, Zn and Cd Produce oxidative damage and evoke differential antioxidant response in spinach. *Braz. J. Plant. Physiol.* 21(2): 103-111.
- Pandey N, Pathak GC. 2006. Nickel alters antioxidative defense and water status in green gram. *Indian J. Plant Physiol.* 11: 113-118.
- Parida AK, Das AB, Mitra B, Mohanty P. 2004. Salt-stress induced alterations in protein profile and protease activity in the mangrove, *Bruguiera parviflora*. *Z. Naturforsch.* 59: 408-414.
- Pérez-López U, Robredo A, Lacuesta M, Sgherri C, Muñoz-Rueda A, Navari-Izzo F, Mena-Petite A. 2009. The oxidative stress caused by salinity in two barley cultivars is mitigated by elevated CO₂. *Physiol. Plant*, 135: 29-42.
- Poleskaya OG, Kashirina EI, Alekhina ND. 2006. Effect of Salt Stress on Antioxidant System of Plants as Related to Nitrogen Nutrition, *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(2): 186-192.
- Prasad DAG, Rahimpouran S, Komala HP. 2014. Ecotoxicological effects of iron on the activities of antioxidant enzymes in Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seedlings. *Int. J. Pure App. Biosci.* 2(5): 118-123.
- Rastgo L, Alemzadeh A, Tale MA, Tazangi SE, Eslamzadeh T. 2014. Effects of copper, nickel and zinc on biochemical parameters and metal accumulation in gouan, *Aeluropus littoralis*. *Plant Knowledge Journal*, 3(1): 31-38. ISSN: 2200-5390 Australia.
- Shalata A, Mittova V, Volokita Guy M, Tal M. 2001. Response of the Cultivated Tomato and its Wild Salt-Tolerant Relative *Lycopersicon pennelli* to Salt-Dependent Oxidative Stress: The Root Antioxidative System. *Physiologia Plantarum*, 112: 487-494.
- Singh Y, Malik CP. 2011. Phenols and their antioxidant activity in Brassica juncea seedlings growing under HgCl₂ stress. *J. Microbiol. Biotech. Res.* 1 (4): 124-130.
- Smirnoff N. 2005. Ascorbate, Tocopherol and Carotenoids: Metabolism, Pathway Engineering and Functions. In: Smirnoff N, Ed. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd. p:53-86.
- Stobart AK, Griffiths WT, Amcen-Bukhari I, Sherwood, RP. 1985. The effect of Cd⁺² on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiol. Plant*, 63: 293-298.
- Sultana B, Aslam M, Anwar F, Munir H. 2016. Foliar spray of selected plant growth regulators affected the biochemical and antioxidant attributes of spinach in a field experiment. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 40: 136-145.
- Toledo MEA, Ueda Y, Imahori Y, Ayaki, M. 2003. L-ascorbic acid metabolism in spinach (*Spinacia oleracea* L.) during postharvest storage in light and dark. *Journal of Postharvest Biology and Technol.* 28: 47-57.
- Turfan N, Kurnaz A, Alay M, Saryıldız T. 2016. Determining of Some Chemical Properties in Taşköprü Garlic Stored in Different Conditions. *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, 16 (2): 427-437.
- Türkan İ, Bor M, Ozdemir F, Koca H. 2004. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought tolerant *P. acutifolius* gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Sci.* 168: 223-231.
- Velikova V, Yordanov I, Edrava A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151: 59-66.
- Vinod K, Awasthi G, Chauhan PK. 2012. Cu and Zn tolerance and responses of the Biochemical and Physiochemical system of Wheat. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 8(3): 203-213.
- Wang L, Chen G, Zhang G, Li X, Ni S, Yang R. 2010. Water use efficiency of soybean under different mulching in dryland. *Soybean Science*, 9(5): 767-771.
- Welch RM. 2002. The impact of mineral nutrients in food crops on global human health. *Plant and Soil*, 247: 83-90.
- Witham FH, Blaydes DF, Devlin RM. 1971. Experiments in plant physiology, pp 55-56. Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- Yıldız M, Terzi H. 2008. Effects of NaCl on protein profiles of tetraploid and hexaploid wheat species and their diploid wild progenitors. *Plant Soil Environ.* 54: 227-233.
- Zengin FK, Munzuroğlu Ö. 2005. Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Acta Biologica Cracoviensia*, 47(2): 157-164.
- Zengin FK, Munzuroğlu Ö. 2006. Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) Fidelerinin Toplam Çözünür Protein, Prolin ve Klorofil Miktarları Üzerine Civa Klorürün (HgCl₂) Etkileri. *Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Der.* 18 (1): 25-30.
- Zheng Y, Liu Y, Guo K, Fan Dayong, Li Guoqing, Yu L, Yang R. 2011. Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China *Environmental and Experimental Botany*, 71: 174-180.