

Kuraklık ve Tuz Streslerine Maruz Kalan Tütün (*Nicotiana tabacum* L.) Bitkisinde Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Parametreler Üzerine Melatoninin Etkileri

Armağan KAYA¹ , Memet İNAN² 

¹Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Mühendislik Temel Bilimleri Bölümü Alanya/Antalya, ²Adıyaman Üniversitesi Kahta Meslek Yüksekokulu Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Kahta/Adıyaman

✉ : armagan-kaya@hotmail.com

ÖZET

Bitkiler kuraklık ve tuzluluk gibi abiyotik stres faktörlerine sıklıkla maruz kalırlar. 2016 yılında yapılan bu çalışma tuzluluk ve kuraklık streslerinin ayrı ayrı ve eş zamanlı olarak uygulandığında tütün bitkisinde meydana gelen değişimleri belirlemek ve dışarıdan yapılan melatonin uygulamasının bu değişimler üzerine etkisini saptamak amacıyla, iklimlendirme odasında, saksılarda 3 tekrarlamalı olarak yürütülmüştür. Bu amaçla saksılara dikilen tütün fidelerinin yarısına püskürtme yolu ile bir kez 50 µM melatonin uygulanırken, diğer yarısına uygulama yapılmamıştır. Stres ve kontrol gruplarında klorofil, karotenoid, prolin ve malondialdehit içerikleri ile askorbat peroksidaz ve guaiakol peroksidaz aktiviteleri incelenmiştir. Dışsal melatonin uygulaması yapılmadan NaCl (50 mM) ve PEG (%10) streslerine hem ayrı ayrı, hem de eş zamanlı (50 mM NaCl + % 10 PEG) maruz kalan tütün bitkilerinde klorofil içeriği azalmıştır. Bu bitkilerde karotenoid, prolin ve malondialdehit içerikleri ile askorbat peroksidaz ve guaiakol peroksidaz aktiviteleri artmıştır. Bu değişimlerin eş zamanlı stres uygulanan bitkilerde daha belirgin olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte 50 µM melatonin uygulaması pigment, prolin ve malondialdehit içerikleri ile enzim aktivitelerini arttırmıştır. Bu çalışma yapraklara melatonin uygulamasının tütün bitkisinde stres cevaplarını düzenleyerek kuraklık ve tuzluluğun olumsuz etkilerini azalttığını göstermektedir.

DOI : 10.18016/ksudobil.350965

Makale Tarihçesi

Geliş : 10.11.2017

Kabul : 15.01.2018

Anahtar Kelimeler

Nicotiana tabacum,
Antioksidan,
Melatonin,
Stress

Araştırma Makalesi

Effect of Melatonin on some of the Physiological and Biochemical Parameters of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) under Drought and Salt Stresses

ABSTRACT

Plants are generally exposed to abiotic stress factors such as drought and salt. Objective of this study was to compare the changes that salinity and drought stress would create simultaneously and individually on tobacco plant and to determine the changes by melatonin application. A pot experiment was conducted in a growth chamber and replicated three times in 2016. For this reason, half of the plants were subjected to 50 µM melatonin, the other half was left untreated. Prior to the melatonin application, NaCl (50 mM) and PEG (10%) stress effects were applied both individually and combined (50 mM NaCl + 10% PEG). The results indicated that chlorophyll content in tobacco plants was decreased, however the carotenoid contents, proline, malondialdehyde and activities of ascorbat peroxidase and guaiacol peroxidase were increased. Mentioned activity changes were even greater for the combined stress factor application. On the other hand, in 50 µM melatonin applied plants were found to be increasing in enzymatic activity as well as the contents of pigment, prolin and malondialdehite. This study illustrated that melatonin application on the leaves coordinates the stress response and decreases the negative effect of the drought and salinity.

Article History

Received : 10.11.2017

Accepted : 15.01.2018

Keywords

Nicotiana tabacum,
Antioxidant,
Melatonin,
Stress

Research Article

To Cite : Kaya A, İnan M 2018. Kuraklık ve Tuz Streslerine Maruz Kalan Tütün (*Nicotiana tabacum* L.) Bitkisinde Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Parametreler Üzerine Melatoninin Etkileri. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 21(4):559-564, 2018. DOI:10.18016/ksudobil.350965

GİRİŞ

Bitkiler doğal çevrelerinde fizyolojik ve biyokimyasal zararlar oluşturarak ürünlerin kalitesini bozabilen birçok stres faktörüne maruz kalırlar (Büyük ve ark., 2012). Kuraklık bitkilerin sıklıkla maruz kaldığı stres faktörlerinden biridir. Dünya çapında su kaynaklarının azalması ile birlikte özellikle kurak ve yarı kurak geçiş bölgelerinde bulunan ülkelerde kuraklık bitki gelişimini sınırlandıran önemli bir etken haline gelmiştir (Örs ve Ekinci, 2015). Kuraklık bitkilerde büyüme ve verimi etkilemekle birlikte metabolik, mekanik ve oksidatif birçok değişikliğe sebep olmaktadır (Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005). Yüksek molekül ağırlığına sahip bir madde olan polietilen glikol (PEG) bulunduğu ortamın ozmotik potansiyelini ayarlayarak su alımını düzenler ve istenilen su stresi koşullarını oluşturabilir (Çarpıcı ve Erdel, 2015; Tiryaki 2016). Literatürde kuraklık stresi oluşturabilmek için PEG kimyasalının kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Van den Berg ve Zeng, 2006; Bayomi ve ark. 2008; Çarpıcı ve Erdel, 2015; Tiryaki 2016).

Tuzluluk bitkilerde osmotik ve iyon stresine neden olarak büyüme ve gelişmeyi olumsuz yönde etkileyen bir diğer stres faktörüdür. Tuzluluğun bitki üzerinde gösterdiği olumsuz etkiler tuzun çeşidine, stresin düzeyine ve süresine, bitkinin türüne ve gelişme durumuna bağlı olarak değişmektedir (Çulha ve Çakırlar, 2011).

Bitkilerde hücrel metabolizmanın bir sonucu olarak reaktif oksijen türleri (ROS) sürekli üretilir ve normal koşullarda ROS'ların miktarı antioksidan savunma ve çeşitli koruma sistemleri ile düşük düzeyde tutulur. Ancak kuraklık ve tuzluluk gibi abiyotik stres şartları altında bitkilerde ROS üretimi artar ve artan ROS seviyesi lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, enzim inhibisyonu, klorofil parçalanması, DNA ve RNA hasarı ve hücre ölümlerine sebep olarak bitkiye zarar verir. Bitkilerde enzimatik (guaiakol peroksidaz (POD), askorbat peroksidaz (APX), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) vs.) ve enzimatik olmayan (karotenoid, glutatyon, askorbat vs.) antioksidanlar ROS seviyesini düzenleyerek bitkilerin stres şartları altında yaşamlarını sürdürmesini sağlarlar (Mittler, 2002; Çulha ve Çakırlar, 2011; Büyük ve ark., 2012).

Antioksidan savunmanın yetersiz kaldığı durumlarda bitkilere dışarıdan uygulanan maddelerle bitkinin stres direnci artırılabilir. Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) ilk olarak sığır beyin üstü bezinden izole edilen ancak daha sonra varlığı bakteri, alg, omurgasızlar ve bitkilerde de saptanan bir hormondur (Lerner ve ark., 1958; Kobylinska ve

Posmyk, 2016). Melatonin (Mel) bitki büyüme ve gelişmesinde farklı fonksiyonlara sahiptir. Mel'in bitkilerde kök ve gövde büyümesini düzenlediği, çimlenmeyi ve kök oluşumunu teşvik ettiği ve yaprak dökümünü geciktirdiği bilinmektedir (Arnao ve Hernandez-Ruis, 2014). Bununla birlikte kuraklık, radyasyon, ekstrem sıcaklık ve kimyasal kirleticiler gibi pek çok abiyotik strese karşı bitkinin stres toleransını geliştirmektedir (Zhang ve ark., 2014). Tüm bu özelliklerinden dolayı son yıllarda Mel'in stres üzerine etkilerini araştıran çalışmalar artmıştır (Korkmaz ve ark., 2016; Kobylinska ve Posmyk, 2016; Kobylinska ve ark., 2017). Tütün hücre kültürleri ile yapılan çalışmalarda ağır metal stresinin yol açtığı hücre ölümlerine karşı Mel'in koruyucu rol oynadığı belirlenmiştir (Kobylinska ve Posmyk, 2016; Kobylinska ve ark., 2017)

Tütün (*Nicotiana tabacum*) Solanaceae (Patlıcangiller) familyasına ait olup kurutulmuş yapraklarından yararlanılan tek yıllık bir endüstri bitkisidir. Tütün bitkisinin kurutulmuş yaprağı tütün mamulleri sanayiinin hammaddesidir. Dünya genelinde 120'den fazla ülkede yaklaşık 4 milyon hektar alanda tütün yetiştiriciliği yapılmaktadır (Anonim, 2013). Yetiştirme şartları açısından fazla seçici olmayan tütün Türkiye koşullarına da iyi adaptasyon sağlamıştır. İnsan sağlığına olan zararı tartışılmakla birlikte ekonomiye katkısı ve sağladığı istihdam açısından tütün Türkiye için önemli bir tarım ürünüdür (Karabacak, 2017).

Her ne kadar tuzluluk ve kuraklık stresi ile ilgili çalışmalar yapılmış olsa da tütün bitkisinde bu stresler üzerine Mel'in etkileri ile ilgili bir araştırmaya ulaşılamamıştır. Stres şartları altında tütün yaprağında görülen olumsuz etkileri iyileştirme ile ilgili çalışmalar istenilen düzeyde değildir. Bu çalışmanın amacı; ekonomik değeri olan tütün bitkisinde tuzluluk ve kuraklık streslerinin ayrı ayrı ve eş zamanlı uygulanması sonucu meydana gelen bazı stres cevapları üzerine dışarıdan yapılan melatonin uygulamasının etkilerini saptamaktır.

MATERYAL ve METOT

Bitki Gelişimi ve Uygulamalar

Çalışmada bitkisel materyal olarak yerel "şark tipi" tütün fideleri Adıyaman/Çelikhan'da tütün üretimi yapan çiftçilerden temin edilmiştir. Aynı gelişme dönemindeki fideler, torf: perlit karışımı (3:1) içeren 7 litrelik (28 x 22,5 cm) saksılara her saksıda üç fide olacak şekilde üç tekrarlamalı olarak toplam 24 adet saksıya dikilmiş, 30°C sıcaklık ve % 65 nem koşullarına sahip iklim odasına yerleştirilmiştir. Fidler canlanmaya başladıktan 10 gün sonra,

saksuların yarısına 50 µM Mel (% 0.02 Tween 20 içinde hazırlandı) tüm bitki yapraklarına aynı oranda püskürtme yolu ile bir defa uygulanmıştır. Saksuların diğer yarısında ise Mel uygulaması yapılmadan sadece % 0.02 Tween 20 çözeltisi yapraklara püskürtülmüştür. Yapraklara dışarıdan yapılan Mel uygulamasından iki gün sonra hem Mel uygulaması yapılan [Mel(+)], hem de yapılmayan [Mel(-)] bitkiler üç farklı gruba ayrılarak stres uygulanmıştır. Birinci grup bitkilere sadece 50 mM NaCl, ikinci grup bitkilere sadece %10 PEG ve üçüncü grup bitkilere 50 mM NaCl ve %10 PEG birlikte uygulanmıştır. Konsantrasyonlar literatür taramaları sonucu belirlenmiştir. Stres uygulamasının 21. gününde hem kontrol hem stres gruplarındaki bitkinin tüm yaprakları toplanmış ve -80 °C’de saklanmıştır.

Klorofil ve Karotenoid İçeriklerinin Tayini

Pigmentlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması işleminde De Kok ve Graham (1980) yöntemi kullanılmıştır. 1 gr yaprak örneği 50 mL aseton içerisinde homojenize edilmiş ve örneklerin absorbans değerleri Lichtenthaler ve Welburn (1983)’a göre 662, 645, 470 nm’de spektrofotometrede okunmuştur.

Peroksidaz (POD) ve Askorbat Peroksidaz (APX) Tayini

0.5 gr yaprak dokusu 2,5 mL 0,1 M pH 7,5 Tris-HCl tamponu, 2,5 mL 0.1mM EDTA ve 0.5 mL % 1’lik PVP içerisinde homojenize edilmiş ve homojenat 4 °C’de 15.000 rpm’de 20 dak santrifüj edilerek süpernatan elde edilmiştir (Andrews, 2005).

POD tayini Mac Adam ve ark., (1992)’a göre yapılmıştır. Reaksiyon karışımı 3 mL 0.1 M fosfat tampon, 400 µL 0.03 M H₂O₂, 500 µL 0.2 M guaiacol ve 100 µL ekstrakt eklenerek hazırlanmış ve enzim aktivitesi spektrofotometrede 436 nm’de 1 dakikada elde edilen absorbans değişimi olarak belirlenmiştir. APX tayini Nakano ve Asada, (1981) ve Cakmak (1994)’a göre yapılmıştır. Reaksiyon karışımı 550 µL fosfat tamponu (pH 7.6), 100 µL 10 mM EDTA ve 12 mM H₂O₂ karışımı, 250 µL ekstrakt ve 100 µL 0.25 mM askorbik asit olarak hazırlanmış ve enzim aktivitesi spektrofotometrede 290 nm’de 1 dakikada elde edilen absorbans değişimi olarak belirlenmiştir.

Prolin tayini

Yöntem Bates ve ark., (1973)’a göre yapılmıştır. 0.5 g yaprak dokusu %3’lük sülfosalisilik asit ile homojenize edilmiştir. Ekstraktan 2 mL alınarak üzerine 2 mL asit ninhidrin ve 2 mL glasiyal asetik asit eklenip önce 100°C su banyosunda 1 saat tutulmuş sonra da reaksiyonun durdurulması için 5 dakika buz banyosunda bekletilmiştir. Tüplerdeki örneklerle ve standartlara 4 mL toluen ilave edilmiş ve örneklerin absorbansı 520 nm’de ölçülmüştür.

Malondialdehit (MDA) Analizi

Yöntem Heath ve Packer, (1968)’e göre yapılmıştır. 0.5 g

yaprak % 0.1’lik 5 mL trikloroasetik asit (TCA) içinde homojenize edilmiştir. 2 mL örnek 2 mL % 0.5’lik thiobarbiturik asit (TBA) ile 30 dakika 95 °C’de su banyosunda kaynatılmış ve sonra buz banyosunda soğutulmuştur. Son karışım 10.000 rpm’de santrifüj edilmiş ve süpernatanın absorbansı spektrofotometrede 532 nm’de ve 600 nm’de ölçülmüştür.

İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler tesadüf blokları deneme desenine göre SPSS 17.0 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Farklı stres gruplarında ortalamalar arasındaki farklılıklar Duncan’s (1955) ve aynı stres uygulamasında Mel(+) ve Mel(-) grupları arasındaki farklılıklar bağımsız t testleri kullanılarak belirlenmiştir. Analizlerde p<0.05 istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

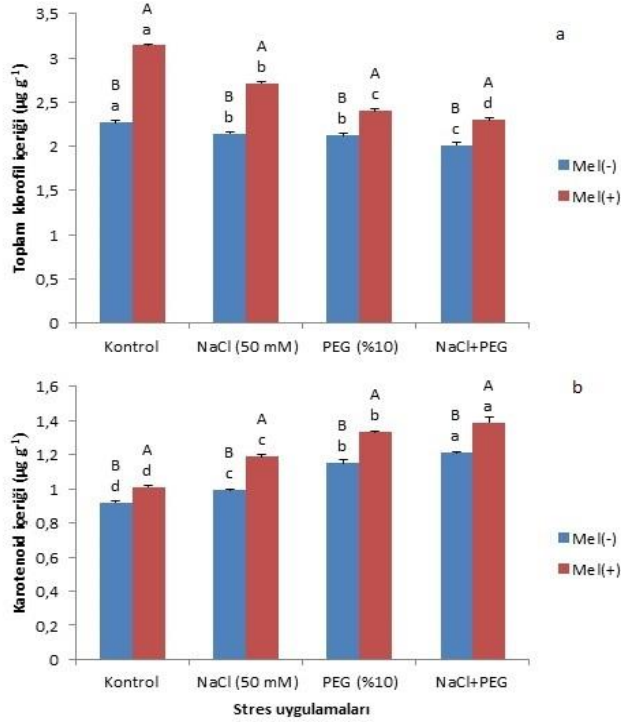
Toplam Klorofil ve Karotenoid İçeriği

Çalışmamızda toplam klorofil içeriği uygulama yapılan tüm stres gruplarında kontrole kıyasla azalmıştır ve en yüksek toplam klorofil içeriği 3.14 µg g⁻¹ olarak Mel(+) bitkilerde kontrol grubunda bulunmuştur (*p*<0.05) (Şekil 1a). Tuzluluk ve kuraklık stresleri bitkilerde genel olarak fotosentez etkinliğinde ve klorofil içeriğinde azalmaya sebep olmaktadır (Yıldız ve ark., 2010; Örs ve Ekinci, 2015). Çelik ve Atak (2012) toplam klorofil içeriğinin, düşük konsantrasyonlarda tuz stresine maruz kalan iki farklı tütün çeşidinde artarken, yüksek konsantrasyonlarda azaldığını belirtmişlerdir. Santos (2004) bitkilerde klorofil içeriğindeki azalmanın klorofil biyosentezinin azalmasından ya da klorofil yıkımının artmasından kaynaklanabileceğini bildirmiştir.

Karotenoid içeriği kontrole kıyasla tüm stres gruplarında artmıştır ve en yüksek karotenoid içeriği 1,39 µg g⁻¹ olarak Mel(+) bitkilerde NaCl+PEG uygulanan grupta bulunmuştur. Mel(+) bitkilerde karotenoid içeriği Mel(-) bitkilere kıyasla daha yüksek bulunmuştur (*p*<0.05) (Şekil 1b). Karotenoidler sadece bitkisel pigmentlerden biri değil aynı zamanda oksidatif stres toleransında rol oynayan önemli antioksidanlardandır (Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005). Farklı stres koşullarında karotenoid içeriğinin arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Keleş ve Öncel, 2002; Kaya ve İnan, 2017) Bu çalışmada strese bağlı olarak karotenoid içeriğinin artması karotenoidlerin stres cevabı ile ilişkilendirilebilir.

Peroksidaz (POD) ve Askorbat Peroksidaz (APX) Aktiviteleri

APX ve POD stres altındaki bitkilerde stresle başa çıkabilmek için ROS kontrolü ve detoksifikasyonunda rol oynayan önemli antioksidan enzimlerdir (Büyük ve ark., 2012). Kuraklık ve tuzluluk streslerinin tütün hücre kültürleri üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar mevcuttur (Bueno ve ark., 1998; Mytinova ve ark., 2010).



Şekil 1. NaCl, PEG ve Mel uygulamalarının toplam klorofil (a) ve karotenoid (b) içerikleri üzerine etkileri. Farklı küçük harfler NaCl ve PEG uygulamaları arasındaki önemli farklılıkları Duncan testine göre ($P < 0.05$) gösterirken, farklı büyük harfler NaCl ve PEG uygulamalarında Mel(+) ve Mel(-) grupları arasındaki önemli farkı bağımsız t testine göre ($P < 0.05$) ifade eder.

Çelik ve Atak (2012) farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz kalan tütün çeşitlerinde POD ve APX aktivitelerinin kontrole kıyasla arttığını belirtmişlerdir. Bu bulgulara benzer olarak çalışmamızda da hem POD hem de APX aktiviteleri tüm stres uygulanan gruplarda kontrole kıyasla artmıştır. En yüksek POD aktivitesi $0.059 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein ve en yüksek APX aktivitesi $0.096 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein olarak Mel(+) bitkilerde NaCl+PEG uygulanan grupta bulunmuştur. Yapraklara dışarıdan yapılan Mel ön uygulamasının yapılması APX ve POD aktivitelerini arttırmıştır (Şekil 2a,b). Bu artış bitkilere dışarıdan uygulanan melatonin, antioksidan enzim aktivitelerini uyararak ya da antioksidan enzimleri oksidatif hasardan koruyarak bitkinin stres toleransını geliştirmesiyle açıklanabilir (Posmyk ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2014).

Prolin İçeriği

Prolin özellikle kuraklık ve tuzluluğa maruz kalan

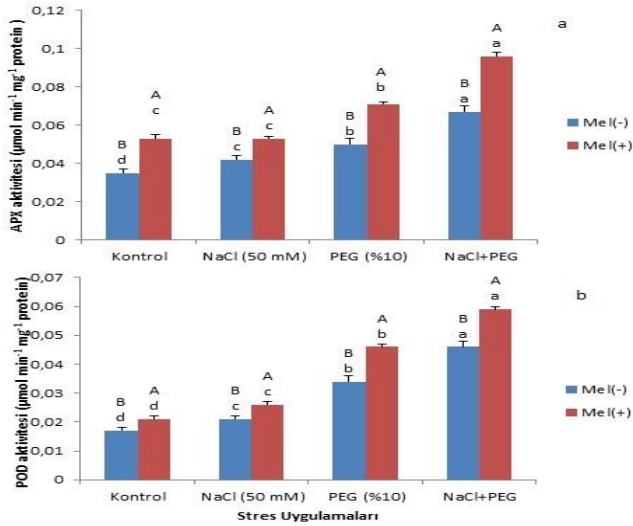
bitkilerde osmoregülatör olarak rol oynar. Bununla birlikte prolinin çeşitli stres şartlarında birikimi olumsuz koşullara karşı bitki adaptasyonunun bir parçasıdır (Delauney ve Verma, 1993). Çalışmamızda stres uygulanan gruplarda prolin içeriği, kontrole kıyasla artmış ve en yüksek prolin içeriği $0.023 \mu\text{g g}^{-1}$ FW olarak Mel(+) bitkilerin %10 PEG ve NaCl+PEG uygulanan gruplarında bulunmuştur. Dışarıdan yapılan melatonin uygulaması bitkilerde prolin içeriğini arttırmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 3b). Bulgularımız farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz kalan tütün çeşitlerinde tuz stresinin artışına paralel olarak prolin içeriğinin arttığını belirten Çelik ve Atak (2012)'in sonuçlarını destekler niteliktedir.

Malondialdehit (MDA) İçeriği

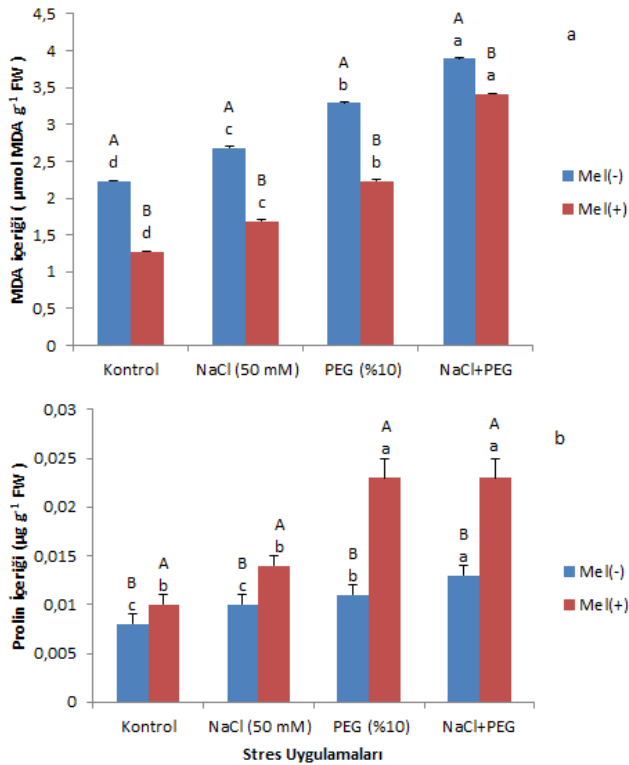
MDA lipid peroksidasyonunun sitotoksik bir ürünü olup serbest radikallerin ve dolayısıyla doku hasarının bir göstergesidir (Kawa ve ark., 1979). Literatürde herbisit (Kaya ve ark., 2014) ve tuz (Çelik ve Atak, 2012) streslerine maruz kalan tütünde MDA içeriğinin arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmada en yüksek MDA içeriği $3.89 \mu\text{mol MDA g}^{-1}$ FW olarak Mel(-) bitkilerin NaCl+PEG uygulanan grubunda bulunmuştur. Dışarıdan yapılan Mel uygulaması kontrol ve stres gruplarında MDA birikimini önemli oranda azaltmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 3a). Bu azalış melatoninin prolin birikimini ya da antioksidan enzim aktivitelerini arttırarak bitkinin stres direncini geliştirmesi ile ilişkilendirilebilir.

SONUÇ

Bitkiler yaşamları boyunca tuzluluk, kuraklık, sıcak, soğuk gibi büyüme ve gelişmelerini olumsuz yönde etkileyecek streslere maruz kalırlar. Bu çalışmada NaCl ve PEG uygulamalarına maruz kalan tütün bitkisinde tuzluluk ve kuraklık stresinin etkisi ile birtakım fizyolojik ve biyokimyasal değişimler görülmüş ve bu değişimler her iki stresin eş zamanlı uygulandığı gruplarda daha belirgin hale gelmiştir. Strese maruz kalan tütünde klorofil içeriği azalmış ve MDA içeriği artmıştır. Bununla birlikte bitki stres direncinin bir sonucu olarak karotenoid içeriği, prolin birikimi ve antioksidan enzim aktiviteleri artmıştır. Yapraklara melatonin uygulamasının yapılması stresin olumsuz etkilerini azaltmıştır. Bu çalışma dışarıdan yapılan Mel uygulamasının tütün bitkisinde stres cevaplarını düzenleyerek kuraklık ve tuzluluğun olumsuz etkilerini iyileştirdiğini göstermektedir.



Şekil 2. NaCl, PEG ve Mel uygulamalarının APX (a) ve POD (b) aktiviteleri üzerine etkileri. Farklı küçük harfler NaCl ve PEG uygulamaları arasındaki önemli farklılıkları Duncan testine göre ($P<0.05$) gösterirken, farklı büyük harfler NaCl ve PEG uygulamalarında Mel(+) ve Mel(-) grupları arasındaki önemli farkı bağımsız t testine göre ($P<0.05$) ifade eder.



Şekil 3. NaCl, PEG ve Mel uygulamalarının prolin (a) ve MDA (b) içerikleri üzerine etkileri. Farklı küçük harfler NaCl ve PEG uygulamaları arasındaki önemli farklılıkları Duncan testine göre ($P<0.05$) gösterirken, farklı büyük harfler NaCl ve PEG uygulamalarında Mel(+) ve Mel(-) grupları arasındaki önemli farkı bağımsız t testine göre ($P<0.05$) ifade eder.

KAYNAKLAR

- Anonim 2013. Adıyaman Tütün Raporu. İpekyolu Kalkınma Ajansı Adıyaman Yatırım Destek Ofisi, Adıyaman.
- Andrews, C. J. 2005. Purification and characterisation of a family of glutathione transferases with roles in herbicide detoxification in soybean (*Glycine max* L.); selective enhancement by herbicides and herbicide safeners. *Pestic. Biochem. Phys.* 82 : 205–219.
- Arnao, M.B., Hernandez-Ruiz, J. 2014. Melatonin: plant growth regulator and/or biostimulator during stress? *Trends in Plant Sci.* 19(12) : 789-797.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D. 1973. Rapid determination of proline for water-studies. *Plant Sci.* 39 : 205-207.
- Bayoumi, T.Y., Eid, M.H., Metwali, E.M. 2008. Application of physiological and biochemical indices as a screening technique for drought tolerance in wheat genotypes. *AJB*, 7(14):2341-2352.
- Bueno, P., Piqueras, A., Kurepa J., Savoure, A., Verbruggen, N., Montagu, M.V., Inze, D. 1998. Expression of antioxidant enzymes in response to abscisic acid and high osmoticum in tobacco BY-2 cell cultures. *Plant Sci.* 138 : 27–34.
- Büyük, İ., n-Aydın, S., Aras, S. 2012. Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. *Türk Hij. Den. Biyol. Derg.* 69(2) : 97 – 110.
- Cakmak, I. 1994. Activity of ascorbate-dependent H_2O_2 -scavenging enzymes and leaf chlorosis are enhanced in magnesium-deficient and potassium deficient leaves, but not in phosphorus-deficient leaves. *J. Exp. Bot.* 45 : 1259–1266.
- Çarpıcı, E.B., Erdel, B. 2015. Bazı yonca çeşitlerinde (*Medicago sativa* L.) kuraklık stresinin çimlenme özellikleri üzerine etkisi. *Derim*, 32(2):201-210.
- Çelik, Ö., Atak, Ç. 2012. The effect of salt stress on antioxidative enzymes and proline content of two Turkish tobacco varieties. *Turk J Biol*, 36 : 339-356.
- Çulha, Ş., Çakırlar, H. 2011. Tuzluluğun bitkiler üzerine etkileri ve tuz tolerans mekanizmaları, *AKU Fen Bilimleri Dergisi*, 11 : 11-34.
- De-Kok, L., Graham, M. 1980. Levels of pigments, soluble proteins, amino acids and sulfhydryl compounds in foliar tissue of *Arabidopsis thaliana* during dark induced and natural senescence. *Plant Physiol. Biochem.* 27 : 133-142.
- Delauney, A.J., Verma, D.P.S. 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* 4(2) : 215-223.
- Heath, R.L., Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast, I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophysics*, 125 : 180–198.
- Kalefetoğlu, T., Ekmekçi, Y. 2005. The effects of drought on plants and tolerance mechanisms. *G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 18(4) : 723-740.

- Karabacak, K. 2017. Türkiye’de tütün tarımı ve coğrafi dağılışı, Coğrafi Bilimler Dergisi, 15 (1) : 27- 48.
- Kaya, A., Yigit, E. 2014. The physiological and biochemical effects of salicylic acid on sunflowers (*Helianthus annuus*) exposed to flurochloridone. *Ecotox. Environ. Safe*, 106 : 232–238.
- Kaya, A., İnan, M. 2017. Tuz (NaCl) Stresine Maruz Kalan Reyhan (*Ocimum basilicum* L.) Bitkisinde Bazı Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Parametreler Üzerine Salisilik Asidin Etkileri. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*. 21(3): 332-342
- Keleş, Y., Öncel I. 2002. Buğday Fidelerinde Büyüme ve Pigment İçeriği Üzerine Sıcaklık ve Su-Tuz Streslerinin Birlikte Etkileri. *AUJST*, 3(1): 143-152
- Kobylinska, A., Reiter, R.J., Posmyk, M.M., 2017. Melatonin protects cultured tobacco cells against lead-induced cell death via inhibition of Cytochrome c translocation. *Front Plant Sci*, 8 : 1560.
- Kobylinska, A., Posmyk, M.M. 2016. Melatonin restricts Pb-induced PCD by enhancing BI-1 expression in tobacco suspension cells. *Biometals*, 29 : 1059–1074.
- Korkmaz, A., Demir, Ö., Kocaçınar, F., Cuci, Y. 2016. Biber fidelerinde yapraktan yapılan melatonin uygulamalarıyla üşüme stresine karşı toleransın artırılması, *KSÜ Doğa Bil. Derg*, 19 (3) : 348-354.
- Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, Y. 1958. Isolation of Melatonin, a Pineal Factor That Lightness Melanocytes. *JACKS*, 80: 2587-2591.
- Lichtenthaler, K., Welburn, A.R. 1983. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Botanisches Institutder Univeristat, Kaiserstran ße 12, Postfach pp. 591-592.*
- Mac Adam, J.W., Nelson, C.J., Sharp, R.E. 1992. Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. *Plant Physiol*, 99 : 872-878.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Sci*, 7, 405-410.
- Mýtinová, Z., Motyka, V., Haisel, D., Gaudinová, A., Lubovská, Z., Wilhelmová, N. 2010. Effect of abiotic stresses on the activity of antioxidative enzymes and contents of phytohormones in wild type and AtCKX2 transgenic tobacco plants. *Biol. Plant*. 54 (3) : 461-470
- Nakano, Y., Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 22 : 867–880.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem*, 95 : 351.
- Örs, S., Ekinci, M. 2015. Kuraklık stresi ve bitki fizyolojisi, *Derim*, 32 (2) : 237-250.
- Posmyk, M.M., Kuran, H., Marciniak, K., Janas, K.M. 2008. Presowing seed treatment with melatonin protects red cabbage seedlings against toxic copper ion concentration., *J. Pineal Res*, 45 : 24–31.
- Santos, C.V. 2004. Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. *Sci. Hortic*, 103 : 93–99.
- Tiryaki, İ. 2016. Yoncada (*Medicago sativa* L.) Kuraklık Stresi ve Tolerantlık Mekanizması, *KSÜ Doğa Bil. Derg.*, 19(3):296-305.
- Van den Berg, L., Zeng, Y.J. 2006. Response of South African indigenous grass species to drought stress induced by polyethylene glycol (PEG) 6000. *S Afr J Bot* 72:284–286.
- Yıldız, M., Terzi, H., Cenkci, S., Arıkan Terzi, E.S., Uruşak, B. 2010. Bitkilerde tuzluluğa toleransın fizyolojik ve biyokimyasal markörleri, *AUBTD-C*, 1(1) : 1-33.
- Zhang, N., Sun, Q., Zhang, H., Cao, Y., Weeda, S., Ren, S., Guo, Y.D. 2014. Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. *Journal Exp. Bot*, 66 (3) : 647-56.