



T.C.

RİZE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POLİAMİNLERİN OKSİDATİF STRESE ETKİSİNİN

BİYOKİMYASAL SEVİYEDE ARAŞTIRILMASI

Tuba BEKİRCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RİZE-2012

T.C.
RİZE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POLİAMİNLERİN OKSİDATİF STRESE ETKİSİNİN
BİYOKİMYASAL SEVİYEDE ARAŞTIRILMASI

Tuba BEKİRCAN

Yrd. Doç. Dr. Nuran DURMUŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RİZE-2012

T.C.
RİZE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANABİLİM DALI

**POLİAMİNLERİN OKSİDATİF STRESE ETKİSİNİN
BİYOKİMYASAL SEVİYEDE ARAŞTIRILMASI**

Tuba BEKİRCAN

BİYOLOJİ

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 25.01.2012

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 10.02.2012

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Nuran DURMUŞ

Juri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Neslihan S. GÜLER

Juri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER

Enstitü Müdürü: Doç. Dr. Fatih YILMAZ

RİZE, 2012



ÖN SÖZ

‘Poliaminlerin Oksidatif Strese Etkisinin Biyokimyasal Seviyede Araştırılması’ adlı bu çalışma Rize Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında ‘Yüksek Lisans Tezi’ olarak hazırlanmıştır. Bu konunun seçilmesinde, çalışmanın planlanmasında ve değerlendirilmesinde her türlü yardımı, hoşgörüsü ve sabrından dolayı sayın hocam Yrd. Doç. Nuran DURMUŞ’ a,

Beni bu yaşa getiren maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen babam İbrahim YAPAR’a, annem Çağlayan YAPAR’a ,

Bu tezde ve hayatımda bana dayanak ve destek olan sevgili eşim Çağrı BEKİRCAN’ a, canım arkadaşım Mustafa CÜCE’ ye ve yardımlarından dolayı Onur TOSUN’ a sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma 2009.102.03.1 nolu proje ile Rize Üniversitesi BAP tarafından desteklenmiştir.

Tuba BEKİRCAN

Rize, 2012

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖN SÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	IV
SUMMARY	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
TABLolar DİZİNİ	VII
SEMBOLLER DİZİNİ.....	VIII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Herbisitler.....	4
1.2.1. Diuron (C ₉ H ₁₀ C ₁₂ N ₂ O).....	5
1.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROS).....	6
1.3.1. Hücrelerde Reaktif Oksijen Üretimi.....	8
1.3.2. Reaktif Oksijen Oluşumları.....	10
1.3.2.1. Singlet O ₂ 'nin Oluşumu	10
1.3.2.2. Süperoksit Üretimi	10
1.3.2.3. Hidrojen Peroksit.....	11
1.3.2.4. Hidroksil Radikali	12
1.3.3. ROS'ların Makromoleküllere Etkileri.....	13
1.4. Antioksidan Sistem.....	15
1.4.1. Antioksidan Enzimler.....	15
1.4.1.1. Süperoksit Dismutaz.....	15
1.4.1.2. Katalaz.....	17
1.4.1.3. Peroksidazlar	18
1.4.1.4. Glutatyon Redüktaz.....	19
1.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	20
1.4.2.1. Glutatyon	20
1.4.2.2. Askorbik Asit	21
1.4.2.3. Karotenoidler.....	25
1.5. Bitki Büyüme Düzenleyicisi Olarak Poliaminler	26

2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR	28
2.1.	Bitkilerin Büyütülmesi	28
2.2.	Nispi Su İçeriği Tayini	28
2.3.	Klorofil ve Karotenoid Tayini	29
2.4.	Lipid Peroksidasyonu Tayini	29
2.5.	Çözünebilir Protein Tayini	29
2.6.	Prolin Tayini	30
2.7.	Askorbik Asit Tayini	30
2.8.	Antioksidan Enzim Ekstraktının Hazırlanması	30
2.8.1.	SOD Aktivitesinin Tayini	30
2.8.2.	GPX Aktivitesinin Tayini	31
2.8.3.	GR Aktivitesinin Tayini	31
2.8.4.	KAT Aktivitesinin Tayini	31
2.9.	İstatistiksel Analizler	32
3.	BULGULAR	33
3.1.	Poliamin ve Diuron Uygulamalarının Nispi Su İçeriğine Etkileri	33
3.2.	Poliamin ve Diuron Uygulamalarının Toplam Klorofil Miktarına Etkileri	33
3.3.	Poliamin ve Diuron Uygulamalarının Karotenoid Miktarına Etkileri	34
3.4.	Poliamin ve Diuron Uygulamasının Prolin Miktarına Etkileri	35
3.5.	Poliamin ve Diuron Uygulamalarının Askorbik Asit Miktarına Etkileri	36
3.6.	Poliamin ve Diuron Uygulamalarının Çözünebilir Protein Miktarına Etkileri	37
3.7.	Poliamin ve Diuron Uygulamalarının Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkileri	38
3.8.	Poliamin ve Diuron Uygulamalarının SOD Aktivitesine Etkileri	39
3.9.	Poliamin ve Diuron Uygulamalarının Guaikol Peroksidaz Aktivitesine Etkileri	40
3.10.	Poliamin ve Diuron Uygulamalarının Glutasyon Redüktaz Aktivitesine Etkileri	41
3.11.	Poliamin ve Diuron Uygulamalarının Katalaz Aktivitesine Etkileri	42
4.	TARTIŞMA	44
5.	SONUÇLAR ve ÖNERİLER	55
	KAYNAKLAR	58
	ÖZGEÇMİŞ	76

ÖZET

Bu çalışmada spermidin (SPD), spermin (SPM) ve putresin (PUT) poliaminleri ile ön muamele yapıldıktan sonra diuron herbisiti uygulanan mısır fidelerindeki nispi su içeriği, toplam klorofil, karotenoid, çözünebilir protein, lipid peroksidasyonu, prolin, askorbik asit miktarları ve antioksidan enzimlerin (süperoksit dismutaz (SOD), guaikol peroksidaz (GPX), glutatyon redüktaz (GR) ve katalaz (KAT)) aktivite değişimi belirlenmiştir.

Diuron uygulanan fidelerdeki lipid peroksidasyonu ve prolin içeriğinin arttığı, nispi su içeriği, toplam klorofil, karotenoid ve çözünebilir protein miktarlarının ise istatistiki bakımdan önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Poliaminlerle ön muamele yapılan fidelerdeki lipid peroksidasyonu artışının daha az olduğu ve diuronun sebep olduğu lipid peroksidasyonunu gidermede en etkili poliaminin SPM olduğunu kaydedilmiştir. Diğer taraftan poliaminlerle ön muamele yapılan fidelerdeki prolin içeriğinin sadece diuron uygulanan fidelere nazaran daha fazla arttığı ve en etkili poliaminin PUT olduğu belirlenmiştir. Poliaminlerle ön muamele nispi su içeriğinde istatistiki bakımdan önemli bir değişime sebep olmazken, toplam klorofil, karotenoid ve çözünebilir protein miktarlarında diuron etkisiyle meydana gelen azalmaların engellendiği tespit edilmiştir. Diuron uygulanan fidelerdeki askorbik asit miktarının başlangıçta azaldığı daha sonra ise arttığı belirlenmiş olup, poliamin ön muamelesinin askorbik asit miktarında önemli bir değişime sebep olmadığı kaydedilmiştir. Antioksidan enzimlerle ilgili yapılan çalışmalarda, diuron uygulamasıyla fidelerdeki SOD, GPX ve GR aktivitelerinin arttığı, KAT aktivitesinin ise azaldığı belirlenmiştir. Poliaminlerle ön muamele yapılan fidelerdeki enzim aktivitelerinde, poliamin çeşitine ve diuron uygulama süresine bağlı olarak farklı değişimler bulunmuştur.

Elde edilen veriler ışığında, poliaminlerin direkt olarak serbest radikalleri temizleyerek veya reaktif oksijen türleri (ROS)'nin seviyesini azaltan sistemlerin etkilerini geliştirerek oksidatif strese sebep olan faktörlere karşı bitkilerin tolerans mekanizmasına katılmaları muhtemeldir.

Anahtar Kelimeler: Poliamin, Oksidatif Stres, Diuron, Antioksidan enzimler, Prolin, Askorbik asit

SUMMARY

Research of Polyamines's Effect on Oxidative Stress in Biochemical Levels

In this study , maize (*Zea mays* L.) seedlings subject to diuron after pretreated with polyamines (spermidine, spermine and putrescine) were examined to find out the changes of relative water content, total chlorophyll, carotenoid, soluble protein, lipid peroxidation, proline, ascorbic acid and change in activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR) and catalase (CAT)).

In the maize seedlings, lipid peroxidation and proline content were increased by diuron treatment, while relative water content, total chlorophyll, carotenoid and soluble protein quantity were decreased significantly. Pretreatment with polyamines increased the lipid peroxidation less than diuron treatment. And most effective polyamines in prevention of lipid peroxidation was spermidine. On the other hand, proline content was increased by polyamines pretreatment more than just treatment with diuron. And most effective polyamine was putrescine.

Pretreatment with polyamines didn't cause a significant change in the statistical sense in relative water content, while the reduction of total chlorophyll, carotenoid and soluble protein content due to the diuron treatment have been identified prevented with polyamines. At the beginning, ascorbic acid content decreased with diuron treatment in seedlings, but after that content of ascorbic acid increased. It was reported that pretreatment with polyamines didn't effect to ascorbic acid.

SOD, GPX and GR activities were recorded to increase in seedlings exposed to diuron, while CAT activity was decreased. The enzyme activities in seedlings pretreated with polyamines showed different changes according to polyamines kind and duration of diuron treatment.

According to the present result, polyamines might deactivated ROS or reduce ROS level by supporting antioxidant scavenging systems. So it can be said that polyamines can positively stimulate the tolerance mechanisms of plants against the factors caused oxidative stress.

Key Words: Oxidative stress, Polyamines, Diuron, Antioxidant enzymes, proline, Ascorbic acid.

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Diuronun etki mekanizması.....	6
Şekil 2. Tilakoid membranlardaki mehler- peroksidaz reaksiyon dizisi.....	16
Şekil 3. Askorbat-Glutatyon siklusu.....	24
Şekil 4. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve diuron uygulanan mısır fidelerinde çözünebilir protein miktarındaki değişiklikler	38
Şekil 5. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve diuron uygulanan mısır fidelerinde lipid peroksidasyonu miktarındaki değişiklikler	39
Şekil 6. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve diuron uygulanan mısır fidelerinde SOD aktivitesindeki değişiklikler	40
Şekil 7. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve diuron uygulanan mısır fidelerinde GPX aktivitesindeki değişiklikler	41
Şekil 8. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve diuron uygulanan mısır fidelerinde GR aktivitesindeki değişiklikler	42
Şekil 9. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve diuron uygulanan mısır fidelerinde KAT aktivitesindeki değişiklikler	43

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve diuron uygulanan mısır fidelerindeki nispi su içeriği	33
Tablo 2. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve diuron uygulanan mısır fidelerindeki toplam klorofil miktarı	34
Tablo 3. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve diuron uygulanan mısır fidelerindeki karotenoid miktarı	35
Tablo 4. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve diuron uygulanan mısır fidelerindeki karotenoid miktarı	36
Tablo 5. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve diuron uygulanan mısır fidelerindeki askorbik asit miktarı	37

SEMBOLLER DİZİNİ

D: Diuron

DHA: Dehidroaskorbat

ETS: Elektron Transport Sistemi

GR: Glutasyon Redüktaz

GPX: Guaikol Peroksidaz

GSH: İndirgenmiş Glutasyon

GSSG: Oksitlenmiş Glutasyon

MDHA: Monodehidroaskorbat

$^1\text{O}_2$: Singlet Oksijen

O_2^- : Süperoksit Radikali

OH \cdot : Hidroksil Radikali

PSI: Fotosistem I

PSII: Fotosistem II

PUT: Putresin

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

SOD: Süperoksit Dismutaz

SPD: Spremidin

SPM: Spermin

1. GENEL BİLGİLER

1.1.Giriş

Bitkiler canlıların önemli bir bölümünü oluşturur ve canlı yaşamın devamlılığı açısından doğanın vazgeçilmez öğelerindendirler. Besin piramidinin tabanında yer aldıkları için, ekosistemin primer üreticileri konumundadırlar. Primer üretici organizmalar, yaşadıkları ortamdan aldıkları hammaddeleri (azot, fosfor, potasyum, kalsiyum v.b besin elementleri ile karbondioksit) kullanarak kendileri ve diğer canlıların yaşamları için gerekli olan besinleri sentezleyen organizmalardır. Yeşil bitkilerin önemi, sadece primer üretici olmaları ile sınırlı değildir. Ekosistemin oksijen ve karbondioksit dengesinin korunması ve buna bağlı olarak yeryüzündeki sıcaklık kontrolünün sağlanması da yeşil bitkilerin denetimi altındadır. Bitkiler ayrıca erozyonu önler, toprağa organik madde kazandırır, canlılara barınma ve beslenme ortamı sağlayarak ekosisteme devamlılık kazandırır. Bunların dışında bitkilerin tarımda, mobilyacılıkta, tekstilde, ilaç ve kimya sanayiinde ve süs bitkisi olarak peyzaj düzenlemelerinde de önemli işlevleri bulunmaktadır.

Üstlendikleri tüm bu görevler, bitkilerin doğanın vazgeçilmez unsurları olduklarının çok açık bir göstergesidir. Fakat canlı yaşamı için bu kadar önemli olan bitki gelişimi ve verimliliği, çeşitli çevre faktörlerinden olumsuz etkilenir. Bitkilerin olumsuz çevre faktörleri altında hayatta kalabilmesi, bitki türünün kendine özgü optimum çevre isteklerinin karşılanması ile mümkündür. Bu optimum isteklerde meydana gelen her türlü artış ve azalış bitki metabolizmasında stresi meydana getirir (Levitt, 1980). Diğer bir ifade ile bitkide metabolizmayı etkileyip önemli fizyolojik ve metabolik değişimlere yol açarak bitkilerde büyüme ve gelişmeyi olumsuz şekilde etkileyen, üründe nitelik ve nicelik kaybına (ürün kalitesinin ve miktarının azalmasına), bitkinin veya organlarının ölümüne yol açabilen durumlar stres olarak kabul edilir (Mojovic, 2004). Elverişsiz bir çevre faktörüne karşı bitkinin hayatta kalabilme yeteneğine ise “stres direnci” denir (Levitt, 1980).

Stres faktörleri, bitkileri yaşamlarının herhangi bir döneminde ortaya çıkarak etkileyen ancak değişik tepkilerin alınmasına yol açabilen diğer bir deyişle özellikleri birbirine benzemeyen bitkileri değişik olarak etkileyen çevresel etmenlerdir (Mojovic, 2004). Herhangi bir stres faktörüne maruz kalan organizmanın bütün fonksiyonel birimlerinde değişimler ve tepkiler meydana gelir. Stresin ortadan kalkması veya strese

karşı direnç sağlanması durumunda, stres geri dönüşümlü olabilir. Ancak stres olayı geçici olarak meydana gelmişse bile, stresin uzun süre devam etmesi, şiddetini artırması veya dayanıklılık sağlanamaması durumunda, bitki canlılığı gerilemeye başlamakta ve stres devam ettikçe, bu zayıflama daha da ilerlemektedir. Bitki kapasitesinin sonuna ulaşıldığında, o ana kadar belirti göstermeden kalabilen tepkiler, kronik hastalığa veya geri dönüşümsüz bir zarara yol açabilmektedir (Özcan ve ark., 2004).

Bitkiler yaşamları sürecinde birçok stres faktörü (stresör) ile karşılaşmaktadır. Bu stres faktörlerinin bitkiler üzerindeki etkileri, genellikle eş zamanlı meydana gelmektedir. Stres faktörleri, orijinlerine göre değişik şekillerde sınıflandırılabilirler. Stresörlerin “biyotik” ve “abiyotik” olarak iki grupta ele alındığı sınıflandırmada abiyotik stres; düşük sıcaklık, tuzluluk, kuraklık, su baskını, sıcaklık, radyasyon, kimyasallar ve kirlenici maddeler (ağır metaller, pestisitler ve aerosoller), oksidatif stres (reaktif oksijen türü, ozon), rüzgar (rüzgardaki tuz ve toz partikülleri) ve toprağın besleyicilerden yoksun olması gibi faktörleri kapsamaktadır. Biyotik stres faktörleri ise, patojenler (virüsler, bakteriler ve mantarlar), hayvanlar (böcekler, herbivorlar, kemirgenler), bitkiler (parazit bitkiler, allelopati) ve çeşitli antropojenik aktivitelerdir. Bütün bu stres faktörleri bitkiler için bir tehlikedir ve dünya çapında ürün verimliliğini kısıtlandırır. Dünya genelinde bitkisel üretimde ürün kaybının başlıca nedeni abiyotik strestir ve önemli tarımsal ürünlerin ortalama üretimini yaklaşık %50 azaltarak tarım endüstrisinin geleceğini tehdit etmektedir (Mahajan ve Tuteja, 2005).

Abiyotik stres çeşitlerinden biri olan oksidatif stres reaktif oksijen türleri (ROS) gibi moleküllerin üretiminde artış ve hücrel korunma mekanizmalarında düzensizlik meydana geldiği durumlarda açığa çıkan bir olgudur (Ceconi ve ark., 2003).

Çevresel faktörler üç şekilde oksidatif stresi artırabilirler:

- Direkt olarak serbest radikal üretimine katılabilirler,
- Antioksidan savunma sistemini inhibe ederler ve böylece indirekt olarak reaktif oksijen miktarını artırabilirler,
- Kloroplastların fazla enerjiyi dağıtmasıyla ilgili biyosentetik yolları bozarak ROS üretimine sebep olabilirler (Salin, 1988).

Fotooksidatif hasar, atmosferik kirleniciler, ağır metaller, kuraklık, serosporin gibi doğal bileşikler ve herbisitlerle artar. Ozon (O₃) ve kükürt dioksit (SO₂) gibi atmosferik kirleniciler serbest radikal oluşumuna katılırlar (Mehlhorn, 1990). Nitrit oksitin fotokimyasal yıkımından orjinlenen ozon, bitkiler için SO₂'den daha büyük tehdittir.

Ozonun fitotoksikliğinin onun oksitlenme potansiyelinden kaynaklandığını ve serbest radikal zincir reaksiyonlarını teşvik eden radikallerin oluşmasını desteklediğini ileri sürmüştür. Cu^{+2} iyonları çavdar bitkisinde, ışık destekli lipid peroksidasyonuna, pigment beyazlamasına neden olurlarken içsel katalaz seviyesini azaltırlar (Streb ve ark., 1993). Cu^{+2} iyonları Fenton reaksiyonu ile OH^{\cdot} üretimini katalizler.

Doğal fotosensitizörler (fotosentezi etkileyen toksinler) ışıkta oksidatif hasarı teşvik eder ve bitkileri ışığın görülebilir dalga boyuna duyarlı yaparlar ve fitotoksik reaksiyonlara neden olurlar. En çok bilinen fungal fotosensitizör serosporindir (Daub ve Ehrenshaft, 1993). Işık tarafından aktifleştiginde oksijenle reaksiyona girip 1O_2 'yi oluşturur (Daub ve Hangartner, 1983). İyon sızıntısı hızlıca lipid peroksidasyonu nedeniyle zar içeriğinde değişime neden olur (Daub, 1982). Diuron herbisiti de serosporine benzer şekilde fotosenteze etki etmekte ve oksidatif strese sebep olmaktadır.

Oksidatif strese karşı bitkileri daha toleranslı hale getirmek veya oksidatif stresin meydana getirdiği olumsuz etkileri minimuma indirebilmek için çalışmalar yapılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda poliaminlerin oksidatif stres üzerinde olumlu etkileri olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada bazı poliaminlerin (putresin, spermin, spermidin) oksidatif strese karşı bitkileri daha toleranslı hale getirip getirmediği araştırıldı ve bu maddelerin etki mekanizmalarının bitkilerdeki antioksidan sistemin bileşenleriyle ilişkili olup olmadığına bakıldı. Bu amaçla çalışmada öncelikle bitkiler bazı poliaminlerle (putresin, spermidin, spermin) ön muameleye tabii tutuldu ve daha sonra diuron herbisiti kullanılarak oksidatif stres teşvik edildi. Diuron uygulandıktan sonra oksidatif stresin şiddetine bağlı olarak belirli zamanlarda bitkilerden alınan örnekler üzerinde antioksidan sistemde fonksiyonu olan bazı parametreler ve enzim aktivitelerindeki değişiklikler tayin edildi. Böylece oksidatif stresin olumsuz etkilerini gidermede poliaminlerin katkısı araştırıldı ve hangi mekanizmalarda etki ettikleri hakkında bazı bilgiler elde edilmeye çalışıldı.

1.2. Herbisitler

Herbisitler büyüme ve çimlenme kontrolü için kullanılan ksenobiyotiklerdir. Değişik çeşitleri vardır ancak hepsi bitki bünyesi için olumsuz etkilere sahiptirler. Yüksek herbisit konsantrasyonu tohum çimlenmesini baskılar, gövde ve kök büyümesini geciktirir, klorosise neden olur ve fizyolojik olayları bozar (Spiridonov ve Zhemchuzhin, 2010). Bipiridiyum herbisitler oksidatif stresi direkt oksijen radikalleri üreterek artırırlar. Metilviyolojen olarak da bilinen paraquat redoksaktif bir bileşiktir ve PSI tarafından fotoredüklenir. Bu olay sonunda süperoksit anyonu oluşturmak için oksijene elektron transferi ile reoksidize edilir (Stajner ve ark., 1994). Oluşan süperoksit, oldukça reaktif olan ve hücre hasarına yol açan hidroksil radikalinin oluşumunu sağlar (Frei, 1996) ayrıca paraquat fotosentetik olmayan dokularda da toksiktir. Çünkü birçok kaynaktan elektron alabilir (Stajner ve ark., 2003).

Kloroasataminlerden alaklor ve metaloklor çimlenmeyi önleme amacıyla kullanılan herbisitlerdir. Fotolizin ilk basamağında gerçekleşen deklorasyon sırasında reaktif oksijen türleri başka radikallerin oluşumundan türevlenir (Stajner ve ark., 1995).

Diuron gibi bazı herbisitler PSII reaksiyon merkezindeki kinon bölgesine bağlanarak elektron transferini bloke eder ve fotosentezi durdurur. Ancak takip eden hücre ölümü açlıktan kaynaklanmaz (Bowyer ve ark., 1991). Herbisitten kaynaklanan toksisite ışığa ihtiyaç duyar ve klorofil merkezli 1O_2 üretimine neden olur. Herbisit bağlanmasıyla elektron transferi engellendiğinde, yük dağılımı bozulur ve reaksiyon merkezinde triplet klorofil oluşur.

Genel görüş, fotosentetik elektron taşınımı için kullanılmayan enerjinin triplet klorofil oluşumunu arttırdığı, protein hasarına neden olduğu yönündedir. Herbisitlerin protein hasarını nasıl başlattığı henüz belirlenememiştir (Krieger-Liszka ve Rutherford, 1998). Oksifloren, norflurozon ve atrazinin bitkilerde oksidatif strese yol açtığı kanıtlanmıştır (Kirilovsky, 1994; Keren, 1997). Yapılan araştırmalarda tüm herbisitlerin farklı etki mekanizmaları olsa da sonuç olarak reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir (Geoffroy ve ark., 2002).

İstenmeyen bitkiler ve yabancı otları yok etmek için kullanılan herbisitlerin önemi gün geçtikçe artmaktadır. Birçok herbisit, biyosentetik yolun inhibisyonu veya radikal üretimine direkt katılım yoluyla aktif oksijen türlerinin oluşumunda bulunur. Bipiridiyum herbisitleri ışıkta direkt olarak oksijen radikalini üretirler. Paraquat gibi bileşikler bitkide ışık kaynaklı oksidatif hasarı teşvik ederler. Bu grubun mensupları tamamen öldürücü

herbisitler olarak adlandırılırlar (Dodge, 1971). Bu bileşiklerin dikatyonik yapısı radikal katyona indirgenmesine olanak sağlar.

Difenil eterler, siklik imidler ve lutidin türevleri reaktiflerin birikimi ile fotosentetik yolun inhibisyonuyla radikal ara ürünler gibi davranırlar. Bu herbisitlerin etki mekanizmalarının şekli, protoporfirin gibi ışığa duyarlı tetrapireollerin anormal birikimini teşvik etme gücüne bağlıdır.

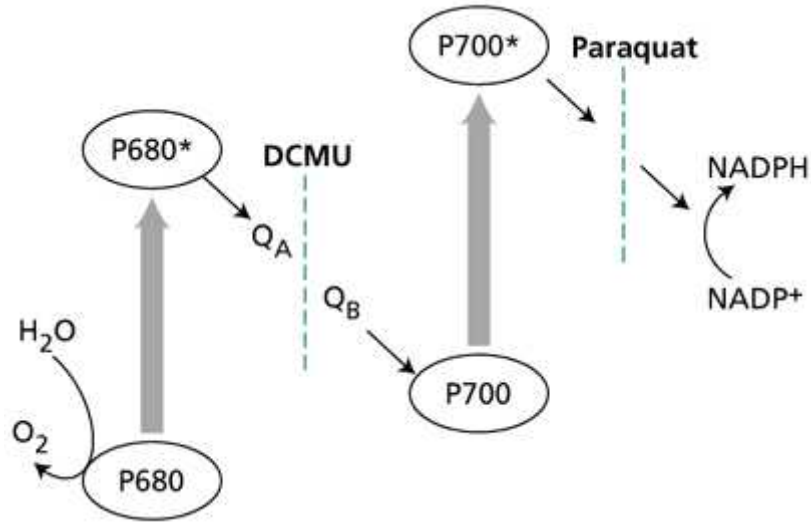
Fotosentetik elektron taşınımını engelleyen diuron gibi bileşikler ve norflurozon gibi karotenoid biyosentezini inhibe eden bileşikler singlet oksijen oluşumuyla birlikte fotooksidatif işlemi başlatırlar. Fotosentezi engelleyen herbisitler triplet klorofilin oksijene enerji transferine uyarıyı artırır.

1.2.1. Diuron (C₉H₁₀Cl₂N₂O)

DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) fotosentezi inhibe eden bir herbisittir. 1954 yılında Bayer tarafından Diuron ismi altında ticareti yapılmaya başlandı.

Diuron (D) fotosentez için oldukça önemli ve etkili bir herbisittir. Plastokinonun PSII'ye bağlanma bölgesini bloke eder (Şekil 1). Böylece elektronlar PSII'den plastokinona ulaşamazlar. Bu olay fotosentetik elektron taşıma zincirine engel olur ve bitkilerin ışık enerjisinin kimyasal enerjiye çevirme yeteneğini engeller. Diuron sadece PSII'deki elektron akışını engeller. PSI ve Calvin döngüsündeki karbon fiksasyonu veya ışık absorpsiyonu gibi diğer fotosentetik reaksiyonlara hiçbir etkisi yoktur.

PSII'de suyun oksidasyonundan oluşmuş elektronları absorbladığı için PSI 'in elektron boşluğu doyuma ulaşamaz. Sonuç olarak NADP⁺ 'nin NADPH'a indirgenmesi engellendiği için fotosentez durur (Metz ve ark., 1986). Yukarıda da anlatıldığı gibi herbisitler bitki metabolizmasını etkileyerek bitki hücrelerinde oksidatif hasara neden olur. Bu hasar sırasında da reaktif yapıdaki oksijen türleri meydana gelir.



Şekil 1. Diuronun etki mekanizması (URL-1, 2011)

1.3 Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

ROS'lar eşleşmemiş elektrona sahip oldukça reaktif moleküllerdir, oluşumları ile biyomolekülleri hızla oksitleyerek hücre ölümüne ve doku hasarına neden olmaktadır (De Zwart ve ark., 1999). ROS, oksijenli solunum yapan tüm hücrelerde sürekli üretilmektedir, bu nedenle hücreler bunlara karşı çeşitli korunma sistemleri geliştirmişlerdir (Ceconi ve ark., 2003). Bitkilerde ROS'ların meydana gelmesi sonucunda enzimlerin direk olarak inhibisyonu, proteinlerin oksidasyonu, membranlarda meydana gelen lipid peroksidasyonu ile toksik bileşiklerin ortaya çıkması ve oksidatif DNA ile RNA hasarı ortaya çıkmaktadır (Mojoivic, 2004).

ROS'ların üretimi normalde bitkiler tarafından kontrol edilir. ROS oluşumu ve antioksidan sistemlerinin etkinliği arasında dinamik bir denge vardır. Ancak bitki abiyotik strese (diuron gibi) maruz kaldığında ROS miktarında birikim olur. Bitkilerde stres koşullarına karşı koyma yeteneği stresi algılama, sinyal molekülü üretme ve stres koruyucu mekanizmaları aktifleştirme etkinliği ve hızına bağlıdır. Stres koşullarını algılamayı takiben, down-stream sinyal olayları aktifleştirilir ve bunlar ROS temizleme enzimlerini kodlayan genlerin aktivasyonunu sağlar (Hancock, 2001). Fotosentetik elektron taşıma sistemi singlet oksijen ve süperoksit üretme potansiyeline sahip aktif oksijen molekülünün ana kaynağıdır (Asada, 1994). Aktif oksijen üretimi oksijenli ortamda fotosentetik elektron taşıma zincirinin işlevinde kaçınılmaz sonuçtur. Fotosentezle bağlantılı oksijen tüketilen işlemlerin en önemlisi, fotorespirasyon yolunun başlatılmasını sağlayan ribulos-1,5-bisfosfat'ın (Rubisco) oksijenaz reaksiyonu ve fotosistem I elektron taşıma zinciri

tarafından moleküler oksijenin direkt indirgenmesidir. Ayrıca fotosistem II bileşenleri de moleküler oksijeni yüksek enerjili singlet oksijene çevirebilirler.

Doğal ve insan kaynaklı stres koşulları toksik oksijen türevlerinin üretimini artırır. Yanıt olarak, antioksidatif savunma sisteminin kapasitesi de artar (Gressel ve Salun, 1994). Fakat çoğu koşulda yanıt orta düzeydedir (Foyer ve ark., 1994). Ayrıca fotosistem II nin reaksiyon merkez proteini olan DI ve apoplastik boşluk gibi bazı önemli bölümlerde oksidatif hasara karşı az miktarda koruma sağlar (Castillo ve Greppin, 1998).

Oksijenin aksine oksijenin indirgenmiş çeşitleri oldukça reaktif ve toksiktir ve hücrelerin oksidatif yıkımına neden olur. Moleküler oksijen fotosentetik elektron taşıma zincirinde suyun oksidasyonu sonucunda üretilir. Oksijen elektron yakalayıcı olarak görev yapar. Ek olarak moleküler oksijen, fotorespirasyonda fosfoglikolat üretimi esnasında da görev yapar. Bu iki reaksiyon olumlu ve olumsuz etkilere sahiptir. Oksijene elektron transferi sırasında oluşan süperoksit radikali metabolizmayla uyumlu değildir ve antioksidatif savunma sistemi tarafından fosfoglikolatın fosfogliserata çevrimi sırasında elimine edilmelidir.

Son yıllarda ROS'lar için programlı hücre ölümü, hormonal sinyal, stres yanıtları ve gelişim gibi yeni görevler belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar ROS'ların bitkilerde hem aerobik metabolizmanın toksik yan ürünleri olduğunu hem de metabolik ve savunma yollarında anahtar düzenleyici olduğunu göstermiştir (Vranova ve ark. 2002)

ROS'ların sabit seviyesi hücrelerde ROS üretimi ve temizleme mekanizması arasındaki etkileşim tarafından belirlenir. Bunlar ROS sinyal iletim yolu tarafından kontrol edilir ve temel ROS döngüsünü oluşturur. Normal büyüme ve gelişme esnasında bu yol aerobik metabolizma tarafından üretilen ROS seviyesini gözlemler. Temel ROS döngüsü ROS'un üretim oranını düşürmek için fotosentezin baskılanması gibi ince metabolik ayarlar yapar. Bitkilerde ROS'un birçok potansiyel kaynağı vardır. Bazıları fotosentez ve solunum gibi normal aerobik metabolizma reaksiyonlarıyken, diğerleri fotorespirasyon gibi abiyotik stres sırasında gelişen yollara aittir (Moller, 2001).

Son yıllarda ROS'ların bitkilerde NADPH oksidaz, aminoksidaz ve hücre duvarına bağlı peroksidazlar gibi yeni kaynakları bulundu. Bunlar sıkıca düzenlenir ve programlı hücre ölümü, strese cevap ve patojen savunması gibi işlevlerin kontrolüne katılır.

Optimal büyüme koşulları altında ROS'ların hücrede üretimi sabit $240 \mu\text{M s}^{-1} \text{O}_2^-$ oranı ve $0,5 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ sabit seviyesinde olduğu tahmin edilir. Stres hücrel homeostasiyi bozar ve ROS'ların üretiminde artışa neden olur ($720 \mu\text{M s}^{-1} \text{O}_2^-$, $5-15 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$). Stres

sırasında ROS üretiminin artması hücreler için tehlike oluşturabilir ve stres koşulları ROS temizleme enzimlerinin ekspresyonunu artırır. Ayrıca stres koşullarında ROS'lar hücre tarafından da üretilir ve savunma yolunun uyarılması için sinyal görevi görürler. Bu yüzden ROS'ların stres metabolizmasının hücreyel yan ürünü olduğu düşünülür (Mittle ve ark., 2004).

ROS'ların toksik olması ve aynı zamanda sinyal olarak görev aldığından dolayı bitki hücreleri, bitki içi ROS konsantrasyonunu düzenlemek için değişik mekanizmalara sahiptir.

SOD, APX ve KAT aktiviteleri arasındaki denge O_2^- ve H_2O_2 seviyelerinin belirlenmesinde çok önemlidir. Feritin ve bakır bağlı protein tarafından Fe ve Cu gibi metal iyonlarının ayrılmasıyla birlikte bu denge metal bağımlı Haber-Weiss ya da Fenton reaksiyonları üzerinden oluşan ve oldukça toksik olan OH^- radikalinin oluşumunu önlemede önemli olduğu düşünülür. Askorbik asit ve glutatyon gibi antioksidanlar kloroplastlarda ve diğer bitki organellerinde yüksek oranda (5-20 mM askorbik asit ve 1-5 mM glutatyon) bulunurlar ve oksidatif strese karşı bitkiyi savunmada önemlidirler (Alscher ve ark., 2002).

Askorbik asit seviyesi baskılanmış mutantlar ve ROS temizleme enzimleri baskılanmış transgenik bitkiler patojen saldırılarına karşı abiyotik stres koşullarında oldukça duyarlı olmuşlardır. Ayrıca ROS temizleme enzimlerinin aşırı ekspresyonu bitkinin abiyotik strese karşı toleransını arttırmıştır (Ezaki ve ark., 2000).

1.3.1. Hücrelerde Reaktif Oksijen Üretimi

Farklı mekanizmalar tarafından üretilen, iki farklı formda aktif oksijen vardır. Oksijenin O_2^- 'e, H_2O_2 'e ve OH^- 'ne indirgenmesi, çoğu biyolojik sistemlerde oksijen aktivasyon mekanizmasının temelidir. Bununla beraber, fotosentetik bitkilerde, fotosistemler tarafından singlet oksijen oluşturulması önemlidir. Moleküler oksijen, sık sık kompleks kimyasal reaksiyonlara imkan veren metabolizmanın bir bileşiği olarak oluşur. Fakat diğer reaktif oksijen türevleri, kimyasal olarak veya çevresel stresin sebep olduğu metabolizmadaki karışıklığın bir sonucu olarak elektron taşıma sistemlerinde ya da enzimlerin fonksiyon kaybı sonucunda oluşur.

Kloroplast içinde aktif oksijen üretilebilen en az 4 bölge vardır;

1) PSI, kloroplastlarda oksijen aktivasyonunun önemli bir mekanizması olan Mehler reaksiyonuyla oksijeni indirgeyebilir. PSI'nın indirgeme bölgesinin, NADP'nin sınırlı

olduğu şartlar altında oksijenin monovalent indirgenmesine önemli ölçüde katkıda bulunduğu düşünülmüştür. Örneğin, eğer Kalvin çemberi NADPH'ı, PSI'in sağladığı elektronlar kadar hızlı bir şekilde okside edemezse, bu durum gerçekleşir.

2) Fotoaktive olmuş PSI, normal olarak, uyarma enerjisini PS reaksiyon merkezlerine transfer eder, fakat elektron taşıma sistemlerinde kullanıldığından yakalanan ışık enerjisinin önlendiği koşullar altında bu enerji oksijeni uyararak, oksijenin triplet formdan singlet forma dönüşmesine neden olur. Bu şartlara örnek olarak; kuraklık nedeniyle stoma kapanması, transport sistemlerinin zarına zarar, belli besinlerin eksikliği veya kirlilik etmenleri ve herbisitler gibi ksenobiyotik kimyasalların varlığı verilebilir.

3) PSII'nin oksidize olan yüzeyi PSII reaksiyon merkezine sudan 4 tekil elektronun transferini kolaylaştırmakta ve oksijeni triplet veya temel durağan seviyeye dönüştürmektedir. Bu bölgeden moleküler oksijene elektronların geçişi veya kısmen indirgenmiş oksijen ürünlerinin salıverilmesi, aktive olmuş oksijen üretimine nisbeten küçük bir katkı yapmakla birlikte, belli alkoller PSII tarafından indirgenebilir.

4) Fotorespirasyon, kloroplastlarda iyi bilinen oksijenasyon yoludur. Rubisco, fosfoglikolat ve fosfogliserat oluşumunda RuBP'nin 2. karbonuna oksijen eklenmesini katalizler. Bu, kloroplastlarda aktif oksijen oluşturmadığı halde, peroksizomlarda glikolat metabolizmasını devamında aktif oksijen oluşturur (Eltner ve Wagner, 1988).

Reaktif oksijen türlerinin en büyük üretim reaksiyonları yalnızca kloroplastlardaki oksijenin univalent indirgenmesi değil aynı zamanda kloroplast dışındaki kısımlarda da O_2 'nin H_2O_2 'ye divalent indirgenmesi reaksiyonlarında da oluşurlar. Peroksizomlar divalent reaksiyonlar için oksidazlar içerirler ve ışık ortamdaki solunum ve lipidlerin β -oksidasyonu gibi oksidatif metabolizma ile beraber H_2O_2 üretirler. C_3 bitkilerindeki H_2O_2 'nin önemli miktarı peroksizomal glikolat oksidaz yoluyla fotorespirasyon sırasında üretilir (Perl-Treves ve Perl, 2002).

O_2^- peroksizomlarda ve plazma membranlarında üretilir. Bitki peroksizomlarında süperoksit ksantin oksidaz ve üç ayrı NAD(P)H oksidazlar yoluyla üretilir. Peroksizomal O_2^- üretimi senesens süresince artmış ve oluşan reaktif oksijen türleri hücre bileşenlerini çürütmüştür (Del Rio ve ark., 1998).

1.3.2.Reaktif Oksijen Oluşumları

1.3.2.1. Singlet O₂'nin Oluşumu

Klorofil pigmentleri singlet oksijenin ilk kaynağıdır. Ayrıca singlet oksijen lipoksigenaz aktivitesinin yan ürünü olarak ortaya çıkar. Hidroksil radikali gibi ¹O₂ 'de oldukça yıkıcıdır ve difüzyonu kontrol eden biyolojik moleküllerle reaksiyona girebilir. Uyarılmış singlet klorofil molekülü enerjisini ETS, floresans ya da termal dağıtım yoluyla kaybetmezse triplet klorofile dönüşür. Triplet klorofil temel durumdaki oksijene enerjisini vererek kendisi eski haline dönerken moleküler oksijeni singlet oksijene dönüştürür (Koç ve Üstün, 2008).

¹O₂ 'ye karşı savunmada tilokoid zarda iki strateji vardır. Bunlardan ilki ışık toplayan cihazın triplet klorofil oluşumunu azaltmak için düzenlenmesidir. İkincisi ise triplet klorofil ve ¹O₂'nin hücre zarına bağlı birimler tarafından yatıştırılmasıdır. Triplet klorofilin ömrünü kısaltan iki ana işlevden ilki reaksiyon merkezinde fotokimyasal ve elektron taşımadır. İkincisi de fazla enerjinin termal dağıtılmasını içerir. Böylece triplet klorofil eski haline döner. Termal enerji dağıtımını fotokorumada asıl rolü oynar. Çünkü PSII'nin ilk kararlı elektron alıcısının (Q_A) indirgenme oranını sınırlar.

¹O₂ 'nin kimyasal reaksiyon için tercih ettiği hedefler doymamış yağ asitleri veya DNA'daki guanin gibi çifte bağlı olan moleküllerdir (Zulfugarov ve ark., 2011).

1.3.2.2. Süperoksit Üretimi

Süperoksit radikali flavoprotein dehidrogenazlar tarafından enzimatik olarak oluşturulabilir. Buna ek olarak daha da önemlisi ferrodoksinlerin, hidrokinonların, tiyollerin ve indirgenmiş hemoproteinlerin otooksidasyonları tarafından enzimatik olmayan yolla da üretilirler (Asada ve Takahashi, 1987). Süperoksit üretiminin çoğunluğu ferrodoksin ve Mehler reaksiyonu sayesinde olmaktadır.

Kloroplastlarda moleküler oksijenin fotoredüksiyonu ilk defa, katalaz ve etanolün varlığında asetaldehit üretiminde gözlemlendi ve bu reaksiyon sonucu oluşan ürün, hidrojenperoksit olarak varsayıldı (Mehler, 1951). 1970'lerde ise ilk indirgenmiş ürün süperoksit radikali (O₂⁻) olarak tanımlandı. Birçok durumda, PSII ve PSI arasındaki elektron akışının kontrolü PSI'nin alıcı parçasının indirgenmiş halini düzenler. Bu da PSI alıcılarının redoks durumunun elektron taşınımı için önemli bir sinyal olmadığı anlamına gelir. Calvin döngüsünün düzenlenmiş aktivasyonu ve elektron akışının kontrolü ferrodoksin havuzunun redoks durumunun belirlenmesinde önemli faktörlerdir (Harbinson

ve ark., 1999). Bu önemlidir, çünkü PSI'nin indirgenme bölümündeki ferrodoksin ve elektron taşıyıcıları moleküler oksijene elektron verip onu süperoksite çevirebilecek negatif elektrokimyasal potansiyele sahiptir (Asada ve Takahashi, 1987). PSI'nin indirgenme bölümlerinde O_2^- üretiminin iki yolu vardır (Badger, 1985). İlk ve genel yol indirgenmiş ferrodoksin ile moleküler oksijenin indirgenmesidir ve sonuç olarak süperoksit oluşur (1). Hidrojen peroksit daha sonra süperoksitin dismutasyonu ile oluşur (2). İkinci yol daha çok kendiliğinden gerçekleşir fakat reaksiyonun hızı SOD tarafından artırılır (3).



Ayrıca mitokondrideki ksantin oksidaz, ürat oksidaz ve NADPH oksidaz enzimler, substratlarının oksidasyonu sırasında süperoksit üretir. Bazı herbisitler PSII'de bulunan D1 proteinine bağlanıp ETS'yi keserek de süperoksit üretimine neden olabilir. Süperoksitlerin en çok etkilediği yapılar proteinlerin sülfidril grupları ve hücre zarındaki doymamış yağ asitleridir. Bu yüzden O_2^- lipid peroksidasyonuna, membran hasarına, hücresel toksisiteye ve DNA'da kırılmalara neden olabilmektedir (Fridovich, 1995).

1.3.2.3. Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik veya enzimatik olmayan dismutasyon tepkimeleri sonucu oluşur. Süperoksitin olduğu yerlerde önemli miktarda H_2O_2 'de üretilir. Fotosentetik elektron transport zinciri H_2O_2 'nin üretiminden sorumludur. H_2O_2 'nin üretildiği başka bir kaynak fotorespirasyonla glikolatın oksidasyonunun meydana geldiği peroksizomlardır. Ayrıca biyokimyasal olarak oksijenin iki elektronlu indirgenmesinin gerçekleştiği solunum işlemleri sırasında ve genellikle flavoproteinlerle gerçekleştirilen reaksiyonlarla da oluşturulur. Diğer taraftan plazma membranı ve ekstrasellular matriks H_2O_2 'nin üretildiği diğer önemli kaynaklardır (Slesak ve ark., 2007). Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz. H_2O_2 'nin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni demir ve bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalinin öncülü olarak davranmasıdır. H_2O_2 özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki

demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'nin ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz yerine getirir (Halliwell, 1984).

1.3.2.4. Hidroksil Radikali

Hücredeki en aktif oksidandır ve çoğu organik bileşiği oksidize eder. Yüksek reaktivitesinin gelişigüzel olmasından dolayı uygun olan ilk substratla tepkimeye girer. Bu nedenle, yüksek bir yıkıcı ve mutajenik potansiyele sahiptir. Hidroksil radikalleri kloroplast membranlarının hemen yakınında oluştuğundan kloroplastlar hidroksil radikallerine özellikle duyarlıdır.

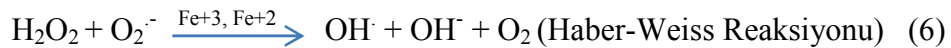
Hidroksil radikali lipid peroksidasyonuna neden olurken, DNA, protein ve pek çok küçük moleküle saldırır. Fenton, 19. yüzyılın sonlarına doğru, hidrojen peroksitin Fe^{+2} 'le potansiyel oksidasyonunu tarif etmiştir. 40 yıl sonra Haber ve Weiss bu reaksiyonda hidroksil radikalini tanımlamıştır (4).



Biyolojik sistemlerin indirgenmiş Fe^{+2} iyonlarının kullanımı bu reaksiyonla sınırlanır. Fakat Fe^{+3} iyonları indirgenmiş Fe^{+2} 'yi süperoksit gibi indirgeyici ajanlarla tekrar oluşturabilir (5).



Kısaca bu iki reaksiyon şöyle özetlenir (6);



Böylece demir iyonunun varlığında, süperoksit ve hidrojen peroksit hidroksil radikaline dönüşür. Böylece organik substratların oksidasyonu başlar. Cu^+ ve Cu^{+2} gibi metal iyonları bu reaksiyonda Fe^{+2} ve Fe^{+3} iyonlarının yerine geçebilir (Akkuş, 1995).

1.3.3. ROS'ların Makromoleküllere Etkileri

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Süperoksit radikali (O_2^-) ve hidroksil radikali (OH^\cdot) sitoplazma, mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatır. Membranlarda lipid peroksidasyonu meydana gelmesi sonucu membran permeabilitesi artar. Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein sülfhidril grupları ve diğer amino asit kalıntıları okside olarak yıkılır, nükleer ve mitokondriyal DNA okside olur. Serbest oksijen radikallerinin tüm bu etkilerinin sonucunda hücre hasarı olur. Hücrede reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve serbest radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir

Hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri doymamış yağ asitleridir ve doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerleyen ve oldukça zararlı olan lipid peroksidasyonu, genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlar. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri ve lipid peroksit radikallerinin oluşması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna nonenzimatik lipid peroksidasyonu denir. Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki yağ asitlerinin doymamış bağları ve serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar (Leshem, 1992).

Lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipid radikallerinin moleküler oksijenle (O_2) etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri oluşur. Lipid peroksit radikalleri, membran yapısındaki diğer doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipidperoksitlerine dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid peroksitlerinin yıkılımı geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Plazma membranı ve subselüler organel lipid peroksidasyonu serbest radikal kaynaklarının hepsiyle uyarılabilir ve geçiş metallerinin varlığında artar. Lokal olarak hidrojen peroksitten (H_2O_2) Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikali (OH^\cdot) oluşması zincir reaksiyonunu başlatabilir.

Lipid peroksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından difüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar.

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir. Malondialdehit (MDA) yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde malondialdehit (MDA) ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır.

Nonenzimatik lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir (Bradley ve Minn, 1992).

Proteinler serbest radikallere karşı doymamış yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikallerin zararından etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur.

Serbest radikallerin etkileri sonunda, yapılarında fazla sayıda disülfid bağı bulunan proteinlerin tersiyer yapıları bozulur, normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Örneğin süperoksit tarafından demir sülfür merkezlerinin oksidasyonu enzimatik fonksiyonları bozar (Gardner ve Fridovich, 1991). Prolin ve lizin reaktif oksijen türleri (ROS) üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler (Stadtman, 1986).

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali (OH[•]) deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Hidroksil radikali ile şeker kısmının oksidasyonu nükleik asitlerdeki tek zincir kırıklarının sebebidir. Hidrojen peroksit (H₂O₂) membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir (Oleinick ve ark., 1986). DNA hücrelerin serbest oksijen radikallerini tolere etme yeteneklerinde en zayıf halkadır. Çünkü Fenton reaksiyonlarında bulunan metallerin bağlanmasında DNA etkilidir. Ayrıca diğer makromoleküllerden ziyade DNA' daki hasar daha yıkıcıdır (Beyer ve ark., 1991).

Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir ve bunlar, çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar. Monosakkaritler ROS'ların etkisiyle yükseltgenerek peroksit türevlerini oluşturur. Oluşan bu peroksit türevleride makromoleküllerle etkileşip onların üzerinde çapraz bağlar oluşturmak suretiyle bu moleküllerin yapılarını bozabilirler (Bryan, 1996). Bu olumsuz koşullara neden olan reaktif oksijen türlerini etkisizleştirmek amacıyla bitkiler antioksidan savunma sistemini geliştirmişlerdir.

1.4. Antioksidan Sistem

Bitkiler kendilerini, yıkıcı oksidatif reaksiyonlara neden olan reaktif oksijen türlerinden korumak için etkili temizleme sistemine sahiptirler. Bu koruma sadece hücre içi bileşiklerle sınırlı değil aynı zamanda sınırlı ölçüde apoplastta da geçerlidir.

Doğal ve yapay streslerde ortaya çıkan ROS'ları temizleyen bu sistem enzimatik antioksidanlar (süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidazlar) ve enzimatik olmayan düşük moleküler ağırlıklı antioksidanları (glutasyon, askorbat, karotenoidler, tokoferoller) içerir.

Ayrıca askorbat peroksidaz, dehidroaskorbat redüktaz, glutasyon redüktaz gibi enzimler de antioksidanların aktif formlarını yeniden oluşturmak için gereklidir.

Yapılan araştırmalarda, süperoksit ve hidrojen peroksidin enzim vasıtasıyla temizlendiği gösterilirken, hidroksil radikali ve singlet oksijenin enzimle temizlendiği dair bir kayıt bulunmamaktadır (Foyer ve Noctor, 2005).

1.4.1. Antioksidan Enzimler

Antioksidan enzimler reaktif oksijen türlerini daha az toksik olan bileşiklere metabolize ederler. Başlıca antioksidan enzimler süperoksit dismutaz, peroksidaz, glutasyon redüktaz ve katalazdır.

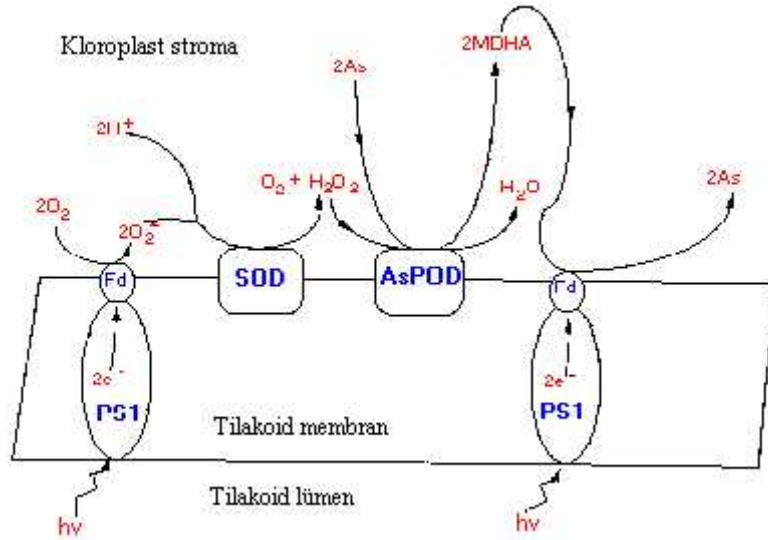
1.4.1.1. Süperoksit Dismutaz

Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) metaloenzim ailesindedir ve ilk defa Mann ve Kleilin (1938) tarafından izole edilmiş ve başlangıçta bir bakır depo proteini olduğu düşünülmüştür. Daha sonraları McCord ve Fridovich (1969) tarafından bu enzimin katalitik fonksiyonu keşfedilene kadar eritrocuprein, indofenol oksidaz ve tetrazolium oksidaz gibi isimlerle adlandırılmıştır. Süperoksit anyon radikallerine (O_2^-) karşı ilk savunma mekanizması, O_2^- radikallerinin H_2O_2 ve O_2 'e dismutasyonudur (7).



Bu reaksiyonu katalizleyen süperoksit dismutaz enzimi redoks aktif metal olarak sitozolde Cu, mitokondride Mn içerir (CuZnSOD, MnSOD).

Fotosentezin güçlü bir inhibitörü olan H_2O_2 bu reaksiyon sonucunda oluşur ve kloroplast fonksiyonlarında büyük öneme sahiptir. Kloroplastlardaki süperoksit ve H_2O_2 tilakoid membrana bağlı SOD ve askorbat peroksidaz (AsPOD) tarafından aşağıda belirtilen mekanizmayla temizlenebilir (Şekil 2).



Şekil 2. Tilakoid membranlardaki meher- peroksidaz reaksiyon dizisi (PS I: Fotosistem I, Fd: Ferrodoksin, As: Askorbik asit, MDHA: Monodehidro askorbat)

Süperoksit radikalini uzaklaştıran SOD, bu sayede de metallerin katalizlediği Haber-Weiss reaksiyonuyla hidroksil radikali oluşum riskini azaltır. Yani SOD enziminin aktivitesi, hidroksil radikallerini üreten Haber – Weiss reaksiyonunun iki bileşeninin nispi oranını belirler. Hidroksil radikallerinin yüksek reaktivitelerinden dolayı, konsantrasyonlarını enzimatik olarak kontrol etmek zordur. SOD, canlı sistemlerdeki süperoksiti parçalayarak bu radikalın zararlarını ortadan kaldırır ve bütün aerobik organizmalarda ve aktifleşmiş oksijen üreten bütün hücre alt yapılarında bulunduğu için oksidatif strese karşı savunmada önemli unsurlardan biridir (Bowler ve ark., 1992; Scandalios, 1993). Metal kofaktörlerine bağlı olarak bakır/çinko (Cu/ZnSOD), mangan (MnSOD) ve demir (FeSOD) izoenzimleri olmak üzere üç farklı tip SOD izoenzimi vardır (Bannister ve ark., 1987). Bu üç farklı izoenzimin teşhisi KCN ve H_2O_2 'ye duyarlılıklarına bağlıdır. MnSOD her iki inhibitöre dirençliyen, Cu/ZnSOD her iki inhibitöre duyarlıdır.

FeSOD ise KCN'ye dirençli H₂O₂'ye ise duyarlıdır. Bu izoenzimlerin hücre alt yapılarındaki dağılımı da farklılık gösterir.

Prokaryotik organizmalar ve ökaryotik hücrelerin mitokondrisinde yaygın olarak bulunan izoenzim MnSOD iken, Cu/ZnSOD prokaryotik organizmalarda bulunmasının yanı sıra yüksek bitkilerin hem sitoplazmasında hem de kloroplastlarında bulunan en yaygın SOD tipidir (Scandalios, 1993). FeSOD izoenzimleri, prokaryotik organizmalarda ve bazı bitki türlerinin kloroplastlarında Cu/ZnSOD ile birlikte bulunabilir (Tsang ve ark., 1991; Bowler ve ark., 1992). Bu 3 tip izoenzim hücrelerde farklı bölgelerde bulunmaları ve farklı metal kofaktörlerine sahip olmalarına rağmen fonksiyonları aynıdır. Oksidatif zarar gören bölgeden nükleusa yayılan, her bir organelin kendine has lipid peroksidasyon ürünleri tarafından düzenlenen sinyal ile SOD genlerinin transkripsiyonunun arttığı kaydedilmiştir (Bowler ve ark., 1992).

Canlı sistemlerde artan ROS oluşumu SOD genlerinin çevresel streslere duyarlı olduğunu göstermiştir (Bowler ve ark., 1992). Bir hafta boyunca sel etkisine maruz bırakılan *Zea mays* bitkisinin yapraklarında süperoksit ve H₂O₂ üretiminde önemli bir artış görülmüştür (Yan ve ark., 1996). Sel etkisinin SOD aktivitesini azalttığı bu yüzden dolayı süperoksit birikiminin arttığı ileri sürülmüştür. Bununla beraber SOD aktivitesinin çeşitli ksenobiotik ve çevresel streslere cevap olarak arttığı ve bu artışların oksidatif strese dirençlilikle bağlantısı olduğu rapor edilmiştir (Foyer ve ark., 1994; Van Camp ve ark., 1994).

1.4.1.2.Katalaz

Katalazlar (KAT, EC 1.11.1.6), elektron vericisi ve alıcısı olarak H₂O₂'i kullanırlar ve oksidaz enzimlerinin oluşturduğu H₂O₂'i parçalarlar (8). Herbiri 60 kDa moleküler ağırlığında 4 alt ünitelerden oluşan katalaz aktif bölgesinde Fe⁺³ atomuyla birlikte hem ihtiva eder. Özellikle aşağıda belirtilen reaksiyonla peroksizomlarda üretilen H₂O₂'nin uzaklaştırılmasında görev alan katalaz bütün aerobik ökaryotlarda bulunur.



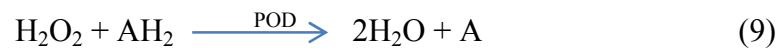
Bu enzimin substrata ilgisi düşük olmasına karşın yüksek katalitik aktiviteye sahiptir ve 1 molekül demir içeren katalaz enzimi, 1 dakikada 0 °C'de 5 milyon H₂O₂ molekülünü parçalayabilir (URL-2, 2011). Bunun için de H₂O₂'i bağlayan iki aktif bölgeye sahiptir. Ayrıca katalazın yokluğu kloroplastlarda kalvin döngüsünde thiol-düzenleyici enzimlerin korunmasının engellenmesine neden olmaktadır.

Katalaz kararlı bir enzim değildir. Yüksek ışık yoğunluğu ve stresli bitki hücrelerinde H₂O₂ oluşumu yüksektir. Fazla miktarda oluşan H₂O₂ katalazın inhibe olmasına neden olur. (Feierabend ve ark., 1992; Streb ve ark., 1993). Siyanid, azid, süperoksit ve indirgenmiş glutatyon tarafından da katalaz aktivitesinin inhibe edildiği bilinmektedir (Paul, 1963; Kono ve Fridovich, 1982). Katalaz bitkilerde sadece peroksizomlarda bulunur ve ayrıca H₂O₂'ye oldukça zayıf affinite gösterir. Bu durum enzimin etkinliğini kısıtlamaktadır (Scandalios ve ark., 1972; Asada, 1992; Scandalios, 1992; Foyer ve ark., 1994). Katalaz kloroplastlarda bulunmaz ve esas olarak fotorespirasyon sırasında oluşan H₂O₂'nin yıkımı için gereklidir. Katalazın en önemli avantajı H₂O₂ 'nin temizlenmesi için hiçbir ilave indirgeyiciye ihtiyacı olmamasıdır.

1.4.1.3. Peroksidazlar

Peroksidazlar (POD, EC 1.11.1.17) birkaç maddeyi (askorbat, guaikol vb.) elektron akseptörü olarak kullanıp peroksitleri indirgerler (9). Bitkilerde yaygın olarak bulunan ve hem grubu ihtiva eden oksidaz grubu enzimlerdir. Bitki peroksidazları enzime kararlılık sağlayan protein kısmına bağlı oligosakkarit zincirleri ile karakterize edilen glikoproteinlerdir (Hu ve Van Huystee, 1989).

Peroksidazlar birçok fizyolojik olayla ilişkilidir ve metabolizmada aktif bir rol oynarlar. Örneğin, bitki hücrelerindeki çeperin uzama özelliği, lignin biyosentezi ve oksin katabolizması ile ilişkisi olduğu saptanmıştır (Hinman ve Lang, 1965; Mader ve Füssl, 1982). Ayrıca yüksek stres koşullarındaki bitkilerde peroksidaz aktivitesinin arttığı bilinmektedir (Guida ve ark., 1992; Asada,1992). Peroksidazlar H₂O₂'yi parçalama özelliklerinden dolayı en önemli antioksidan savunma sistemi öğelerindendir.



H vericisi olarak kullandıkları substrata göre isimlendirilirler. Askorbat peroksidazlar substrat olarak askorbatı kullananlar ve bitki hücrelerinin sitoplazma ve kloroplastlarındaki H₂O₂'nin temizlenmesinde etkilidirler (Dalton ve ark., 1987; Asada, 1992). Bu enzimin kloroplastlarda tilakoid membrana bağlı ve stromada bulunan formları vardır (Chen ve Asada, 1989; Miyake ve Asada, 1992). Askorbatın yokluğunda aşırı derecede kararsız olan bu formlar elektron vericisi olarak askorbat için belirleyicidirler (Miyake ve Asada, 1996). Sitoplazmada bulunan askorbat peroksidaz, kloroplastakinden daha kararlı olup askorbattan başka elektron vericilerini de kullanabilir (Dalton ve ark., 1987; Mittler ve Zilinkas, 1991).

Yaygın şekilde çalışılan guaikol peroksidazlar askorbat peroksidazlara benzerler. (Nakano ve Asada, 1987). Guaikol peroksidazlar, guaikola olan yüksek spesifikliklerine rağmen başka birçok substratı elektron vericisi olarak kullanabilirler. Ayrıca askorbat peroksidazların aksine guaikol peroksidazlar glikoproteindirler (Creissen ve ark., 1994).

Peroksidazların bol miktarda substrat çeşiti ve izoform varlığından dolayı belirli bir hücresel yapı veya dokuyla ilgili izoformlarını belirlemek çok zor olmuştur. H₂O₂ membranlardan geçebildiği için, hücrede bulunan bütün H₂O₂'yi temizleyen enzimlerin antioksidan savunma sisteminde önemli bir rol oynadığı düşünülür. Yüksek oranda reaktif olan hidroksil radikallerinin oluşumunu önlemek için süperoksit ve H₂O₂'nin temizlenmesi gereklidir.

1.4.1.4. Glutasyon Redüktaz

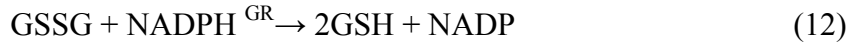
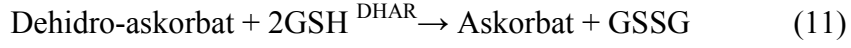
Glutasyon redüktaz (GR) elektron donörü olarak NADPH ile birlikte GSH havuzunun yenilenmesini sağlayan "Halliwell-Asada" yolunu tamamlar (10).



GR bir flavoprotein oksidoredüktazdır. GR aktivitesi bitkilerde en fazla kloroplastlarda bulunurken mitokondrial ve sitosolde de izoenzimleri tanımlanmıştır (Cressien ve ark., 1994).

GSH enzimler üzerindeki tiyol (SH) gruplarını koruyan, bir disülfid redüktant olarak askorbatın rejenerasyonunda işlev görür. ¹O₂ ve OH' lerle tepkimeye girer (Klapheck, 1988). DHAR (E.C. 7.8.5.1) enzimi aracılığıyla DHA'dan AA rejenerasyonuna katılır (11). Böyle reaksiyonlarda GSH, glutasyon disülfide (GSSG) oksitlenir. GSH, NADPH bağımlı

bir reaksiyonda GR tarafından rejenere edilir (12). Creissen ve ark. (1996) GR'ın kloroplastlarda, mitokondride ve sitosolde bulunduğunu mısırdaki çalışmada açıklamışlardır (Hernandez ve ark., 2000).



Son yıllarda yapılan çalışmalarda antioksidan sistemde GSH'nin önemli bir yeri olduğu belirlenmiştir. Bu yüzden glutatyon redüktaz da hücrenin antioksidan sisteminin devamlılığında önemlidir (Meister ve Anderson, 1983; Creissen ve ark., 1994). Ayrıca bu enzim, bakteri ve bitkilerde glutatyon seviyesinin düzenlenmesiyle de ilgilidir (Broadbent ve ark., 1995).

1.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Enzimatik antioksidanların yanısıra enzimatik olmayan antioksidanların da ROS temizleme işlemine katkısı vardır.

1.4.2.1. Glutatyon

Çevresel streslere maruz kaldığında, özellikle GSH gibi antioksidanların seviyeleri değişir. Soğuk, tuzluluk ve kuraklık gibi streslere hücrenin glutatyon havuzunun ilk cevabı GSSG/GSH oranının artmasıdır (Mullineaux ve Rausch, 2005). Stresin teşvik ettiği oksidasyon sonucu glutatyon konsantrasyonu ve GSSG/GSH oranının değişmesi, spesifik hücre cevaplarını başlatan sinyallerdir. Örneğin, askorbat ve glutatyon oksitlendiği zaman hücre siklusu bloklanır ve hücre bölünmesinin durmasına sebep olur. Stresin büyük bir sonucu olarak hücre bölünmesinin durması sonucu bitki büyümesinde durur. GSH ve AA hücre siklusunun G1 fazı üzerinde etkilidir. AA ve GSH askorbat-glutatyon siklusunun çalışmasında birbirleriyle bağlantılıdır (Noctor ve Foyer, 1998).

Hücredeki GSH: GSSG oranı glutatyon redüktaz tarafından muhafaza edilir. Bir homodimerik flavoprotein olan GR, GSSG'yi iki tane GSH'ye indirgemek için NADPH'yi kullanır (Schaedle ve Bassham, 1977). Ayrıca Glutatyon-S-transferaz (GST) enzimi substrat olarak glutatyonu kullanır. Glutatyon-S-transferazların, sitotoksik olan bileşiklerin uzaklaştırılmasında koruyucu fonksiyonları vardır. Belirli GST'ler flavonoid bağlı proteinler olarak fonksiyon yaparlar. Mesela petunyada sitoplazmadan antosiyanin dışarı

çıkışında gerekli olan bir GST vardır. Bazı GST'lar dehidroaskorbattan askorbik asitin yeniden üretilmesinde fonksiyon yaparlar. Glutasyon peroksidazlara (GPXS) benzer olarak belirli GST' lar H_2O_2 ve hidroperoksitlerin detoksifikasyonunda rol oynarlar (Marrs, 1996).

Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidazlar (PHGPXs) H_2O_2 'den çok lipid hidroperoksitlerine karşı yüksek affiniteye sahiptirler. PHGPX' lar biyotik ve abiyotik stresler tarafından teşvik edilir ve fosfolipidhidroperoksitler ve H_2O_2 'yi uzaklaştırarak stres boyunca lipid peroksidasyonunun boyutunun kısıtlanmasında spesifik bir rol oynar (Yoshimura ve ark., 2004).

Glutasyonun yıkımı GSH, GSSG ve Glutasyon-S- konjugatlarıyla alakalıdır. GSSG' nin yıkımı bir detoksifikasyon işlemidir. GSSG oksidatif stres koşullarında proteinlerle birlikte karışık disülfid bağları oluşturur. Bu olay birçok biyosentetik enzimi inaktif eder ve büyük GSSG havuzunun varlığı birçok metabolik reaksiyona uygun değildir. Bu durumda da sistemin normale dönmesi için GSSG'nin yıkımı gereklidir. Ayrıca tohum depo proteinleri sentezi boyunca veya kükürt eksikliği durumunda GSH' ın yıkımı gerçekleşebilir (Tausz ve ark., 2004).

Glutasyon ayrıca bitki hücre siklusunun ilerlemesini düzenler. Hücre siklusunun kontrolünde GSH'ın ilgili olduğuyla ilgili ilk delil Earnshaw ve Johnson (1985) tarafından elde edildi. Büyüme ortamında GSH olmadığı zaman havuç hücrelerinin bölünmesi durdu. Glutasyon sentezinde görevli enzimin inhibitörü olan buthionin-S-R-sülfoksinin (BSO) ortama ilave edildiğinde, G1 fazında hücre bölünmesi durdu. Hücre bölünmesinin durması, hücre siklusuyla ilgili genlerin ekspresyonundaki değişikliklerle bağlantılıdır. Askorbattan veya glutasyonun yokluğu hücre bölünmesini durdurur fakat bu antioksidanlar, hücre siklusunun düzenlenmesinde telafi edici fonksiyonlara sahip değildirler. Kısaca glutasyon mitoz için gereklidir (May ve ark., 1998).

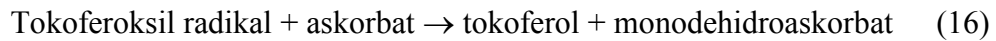
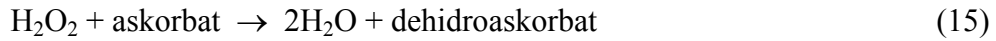
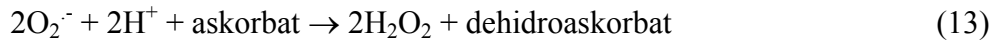
1.4.2.2. Askorbik Asit

Askorbat hücre duvarı dahil tüm hücre altı yapılarında oluşur fakat vakuolda az miktarda bulunur. Fizyolojik pH koşulunda askorbat yaygın olarak askorbat anyonu şeklinde bulunur. Bu anyon kolayca bir elektron kaybederek monodehidroaskorbatı (MDHA) oluşturabilir. Fazla oksidasyon sonucu yüksüz olan ve genelde dehidroaskorbik olarak adlandırılan dehidroaskorbat (DHA) oluşur. Askorbatın elektron verme yeteneği ve

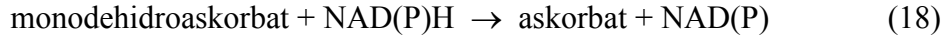
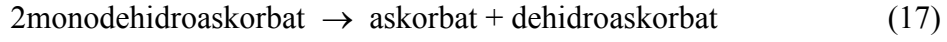
oluşan MDHA'nın daha az reaktif olması antioksidan özelliğinin ve serbest radikal toplayıcılığının temelidir (Buettner ve Schafer, 2004).

Son yıllarda askorbatın bitki büyüme ve gelişmesi gibi stres fizyolojisinde de önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir (Foyer, 1993; Conklin, 2001). ROS'ların detoksifikasyonunda, askorbik asitin anahtar bir antioksidan rolünün olduğu bulunmuştur (Conklin, 2001). Süperoksit, singlet oksijen ve H₂O₂ temizleme özelliği vardır (Padh, 1990). Bu nedenle askorbik asit oksidatif strese karşı korunmada önemli bir role sahiptir.

Askorbat fotosentez ve fotokorumada önemli rol oynar. Kloroplasttaki 2 farklı rolü teşhis edilmiştir. İlki süperoksit/ hidrojen peroksit APX ile temizlenmesinde rol oynar (13, 14, 15). Süperoksit ve hidrojen peroksit PSI'de oksijen fotoredüksiyon (Mehler reaksiyon) ve PSII' de oluşur. Singlet oksijen ise PSII'deki fotoduyarlılıktan oluşur. Askorbat tilakoid membrandan kaçan herhangi bir singlet oksijenle reaksiyona girebilir ve tokoferolün oksidasyonu sayesinde oluşan tokoferil radikallerini rejenere eder (16).



Görüleceği gibi bütün bu reaksiyonlar sonunda askorbat, monodehidroaskorbat ve dehidroaskorbata oksitlenir. ROS temizleme sisteminin fonksiyonunun devamı için askorbatın bu oksitlenmiş formlarının indirgenmesi gerekir. Monodehidroaskorbat (MDHA) ya kendiliğinden ya da NAD(P)H'ı indirgeyici ajan olarak kullanan monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR, EC 1.6.5.4) tarafından askorbata indirgenir (Hossain ve Asada, 1984) (17, 18).



Dehidroaskorbat (DHA), 6'dan büyük pH'larda kararsızdır ve tartarat ile oksalata dönüşebilir. Bu dönüşümü önlemek için dehidroaskorbat, indirgeyici olarak glutasyonu kullanan (GSH) dehidroaskorbat redüktaz (DHAR, EC 1.8.5.1) tarafından askorbata (Jablonski ve Anderson, 1981) ve bu reaksiyon sonucu oluşan GSSG, GR tarafından tekrardan GSH'a indirgenir (Foyer ve Halliwell, 1976) (19).



Bu reaksiyonların gerçekleşmesi için gerekli olan bütün enzimler kloroplastlarda bulunmakta olup bu enzimlerle oksitlenmiş askorbat ürünlerinden indirgenmiş askorbat üretilmektedir.

Sağlıklı yapraklardaki askorbat havuzu yaklaşık %90 indirgenmiş halde bulunur. Çoğu da DHA şeklindedir (Noctor ve Foyer, 1998). DHA hücre duvarında oksidasyona meyilli olur (Pignocchi ve Foyer., 2003; Sanmartin ve ark., 2003). MDHA yüksek miktarlarda bulunmaz. Yapraklar oksidatif strese maruz kaldığında *in vivo* olarak elektron paramagnetik rezonans spektroskopisiyle saptanabilir (Heber ve ark.,1996)

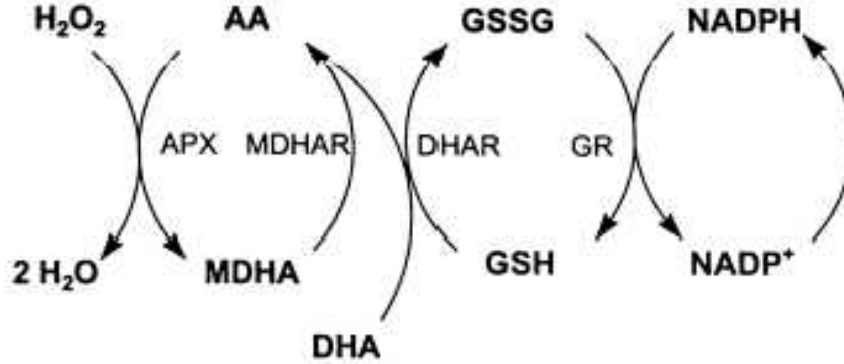
Normal koşullarda askorbat havuzu, yenileme sistemiyle belli bir seviyede tutulur. Bunuda monodehidro askorbat redüktaz (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) ve askorbat-glutasyon döngüsünün bir parçası olan GSH ile ve fotosistem I'deki indirgenmiş ferrodoksinle yapar (Miyake ve Asada, 1992; Asada,1999). MDHAR sitosol, kloroplast, peroksizom, mitokondri ve plasma membranında bulunur (Jimenez ve ark., 1997; Berezi ve Moller, 1998; Noctor ve Foyer, 1998). Bu enzim FAD içerir, MDHA'nın askorbata indirgenmesini katalizler ve NAD(P)H' a bağımlıdır.

MDHAR fenoksil radikallerini indirgeyebilir ve peroksidaz ile ferulik, koniferil ve klorogenik asitin oksidasyonunu engelleyebilir. Ayrıca ferodoksine bağımlı oksijen fotoredüksiyonunu katalizler.

DHA kolayca GSH gibi tiyoller ve SH içeren proteinler tarafından enzimatik olmayan bir işlemle askorbata indirgenebilir.

DHAR ve MDHAR kapasiteleri askorbatın regenerasyonu için limittir ve DHA'nın yıkımı ve kararsızlığı, yapraktaki askorbat ölçüsünün azalmasından sorumlu olabilir.

Ancak yükseltilmiş askorbatın normal miktarından fazla bulunması yararlı değildir ve redoks safasına bağlı olan süreçleri bozabilir. Ayrıca GSH havuzunun konsantrasyonu ve indirgenme fazı artabilir. Plazma membranı ve tonoplastta bulunan sitokrom b₅₆₁ elektronu askorbattan alır ve MDHA'ya verir. Bu sitokromlar transmembran elektron taşıması ve apoplastik ve vakuolar MDHA'nın indirgenmesiyle alkalıdır.



Şekil 3. Askorbat- glutatyon siklusu (Asada- Halliwell yolu)

H_2O_2 'i uzaklaştırmak için meydana gelen bir dizi reaksiyon Askorbat- Glutasyon döngüsü olarak bilinmektedir. Yapraklarda ve dokularda askorbat okside olduğunda daima monodehidroaskorbat'dan (MDHA) dehidroaskorbat (DHA) meydana gelmektedir. DHA GSH'ı substrat olarak kullanan DHA Redüktaz'ın aktivasyonu ile askorbata indirgenmektedir. Bu reaksiyon sonucunda GSSG meydana gelmektedir. GSSG NADPH tarafından tekrar GSH'a dönüştürülmektedir. Bu sırada NADPH'dan kopan elektronlar kullanılarak H_2O_2 suya indirgenmektedir (Noctor, 1998). H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasının yanısıra, bu sistem $NADPH/NADP^+$ oranını düşürerek, elektronların PS I'den moleküler oksijene verilme potansiyelini azaltır ve ROS oluşumunu önler. Böylece bu sistem fotorespirasyona benzer şekilde enerji tüketici fonksiyon yapar.

Askorbat antioksidan ve enzim kofaktörü olarak görev yapar. APX transgenik bitkilerde fazla ekspres edilmiştir ve foto-oksidatif ve oksidatif strese toleransı arttırdığı bilinmektedir. Askorbat, hücre genişlemesinin ve bölünmesinin kontrolüyle ilişkilidir. Kısmen hormonların senteziyle ve hidroksiprolin içeren ekstrasellüler yapısal proteinlerle bağlantılıdır.

Özellikle apoplasttaki askorbat, ozona karşı savunma oluşturur. ROS'lar bir dizi işlemlerde sinyal molekülü olurlar. Bu işlemler kök tüylerindeki gibi hücre büyümesi ve bekçi hücrelerin ABA sinyalleri gibi olabilir. Askorbat ve diğer antioksidanlar kök

tüylerinin büyümesini engeller ve uçta patlamaya neden olur. Kök tüylerinin apoplastlarındaki askorbat konsantrasyonu düşük olmalıdır. Askorbat ve ROS dengesi bekçi hücrelerindeki, stomatal davranışların çevresel kontrolünde bir faktördür.

Yüksek ışık altında APX aktivitesi artar. Işık askorbat havuzunu ve APX aktivitesini düzenler.

1.4.2.3. Karotenoidler

Karotenoid bitkilerde ve bazı diğer fotosentetik mikroorganizmalarda (yosunlar, bazı mantarlar ve bazı bakterilerde) bulunan pigmenttir. Altı yüzün üzerinde bilinen karotenoid vardır; ksantofiller ve karotenler olarak iki sınıfa ayrılır.

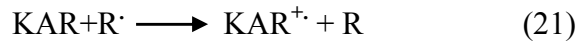
Karotenoidler, C₄₀ çoklu doymamış hidrokarbonların (karotenler) ve bunların oksitlenmiş türevlerinin (ksantofiller) bir sınıfını oluşturur

Fotosentetik sistemlerde karotenoidler fotosentetik tepkime merkezinde önemli bir rol oynarlar. Ya enerji transferine katılırlar, ya da reaksiyon merkezini oto-oksidasyondan korurlar. Fotosentez yapmayan organizmalarda karotenoidler oksidasyondan koruma mekanizmalarıyla ilişkilidirler. Karotenoidler singlet oksijenleri baskılar. Ayrıca süperoksit ve diğer 3 radikalle direkt olarak reaksiyona girebilir (20, 21, 22, 23).

1-Lipid peroksil radikaliyle reaksiyona girebilir,



2- Radikal katyon oluşturarak elektron transfer edebilirler



3- Radikal anyon oluşturmak suretiyle elektron alabilirler.



4-Alilik hidrojen çalma



Bu reaksiyonlardan da anlaşılacağı gibi karotenoidler zincirleme lipid peroksidasyonunu önler.

Fotosentetik dokulardaki karotenoidlerin esas koruyucu rolü, triplet klorofilin direkt olarak temizlenmesiyle singlet oksijen üretiminin önlenmesi ve böylece oksidatif stresten kaçınılmasıdır. Bu reaksiyonda triplet klorofilin enerjisi bir karotenoid molekülüne aktarılır ve sonuç olarak karotenoidin enerjisi ısı şeklinde dağıtılır. Böylece karotenoidler singlet oksijen oluşumunu önlemek için çalışırlar ve ışık yakalayıcı komplekste klorofile yakın olmalarıyla önemli bir role sahiptirler. Önemli bir karotenoid olan zeaksantin katıldığı ksantofil siklusu da ışık yakalayıcı kompleksten fazla enerjinin dağıtılmasında büyük bir role sahiptir (Deming-Adams ve Adams, 1996). PS I ve PS II 'nin ışık yakalayıcı kompleksinde bulunan zeaksantin, etkili bir şekilde triplet klorofilin singlet klorofile dönüşümünü kolaylaştırır. Ksantofil siklusu iki form arasında (violaksantin ve zeaksantin) ksantofillerin reversibl dönüşümüyle alakalıdır. Bir de-epoksidaz enzimi, fazla ışıkta violaksantin zeaksantine dönüşümünü katalizler ve bir epoksidaz enzimi ise karanlıkta veya düşük ışıkta zıt reaksiyonu katalizler. Böylece zeaksantin fotosentetik kapasiteyi aşan ışık yoğunluklarında birikir. Ksantofil siklusunun özellikle PS II pigmentlerindeki fazla enerjinin dağıtılmasında etkili olduğu ileri sürülmüştür (Deming-Adams ve Adams, 1996).

1.5. Bitki Büyüme Düzenleyicisi Olarak Poliaminler

Poliaminlerin bitki hormonu olup olmadığı hala tartışma konusudur. Poliaminlerin hormon sınıfına dahil edilmesi ilk defa 1982 yılında Uluslararası Bitki Büyüme Maddeleri Konferansında geçici olarak kabul edilmiştir. Galston, bu bileşiklerin hormon olarak kabul edilmesini, tüm hücrelerde geniş bir şekilde yayılmış olmalarından ve büyüme ve gelişme sürecinde mikromolar konsantrasyonlarda düzenlemeyi kontrol için kullanılabilir olmalarından dolayı doğrulamıştır (Galston ve Kaur-Shawhney, 1995). İçsel poliaminler ışık, hormon, tozlanma, stres ve yaşlanma gibi uyarılara verdiği cevaplar, taşınımları ve dışsal uygulama sonucundaki etkileri nedeniyle (Tekin ve Bozcuk, 1998) bitki büyüme ve gelişmesinde önemli bir düzenleyici role sahiptirler (Kaur-Sawhney ve ark., 1980; Altman ve Bachrach, 1981). Bazı araştırmacılar, çoğalan hücrelerde hızla sentez edilmeleri ve kolay taşınabilirlikleri nedeniyle, bazıları ise düşük molekül ağırlıkları, geniş kapsamlı etkileri ve organizmada çok yüksek düzeyde bulunmalarından dolayı poliaminlerin daha çok hormonlara benzerlik gösterdiğini ifade etmişlerdir (Tekin ve Bozcuk, 1998).

Poliaminler, alifatik aminlerin bir sınıfıdır ve bitkiler, mikroorganizmalar ve hayvan dokularında yaygın olarak dağılmışlardır (Smith ve ark., 1985). Biyojen aminler, amino asitlerin dekarboksilasyonu veya aldehit ve ketonların aminasyonu veya transaminasyonu ile oluşan azotlu bileşiklerdir (Çolak ve Uğur, 2002). Biyolojik aminlerin kimyasal yapısı alifatik (putresin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatik (tiramin, β -feniletilamin) veya heterosiklik (histamin, triptamin) olarak değişiklik gösterir (Özoğul ve Özoğul, 2004). Poliaminlerin en önemli formları; putresin ($C_4H_{12}N_2$), spermidin ($C_7H_{19}N_3$) ve spermin ($C_{10}H_{26}N_4$) 'dir (Pandey ve ark., 2000). Diamine putresin, triamine, spermidin ve tetramine spermin bitki hücrelerinde her yerde bulunurlar (Smith ve Davies, 1985; Pistocchi ve ark. 1990). Poliaminlerin biyosentezi ve metabolizması kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Yüksek bitkilerde putresin, ornithin dekarboksilazdan (ODC) yararlanılarak ornithinden yapılır. Putresin sentezi için yüksek bitkilerde bir diğer oluşum yolu arginin dekarboksilazla (ADC) ilgilidir. Bu reaksiyonun ürünü agmatindir. Agmatin, 2 enzimatik basamaktan sonra putresine dönüştürülür. Poliaminler bitki bünyesinde serbest olarak ya da fenolik asitlere, protein, nükleik asit gibi makromoleküllere veya diğer düşük molekül ağırlıklı bileşiklere bağlı olarak bulunurlar. Poliaminler hücre farklılaşması, gelişmesi ve bölünmesine düşük konsantrasyonlarda etki ederler. Poliaminler somatik embriyogenez de dahil olmak üzere sap veya gövde kalınlaşmasını, çiçeklenmeyi, kök büyümesi ve gelişmesini, yumru gelişimini, meyve olgunlaşmasını düzenlemektedirler (Marton ve Morris, 1987). Poliaminlerden putresin genellikle en yüksek oranda bulunandır. Spermidin ise sperminden daha yüksek oranda bulunur.

Poliaminler, streslere tepki, bitki büyümesi ve gelişmesini içeren biyolojik süreçlerin büyük bir kısmı ile ilişkilidirler (Smith ve ark., 1985). Poliaminlerin seviyelerindeki artış özellikle potasyum eksikliğinde, su eksikliği, tuz stresi, asit stresi, oksijensizlik ve çevresel streslere karşı yanıt olarak ortaya çıkar (Flores ve Galston, 1982). Çünkü poliaminler aminoasit dekarboksilaz reaksiyonuyla H tüketerek intrasellüler pH'ı ayarlar (Walden ve ark., 1997). Hücresel pH' da, poliaminler polikasyonlardır ve böylece, DNA, RNA, fosfolipidler, asidik protein kalıntıları ve hücre duvarı bileşikleri gibi önemli hücresel polianyonlarla bağlanmaktadır. Bundan dolayı, makromolekül aktivitesi, makromolekül sentezi, membran geçirgenliği, mayoz ve mitoz bölünmeye etki etmektedirler. Bu *in vitro* da gösterilmektedir fakat *in vivo* kanıtları hala yetersizdir (Galston ve Kaur-Shawhney, 1995).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Bitkilerin Büyütülmesi

Çalışma ekonomik bir bitki olan mısır (*Zea mays* L. cv RX 788) üzerinde yapıldı. MayAgro Tohumculuk' tan elde edilen tohumlar bir gece saf suda bekletildikten sonra toprak içeren plastik kaplara dikildi ve laboratuvar koşullarında (25±2 °C ve % 65-75 nispi nemde) büyütüldü. Birinci gruptaki bitkilere mısır tarlalarındaki yabancı otlarla mücadelede tercih edilen herbisit (diuron) uygulanırken, ikinci gruptaki bitkilerin yapraklarına % 0,05 Tween 20 içeren saf su uygulandıktan sonra nispi su içeriği, klorofil, karotenoid, lipid peroksidasyonu, çözünebilir protein, prolin ve askorbik asit tayinleri yapılarak, antioksidan enzim aktiviteleri ölçüldü. Çalışmanın diğer aşamasında ise herbisitlerin muhtemel olumsuz etkilerinin poliaminlerle azaltılıp azaltılamayacağı araştırıldı. Bu amaçla bitkilere herbisit uygulanmadan önce poliaminler (putresin, spermin, spermidin) uygulandı. Daha önce bu konuda yaptığımız çalışmalar ve literatür taramaları doğrultusunda poliaminlerin 1 mM konsantrasyonunda uygulanması ideal olarak kararlaştırıldı ve 10 günlük fidelere 3 gün boyunca 1 mM konsantrasyonunda putresin (PUT), spermin (SPM) ve spermidin (SPD) poliaminleri % 0,05'lik Tween 20 içerisinde hazırlanarak uygulandı. Bu ön muameleden sonra bitkilere diuron herbisiti tavsiye edilen tarla dozu (recommended field dose) olan 1,8 kg/ha'lık konsantrasyonda uygulandı. Diuron uygulandıktan 24, 48 ve 72 saat sonra bitkiler hasat edildi. Poliaminlerle ön muamele edilen ve edilmeyen bitkilerdeki parametreler mukayese edilerek, bitkilerin herbisitlere karşı olan tolerans mekanizmalarına poliaminlerin katkısı tespit edildi.

2.2. Nispi Su İçeriği Tayini

Nispi su içeriği tayini Castillo (1996)'ya göre yapıldı. Bitki yapraklarının taze ağırlıkları ölçüldükten sonra +4 °C'de 24 saat saf suda bekletilerek turgid ağırlıkları alındı. Daha sonra örnekler 80 °C'ye ayarlı etüvde 48 saat bekletilerek kuru ağırlıkları kaydedildi ve aşağıdaki formülde yerine koyularak nispi su içerikleri (NSİ) belirlendi.

$$\text{Nispi Su İçeriği (\%)} = (\text{Taze ağırlık} - \text{Kuru ağırlık} / \text{Turgid ağırlık} - \text{Kuru ağırlık}) \times 100$$

2.3. Klorofil ve Karotenoid Tayini

Bitkilerin yapraklarından 0,1 g alınarak 5 ml % 80'lik aseton içerisinde homojenize edildi. Homojenat 3000 rpm'de 5 dak. santrifüj edildikten sonra, elde edilen pigment ekstraktlarının 645, 663 ve 450 nm'lerdeki absorbanları spektrofotometrede okunup, absorban değerleri aşağıdaki formüllerde yerine koyularak, toplam klorofil Arnon (1949)'a ve toplam karotenoid miktarları Jaspars (1965)'a göre belirlendi.

$$\text{Toplam klorofil (mg/l)} : 20,2 \times A_{645} + 8,02 \times A_{663}$$

$$\text{Toplam karotenoid (mg/l)} : 4,07 \times A_{450} - (0,0435 \times K1 a + 0,367 \times K1 b)$$

2.4. Lipid Peroksidasyonu Tayini

Lipid peroksidasyon seviyesi, lipid peroksidasyonun bir ürünü olan malondialdehid içeriğine dayanarak Heath ve Packer (1968) metodunu takiben ölçüldü. Ekstraksiyon % 0,1 trikloro asetik asit (TCA) içerisinde yapıldı. Homojenat 15 000Xg de 5 dak. santrifüj edildi. Süpernatantın 1 ml'sine 4 ml, % 20 TCA içerisinde hazırlanmış % 0,5 tiobarbiturik asit (TBA) ilave edildikten sonra absorbanı 532 nm de kaydedildi. 600 nm de spesifik olmayan absorpsiyon için okunan değer hesaptan çıkarıldı. Elde edilen sonuç formülde ($A = E.c.1$) yerine konularak malondialdehit (MDA) konsantrasyonu hesaplandı.

2.5. Çözünabilir Protein Tayini

Çözünabilir protein miktarının tayini için Bradford (1976) yöntemi kullanıldı. Bu yöntem fosforik asitli ortamda proteinlerin Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması ve oluşan kompleksin 595 nm'de maksimum absorban göstermesi esasına dayanır. İlk olarak bovin serum albumin çözeltisi kullanılarak standart grafik çizildi. Daha sonra mısır yapraklarındaki çözünabilir protein tayini için hazırlanan antioksidan enzim ekstraktından 0,3 ml alınarak üzerine 1,7 ml fosfat tamponu ve 1,5 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi ilave edilerek vorteksle karıştırıldı. 2 ile 60 dak. arasında spektrofotometrede 595 nm'de absorbanları ölçüldü. Elde edilen absorban değerine karşılık gelen protein miktarları standart grafik yardımıyla hesaplanarak mg protein/ g taze ağırlık olarak ifade edildi.

2.6. Prolin Tayini

Mısır yapraklarındaki prolin miktarı spektrofotometrik olarak Asit-Ninhidrin metodu ile belirlendi (Bates ve ark., 1973). Bu amaçla önce saf prolin kullanılarak standart grafik hazırlandı. Herbisitin etkisiyle prolin değişimini belirlemek için 1g yaprak 5ml % 3'lük sülfosalisilik asit içinde homojenize edildikten sonra 8000 rpm'de 15 dak. santrifüj edildi. Süpernatant kısmından 1'er ml alınarak üzerlerine 1 ml glasiyal asetik asit ve 1 ml asit ninhidrin çözeltisi ilave edilip 100°C' de 1 saat bekletildi. Reaksiyonu durdurmak amacıyla 10 dakika buz banyosunda tutulduktan sonra 520 nm'de ölçüm yapıldı. Elde edilen absorbans değerleri standart grafik üzerinden µg prolin olarak belirlenip, 1 g taze ağırlıktaki prolin miktarı hesaplandı.

2.7. Askorbik Asit Tayini

Askorbik asit tayini, Shieh ve Sweet (1979) tarafından geliştirilen metoda göre yapıldı. Bu yöntemle askorbik asit tayini için öncelikle standart grafik çizildi. Daha sonra 2 g yaprak 5 katı hacimdeki fosfat-sitrik asit tamponunda homojenize edildikten sonra 5000 rpm'de 5 dak. santrifüj edildi. Süpernatant kısmından 0,1 ml alınarak, 0,5 ml fosfat-sitrik asit tamponu ile 2,4 ml taze hazırlanmış bakır-2,2- biquinolin çözeltisi konulmuş tüpe ilave edilip spektrofotometrede 540 nm'de ölçüm yapıldı. Elde edilen absorbans değerlerine karşılık gelen askorbik asit miktarları standart grafik yardımıyla hesaplanarak mg askorbik asit/g taze ağırlık olarak ifade edildi.

2.8. Antioksidan Enzim Ekstraktının Hazırlanması

Mısır yapraklarından 0,5 g alınarak 5 ml soğuk ekstraksiyon tamponunda (50 mM K₂HPO₄, 1 mM EDTA pH 7,0, % 1 polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) buz üzerinde ekstrakte edildi. Ekstrakt +4 °C'de 20.000Xg'de 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant enzim aktivitesinin tayini için kullanıldı.

2.8.1. SOD Aktivitesinin Tayini

SOD aktivitesi Beauchamp ve Fridovich (1971) metodunun Dhinsa ve Matowe (1981) tarafından geliştirilen yöntemi ile belirlendi. Bu metotta aktivite, indikatör molekül olarak kullanılan nitro blue tetrazolium (NBT)'un süperoksit radikalleri ile mavi renkli fomazona indirgenmesi reaksiyonunun SOD enzimi tarafından engellenmesinin

ölçülmesiyle tayin edildi. Bu reaksiyonun % 50'sinin inhibisyonuna uygun süpernatant hacmi 1 enzim ünitesi olarak kabul edildi.

Aktivite tayini için 50 mM fosfat tamponu (pH 7,8), 0,1 mM EDTA, 13 mM metionin, 75 µM NBT ve 2 µM ribofilavin içeren karışıma 70 µl enzim ekstraktı ilave edildi. Ribofilavin en son konulacak ve tüplerin beyaz ışık kaynağı altına yerleştirilmesiyle reaksiyon başlatıldı. Işık kaynağının 10 dak. sonra uzaklaştırılmasıyla reaksiyon sonlandırıldı ve oluşan reaksiyon ürünü 560 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu. SOD aktivitesi mg protein başına ünite enzim olarak ifade edildi.

2.8.2. GPX Aktivitesinin Tayini

GPX aktivitesi, Urbanek ve ark. (1991)'nin yöntemine göre belirlendi. Enzim aktivitesi, 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 0,1 mM EDTA, 5 mM guaiakol, 15 mM H₂O₂ ve 50 µl enzim ekstraktı içeren 2 ml'lik reaksiyon karışımının 470 nm'de 1 dak. süreyle ölçülmesiyle belirlendi. GPX aktivitesi 26,6 mM⁻¹cm⁻¹ epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı ve sonuçlar mg protein başına verildi. GR aktivitesi, NADPH için 6,22 mM⁻¹cm⁻¹ epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı ve sonuçlar mg protein başına verildi.

2.8.3. GR Aktivitesinin Tayini

GR aktivitesi Foyer ve Halliwell (1976)'e göre belirlendi. Aktivite tayini için 200 µl 0,5 mM EDTA içerisinde hazırlanmış 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 250 µl GSSG ve 500 µl NADPH ihtiva eden karışıma 50 µl enzim ekstraktı ilave edildi. NADPH'ın oksidasyonu 340 nm'de 5 dak. boyunca absorbansdaki azalmanın ölçülmesiyle belirlendi.

2.8.4. KAT Aktivitesinin Tayini

KAT aktivitesi Aebi (1983)'e göre ölçüldü. Reaksiyon karışımı (3 ml), 10,6 mM H₂O₂ içermekte ve reaksiyon 25 µl enzim ekstraktının ilave edilmesi ile başlatıldı. 240 nm'de ve 25 °C'de 3 dak. boyunca absorbansdaki azalış ölçülerek KAT aktivitesi tayin edildi. KAT aktivitesi, H₂O₂ için 39,4 mM⁻¹cm⁻¹ epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı ve sonuçlar mg protein başına verildi.

2.9. İstatistiksel Analizler

Üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilen ekstraksiyon ve analizlerin sonucunda elde edilen verilerin varyans analizi Windows tabanlı, lisanslı bir paket program olan Statistic Package for Social Sciences (SPSS) içerisinde yer alan Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi'ne göre yapıldı.

3. BULGULAR

3.1. Poliamin ve Diuron Uygulamalarının Nispi Su İçeriğine Etkileri

Diuron uygulamasından 24 ve 48 saat sonra önemli bir değişim gözlenmezken, 72 saat sonra fidelerdeki nispi su içeriğinin kontrole göre istatistiki bakımdan önemli ($P \leq 0,05$) ölçüde azaldığı gözlemlendi. 72 saatin sonunda kontrol fidelerinde % 91,23 olan nispi su içeriği diuron uygulanan fidelerde % 84,27 olduğu bulundu (Tablo 1).

Tablo 1. Poliaminlerle ön muamele yapılmış ve diuron uygulanmış mısır fidelerindeki nispi su içeriği

Nispi Su İçeriği(%)	24.SAAT	48.SAAT	72.SAAT
Kontrol	91,49 \pm 0,05* a	91,34 \pm 0,13 a	91,23 \pm 0,17 b
Diuron	91,36 \pm 0,09 a	89,22 \pm 0,19 a	84,27 \pm 0,91 a
Spermidin	91,48 \pm 0,62 a	89,36 \pm 1,83 a	86,69 \pm 5,03 ab
Spermin	91,43 \pm 0,07 a	89,27 \pm 0,74 a	87,37 \pm 0,48 ab
Putresin	91,31 \pm 0,13 a	89,75 \pm 0,26 a	87,50 \pm 0,70 ab

*Üç tekerrürlü ortalamaların standart sapması. Aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$). Ortalamalar satır olarak değil, her bir sütun kendi içinde karşılaştırılmıştır (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi).

SPD, SPM ve PUT ile ön muamele yapılan fidelerdeki nispi su içeriğinde, sadece diuron uygulanan fidelerdekine oranla istatistiki olarak önemli değişimler gözlenmedi.

3.2. Poliamin ve Diuron Uygulamalarının Toplam Klorofil Miktarına Etkileri

Kontrolle karşılaştırıldığında diuron uygulanan fidelerin 24, 48 ve 72. saatlerdeki toplam klorofil miktarındaki azalmanın istatistiki bakımdan ($P \leq 0,05$) önemli olduğu bulundu (Tablo 2). Fidelerin toplam klorofil miktarı 24. saatte kontrol grubunda 2,78 iken diuron uygulananlarda 2,4, 48. saatte kontrol 2,7 iken diuron grubu 1,96, 72. saatte ise kontrol 2,36 iken diuron uygulanan fidelerin toplam klorofil miktarı 1,43 olduğu bulundu.

Tablo 2. Poliaminlerle ön muamele yapılmış ve diuron uygulanmış mısır fidelerindeki toplam klorofil miktarı

Toplam klorofil miktarı (mg/g taze ağırlık)	24.SAAT	48.SAAT	72.SAAT
Kontrol	2,78 ±0,13 b	2,7 ±0,04 e	2,36 ±0,02 d
Diuron	2,4 ±0,03 a	1,96 ±0,01 a	1,43 ±0,02 a
Spermidin	2,65 ±0,04 ab	2,24 ±0,02 d	1,91 ±0,04 bc
Spermin	2,57 ±0,18 ab	2,16 ±0,03 c	1,95 ±0,02 c
Putresin	2,46 ±0,17 a	2,06 ±0,04 b	1,86 ±0,04 b

*Üç tekerrürlü ortalamaların standart sapması. Aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$). Ortalamalar satır olarak değil, her bir sütun kendi içinde karşılaştırılmıştır (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi).

SPD ve SPM ön muamele fidelerin 24 saat sonundaki toplam klorofil miktarları diuron grubundakilerle kıyaslandığında az da olsa bir artış gösterirken PUT ile ön muamele yapılmış fidelerin toplam klorofil miktarlarının diuron grubuyla istatistiki olarak aynı olduğu gözlemlendi. 48. ve 72. saat sonlarında tüm poliamin gruplarının, diuron uygulanmış gruba oranla toplam klorofil miktarlarında istatistiki bakımdan önemli artışlar olduğu kaydedildi. SPM ön muamelesine tabi tutulmuş fideler, toplam klorofil miktarları bakımından diuron grubundan en fazla farkın gözlemlendiği grup oldu. 72 saat sonunda diuron uygulanan fidelerdeki toplam klorofil miktarındaki azalma %39,4 iken, SPD ile ön muamele edilmiş fidelerde %19,06, SPM ile ön muamele edilmiş fidelerde %17,37 ve PUT ile ön muamele edilmiş fidelerde ise %21,18 olarak bulundu.

3.3. Poliamin ve Diuron Uygulamalarının Karotenoid Miktarına Etkileri

Diuron uygulanan fidelerdeki karotenoid miktarının 24, 48 ve 72. saatlerde kontrole oranla istatistiki bakımdan önemli ölçüde ($P \leq 0,05$) azaldığı görüldü (Tablo 3). 72 saat sonunda diuron uygulanan fidelerin toplam karotenoid miktarında % 46,15 oranında azalma görüldü.

Tablo 3. Poliaminlerle ön muamele yapılmış ve diuron uygulanmış mısır fidelerindeki karotenoid miktarı

Karotenoid miktarı (mg/g taze ağırlık)	24.SAAT	48.SAAT	72.SAAT
Kontrol	0,28 ±0,005 c	0,26 ±0,005 c	0,26 ±0,01 d
Diuron	0,20 ±0,01 a	0,17 ±0,005 a	0,14 ±0,005 a
Spermidin	0,26 ±0,01 bc	0,23 ±0,02 b	0,2 ±0,005 c
Spermin	0,24 ±0,005 b	0,22 ±0,01 b	0,19 ±0,005 c
Putresin	0,21 ±0,02 a	0,19 ±0,005 a	0,17 ±0,005 b

*Üç tekerrürlü ortalamaların standart sapması. Aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$). Ortalamalar satır olarak değil, her bir sütun kendi içinde karşılaştırılmıştır (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi).

Diuron grubunda gerçekleşen karotenoid miktarındaki bu azalma SPD ve SPM ön muamelesi uygulanmış fidelerde 24, 48 ve 72. saatlerde istatistiki bakımdan önemli ölçüde engellendi. PUT ön muamelesi uygulanan fidelerde ise diuron grubundaki toplam karotenoid miktarının azalmasıyla 24 ve 48. saatlerde istatistiki bakımdan benzerlik gösterdi. PUT ile ön muamele yapılan fidelerde sadece 72. saatte diuron uygulanan fidelerdeki toplam karotenoid miktarıyla kıyaslandığında istatistiki bakımdan önemli ölçüde azalmanın engellendiği gözlemlendi. 72 saat sonunda SPD ile ön muamele yapılan fidelerin toplam karotenoid miktarlarındaki azalma %23,07; SPM ile ön muamele yapılan fidelerde %26,92 ve PUT ile ön muamele yapılan fidelerdeki toplam karotenoid miktarındaki azalma %34,61 olduğu tespit edildi.

3.4. Poliamin ve Diuron Uygulamasının Prolin Miktarına Etkileri

Diuron uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra fidelerdeki prolin miktarının kontrol grubuna göre istatistiki bakımdan önemli ($P \leq 0,05$) ölçüde arttığı gözlemlenmiştir (Tablo 4). Bu artış 24. saatte % 42,69, 48. saatte % 62,18 iken 72 saat sonunda % 85,12' dir.

Tablo 4. Poliaminlerle ön muamele yapılmış ve diuron uygulanmış mısır fidelerindeki karotenoid miktarı

Prolin (mg/taze ağırlık)	24.SAAT	48.SAAT	72.SAAT
Kontrol	1,78 ±0,09 a	3,57 ±0,41 a	3,90 ±0,52 a
Diuron	2,54 ±0,04 b	5,79 ±0,53 cd	7,22 ±0,50 b
Spermidin	3,51 ±0,36 c	5,69 ±0,44 c	9,54 ±0,31 c
Spermin	4,30 ±0,24 d	4,56 ±0,23 b	8,80 ±1,04 c
Putresin	5,33 ±0,22 e	6,51 ±0,44 d	10,66 ±0,96 d

*Üç tekerrürlü ortalamaların standart sapması. Aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$). Ortalamalar satır olarak değil, her bir sütun kendi içinde karşılaştırılmıştır (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi).

SPD, SPM ve PUT ile ön muamele yapılan fidelerde 72. saat sonunda prolin miktarlarında diuron grubuna göre istatistiki bakımdan önemli ($P \leq 0,05$) ölçüde artış gözlemlendi. 24 saat sonunda en fazla artış sırasıyla PUT, SPM ve SPD' dir. 72 saat sonunda ise SPM ve SPD ile ön muamele edilmiş fidelerdeki prolin artışları istatistiki bakımdan aynı iken PUT ile ön muamele edilmiş fidelerdeki prolin artışı diğer tüm gruplardan (K, D, SPM, SPD) istatistiki olarak farklı ve fazladır.

3.5. Poliamin ve Diuron Uygulamalarının Askorbik Asit Miktarına Etkileri

Diuron uygulamasından 24 ve 48 saat sonra fidelerdeki askorbik asit miktarı kontrole göre istatistiki bakımdan önemli ($P \leq 0,05$) ölçüde azaldığı gözlenirken, 72 saat sonunda diuron uygulanan fidelerde kontrole göre askorbik asit miktarında istatistiki bakımdan önemli bir artış söz konusudur (Tablo 5).

Tablo 5. Poliaminlerle ön muamele yapılmış ve diuron uygulanmış mısır fidelerindeki askorbik asit miktarı

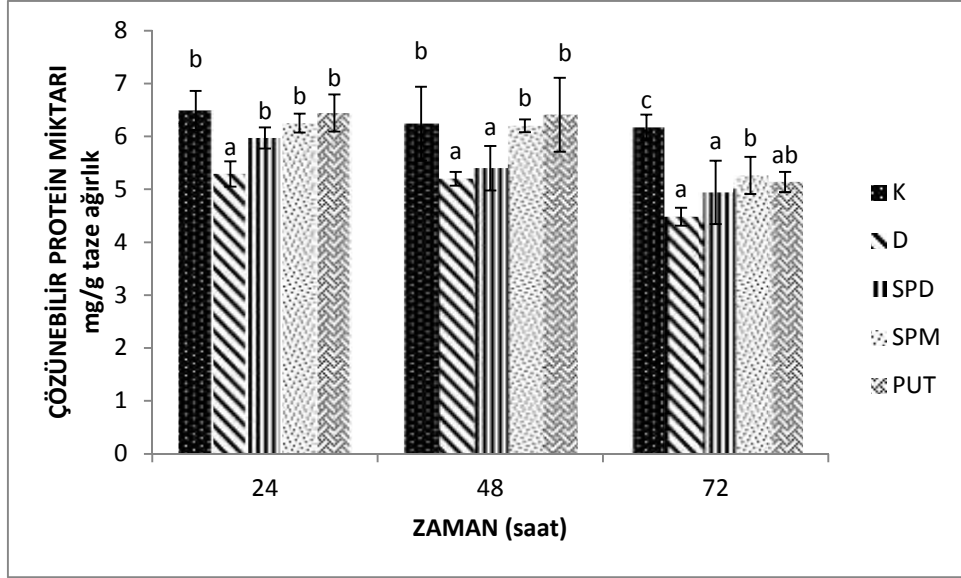
Askorbik asit (mg/g taze ağırlık)	24.SAAT	48.SAAT	72.SAAT
Kontrol	0,58 ±0,17 b	0,38 ±0,05 b	0,28 ±0,01 a
Diuron	0,41 ±0,08 a	0,29 ±0,01 a	0,49 ±0,02 c
Spermidin	0,46 ±0,05 ab	0,28 ±0,37 a	0,38 ±0,04 b
Spermin	0,41 ±0,05 a	0,24 ±0,34 a	0,43 ±0,01 bc
Putresin	0,38 ±0,38 a	0,28 ±0,01 a	0,4 ±0,08 bc

*Üç tekerrürlü ortalamaların standart sapması. Aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$). Ortalamalar satır olarak değil, her bir sütun kendi içinde karşılaştırılmıştır (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi).

Poliamin ön muameleleri uygulanan fidelerdeki askorbik asit miktarında 24 ve 48. saatlerde diuronla kıyaslandığında istatistiki bakımdan önemli bir fark gözlenmedi. Sadece 72. saatte SPD ile ön muamele yapılan fidelerin askorbik asit miktarlarında diurona kıyasla daha az bir artış görüldü.

3.6. Poliamin ve Diuron Uygulamalarının Çözünabilir Protein Miktarına Etkileri

Kontrol grubundaki fidelere göre diuron uygulanmış fidelerdeki çözünabilir protein miktarlarının istatistiki bakımdan önemli ($P \leq 0,05$) ölçüde azaldığı gözlemlendi. İstatistiki bakımdan en çok azalma 72 saat sonunda gözlemlendi. Bu azalmalar 24 saat sonunda % 18,48, 48 saat sonunda % 16,66 iken 72 saat sonunda % 27,39 olarak belirlendi (Şekil 4).

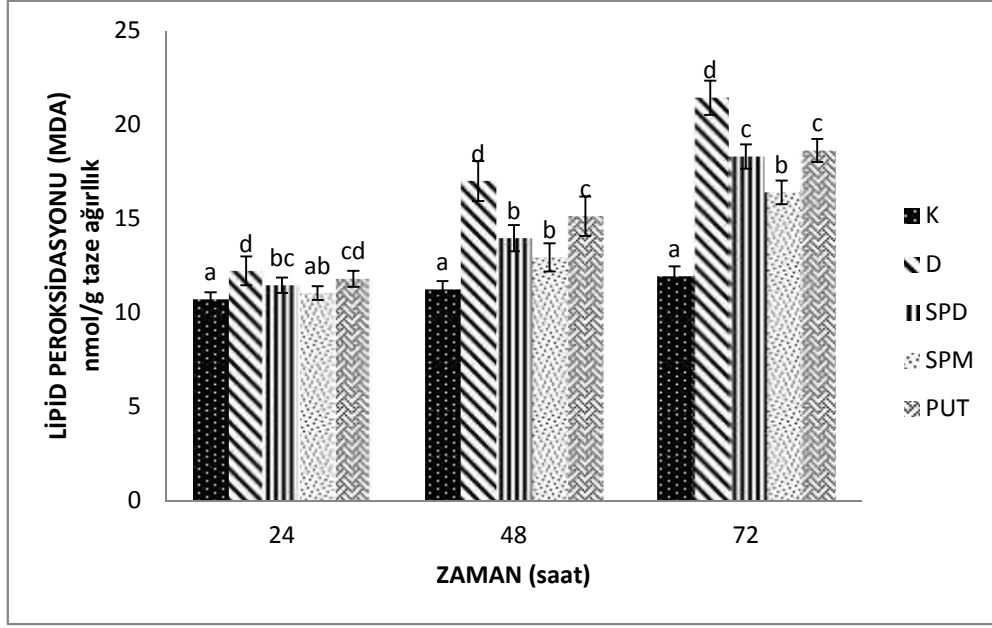


Şekil 4. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve diuron uygulanan mısır fidelerinde çözünebilir protein miktarındaki değişiklikler (Barlar üç tekerrürlü ölçümlerin standart sapmalarını göstermektedir. Herbir zaman diliminde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P \leq 0,05$) seviyesinde önemsizdir.)

Diuron uygulanan fidelerdeki çözünebilir protein miktarındaki azalma 24 saat sonunda SPD, SPM ve PUT ile ön muamele edilmiş fidelerde istatistiki olarak gözlenmedi. SPD ile ön muamele edilmiş fidelerde 48 ve 72 saat sonunda çözünebilir protein miktarının diuron uygulanan gruptaki fidelere oranla istatistiki bakımdan önemli ölçüde ($P \leq 0,05$) değişmediği gözlemlendi. PUT ile ön muamele yapılmış fidelerdeki çözünebilir protein miktarlarında 48 saat sonunda diuron grubuna kıyasla istatistiki olarak önemli bir artış gözlenirken, 72. saat sonunda diuron grubundaki fidelerin çözünebilir protein miktarlarına yakın sayılabilecek bir artış gözlemlendi. SPM ile ön muamele edilmiş fidelerin çözünebilir protein miktarlarının tüm zaman dilimlerinde diuron uygulanan fidelerdekine oranla istatistiki bakımdan önemli derecede arttığı gözlemlendi.

3.7. Poliamin ve Diuron Uygulamalarının Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkileri

24, 48 ve 72 saat sonunda diuron uygulanmış fidelerde kontrol grubundaki fidelere oranla lipid peroksidasyonun istatistiki bakımdan önemli ölçüde ($P \leq 0,05$) arttığı gözlemlendi. 24 saat sonunda diuron kaynaklı bu artış % 14,01, 48 saat sonunda % 51,24 iken 72 saat sonunda kontrol grubuna göre lipid peroksidasyonundaki artış % 79,63 olarak belirlendi (Şekil 5).

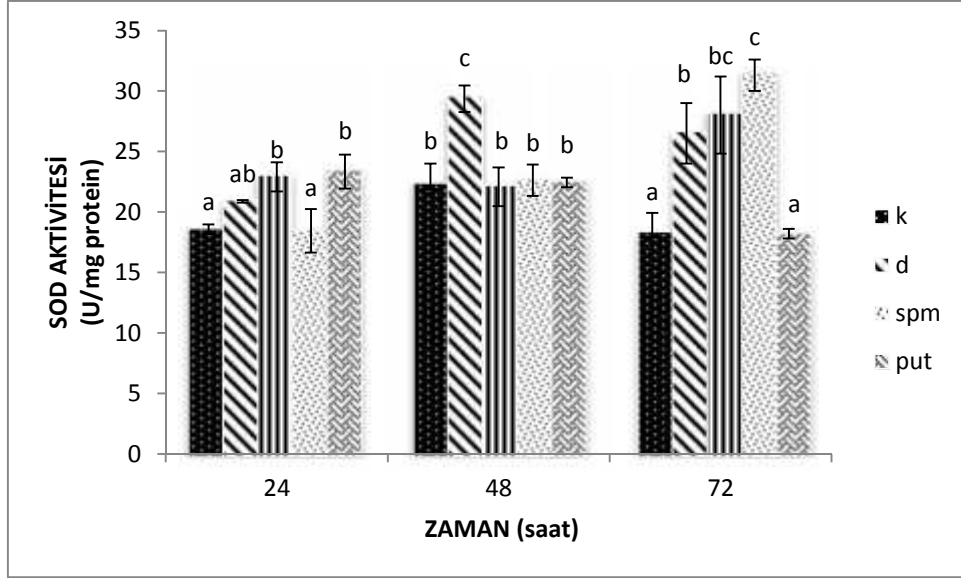


Şekil 5. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve diuron uygulanan mısır fidelerinde lipid peroksidasyonu miktarındaki değişiklikler (Barlar üç tekerrürlü ölçümlerin standart sapmalarını göstermektedir. Herbir zaman diliminde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P \leq 0,05$) seviyesinde önemsizdir.)

Tüm zaman dilimlerinde her üç poliamin gruplarında, diuron uygulanan fidelerdekilere oranla lipid peroksidasyonun önemli ölçüde engellendiği gözlemlendi. 24. ve 72. saat sonlarında lipid peroksidasyonundaki diuron uygulanan fidelere kıyasla en önemli azalma SPM ile ön muameleli grupta gözlenirken, 48. saat sonunda SPM ve SPD'nin lipid peroksidasyonunu diuron grubuna göre istatistiki olarak aynı miktarda azalttığı gözlemlendi. PUT ile ön muamele yapılan fidelerdeki lipid peroksidasyonu 24 saat sonunda diuron grubuna yakın bir değerde olsa da, 48 ve 72 saat sonunda diuron uygulanan fidelerdeki lipid peroksidasyonu miktarından istatistiki olarak önemli derecede düşük olduğu tespit edildi.

3.8. Poliamin ve Diuron Uygulamalarının SOD Aktivitesine Etkileri

Diuron uygulanan fidelerdeki SOD aktivitesinin kontrol grubuna oranla istatistiki bakımdan ($P \leq 0,05$) önemli ölçüde arttığı görüldü. Kontrol grubuna göre diuron uygulanan fidelerdeki SOD aktivitesindeki artış 24. saatte % 12,37, 48. saatte % 31 iken 72. saatte % 44,72 olarak belirlendi (Şekil 6).

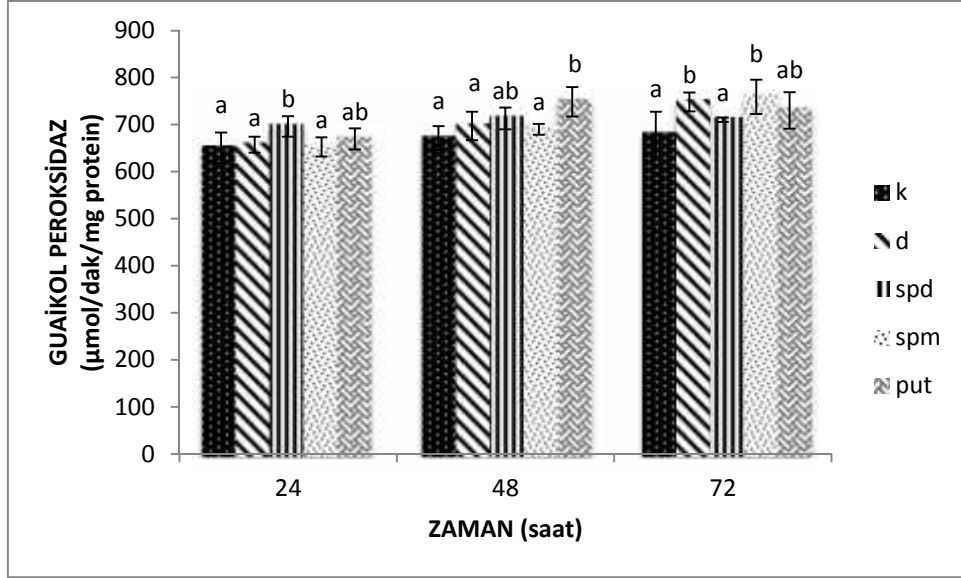


Şekil 6. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve diuron uygulanan mısır fidelerinde SOD aktivitesindeki değişiklikler (Barlar üç tekerrürlü ölçümlerin standart sapmalarını göstermektedir. Herbir zaman diliminde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P \leq 0,05$) seviyesinde önemsizdir.)

Uygulamanın 24. saatinde poliamin ön muameleli fidelerdeki en yüksek SOD aktivitesi diuronla kıyasla % 13,24 artışla PUT ve % 11,07 artışla SPD gruplarındaki fidelerde gözlenirken, SPM ile ön muamele yapılmış fidelerdeki SOD aktivitesinin diuron uygulanan fidelerdekine yakın olduğu tespit edildi. 48 saat sonunda SPD, SPM ve PUT ile ön muamele edilmiş fidelerdeki SOD aktivitesi diuron grubundaki fidelerin SOD aktivitesiyle kıyaslandığında istatistiksel bakımdan önemli derecede azalma ($P \leq 0,05$) olduğu gözlemlendi. 72 saat sonunda ise SPD grubunda diuron grubuna yakın bir artış gözlenirken, SPM grubundaki SOD aktivitesindeki artışın diuron grubu ile kıyaslandığında % 26,27 daha fazla olduğu gözlemlendi. PUT ile ön muamele yapılan fidelerin SOD aktivitesine bakıldığında ise diuron uygulanan fidelerdeki ile kıyaslandığında % 31,32 oranında önemli bir düşüş tespit edildi.

3.9. Poliamin ve Diuron Uygulamalarının Guaikol Peroksidaz Aktivitesine Etkileri

Diuron uygulanan fidelerdeki guaikol peroksidaz aktivitesi 24 ve 48 saat sonunda kontrol grubu fidelerindeki GPX aktivitesiyle istatistiksel bakımdan ($P \leq 0,05$) aynı olduğu gözlemlendi. 72 saat sonunda ise diuron uygulanan fidelerdeki GPX aktivitesinde kontrol fidelerindeki GPX aktivitesiyle kıyaslandığında istatistiksel bakımdan önemli ölçüde bir artış gözlemlendi (Şekil 7).

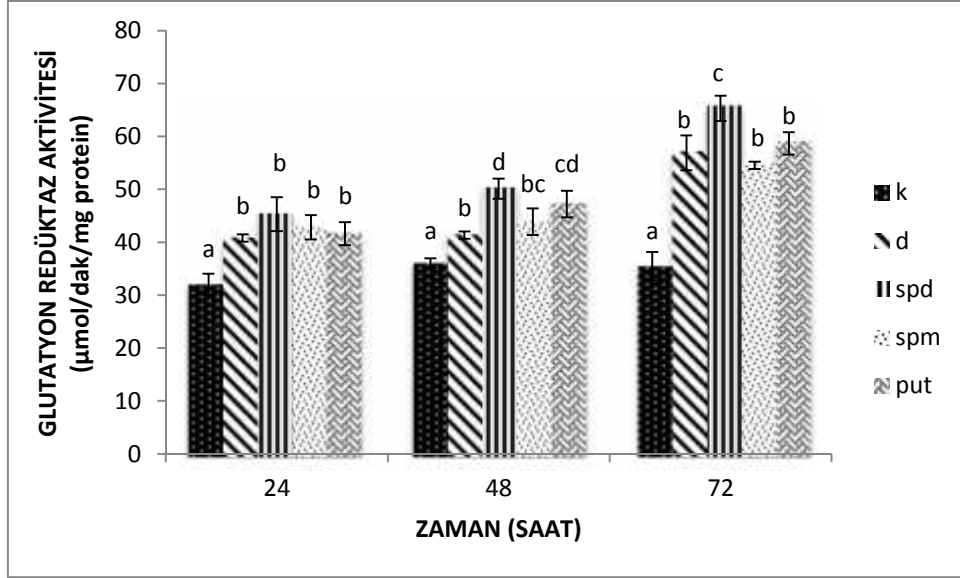


Şekil 7. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve diuron uygulanan mısır fidelerinde GPX aktivitesindeki değişiklikler (Barlar üç tekerrürlü ölçümlerin standart sapmalarını göstermektedir. Herbir zaman diliminde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P \leq 0,05$) seviyesinde önemsizdir.)

SPD ile ön muamele yapılan fidelerdeki GPX aktivitesi diuron grubuyla oranlandığında 24. saatte % 5,94 oranında artış, 72. saatte % 5,04 oranında azalış saptanırken, 48. saate diuron grubundaki GPX aktivitesine yakın olmakla beraber az da olsa bir artış gözlemlendi. SPM ile ön muamele yapılmış fidelerin 24. , 48. ve 72. saat sonlarındaki GPX aktiviteleri diuron uygulanan fidelerinki ile istatistiki bakımdan aynı olduğu tespit edildi. PUT ile ön muamele yapılmış fidelerde 24. ve 72. saat sonlarında diuron grubuna yakın GPX aktiviteleri gözlenmesine rağmen 48. saatte diuron uygulanan fidelerdeki GPX aktivitesinden % 7,04 oranında fazla bir aktivite tespit edildi.

3.10. Poliamin ve Diuron Uygulamalarının Glutasyon Redüktaz Aktivitesine Etkileri

Kontrol grubundaki fidelerin glutasyon redüktaz aktivitesiyle kıyaslandığında 24, 48 ve 72 saatlerinde diuron uygulanan fidelerin GR aktivitelerinde istatistiki bakımdan önemli ($P \leq 0,05$) ölçüde artış gözlemlendi (Şekil 8). Bu artış 24.saatte % 27,34, 48.saatte % 14,76 iken 72.saatte % 60,4 olarak saptanmıştır.

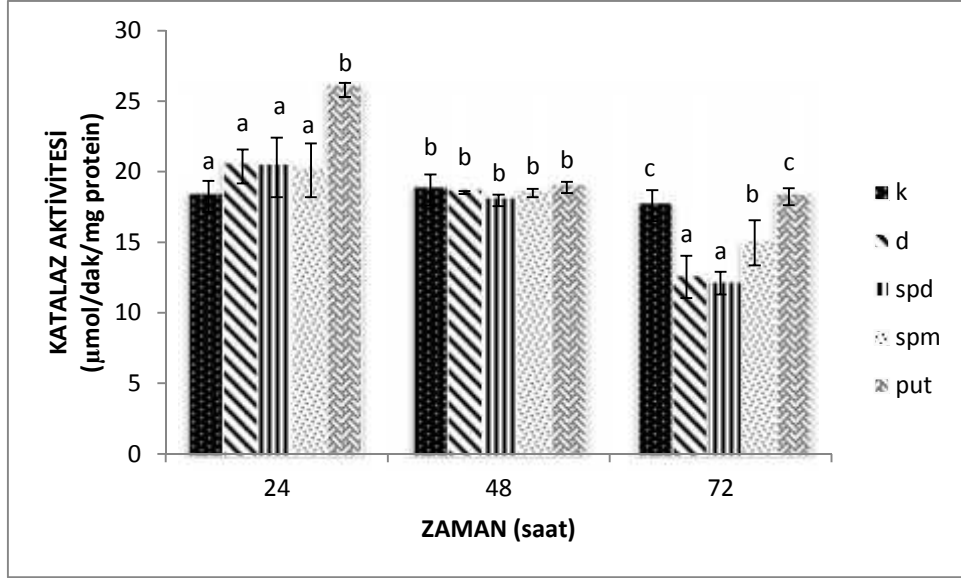


Şekil 8. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve diuron uygulanan mısır fidelerinde GR aktivitesindeki değişiklikler (Barlar üç tekerrürlü ölçümlerin standart sapmalarını göstermektedir. Herbir zaman diliminde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P \leq 0,05$) seviyesinde önemsizdir.)

Uygulamanın 24. saatinde GR aktivitesi bakımından tüm poliamin gruplarının, diuron uygulanan gruba istatisti bakımdan benzer olduğu saptandı. 48 saat sonunda, SPD ile ön muamele yapılan fidelerdeki GR aktivitesinde diuron uygulananlardakine oranla % 21,23 oranında bir artış gözlemlendi. PUT uygulanan fidelerin GR aktivitesinde de diuron uygulanan fidelerdekine oranla % 14,14 oranında bir artış saptandı. 72 saat sonunda ise SPM ve PUT ile ön muamele yapılmış fidelerdeki GR aktivitesinin diuron uygulanan fidelerdekiyle aynı olduğu gözlenirken sadece SPD ile ön muamele yapılmış fidelerde diuron grubuna kıyasla GR aktivitesinde % 14,8 oranında bir artış belirlendi.

3.11. Poliamin ve Diuron Uygulamalarının Katalaz Aktivitesine Etkileri

Diuron uygulanan fidelerdeki katalaz aktivitesi kontrol fidelerinin KAT aktivitelerine göre 24 ve 48 saat sonunda istatistiki olarak bir fark göstermezken, 72. saat sonunda diuron uygulanan fidelerdeki KAT aktivitesinin kontrole göre % 28,42 oranında azaldığı gözlemlendi (Şekil 9).



Şekil 9. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve diuron uygulanan mısır fidelerinde KAT aktivitesindeki değişiklikler (Barlar üç tekerrürlü ölçümlerin standart sapmalarını göstermektedir. Herbir zaman diliminde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P \leq 0,05$) seviyesinde önemsizdir.)

SPD ile ön muamele yapılan fidelerdeki KAT aktivitesi tüm zaman dilimlerinde diuron uygulanan fidelerdekiyle istatistiki olarak aynı bulundu. SPM ile ön muamele yapılan fidelerin, diuron grubuyla kıyaslandığında KAT aktivitesi 24 ve 48 saat sonlarında aynı iken, 72 saat sonunda ise % 19,29 bir artış olduğu gözlemlendi. PUT ile ön muamele yapılan fidelerdeki KAT aktivitesinde diuron grubuna oranla 24.saatte % 26,65 ve 72.saatte % 45,29 oranlarında artışlar gözlemlendi.

4. TARTIŞMA

Poliaminler bitki büyüme ve gelişmesiyle alakalı olan, sık rastlanan düşük moleküler ağırlıklı alifatik aminlerdir. Birçok biyolojik olay ve bitkilerin strese cevaplarında önemli rol oynarlar. Poliaminlerin stres boyunca oynadığı tam rol belirlenmeye çalışılmasına rağmen, bazı streslerin olumsuz etkisi poliaminlerin dışarıdan ilavesiyle hafifletilebilir. Bu bileşiklerin dışarıdan uygulanması atrazine karşı bezelye bitkilerini korumuş (Zheleva ve ark., 1994), domates ve tütünde ozonun teşvik ettiği yaprak nekrozislerini önlemiştir (Ormrod ve Beckerson, 1986; Langebartels ve ark., 1991). Bu çalışmada mısır yapraklarındaki oksidatif strese karşı poliaminlerin koruyucu etkileri araştırılmıştır. Oksidatif stresin parametreleri kullanılarak diuron herbisitinin oksidatif stresi teşvik ettiği belirlenmiştir. Herbisitler genellikle bitkinin yaşamı için gerekli temel metabolik olayları etkiledikleri için bitkisel metabolizmanın seyrini anlamamıza yardımcı olmak için özel problemler olarak kullanılabilirler. Çalışmada kullanılan diuron herbisiti bitkilerdeki en önemli fizyolojik olay olan fotosenteze etki etmekte ve fotosistem II'yi inhibe ederek başta singlet oksijen olmak üzere reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna sebep olmaktadır (Fayez, 2000; Geoffroy ve ark., 2002; Reis ve ark., 2011). ROS'lar başta membranlardaki doymamış yağ asitleri olmak üzere bütün makromoleküllere saldırırlar ve bitkilerde ürün kayıplarına sebep olurlar. Nitekim bu çalışmada diuron uygulanan fidelerdeki lipid peroksidasyonunun kontrole nazaran önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. Lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak MDA birikimi ölçülmektedir (Smirnoff 1995). Diuron uygulanmasından 72 saat sonra kontrole nazaran MDA miktarının %79,63 oranında arttığı kaydedilmiştir. Fotosistem II'yi inhibe eden diğer bir herbisit olan atrazin de mısır bitkisi yapraklarında lipid peroksidasyonunu artırdığı başka araştırmacılar tarafından belirlenmiştir (Nemat Alla ve Hassan, 2006; Akbulut ve Yiğit, 2010). Ayrıca başka bitkilerde de herbisitler tarafından lipid peroksidasyonunun artırıldığı rapor edilmiştir (Luo ve ark., 2004; Song ve ark., 2007; Jiang ve Yang, 2009). ROS' lar tarafından başlatılan lipid peroksidasyonu önemli ölçüde hücre membranlarının fonksiyonunu ve bütünlüğünü etkiler ve hücre fonksiyonunda irreversibl hasar üretebilir (Aravind ve Prasad, 2005). Dolayısıyla lipid peroksidasyonu artışı oksidatif stresin önemli bir göstergesidir (Jiang ve Yang, 2009, Yang ve ark., 2011). Çalışmamızda poliamin uygulanan fidelerdeki lipid peroksidasyonu artışının sadece diuron uygulanan fidelerdekine nazaran daha az oranda

olduğu belirlenmiştir. SPD, SPM ve PUT ile ön muamele yapılan fidelerdeki lipid peroksidasyonundaki artışın 72 saat sonra sırasıyla % 53,39, % 37,46 ve % 56,07 olduğu kaydedilmiştir. Lipid peroksidasyonunu önlemede en etkili poliaminin SPM olduğu belirlenmiştir. Benavides ve ark. (2000)'da ayçiçeği yaprak disklerinde paraquatın sebep olduğu lipid peroksidasyonunu gidermede en etkili poliaminin SPM olduğunu kaydetmişlerdir. Ayrıca Kitada ve ark. (1979) sıçan karaciğer mikrozomlarındaki lipid peroksidasyonunu önlemede, mikrozomal fosfoliplere direkt bağlanmasından dolayı SPM'nin en etkili olduğunu rapor ettiler ve Tadolini ve ark. (1984) SPM ve SPD tarafından lipid peroksidasyonunun inhibisyonunu bir polikasyon/fosfolipid vesikül kompleksi oluşturmalarına dayandırmıştır. Ayrıca poliaminler, demir ve fosfolipid polar başlarla birlikte tersiyer kompleks oluştururlar ve Fe^{+2} 'in otooksidasyona duyarlılığını ve böylece serbest oksijen radikalleri üretme yeteneğini değiştirebilirler (Tadolini, 1988; Tiburcio ve ark., 1994). Başka çalışmalarda da poliaminlerin aktif oksijen türlerinin temizleyicileri olarak rol oynadığı ve farklı çevresel stres koşullarında lipid peroksidasyonunu azaltarak membranları kararlılaştırdığı kaydedilmiştir (Unal ve ark., 2008). SPD ve PUT'a kıyasla SPM'nin daha fazla olan koruyucu etkisi, daha uzun zincir ve daha çok sayıda pozitif yük taşıması sonucu daha önemli nötrale edici ve membran kararlılaştırıcı özelliğine bağlanabilir (Velikova ve ark., 2000; Kubis, 2003). Nitekim poliaminler organik polikasyonlar olarak, negatif yüklü fosfolipidlerle birleşerek membranları stabilize edebilirler (Besford ve ark., 1993, Zhao ve Yang, 2008). Ballas ve ark. (1983) poliaminlerin eritrosit membran proteininin glutamik asit kalıntılarının karboksil grubuna bağlanabildiğini ve membran bütünlüğünü koruyabildiğini tespit etmişlerdir.

Daha önceki çalışmalar klorofil içeriği azalmasının bitki büyüme ve gelişmesine zararı izlemek için iyi bir indikatör olduğunu göstermiştir (Zhou, 2003; Song ve ark., 2007; Yin ve ark., 2008). Bu çalışmada klorofilin diurona oldukça duyarlı olduğu gösterilmiştir. Çünkü diuron uygulanan fidelerdeki klorofil miktarının kontrole nazaran önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Nitekim Ridley (1977), bitkilerdeki diuron fitotoksitesinin primer septomunun klorofil yıkımı olduğunu rapor etmiştir. Diuron oksitlenmiş karotenoidin yeniden üretilmesini önlemekte ve klorofil yıkımına sebep olmaktadır (Ridley, 1977). Başka çalışmalarda da diuron etkisiyle klorofil miktarının azaldığı kaydedilmiştir (Barry ve ark., 1990; Fayez, 2000; Fayez ve Elfattah, 2007). Poliaminlerle ön muamele yapılan

fidelerde ise diuron etkisiyle meydana gelen klorofil miktarındaki azalmanın önemli ölçüde giderildiği belirlenmiştir. Toplam klorofil miktarındaki azalmayı önlemede en etkili olan poliaminlerin SPM ve SPD olduğu tespit edilmiştir. Yulaf yapraklarında yapılan bir çalışmada SPM'nin tilakoid bütünlüğünü en iyi koruyan poliamin olduğu rapor edilmiştir (Tiburcio ve ark., 1994). Bezelye bitkilerinde de atrazin etkisiyle klorofil miktarında meydana gelen azalmanın poliaminler tarafından önemli ölçüde önlediği tespit edilmiştir (Zheleva ve ark., 1994). Besford ve ark. (1993) osmotik stresli yulaf yapraklarında SPD ve SPM'nin klorofil kaybını önlediğini kaydetmişlerdir. Başka çalışmalarda da poliaminlerin klorofil parçalanmasını geciktirdiği ve antisenesens rollerinin olduğu belirtilmiştir (Cheng ve Kao, 1983; Flores,1991; Durmuş, 2003).

Toplam klorofil miktarına benzer şekilde karotenoid miktarında da diuron etkisiyle önemli bir azalmanın olduğu kaydedilmiştir. Diuron uygulanmasından 72 saat sonra kontrole nazaran karotenoid miktarının % 46,15 oranında azaldığı belirlenmiştir. Fayez (2000)'de diuron uygulanan soya fasülyesinde karotenoid miktarının önemli ölçüde azaldığını rapor etmiştir. *Saccharina japonica* ve *Chlorella vulgaris* alglerinde ve *Hordeum vulgare*'nin izole edilmiş kloroplastlarında da diuron etkisiyle karotenoid miktarının azaldığı kaydedilmiştir (Barry ve ark., 1990; Fayez ve Elfattah, 2007; Kumar ve ark., 2010). Poliaminlerle ön muamele yapılan fidelerde, diuron uygulanmasıyla karotenoid miktarında meydana gelen azalmanın önemli ölçüde engellendiği tespit edilmiştir. Özellikle SPM ve SPD poliaminlerinin daha etkili olduğu belirlenmiştir. Karotenoidlerin triplet klorofil (Noguchi ve ark., 1990) ve singlet oksijenin (Demming-Adams, 1990) etkili temizleyicileri olduğu bilindiği için, poliaminlerin etkisiyle bu yardımcı pigmentlerin miktarının artması ROS'ların bitkilerde sebep olduğu hasarı kısıtlama kapasitesini artırabilir. Nitekim toleranslı genotiplerde daha yüksek klorofil ve karotenoid miktarları tayin edilmiştir (Pastori ve Trippi, 1992). Poliaminler, antioksidan özelliklerinden dolayı diuron etkisiyle oluşan ROS'ların miktarlarını azaltmış olabilirler. Böylece karotenoid gibi antioksidan moleküllerin miktarı fazla azalmadığı için bitkiler oksidatif strese karşı daha toleranslı olacaklardır.

Askorbik asit ROS'ların detoksifikasyonunda karotenoidler gibi anahtar bir antioksidandır. Süperoksit, singlet oksijen ve H₂O₂'yi temizleme özelliği vardır. Askorbik asit özellikle kloroplastlarda fotosentez boyunca üretilen ROS'ları temizleyerek, kloroplastın oksitleyici ortamında fotosentezin karbon assimilasyonu fonksiyonunun

bozulmamasını sağlar. Suda çözünebilir bir bileşik olduğu için, aktifleşmiş oksijenle sulu fazda bulunan diğer bileşenlerden daha kolayca reaksiyona girer ve oksidatif hasardan makromolekülleri korur. Diuron uygulanmasından 24 ve 48 saat sonra askorbik asit miktarının önemli ölçüde azaldığı 72 saat sonra ise arttığı belirlenmiştir. Diuron uygulanan bitkilerdeki askorbik asit miktarının başlangıçta azalması, reaktif oksijen türleriyle askorbik asitin dehidroaskorbata oksidasyonu veya askorbat peroksidazların askorbik asiti substrat olarak kullanmalarıyla açıklanabilir. Nitekim pirinç bitkisiyle yapılan çalışmalarda stres durumunda askorbat miktarı azalırken dehidroaskorbat miktarının arttığı kaydedilmiştir (Boo ve Jung, 1999; Boo ve ark., 2000). Öte yandan, Nayar ve Chander (2004) nohutta su ve soğuk stresi boyunca askorbik asit miktarının önce arttığını daha sonra ise azaldığını kaydetmişlerdir. Stres boyunca askorbik asit miktarında görülen bu değişiklikler askorbat peroksidaz aktivitesindeki değişimlerle alakalı olabilir. Askorbat peroksidaz aktivitesinin bazı bitkilerde stres durumunda arttığı bazılarında ise azaldığı rapor edilmiştir (Geoffroy ve ark., 2004; Goamez ve ark., 2004; Zhang ve ark., 2009). Atrazin uygulanan mısır fidelerinde askorbat peroksidaz aktivitesinin başlangıçta arttığı daha sonra ise azaldığı belirlenmiştir (Akbulut ve Yiğit, 2010). Kubis (2001), arpa yapraklarının su içeriğinde % 40 azalmanın olduğu su stresi durumunda askorbat peroksidaz aktivitesinin azaldığını kaydetmiştir. Bu çalışmada diuron uygulanmasından 24 ve 48 saat sonra NSİ miktarının önemli oranda değişmediği ancak 72 saat sonra istatistiki bakımdan önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur. Dolayısıyla 72. saatte azalan su içeriğinden dolayı askorbat peroksidaz aktivitesi azalmış ve askorbik asit miktarı artmış olabilir. Poliaminlerle ön muamele yapılan fidelerdeki askorbik asit ve NSİ miktarında sadece diuron uygulanan fidelerle mukayese edildiğinde çok önemli bir farklılık belirlenmemiştir. SPD ile ön muamele yapılan su stresli bitkilerde de NSİ miktarının değişmediği (Kubis, 2003; Kubis, 2008), tuz stresli bitkilerde ise NSİ’de tuzun etkisiyle meydana gelen azalmanın giderildiği (Duan ve ark., 2008) kaydedilmiştir. Diğer taraftan, PUT’un NaCl varlığında sürgün su içeriğinde azalmaya sebep olduğu, SPD ve SPM’nin ise bitki su durumu üzerine etkileri olmadığı rapor edilmiştir (Ndayiragije ve Lutts, 2006).

Çözünebilir protein miktarında diuron uygulanmasından 24 saat sonra meydana gelen azalmanın poliaminlerle ön muamele yapılan fidelerde tamamen önlendiği, 48. saatte SPM ve PUT’un etkili olduğu, 72. Saatte ise SPM’nin en etkili poliamin olduğu tespit edilmiştir. Benzer olarak, Unal ve ark. (2008) dışarıdan SPM uyguladıkları örneklerdeki

protein içeriğinin PUT ve SPD uygulananlara kıyasla daha yüksek olduğunu kaydetmişlerdir. Başka çalışmalarda da poliaminlerin protein yıkımını geciktirdikleri ve proteaz aktivitesini inhibe ettikleri rapor edilmiştir (Altman, 1982; Bais ve Ravishankar, 2002). SPD ve SPM'nin uygulanması yaprak dokularından klorofil ve Rubisco büyük alt ünitesi gibi, tilakoid membranlardan D1, D2 ve sitokrom f proteinlerinin kaybının geciktirilmesinde etkili olmuştur (Besford ve ark., 1993). Diuron PS II kompleksinin D1 proteini üzerindeki Q_B bağlanma bölümüne bağlanmakta ve Q_A'dan Q_B'ye olan elektron aktarımını bloklamaktadır (Hess ve Warren, 2002). PUT, SPD ve SPM'nin ışık yakalayıcı kompleks (LHCP) ve PS II ile birleşebildiği (Kotzabasis ve ark., 1993) ve poliaminlerin UV radyasyonundan PS II'yi koruyabildiği kaydedilmiştir (Unal ve ark.,2008). Dolayısıyla poliaminler diuronun olumsuz etkilerine karşı da PS II'yi koruyabilir. Nitekim poliaminlerin osmotik stres boyunca klorofil-protein komplekslerinin parçalanmasını önlediği (Besford, 1993), su stresi altında elektron transportunu normalleştirdiği kaydedilmiştir (Floryszak-Wieczorek ve ark., 1992a, 1992b). Öte yandan, stres koşulları altında, polipeptidlerin yıkımına neden olan proteolitik enzimlerin salınımının meydana gelebildiği (Davies, 1982) ve poliamin seviyelerinin manipülasyonunun proteaz aktivitesinin yükselmesini inhibe ettiği belirlenmiştir (Kaur-Sawhney ve Galston, 1979; Altman, 1982). Ayrıca, de novo polipeptid senteziyle alakalı poliamin koruyucu aktivitesi, protein sentezleyen sistemlerin aktivatörleri olarak Mg⁺² ile bu organik polikasyonların yer değiştirme kabiliyetiyle açıklanabilir (Cohen ve Zalik, 1978). Genel olarak bakıldığında senesensi geciktirici bileşiklerin klorofille birlikte protein yıkımını da geciktirdikleri kabul edilir (Srivastava ve ark., 1983).

Çözünabilir protein miktarının aksine diuron uygulanan fidelerde prolin miktarında önemli artış olduğu tespit edilmiştir. Diuron uygulanmasından 72 saat sonra prolin miktarındaki artışın, kontrole kıyasla % 85,12 olduğu belirlenmiştir. Diuron uygulanan soya fasülyesi bitkilerinde de prolin içeriğinin önemli ölçüde arttığı kaydedilmiştir (Fayez, 2000). Prolin artışının, herbisitinin etkisinden dolayı meydana gelen stresten olması muhtemeldir. Nitekim, çeşitli bitkilerde soğuk (Chu ve ark., 1999), ısı (Chang ve Lee, 1999), kuraklık (Choudhary ve ark., 2005), UV (Saradhi ve ark., 1995), ağır metal (Wang ve ark.,2007, Radic ve ark., 2010), oksidatif stres (Yang ve ark., 2009) ve yüksek tuzluluk (Yoshiba ve ark., 1995) gibi streslerin prolin konsantrasyonunda önemli artışa sebep olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, chlorsulfuron herbisiti uygulandıktan sonra *Pisum* ve

Vicia'nın köklerindeki prolin içeriğinin arttığı tespit edilmiştir (Fayez ve Kristen, 1996). Başka herbisitlerin de bitkilerde prolin miktarını artırdığı kaydedilmiştir (Hjorth ve ark., 2006; Song ve ark., 2007). Bitkiler olumsuz çevre koşullarıyla başa çıkabilmek için farklı alışma ve sakınma stratejileri geliştirirler (Matysik ve ark., 2002). Bu stratejiler arasında prolin birikimi de vardır. Literatürde stresli bitkilerdeki prolinin fonksiyonu, bir osmolit özelliğinde olması ve su stresini dengeleyebilmesiyle açıklanmasına rağmen, prolinin singlet oksijen ve serbest radikallerin sebep olduğu hasarlara karşı bitkileri koruduğu da gösterilmiştir (Matysik ve ark., 2002). Singlet oksijeni bastırıcı ve hidroksil radikalleri temizleyici olarak prolin, proteinler, DNA ve membranları stabilize edebilir (Smirnoff ve Cumbes, 1989; Gadallah,1999; Mohanty ve Matysik, 2001; Matysik ve ark., 2002). Poliaminlerle ön muamele yapılan fidelerdeki prolin miktarının artması, poliaminlerin direkt olarak radikal temizleme özelliklerine katkı sağlamış ve diuron hasarına karşı bitkileri korumuş olabilir. Kısaca daha önce tartışılan parametrelerdeki poliaminlerin ifade edilen iyileştirici etkilerine prolin artışının da katkısı olduğunu söyleyebiliriz. Başka çalışmalarda da dışarıdan uygulanan poliaminlerin strese karşı oluşan olumlu etkilerine prolin artışının katkısı olabileceği vurgulanmıştır (Duan ve ark., 2008; Yiu ve ark., 2009). Nitekim, prolinin stres iyileşmesinde gerekli olan azot ile karbon kaynağı olduğu ve stres sinyal iletim yollarının bir bileşeni olduğu kaydedilmiştir (Khedr ve ark., 2003). Prolin ve diğer metabolitlerin birikiminin fizyolojik sonucu olarak oksidatif strese dirençliliğin artması muhtemeldir (Hong ve ark., 2000). Prolin muamelesinin maya ve mantarlarda ROS seviyesini azaltabildiği ve böylece programlı hücre ölümünü önleyebildiği (Chen ve Dickman, 2005), insan hücrelerini kanserojenik oksidatif strese karşı koruyabildiği (Krishnan ve ark., 2008), transgenik alg ve tütün bitkilerinde prolinin aşırı birikmesiyle serbest radikal miktarlarının azaltıldığı rapor edilmiştir (Hong ve ark., 2000; Siripornadulsil ve ark., 2002). Ayrıca prolinin izole edilmiş tilakoid membranlardaki fotosistem II (PS II) üzerine singlet oksijen ve hidroksil radikallerinin zarar verici etkilerini azaltabildiği belirlenmiştir (Alia ve Mohanty, 1997). Dolayısıyla bu çalışmada kullanılan fotosistem II inhibe edici herbisiti olan diuronun olumsuz etkilerine karşı da poliamin uygulanmasıyla artan prolin miktarının koruyucu etki yapmış olması muhtemeldir. Yüksek prolin miktarı bitkileri streslere karşı daha toleranslı hale getirmektedir (Choudhary ve ark., 2005; Vendruscolo ve ark., 2007; Duan ve ark., 2008)

Bitkileri reaktif oksijen türlerinin sitotoksik etkilerinden koruyan antioksidan savunma sisteminin önemli bileşenlerinden birisi de antioksidan enzimlerdir. Süperoksit dismutaz, guaikol peroksidaz, glutatyon redüktaz ve katalaz hücrelerde bulunan önemli antioksidan enzimlerdendir. Bu çalışmada diuron uygulamasının bu enzimlerin aktivitesinde sebep olduğu değişimler incelenmiştir. Ayrıca poliamin ön muameleleriyle söz konusu enzim aktivitelerinin etkilenip etkilenmediği araştırılmıştır. Diuron uygulamasından 48 ve 72 saat sonra mısır fidelerindeki SOD aktivitesinin istatistiki bakımdan önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. Benzer şekilde, Chlorotoluron ve prometryne herbisitleri uygulanan buğday kök ve yapraklarındaki SOD aktivitesinin arttığı kaydedilmiştir (Song ve ark., 2007; Jiang ve Yang, 2009). Atrazine herbisiti uygulanan *Zea mays* L. Hybrid 351’de SOD aktivitesinin arttığı, *Zea mays* L. Giza 2’de ise azaldığı tespit edilmiştir (Nemat Alla ve Hassan, 2006). Paraquat uygulanan *Zea mays* L. cv RX 947 bitkilerinde de SOD aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Durmuş, 2003). Başka çalışmalarda da oksidatif stres koşullarında SOD aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir (Smirnoff, 1993; Acar ve ark., 2001; Sairam ve Srivastava, 2001, Ahmad ve ark., 2009).

Poliaminler SOD ve KAT gibi antioksidan enzimlere bağlanabilir ve onların hücre içerisinde oksidatif stresin olduğu kısımlara yayılmasını sağlayabilir (Tang ve ark., 2005). PUT-SOD kompleksinin tek başına olan SOD’dan 20 kat daha fazla membran geçirgenliği olduğu ve memeli sistemlerinde oksidanlara karşı korumayı kolaylaştırdığı rapor edilmiştir (Poduslo ve Curan, 1996). Ayrıca poliaminlerin antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırarak bitkiyi strese karşı koruduğu düşünülmektedir (Tekin ve Bozcuk, 1998). Tuz stresinde SPD ve PUT uygulanan bitkilerdeki SOD aktivitesinin arttığı ve bitkilerin strese olan toleranslarına katkı sağladığı rapor edilmiştir (Verma ve Mishra, 2005; Duan ve ark., 2008). Dışardan uygulanan SPD ve SPM, kadmiyum klorür ve bakırın etkisiyle SOD aktivitesinde görülen azalmayı önlemiştir (Zhao ve Yang, 2008). Bu çalışmada poliaminlerin SOD aktivitesi üzerine etkileri uygulanan poliamin çeşitine göre farklı şekilde olmuştur. SPD ile ön muamele yapılan fidelerdeki SOD aktivitesi kontrole kıyasla 24 ve 72. saatlerde artmasına karşın, diuron uygulanan fidelerdeki artışla istatistiki bakımdan aynıdır. PUT ile ön muamele yapılan fidelerde 24.saatte kontrole kıyasla bir artış olmasına karşın 48 ve 72. saatlerde istatistiki bakımdan önemli bir farklılık bulunmamıştır. SPM ile ön muamele yapılan fidelerdeki SOD aktivitesinde ise 72. saatte istatistiki bakımdan önemli bir artış belirlenmiştir. Benzer şekilde, SPM ile ön muamele yapılmış ve

paraquat uygulanmış *Zea mays L. cv RX 947* bitkilerinde SOD aktivitesinin arttığı kaydedilmiştir (Durmuş, 2003). SOD gibi antioksidan enzimleri aşırı ekspres eden transgeniklerin streslere daha toleranslı oldukları bulunmuştur (McKersie ve ark., 1996; Pitcher ve Zilinskas, 1996). Diğer taraftan, Grupta ve ark. (1993), ışık ve ısının teşvik ettiği oksidatif hasara dirençlilik induksiyonunun, hem SOD hem de GPX aktivitelerinin birlikte artmasına bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Nitekim, SOD reaktif oksijen türlerinden süperoksit radikalini temizler. Ancak bu işlem sonunda başka bir ROS olan hidrojen peroksit ortaya çıkar. Yani SOD radikal temizlemede tek başına yeterli değildir. Bu yüzden çalışmamızda hidrojen peroksitin temizleyicisi olan GPX aktivitesine de bakılmıştır. GPX aktivitesi sadece diuron uygulanan fidelerde 72 saat sonunda istatistiki olarak önemli ölçüde artmış, 24 ve 48. saatlerde ise önemli bir değişim gözlenmemiştir. Diğer taraftan diuron uygulanan *Lemna minor*'da GPX aktivitesinin zayıf şekilde uyarıldığı ve 48 saati aşan muamelede inhibe edildiği kaydedilmiştir (Teisseire ve Vernet, 2000). Atrazin uygulanan mısır fidelerindeki GPX aktivitesinin ise beşinci güne kadar arttığı ve daha sonra azaldığı belirlenmiştir (Akbulut ve Yiğit, 2010). Chlorotoluron herbisiti uygulanan buğday köklerinde GPX aktivitesinin önemli ölçüde arttığı (Song ve ark., 2007), prometryn herbisiti uygulanan kök ve yapraklarda ise düşük konsantrasyonlarda arttığı yüksek konsantrasyonlarda ise azaldığı rapor edilmiştir (Jiang ve Yang, 2009). GPX aktivitesindeki artışın stresin göstergesi olduğu azalmanın ise bitki hasarını temsil ettiği düşünülmektedir (Jiang ve Yang, 2009). Nitekim, bitki dokularında artan GPX aktivitesinin çeşitli kontaminant streslerine karşı biomarker olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Markkola ve ark., 2002; Cho ve Seo, 2005; Song ve ark., 2007). GPX aktivitesindeki artış oksidatif ve abiyotik streslere genel bir cevaptır (Sancho ve ark., 1996; Knörzer ve ark., 1996; Öztürk ve Demir, 2002)

Dışarıdan uygulanan poliaminlerin stres esnasında GPX üzerine etkileriyle ilgili yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar kaydedilmiştir. Kubis (2003) SPD ile ön muamele yaptığı arpa fidelerinde su eksikliği durumunda GPX aktivitesinin önemli ölçüde azaldığını, su stresli salatalık fidelerinde ise arttığını rapor etmiştir (Kubis, 2008). Duan ve ark. (2008), SPD ile ön muamele yapılan tuz stresli salatalık köklerinde, Zhang ve ark. (2009) PUT ve SPD ile ön muamele yapılan soğuk stresli salatalık yapraklarındaki GPX aktivitesinin arttığını belirtmiştir. Öztürk ve Demir (2002) ise tuz stresli ortamda PUT'un GPX aktivitesini azalttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca SPD ve SPM ile ön muamelenin asit

yağmuru uygulamasında GPX aktivitesi üzerine önemli bir etkisinin olmadığı kaydedilmiştir (Velikova ve ark., 2000). Diğer taraftan, CdCl₂ stresi durumunda SPD ve SPM'nin GPX aktivitesini artırdığı belirlenmiştir (Zhao ve Yang, 2008). Bu çalışmada SPD ile ön muamele yapılan fidelerin GPX aktivitesi sadece diuron uygulananlara oranla 24 saat sonunda artarken 72. saatte kontrolle aynı bulunmuştur. SPM ön muamelesi tüm saat dilimlerinde ön muamele yapılmayan fidelerle kıyaslandığında GPX aktivasyonuna herhangi bir etki yapmamıştır. PUT ön muamelesi GPX aktivitesini sadece 48 saat sonunda istatistiki olarak önemli ölçüde arttırmıştır.

Bu çalışmada hidrojen peroksite diğer bir temizleyicisi olan KAT aktivitesi de ölçülmüştür. Diuron uygulanan fidelerdeki KAT aktivitesinin 24 ve 48 saatlerde değişmediği 72. saatte ise önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Diuron uygulanmasından 72 saat sonra GPX aktivitesi artarken KAT aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir. Benzer şekilde su stresli salatalık yapraklarında GPX aktivitesi artarken KAT aktivitesinin azaldığı kaydedilmiştir (Kubis, 2008). *Lemna minor*'da diuronun en düşük konsantrasyonunun en kısa zamanda (6 saat) KAT aktivitesini inhibe ettiği (Teisseire ve Vernet, 2000), *Scenedesmus obliquus*'da diuron etkisiyle birlikte KAT aktivitesinde önemli bir değişimin olmadığı tespit edilmiştir (Geoffroy ve ark., 2002). Kükürt dioksit, ozon ve ağır metal (Cd, Cr, Zn) gibi başka kirleticilerin de bu enzimi inhibe ettiği rapor edilmiştir (Tanaka ve ark., 1985; Chaoui ve ark., 1997; Niewiedomska ve Miszlaski, 1997). Ayrıca atrazin herbisitinin mısır fidelerinde, prometryne herbisitinin ise buğday köklerinde KAT aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Nemat Alla ve Hassan, 2006; Jiang ve Yang, 2009). Shao ve ark. (2008) *Chlamydomonas reinhardtii*'de diuron ve yüksek ışığın birlikte uygulandığında H₂O₂'ye bağımlı sinyal yolunun ciddi deaktivasyonundan dolayı KAT aktivitesinin azaldığı ileri sürülmüştür. KAT aktivitesinin inhibisyonu hidrojen peroksite artışından dolayı da olabilir (Mashoudi ve ark., 1997; Jiang ve Yang, 2009). Ayrıca semidehidroaskorbat (Davison ve ark., 1986), indirgenmiş glutatyon (Sun ve Oberley, 1989), süperoksit ve hidroksil radikalleri (Kono ve Fridovich 1982) tarafından da KAT aktivitesinin inhibe olabileceği kaydedilmiştir.

Poliaminlerle ön muamele yapılan fidelerdeki KAT aktivitesi incelendiğinde, SPD ile ön muamele yapılmış ve diuron uygulanan fidelerdeki KAT aktivitesinin sadece diuron uygulanan fidelerdeki ile aynı olduğu, SPM ön muamelesinin 72 saatte diuronun KAT aktivitesinde sebep olduğu azalmayı önemli ölçüde giderdiği, PUT ön muamelesinin ise

24. saate KAT aktivitesini artırdığı, 72. saatte ise diuronun KAT aktivitesinde sebep olduğu azalmayı tamamen önlediği görülmüştür. SPD ile ön muamele yapılan arpa yapraklarında su stresi durumunda KAT aktivitesinin azaldığı (Kubis, 2003), su stresli salatalık yapraklarında ise KAT aktivitesindeki azalmanın önemli ölçüde giderildiği kaydedilmiştir (Kubis, 2008). SPD ve SPM ile ön muamele yapılan fasulye yapraklarında ise KAT aktivitesinde önemli bir değişimin olmadığı rapor edilmiştir (Velikova ve ark., 2000). Zhang ve ark. (2009), PUT ve SPD ile ön muamele yapılan soğuğa duyarlı salatalık kultivarında KAT aktivitesinde görülen azalmanın tamamen önlendiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca PUT'un tuz stresli ortamda KAT aktivitesini artırdığı kaydedilmiştir (Öztürk ve Demir, 2002; Verma ve Mishra, 2005).

Bitkilerde stres esnasında aktivitesi ölçülen bir başka antioksidan enzim de GR'dir. GR, GSSG'nin GSH'a indirgenmesine aracılık eder ve GSH'ın GSSG'ye oranının yüksek kalmasını sağlayarak oksidatif hasara karşı kloroplastların korunmasında önemli bir rol oynar (Pilon-Smits ve ark., 2000). Bu çalışmada diuron uygulanan fidelerdeki GR aktivitesinin arttığı kaydedilmiştir. Benzer şekilde, diuron uygulanan *Lemna minor* ve *Scenedesmus obliquus*'da da GR aktivitesinin uyarıldığı rapor edilmiştir (Teisseire ve Vernet, 2000; Geoffroy ve ark., 2002). Stres altında askorbat-glutasyon yoluna GSH sağlamak ve GSH/GSSG oranının yüksek tutulması için GR aktivitesinin artması muhtemeldir. Nitekim çeşitli stres koşullarında GR aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Gillham ve Dodge, 1987; Kangasjarvi ve ark., 1994). Poliaminlerin GR aktivitesine etkisi ile ilgili yapılan çalışmalarda, SPD ön muamelesi GR aktivitesini 48 ve 72 saat sonunda yalnız diuron uygulanan fidelere oranla artırmış, SPM ön muamelesi istatistiki olarak etkilememiş ve PUT ön muamelesi ise 48 saat sonra GR aktivitesini arttırmıştır. Kubis (2001) de SPD ile ön muamele yapılan arpa yapraklarında su stresi sırasında GR aktivitesinin arttığını, Verma ve Mishra (2005) ise PUT uygulanan tuz stresli *Brassica juncea*'da GR aktivitesinin arttığını kaydetmişlerdir. Poliaminlerin etkisiyle GR aktivitesinde meydana gelen artışın NADP⁺/NADPH oranını artırarak NADP⁺'nin elektron kabul etme yeterliliğini sağladığı ve sonuçta oksijene daha az elektron akışı olacağından ROS üretimini azalacağı düşünülmektedir (Verma ve Mishra, 2005).

Son zamanlarda transgenik bitkilerle ilgili yapılan çalışmalarda poliamin içeriğindeki artışın antioksidan enzimlerin gen ekspresyonunu önemli ölçüde teşvik edebildiği ve bitkilerin abiyotik streslere karşı daha toleranslı olmasını sağladığı kaydedilmiştir (Wi ve

ark., 2006). Dıştan uygulanan poliaminlerin de içsel poliamin artışını sağladığı ve poliaminlerin koruyucu etkilerine katkı sağladığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Verma ve Mishra, 2005; Duan ve ark., 2008). Stresten önce uygulanan poliaminler membranları kararlaştırarak ve daha yüksek tamponlama ve antioksidan kapasitesi oluşturarak stresi karşılamak ve mücadele etmek için hücreleri hazırlayabilir (Velikova ve ark., 2000). Bu çalışmadaki veriler, PUT, SPD ve SPM ile mısır fidelerinin ön muamelesinin çalışılan parametre ve test edilen poliamine göre farklı derecelerde diuron tarafından üretilen hasarı azalttığını göstermiştir. Poliaminler diuronun olumsuz etkilerinin azaltılmasına, direkt olarak serbest radikalleri temizleyerek katılabilecekleri gibi ROS'ların seviyesini azaltan sistemlerin etkilerini geliştirerek de katılmaları muhtemeldir. Ayrıca herbisitler yabancıotları öldürmek için kullanılıyor fakat kararlı bileşikler oldukları için ortamda kalan miktarları ekonomik bitkiler için olumsuz etkilere sebep olabilmektedir. Bu nedenle ekonomik bitkiler üzerine herbisitlerin etkilerinin bilinmesi tarımsal açıdan önemlidir. Dolayısıyla diuronun etkisiyle oluşan biyokimyasal cevaplar tarımsal alanlara bu herbisitlin kontaminasyonunu değerlendirmek için kullanılabilir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Diuron uygulaması ile mısır fidelerinin nispi su içeriği 72.saat sonunda azalmıştır. Uygulanan tüm poliaminlerle ön muamele 72.saatte azda olsa nispi su kaybını engellemiştir.

Mısır fidelerindeki toplam klorofil miktarının, diuron uygulamasıyla azaldığı tespit edilmiştir. İlk 24 saat sonunda PUT ön muamelesi klorofil azalmasına engel olamamıştır. 48. ve 72.saat sonlarında ise tüm poliamin ön muameleleri toplam klorofil miktarını diuron uygulanan gruba oranla arttırmıştır.

Karotenoid miktarları göz önüne alındığında, diuron uygulamasıyla karotenoid miktarının azaldığı belirlenmiştir. Karotenoid miktarının azalmasına karşı en etkili koruma 24 saat sonunda SPD ön muamelesiyle olur iken 48 ve 72 saat sonlarında SPM ve SPD aynı derecede etkinlik göstererek karotenoid miktarının azalmasını engellemiştir. PUT ön muamelesi ise 24 ve 48 saat sonlarında diuron grubuyla benzerlik gösterirken 72 saat sonunda karotenoid miktarındaki azalmayı engellemiştir.

Tüm zaman dilimlerinde mısır fidelerine diuron uygulaması prolin miktarını arttırmıştır. Prolindeki bu artış SPD, SPM ve PUT ön muameleleriyle daha da çok olmuştur. Prolin miktarındaki en yüksek artış PUT ile ön muamele sonucu gerçekleşmiştir.

Mısır fidelerine diuron uygulaması 24 ve 48 saat sonunda askorbik asit miktarını azaltırken, 72 saat sonunda askorbik asit miktarı artmıştır. Poliaminlerle ön muamele 24 ve 48 saat sonlarında diuron grubunun askorbik asit miktarıyla istatistiki olarak aynıdır. Ancak 72 saat sonunda SPD ön muamelesi diuron uygulamasına oranla askorbik asit miktarında daha az bir artışa neden olmuştur. SPM ve PUT ön muameleleri ise 72.saatte diuron grubundaki askorbik asit miktarına yakın sonuç vermiştir.

Çözünebilir protein miktarı diuron uygulanan mısır fidelerinde azalmıştır. SPD ile ön muamele sadece 24.saat sonunda çözünebilir protein miktarındaki azalmayı engellemiştir. PUT ile ön muamele 24 ve 48 saat sonlarında çözünebilir protein miktarındaki düşüşe ciddi bir engel sayılabilir fakat 72 saat sonunda düşüşü az miktarda önleyebilmiştir. SPM ile ön muamele ise tüm zaman dilimlerinde fidelerdeki çözünebilir protein miktarlarının azalmasını engellemiştir.

Diuron uygulanan mısır fidelerinde lipid peroksidasyonu zamanla orantılı olarak artmıştır. Poliamin ön muameleleri yapılan fidelerde tüm saat dilimlerinde diuron

uygulanmasına göre daha az lipid peroksidasyonu gözlenmiştir. Lipid peroksidasyonunu diuron oranla en az artış SPM ön muamelesi uygulanan fidelerde gözlenmiştir.

Mısır fidelerine diuron uygulaması SOD aktivitesini artırmıştır. SPD ön muamelesi 24 ve 72 saat sonunda diuron uygulamasına yakın bir SOD aktivite artışına neden olmuştur. SPM ön muamelesi 24 ve 48 saat sonlarında SOD aktivitesinde değişikliğe neden olmamıştır ancak 72 saat sonunda SOD aktivitesindeki en yüksek artış SPM ön muamelesi yapılan fidelerde görülmüştür. PUT ön muamelesi yapılan fidelerin SOD aktivitesi 24. saatte artarken, 48. ve 72. saatlerde SOD aktivitesine ciddi bir katkıda bulunmamıştır.

GPX aktivite artışı diuron uygulanan mısır fidelerinde sadece 72. saatte meydana gelmiştir. Tüm saat dilimlerinde SPM ön muamelesinin GPX aktivitesine herhangi bir etkisi olmamıştır. PUT ön muamelesinde 24. ve 72. saatlerde GPX aktivitesinde az miktarda artışa neden olmuşken 48. saatte GPX aktivitesini önemli derecede arttırmıştır. SPD ön muamelesi ise 24. ve 48. saatlerde GPX aktivitesini artırmış ancak 72. saatte diuron uygulamasına oranla GPX aktivitesini azaltmıştır.

Diuron uygulaması fidelerin GR aktivitesini artırmıştır. SPD ön muamelesi 48. ve 72. saatlerde diuron uygulanan fidelerdeki GR aktivitesinden daha fazla aktivite artışına neden olmuştur. SPM ön muamelesi ile GR aktivitesinde 24. ve 72. saatlerde diuron uygulanan fidelerdeki ile aynı sonucu vermiştir, 48. saat sonunda ise diuron grubuna yakın bir aktivite gözlenmiştir. PUT ön muamelesi ile GR aktivitesi sadece 48. saat sonunda diuron uygulamasına kıyasla artış göstermiştir.

Diuron uygulaması sadece 72. saat sonunda fidelerde KAT aktivite azalmasına neden olmuştur. SPD ön muamelesi KAT aktivitesini etkilememiştir. SPM ön muamelesi 24. ve 48. saatlerde KAT aktivitesini etkilemez iken 72. saatte diuronun sebep olduğu azalmayı önemli ölçüde engellemiştir. PUT ön muamelesi ise 24 saat sonunda KAT aktivitesini istatistiki olarak önemli ölçüde arttırmıştır. 72 saat sonunda ise diuronun etkisiyle KAT aktivitesinde görülen azalmayı tamamen önlemiştir.

Kültür bitkilerinde önemli ürün kayıplarına neden olan yabancı otlarla mücadele için kullanılan herbisitler, oksidatif stresin başlıca sebeplerindendir. Çalışmamızda kullanılan diuron herbisiti de bitkilerin PSII'deki elektorn akışını bloklayarak oksidatif hasara yol açmaktadır. Oluşabilecek bu hasarı engellemeye yönelik bitkiler antioksidan savunma sistemlerini aktiveleştirirler. Çalışmamızda poliamin (SPD, SPM, PUT) uygulamalarının, oksidatif stres sırasında antioksidan sistemin bazı bileşenleri ile ilişkisi

araştırılmış ve elde edilen bulgular ışığında bu poliaminlerin oksidatif stres sırasında bitkileri daha dayanıklı hale getirdiği sonucuna varılmıştır. Poliaminlerin dışardan uygulanmaları absorpsiyondan dolayı bitkiden bitkiye değişiklik gösterebilir. Bitkilerin içsel poliamin miktarlarını sentez yolu ile arttırması, oksidatif stres varlığında bitkiyi daha toleranslı hale getireceği düşünülmektedir. Bu yüzden poliamin metabolizmasının moleküler temelleri araştırılarak bu konu için daha ayrıntılı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Acar, O., Türkan, I. and Özdemir, F., 2001. Superoxide Dismutase and Peroxidase Activities in Drought Sensitive and Resistant Barley (*Hordeum vulgare* L.) Varieties. Acta Physiol. Plant., 23, 351-356.
- Aebi, H., 1983. Catalase. In H Bergmeyer, ed. Methods of Enzymatic Analysis, 3, 273-277.
- Ahmad, M.S.A.A., Ali, O., Ashraf, M., Haider, M.Z. and Abbasi Q., 2009. Involvement of Polyamines, Abscisic Acid and Anti-Oxidative Enzymes in Adaptation of Blue Panicgrass (*Panicum antidotale* Retz.) To Aline Environments. Environmental and Experimental Botany, 66, 409-417.
- Akbulut, G.B. and Yiğit, E., 2010. The Changes in Some Biochemical Parameters in *Zea mays* cv. "Martha F1" Treated with Atrazine. Ecotoxicology and Environ. Safety, 73, 6, 1429-1432.
- Akkuş, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları. Konya.
- Alia, P.S. and Mohanty, P., 1997. Involvement of Proline in Protecting Thylakoid Membranes Against Free Radical-induced Photodamage. J. Photochem. Photobiol., 38, 253-257.
- Alscher, G.R., Ertürk, N. and Heath, L.S., 2002. Role of Superoxide Dismutases in Controlling Oxidative Stress in Plants. Journal of Experimental Botany., 53, 1331-1341.
- Altman, A. and Bachrach U., 1981. Involvement of Polyamines in Plant Growth and Senescence. Advances in Polyamine Research. Raven Press, New York, 3, 365-375.
- Altman, A., 1982. Retardation of Radish Leaf Senescence by Polyamines. Physiol. Plant., 54, 189-193.
- Aravind, P. and Prasad, M.N.V., 2005. Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate-glutathione cycle and glutathione metabolism. Plant Physiol. Biochem., 43, 107-116.
- Arnon, D.I., 1949. Copper Enzymes in Chloroplasts, Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol., 24, 1-15
- Asada, K. and Takahashi, M., 1987. Production and Scavenging of Active Oxygen in Photosynthesis, In: Photoinhibition, Kyle, D.J., Osmond, C.B., Arntzen, C.J., eds., Elsevier Publisher, Amsterdam, 227-287.
- Asada, K., 1992. Ascorbate Peroxidase- Hydrogen Peroxide Scavenging Enzyme in Plants. Plant. Physiol., 85, 235-241.

- Asada, R., 1994. In Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants. CRC Press, Boca Raton, FL, 77-104.
- Asada, K., 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 50, 601–639.
- Badger, M. R., 1985. Photosynthetic oxygen-exchange. Annu. Rev. Plant Physiol., 36, 27-53.
- Bais, H.P. and Ravishankar, G.A., 2002. Role of Polyamines in the Ontogeny of Plants and Their Biotechnological Applications. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 69, 1-34.
- Ballas, S.K., Mohandas, N. and Marton, I.J., 1983. Stabilization of Erythrocyte Membranes by Polyamines. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80, 1942-1946.
- Bannister, J.V., Bannister, W.H. and Rotils, G., 1987. Aspect of the Structure, Function and Application of Superoxide Dismutase. CRC Crit. Rev. Biochem., 22, 110-180.
- Barry, P., Young, A.J. and Britton, G., 1990. Photodestruction of Pigments in Higher Plants by Herbicide Action. J. Exp.Bot., 41, 123-129.
- Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I.D., 1973. Rapid Determination of Free Polin for Water Stress Studies. Plant and Soil, 39, 205-207.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I., 1971. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. Anal. Biochem., 44, 276-287.
- Be'rczi, A. and Møller, I.M., 1998. Characterization and Solubilization of Residual Redox Activity in Salt-Washed and Detergent-Treated Plasma Membrane Vesicles from Spinach Leaves. Protoplasma 205, 59–65
- Benavides, M.P., Gallego, S.M., Comba, M.E. and Tomaro, M.L., 2000. Relationship between Polyamines and Paraquat Toxicity in Sunflower Leaf Discs. Plant Growth Regulation, 31, 215-224.
- Besford, R.T., Richardson, C.M., Campos, J.L. and Tiburcio, A.F., 1993. Effect of Polyamines on Stabilisation of Molecular Complexes of Thlykoid Membranes of Osmotically Stressed Oat Leaves. Planta, 186, 201-206.
- Beyer, W., Imlay, J. and Fridovich, I., 1991. Superoxide dismutases. Prog. Nucl. Acid Res. 40, 221-253
- Boo, Y.C. and Jung, J., 1999. Water Deficit- Induced Oxydative Stress and Antioxydative Defenses in Rice Plants. Plant Physiol., 155, 255-261.
- Boo, Y.C., Lee, K.P. and Jung, J., 2000. Rice Plants with a High Protochlorophyllide Accumulation Show Oxidative Stres in Low Light That Mimics Water Stress. Plant Physiol., 157, 405-411.

- Bowler, C., Van Montague, M. and Inze, D., 1992. Superoxide Dismutase and Stress Tolerance. An. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol., 43, 83-116.
- Bowyer, J.R., Baker, N.R. ve Percival, M.P., 1991. Photosystem II and Its Interaction with Herbicides. In *Herbicides, Topics in Photosynthesis*. Elsevier Science, 10, 27–85.
- Bradford, M., 1976, Rapid An Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding. Anal. Biochem., 72, 248-254.
- Bradley, D.E. and Minn, D.B., 1992. Singlet Oxygen Oxidation of Foods. Cat. Rev. Food Sci. Nutri. 31, 211, 236.
- Broadbent, P., Creissen, G.P., Kular, B., Wellburn, A.R. and Mullineaux, P.M., 1995. Oxidative Stres Responses, in Transgenic Tobacco Containing Altered Levels of Glutathione Reductase Activity. Plant.J., 8, 247-255
- Bryan, D., 1996. Oxydative Stres. McKersie, University of Guelph.
- Buettner, G.R. and Schafer, F.Q. 2004. Ascorbate as an antioxidant in vitamin C. Functions and Biochemistry in Animals and Plants. Bios Scientific Publishers, Oxford 173–188.
- Castillo, F.J., 1996. Antioxidative Protection in the Inducible CAM Plant *Sedum album* L. Following the Imposition of Severe Water Stress and Recovery. Oecologia, 107, 469-477.
- Castillo, F.J. and Greppin, H., 1998. Extracellular ascorbic acid metabolism in *Sedum album* L. leaves after ozone exposure. Environ. Epx. Bot., 26, 231-238.
- Ceconi, C., Boraso, A., Cargnoni, A. and Ferrari, R., 2003. Oxidative Stress in Cardiovascular Disease: myth or fact? Archives of Biochemistry and Biophysics, 420, 217-221.
- Chang, Y.C. and Lee, T.M., 1999. High temperature-induced free proline accumulation in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). Bot. Bull.Acad.Sin., 40, 289-294.
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Habib Ghorbal, H. and El ferjani, E., 1997. Cadmiumand zinc Induction of Lipid Peroxidation and Effects on Antioxidant Enzyme Activities in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Sci., 127, 139.
- Chen, C. and Dickman, M.B., 2005. Proline Suppresses Apoptosis in the Fungal Pathogen *Colletotrichum trifolii*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 102, 3459-3464.
- Chen, G.X. and Asada, K., 1989. Ascorbate Peroxidase in Tea Leaves: Occurance of Two Isezymes and their Differences in Enzymatic and Molecular Properties. Plant. Cell. Physiol., 30, 987-998.

- Cheng, S.H. and Kao, C.H., 1983. Localized Effect of Polyamines on Chlorophyll Loss. Plant Cell Physiol., 24, 1463-1467.
- Cho, U.H. and Seo, N.H., 2005. Oxidative Stress in *Arabidopsis thaliana* Exposed to Cadmium is due to Hydrogen Peroxide Accumulation. Plant Sci., 168, 113-120.
- Choudhary, N.L., Sairam, R.K. and Tyagi, A., 2005. Expression of Delta-1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Gene During Drought in Rice (*Oryza sativa* L.), Ind. J. Biochem. Biophys., 42, 366-370.
- Chu, T.M., Jusaitis, M., Aspinall, D. and Paleg, L.G., 1999. Accumulation of Free Proline at Low Temperatures. Plant Physiol., 155, 310-317.
- Cohen, A. and Zalik, S., 1978. Magnesium Replacement by Polyamines in Higher Plant Cell-free Polyphenylalanine Synthesis. Phytochemistry, 17, 113-118.
- Conklin, P.L., 2001. Recent Advances in the Role and Biosynthesis of Ascorbic Acid in Plants. Plant. Cell. Environ., 24, 383-394.
- Creissen, G., Broadbent, P., Stevensen, R., Wellburn, A.R. and Mullineaux, P.M., 1996. Manipulation of Glutathione Metabolism in Transgenic Plants. J. Biochem., 24, 465-472.
- Creissen, G., Edwards, E.A. and Mullineaux, P.M., 1994. Glutathione Reductase and Ascorbate Peroxidase In: Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defences Systems in Plants, Foyer, C.H., Mullineaux, P.M., Eds., CRC Press, Boca Raton, 343-364.
- Çolak, H. and Uğur, M., 2002. Farklı Muhafaza Sıcaklığı ve Süresinin Fermente Sucuklarda Biyojen Aminlerin Oluşumu Üzerine Etkisi. Türk J. Vet. Anim. Sci., 26, 779-784
- Dalton, D.A., Harus, F.J., Russell, S.A. and Evans, H.J., 1987. Purification, Properties and Distribution of Ascorbate Peroxidase in Legumens Root Nodules. Plant. Physiol., 83, 789-794.
- Daub, M. E. and Ehrenshaft, M., 1993. The photoactivated toxin cercosporin as a tool in fungal photobiology. Plant. Physiol., 89, 227-236.
- Daub, M. E. and Hangartner, R. P., 1983. Production of singlet oxygen and superoxide by the fungal toxin, cercosporin. Plant Physiol., 73, 856-857.
- Daub, M. E., 1982. Peroxidation of tobacco membrane lipids by the photosensitizing toxin, cercosporin. Plant Physiol., 169, 1361-1364.
- Davies, D.D., 1982. Physiological Aspects of Protein Turnover, In: Encyclopedia of Plant Physiology, Boulter, D., Partheir, B., Eds., Vol 14 A, Springer Verlag, Berlin, 189-228.

- Davison, A.J., Kettle, A.J. and Fatur, D.J., 1986. Mechanism of the Inhibition of Catalase by Ascorbate. Roles of Active Oxygen Species, Copper and Semidehydroascorbate. J. Biol. Chem., 261, 1193-1200.
- De zwart, L. L., Meerman, J.H.N., Commandeur, J.N.M. and Vermeulen, N.P.E., 1999. Biomarkers of Free Radical Damage Applications in Experimental Animals and in Humans. Free Radical Biology and Medicine, 26: 202-226.
- Del Rio, L.A.,Pastori, G.M., Palma, J.M., Sandalio, L.M., Sevilla, F., Corpas, F.J., Jimenez,A., Lopez-Huertas, E. and Hernandez, J.A., 1998. The Activated Oxygen Role of Peroxisomes in Senescence. Plant Physiol., 116: 1195-1200.
- Deming-Adams, B. and Adams, W.W., 1996. Energy Dissipation and the Xsantophyll Cycle in CAM Plants, Ecological Studies. Analyses and Synthesis, 114, 97-114.
- Demming-Adams, B., 1990. Carotenoids and Photoprotection in plants: A Role Fort he Xanthophyll Zeaxanthin. Biochem. Biophys. Acta, 1020, 1-24.
- Dodge, A. D., 1971. The mode of action of the bipyridylum herbicides, paraquat and diquat. Endeavour, 30, 130–135.
- Duan, J., Li, J., Guo, S. and Kang, Y., 2008. Exogenous Spermidine Affects Polyamine Metabolism in Salinity-stressed *Cucumis sativus* Roots and Enhances Short-term Salinity Tolerance. J. Plant Physiology, 165, 1620-1635.
- Durmuş, N., 2003. Büyüme yi Düzenleyici Maddelerin Oksidatif Stres Üzerine Etkileri, Doktora tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Elstner, E.N and Wagner, G.A., 1988. Activated oxygen in green plants in relation to stress situations. Curr. Topics Plant Biochem. Physiol, 7, 159-187.
- Earnshaw, B. A.; Johnson, M. A., 1985. The effect of glutathione on development in wild carrot suspension cultures. Biochem. Biophys. Res. Commun. 133, 988-93
- Ezaki, B., Garner, R.C., Ezaki, Y. ve Matsumoto, H., 2000. Expression of Aluminum Induced Genes in Transgenic Arabidopsis Plants can Ameliorate Aluminum Stress and Oxidative Stress. Plant Physiology, 122, 657-666.
- Fayez, K.A., 2000. Action of Photosynthetic Diuron Herbicide on Cell Organelles and Biochemical Constituents of the Leaves of Two Soybean Cultivars. Pest. Biochem. And Physi., 66, 105-115.
- Fayez, K.A. and Elfattah, Z.A., 2007. Alteration in Growth and Physiological Activities in *Chlorella vulgaris* under the Effect of Photosynthetic İnhibitor Diuron. Int. J. Agricul. Biology, 9,4, 631-634.
- Fayez, K.A. and Kristen, U., 1996. The Influence of Herbicides on the Growth and Proline Content of Primary Roots and on the Ultrastructure of Root Caps. Environ. Exp. Bot., 36, 71.

- Feierabend, J., Schaan, C. and Hertbig, B., 1992. Photoinactivation of Catalase Occurs Under Both High and Low Temperature Stress Conditions and Accompanies Photoinhibition of Photosystem II. Plant. Physiol., 100, 1554-1561.
- Flores, H. and Galston, A., 1982. Analysis of Polyamines in Higher Plants by High Performance Liquid Chromatography. Plant Physiol., 69, 701-706.
- Flores, H., 1991. Changes in Polyamine Metabolism in Response to Abiotic Stress, In: Slocum R.D., Flores, H.E. (eds) Biochemistry and physiology of Polyamines in Plants. CRC Press, Boca Raton, 213-228.
- Floryszak-Wieczorek, J., Grabikowski, E., Kubis, J. and Krzywanski, Z. 1992. The effect of Spermidine on Lipid Peroxidation in Wheat Leaves During Water Stress. Acta Physiol. Plant., 14, 3-10.
- Floryszak-Wieczorek, J., Murkowski, A., Kubis, J. and Krzywanski, Z., 1992. The effect of the Spermidine on Chlorophyll Luminescence in Wheat Leaves Under Water Stress. Acta Physiol. Plant., 14,119-126.
- Foyer, C.H. and Halliwell, B., 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. Planta, 133, 21-25.
- Foyer, C.H. and Noctor, G., 2005. Oxidant and Antioxidant Signaling in Plants: a Reevolution of the Concept of Oxydative Stress in a Physiological Concept. Plant, Cell&Environment Vol. 28, 1056-1071.
- Foyer, C.H., 1993. Ascorbic acid, In: Antioxidants in Higher Plants. Alscher, R.G., Hess, J.L., Eds., CRC Press, Boca Raton, 31-58.
- Foyer, C.H., Descourvieres, P. and Kunert, K. J., 1994. Plant Cell Environ.,17, 507-523.
- Frei, B., 1996. Natural antioxidants in human health and disease. Free Rad. Biol. Med. 20, 257-258.
- Fridovich, I., 1995. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. Annu. Rev. Biochem., 64, 97-112.
- Gadallah, M.A.A., 1999. Effect of Proline and Glycine Betaine on *Vicia faba* Responses to Salt Stress. Biol. Plant., 42, 247-249.
- Galston, A.W. and Kaur-Sawhney, R., 1995. Polyamines as Endogenous Growth Regulators. In: Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology 2nd edn. Davies, P.J., (Ed). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 158-178.
- Gardner, P.R. ve Fridovich, I., 1991. Superoxide Sensitivity of *Esheria coli* 6-Phosphoglikonate Dehidratose. J. Biol. Chem., 266,1478-1483.
- Geoffroy, L., Frankart, C. and Eullaffroy, P., 2004. Comparison of Different Physiological Parameter Responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* Exposed to Herbicide Flumioxazin. Environ. Pollut., 131, 231-241.

- Geoffroy, L., Teisseire, H., Couderchet, M. and Vernet, G., 2002. Effect of Oxyfluorfen and Diuron Alone and in Mixture on Antioxidative Enzymes of *Scenedesmus obliquus*. Pest. Biochem. and Physiol., 72, 178-185.
- Geoffroy, L., Teisseire, H., Couderchet, M. and Vernet, G., 2002. Effect of oxyfluorfen and Diuron Alone and in Mixture on Antioxidative Enzymes of *Scenedesmus obliquus*. Pesticide Biochem. Physiol. 72, 178-185.
- Gillham, D.J. and Dodge, A.D., 1987. Chloroplast Superoxide and Hydrogen Peroxide Scavenging Systems from Pea Leaves, Seasonal Variations. Plant sci.,50, 105-109.
- Goamez, J.M., Jimenez, A., Olmos, E. and Sevilla, F., 2004. Location and Effects of Long-term NaCl Stress on Superoxide Dismutase and Ascorbate Peroxidase Isoenzymes of Pea (*Pisum sativum* cv. Puget) Chloroplasts. J. Exp. Bot., 55, 119-130.
- Gressel, J. and Salun, E., 1994. In Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 237-274.
- Grupta, A.S., Webb, R.P., Holaday, S.A. and Allen, R.D., 1993. Overexpression of Superoxide Dismutase Protects Plants from Oxidative Stress. Plant Physiol., 103, 1067-1073.
- Guida, G., Zacheo, G. and Bleve-Zacheo, T., 1992. Activation of Detoxifying Enzymes in Tomato Roots Following Paraquat Treatment and Nematode Infection. Nematologia Mediterranea, 20, 2, 203-209.
- Halliwell, B., 1984. Toxic Effects of Oxygen on Plant Tissues, In: Chloroplast Metabolism, The Structure and Function of Chloroplasts in Green Leaf Cells, Halliwell, B., Ed., Oxford Press, Oxford, 180-206.
- Hancock, J.T., Desikan, R., and Neill, S.J., 2001. Role of Reactive Oxygen Species in Cell Signalling Pathways. Biochem. Soc. Transact., 29, 345-350.
- Harbinson, J., Genty, B. and Foyer, C. H., 1999. Plant Physiol., 94, 545-553.
- Heath, R.L., Packer, L., 1968, Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys., 125, 189-198.
- Heber, U., Bligny, R., Streb, P. and Douce, R., 1996. Photorespiration is Essential for the Protection of the Photosynthetic Apparatus of C₃ Plants Against Photoinactivation Under Sunlight. Bot. Acta 109, 307-315.
- Hernandez J.A., Jimenez, A., Mullineaux, P. and Sevilla, F., 2000. Tolerance of Pea (*Pisum sativum* L.) to Long-Term Salt Stress is Associated with Induction of Antioxidant Defences. Plant Cell Environ. 23, 853-862.

- Hess, D. and Warren, F., 2002. The herbicide handbook of the weed science society of America 8th Edition, 159-161.
- Hinman, R.L. and Lang, J., 1965. Peroxidase Catalyzed Oxidation of Indol-3-Acetic Acid. Biochem., 4, 144-158.
- Hjorth, M., Mathiassen, S.K., Kudsk, P. and Ravn, H.W., 2006. Amino acids in loose silky-bent (*Apera spica-venti* (L.) Beauv.) responding to prosulfocarb exposure and the correlation with physiological effects. Pest. Biochem. Physiol., 86, 138-145.
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z. and Verma, D.P.S., 2000. Removal of Feedback Inhibition of Δ^1 -Pyrroline-5- Carboxylate Synthase Results in increased proline Accumulation and Protection of Plants from Osmotic Stres. Plant Physiol., 122, 1129-1136.
- Hossain, M.A. and Asada, K., 1984. Monodehydroascorbate Reductase in Spinach Chloroplasts and Its Partipication in Regeneration of Ascorbate for Scavenging Hydrogen Peroxide. Plant Cell Physiol., 25, 385-395.
- Hu, C. and Van Huystee, R.B., 1989. Role of Carbohydrate Moieties in Peanut Peroxidases. Biochem. J., 263, 129-135.
- Huang, A.H.C., Trelease, R.N. ve Moore, T.S., 1983. Plant Peroxisomes. Academic Press, New York.
- Jablonski, P.P. and Anderson, J.W., 1981. Light Dependent Reduction of Dehydroascorbate by Ruptered Chloroplasts. Plant Physiol., 67, 1239-1242.
- Jaspars, E.M.J., 1965. Pigmentation of Tobacco Crown-gall Tissues Cultured *in vitro* in Dependence of the Composition of the Medium. Physiol. Plant., 18, 933-940.
- Jiang, L. and Yang, H., 2009. Prometryne-induced Oxidative Stres and Impact on Antioxidant Enzymes in Wheat. Ecotoxicology and Environ. Safety, 72, 1687-1693.
- Jimenez, A., Hernandez, J. A., Del Rio, L. A. and Sevilla, F., 1997. Evidence for the Presence of the Ascorbate-Glutathione Cycle in Mitochondria and Peroxisomes of Pea Leaves. Plant Physiology, 114, 275-284.
- Kangasjarvi, J., Talvinen, J., Utriainen, M. and Karjalainen, R., 1994. Plant Defence Systems Induced ozone. Plant cell Environ., 17, 783-794.
- Kaur-Sawhney, R. and Galston, A.W., 1979. Interaction of Polyamines and Light on Biochemical Processes Involved in Leaf Senescence. Plant Cell Environ., 2, 189-196.
- Kaur-Sawhney, R., Flores, H. and Galston, A., 1980. Polyamine-induced DNA Synthesis and Mitosis in Oat Leaf Protoplast. Plant Physiol., 65, 368-371.

- Keren, N., 1997. Mechanism of Photosystem II Inactivation and D1 Protein Degradation at Low Light: the Role of Back Electron Flow. Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A. 94, 1579–1584.
- Khedr, A.H.A., Abbas, M.A., Wahid, A.A.A., Quick, W.P. and Abogadallah, G.M., 2003. Proline Induces the Expression of Salt Stress Responsive Proteins and may Improve the Adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt stress. J. Exp. Bot., 54, 2553-2562.
- Kirilovsky, D., 1994. Influence of DCMU and Ferricyanide on Photodamage in Photosystem II. Biochemistry, 33, 3087–3095.
- Kitada, M, Igarashi, K, Hirose, S. and Kitagawa, K., 1979. Inhibition by Polyamines of Lipid Peroxide Formation in Rat Liver Microsomes. Biochem Biophys Res Com 87, 388–394.
- Klapheck, S., 1988. Homoglutathione: Isolation, Quantification and Occurrence in Legumes. Physiol Plant, 74, 727-732.
- Knörzer, O.C., Durner, J. and Böger, P., 1996. Alterations in the Antioxidative System of Suspension-cultured Soybean Cells (*Glycine max*) Induced by Oxidative Stress. Physiol. Plant., 97, 388.
- Koç, E. ve Üstün, A.S., 2008. Patojenlere Karşı Bitkilerde Savunma ve Antioksidanlar, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 24, 82 – 100.
- Kono, Y. and Fridovich, I., 1982. Superoxide Radical Inhibits Catalase. J. Biol. Chem., 257, 10, 5751-5754.
- Kotzabasis, K., Fotinou, C., Roubelakis-Angelakis, K.A. and Ghanotakis, D., 1993. Polyamines in the Photosynthetic Apparatus. Photosystem II highly resolved Subcomplexes are Enriched in Spermine. Photosynth. Res., 38,83-88.
- Krieger-Liszkay, A. ve Rutherford, A.W., 1998. Influence of Herbicide Binding on the Redox Potential of the Quinone Acceptor in Photosystem II: Relevance to Photodamage and Phytotoxicity. Biochemistry, 37, 17339–17344.
- Krishnan, N. Dickman, M.B. and Becker, D.F., 2008. Proline Modulates the Intracellular Redox Environment and Protects Mammalian Cells Against Oxidative Stress. Free Radical Biol. Med., 44, 671-681.
- Kubis, J., 2001. Polyamines and “scavenging system”: Influence of Exogenous Spermidine on Halliwell-Asada Pathway Enzyme Activity in Barley Leaves Under Water Deficit. Acta Physiol. Plant., 23, 3, 335-341.
- Kubis, J., 2003. Polyamines and “scavenging system”: Influence of Exogenous Spermidine on Catalase and Guaiacol Peroxidase Activities, and Free Polyamine Level in Barley Leaves Under Water Deficit. Acta Physiol. Plant., 25,4, 337-343.

- Kubis, J., 2008. Exogenous Spermidine Differentially Alters Activities of Some Scavenging System enzymes, H₂O₂ and Superoxide Radical Levels in Water-Stressed Cucumber Leaves. J. Plant Physiol., 165, 397-406.
- Kumar, K.S., Choo, K., Yea, S.S., Seo, Y. and Han, T. 2010. Effects of the Phenylurea Herbicide Diuron on the Physiology of *Saccharina japonica* Aresch. Toxicology and Environ. Health Sci., 2, 188-199.
- Langebartels, C., Kerner, K., Leonardi, S., Schraudner, M., Trost, M., Heller, W. and Sandermann, H., 1991. Biochemical plant Responses to Ozone. Differential Induction of Polyamine and Ethylene Biosynthesis in Tobacco. Plant Physiol., 95, 882-889.
- Leshem, Y.Y., 1992. Plant Membranes: A Biophysical Approach to Structure, Development and Senescence. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, The Netherlands, 266 p.
- Levitt, J., 1980, Responses of Plants to Environmental Stresses. Academic Press, Inc. London.
- Luo, X.Y., Sunohara, Y. and Matsumoto, H., 2004. Fluazifop-butyl Causes Membrane Peroxidation in the Herbicide-susceptible Broad Leaf Weed Bristly Starbur (*Acanthospermum hispidum*). Pestic. Biochem. Physiol., 78, 93-102.
- Mader, M. and Füssl, F., 1982. Role of Peroxidase in Lignification of Tobacco Cells, Plant Physiol., 70, 1132-1134.
- Mahajan, S. and Tuteja, N., 2005, Cold, Salinity and Drought Stresses: An overview. Archives of Biochemistry and Biophysics., 444, 139-158.
- Mann, T., and Kleilin, D. 1938. Homocuprein and heptacuprein, copper-protein compounds of blood and liver in mammals. Proc. R. Soc. London B. 126, 303-315
- Markkola, A.M., Tarvainen, O. and Ahonen-Jonnarth, U., 2002. Urban Polluted Forest Soils induce Elevated Root Peroxidase Activity in Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. Environ.Pollut., 116, 273-278.
- Marrs, K.A., 1996. The Functions And Regulation Of Glutathione S-Transferases In Plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 47, 127-158.
- Marton, L. and Morris, D., 1987 Molecular and cellular functions of the polyamines, in: P. P. McCann, A., Pegg, A. Sjoerdsma (Eds.), Inhibition of Polyamine Metabolism. Academic Press, San Diego, CA, pp. 79-105.
- Mashoudi, S., Chaoui, A., Ghorbal, M.H. and Ferjani, E.E., 1997. Response of Antioxidant Enzymes to Excess Copper in Tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill). Plant Sci., 127, 129-137.

- Matysik, J. ve Bhalu, B., Mohanty, P., 2002. Molecular Mechanisms of Quenching of Reactive Oxygen Species by Proline Under stres in Plants. Current Science, 82,5, 525-532.
- May, M.J., Vernoux, T., Leaver, C., Van Montagu, M. and Inzé, D., 1998. Glutathione Homeostasis in Plants: Implications for Environmental Sensing and Plant Development. Journal of Experimental Botany, 49, 649-667.
- McCord, J.M. and Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase, an enzymatic function for erythrocyte. J. Biol. Chem. 244, 6049-6055.
- McKersie, B.D., Bowley, S.R., Harjanto, E. and Leprince, O., 1996. Water-deficit Tolerance and Field Performance of Transgenic Alfalfa Overexpressing Superoxide Dismutase. Plant Physiol., 111, 1177-1181.
- Mehler A.H., 1951. Studies on Reactions of Illuminated Chloroplasts: I. Mechanism of the Reduction of Oxygen and Other Hill Reagents. Arch. Biochem. Biophys., 33, 65-77.
- Mehlhorn, H., 1990. Ethylene-promoted Ascorbate Peroxidase Activity Protects Plants Against Hydrogen Peroxide, Ozone and Paraquat. Plant Cell Environ. 13, 971-976.
- Meister, A. and Anderson, M.E., 1983. Glutathione, Annu. Rev. Biochem., 52, 711-760.
- Metz, J., Pakrasi, H., Seibert, M. and Arntzer, C. 1986. Evidence for a Dual Function of the Herbicide-Binding D1 Protein in Photosystem II. FEBS Letters 205, 269.
- Mittle, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Van Breusegem, F., 2004. Reactive Oxygen Gene Network of Plants. Plant Science, 9, 490-498.
- Mittler, R. and Zilinkas, B.A., 1991. Purification and Characterization of Pea Cytosolic Ascorbate Peroxidase. Plant. Physiol., 97, 962-968.
- Miyake, C. and Asada, K., 1992. Thylakoid Bound Ascorbate Peroxidase in Spinach Chloroplasts and Photoreduction of Its Primary Oxidation Product Monodehydroascorbate Radicals in The Thylakoids. Plant Cell Physiol., 33, 541-553.
- Miyake, C. and Asada, K., 1996. Inactivation Mechanism of Ascorbate Peroxidase at Low Concentrations of Ascorbate, Hydrogen Peroxide Decomposes Compound I of Ascorbate Peroxidase. Plant Cell Physiol., 37, 423-430.
- Mohanty, P. and Matysik, J., 2001. Effect of Proline on the Production of Singlet Oxygen, Amino Acids, 21, 195-200.
- Mojović, M., Vuletić, M., Bacić, G. and Vucinić, Z., 2004. Oxygen Radicals Produced by Plant Plasma Membranes: an EPR spin-trap study. J Exp. Bot.; 55, 2523-2531.

- Moller, I.M., 2001. Plant Mitochondria and Oxydative Stress: Electron Transport, NADPH Turnover and Metabolism of Reactive Oxygen Species. Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 52, 561-591.
- Mullineaux, P.M. and Rausch T., 2005. Glutathione, Photosynthesis and The Redox Regulation of Stress-responsive Gene Expression. Photosynth Res. 86, 459-74.
- Nakano, Y. and Asada, Y., 1987. Purification of Ascorbate Peroxidase from Spinach Chloroplasts: Its Inactivation in Ascorbate Depleted Medium and Reactivation by Monodehydroascorbate Radical. Plant Cell Physiol., 28, 131-135.
- Nayar, H. and Chander, S., 2004. Protective Effects of Polyamines Against Oxidative Stress Induced by Water and Cold Stress in Chickpea. J. Agronomy Crop Sci., 190, 355-365.
- Ndayiragije, A. and Lutts, S., 2006. Do Exogenous Polyamines have an Impact on the Response of a salt-sensitive rice cultivar to NaCl? J. Plant Physiology, 163, 506-515.
- Nemat Alla, M.M. and Hassan, N.M., 2006. Changes of Antioxidants Levels in Two Maize Lines Following Atrazine Treatments. Plant Physiol. and Biochem., 44, 202-210.
- Niewiedomska, E. and Miszlaski, Z., 1997. Determination of Some Oxidative Stress Parameters in Variegated Leaves of *Chlorophytum comosum* (Thunb) Bak. Acta Physiol. Plant., 19, 33,
- Noctor, G. and Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and Glutathione, Keeping Active Oxygen Under Control. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 49, 249-279.
- Noguchi, T., Hayashi, H. and Tasumi, H., 1990. Factors Controlling the Efficiency of Energy Transfer from Carotenoids to Bacteriochlorophyll in Purple Photosynthetic Bacteria. Biochem. Biophys. Acta., 1017, 280-290.
- Oleinick, N.L., Chiu, S., Ramakrishnan, N. and Xue, L., 1986. The Formation, Identification and Significance of DNA-Protein Cross-Links in Mammalian Cells. Brit. J. Cancer, 55, 8, 135-140.
- Ormrod, D.P., 1986. Beckerson, D.W., Polyamines as Antiozonants for Tomato. Hort. Science, 21, 1070-1071.
- Özcan S., Babaoğlu, M. ve Gürel, E., 2004. Bitki Biyoteknolojisi Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya.
- Özoğul, F. and Özoğul, Y., 2004. Biogenic Amine Content and Biogenic Amine Quality Indices of Sardines (*Sardina pilchardus*) Stored in Modified Atmosphere Packaging and Vacuum Packaging. Food Chemistry, 99, 574-578.
- Öztürk, L. and Demir, Y., 2002. Effects of Putrescine and Ethephon on Some Oxidative Stress Enzyme Activities and Proline Content in Salt Stressed Spinach Leaves. Plant Growth Regul., 1-7.

- Padh, H., 1990. Cellular Functions of Ascorbic Acid. Bochem. and Cell Biol., 68, 1166-1173.
- Pandey, S., Ranade, S. A., Nagar, P. K. and Kumar, N., 2000. Role of Polyamines and Ethylene as Modulators of Plant Senescence. Journal of Biosciences. 25, 3, 291-299.
- Pastori, G.M., and Trippi, V.S., 1992. Oxidative Stress Induces High Rate of Glutathione Reductase Synthesis in a Drought-resistant Maize Strain. Plant Cell Physiol., 33, 957-961.
- Paul, K.G., 1963. Peroxidases, In: The Enzymes Boyer, P.D., Lardy, H., Myrback, K., Eds., Academic Press, 227-274.
- Peleg, I., Zer, H. and Chevion, M., 1992. Paraquat Toxicity in *Pisum sativum*: Effects on Soluble and Membrane Bound Proteins. Physiol. Plant., 86, 131-135.
- Perl-Treves, R. and Perl, A., 2002. Molecular Oxygen and Its Reactive Derivates. (D. INZE and M. VAN MONTAGU Eds.) Oxidative Stress in Plants. Taylor & Francis Inc., London, 1-31.
- Pignocchi C. and Foyer C.H., 2003. Apoplastic Ascorbate Metabolism and Its Role in the Regulation of Cell Signalling. Curr Opinion Plant Biol. 6, 379-389
- Pilon-Smits, E.A.H., Zhu, Y.L., Sears, T. and Terry, N., 2000. Overexpression of Glutathione Reductase in *Brassica juncea*: Effects on Cadmium Accumulation and Tolerance. Physiol. Plant., 110, 455-460.
- Pistocchi, R., Antognoni, F., Bagni, N. and Zannoni D., 1990. Spermidine Uptake by Mitochondria of *Helianthus tuberosus*. Plant Physiol. 92, 690-695.
- Pitcher, L.H. and Zilinskas, B.A., 1996. Overexpression of Copper/Zinc Superoxide Dismutase in the Cytosol of Transgenic Tobacco Confers Partial Resistance to Ozone Induced Foliar Necrosis. Plant Physiol. 110, 583-588.
- Pitcher, L.H., Brennan, E., Hurley, A., Dunsmuir, P., Tepperman, J.M. and Zilinskas, B.A., 1991. Overproduction of Petunia Copper/Zinc Superoxide Dismutase Does Not Confer Ozone Tolerance in Transgenic Tobacco. Plant Physiol. 97, 452-455.
- Podulso, J.F. and Curan, G.L., 1996. Increased Permeability of Superoxide Dismutase at the Blood Nerve and Blood Brain Barriers with Retained Enzymatic Activity after Covalent Modification with Naturally Occuring Polyamine, Putrescine. J. Neurochem., 67, 734-741.
- Popovic, R.B., Kyle, D.J., Cohen, A.S. and Zalik, S., 1979. Stabilisation of Thylakoid Membranes by Spermin during Stress Induced Senescence of Barley Leaf Discs. Plant Physiol., 64, 721-726.
- Radic, S., Babic, M., Skobic, D., Roje, V. and Pevalek-Kozlina, B., 2010. Ecotoxicological Effects of Aluminum and Zinc on Growth and Antioxidants in *Lemna minor*. Ecotoxicol. Environ. Saf., 73, 336-342.

- Reis, M.O., Necchi Jr. O., Colepicolo, P. and Barros, M.P., 2011. Co- stressors Chilling and High Light Increase Photooxidative Stres in Diuron-Treated Red Alga *Kappaphycus alvarezii* but with Lower Involvement of H₂O₂. Pest. Biochem. and Physiol., 99, 7-15.
- Ridley, S.M., 1977. Interaction of Chloroplasts with Inhibitors. Plant Physiol., 59, 724-732.
- Sairam, R.K. and Srivastava, G.C., 2001. Water Stres Tolerance of Wheat (*Triticum aestivum* L.): Variations in Hydrogen Peroxide Accumulation and Antioxidant Activity in Tolerant and Susceptible Genotypes. J. Agron. Crop. Sci., 186, 63-70.
- Salin, M. L., 1988. Toxic Oxygen Species and Protective Systems of the Chloroplast. Physiol. Plant., 72, 681-689.
- Sancho, M.A., Milrad de Forchetii, S., Pliego, F., Valpuesta, V. and Queseda, M.A., 1996. Total Peroxidase Activity and Isoenzymes in the Culture Medium of NaCl Adapted Tomato Suspension Cells. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 44, 161-167.
- Sanmartin, M., Drogoudi, P. D., Lyons, T., Pateraki, I., Barney, J. and Kanellis, A. K., 2003. Over-expression of Ascorbate Oxidase in the Apoplast of Transgenic Tobacco Results in Altered Ascorbate and Glutathione Redox States and Increased Sensitivity to Ozone. Planta, 918-928.
- Saradhi, P.P., Alia, A.S. and Prasad, K.V.S.K., 1995. Proline Accumulates in Plants Exposed to UV Radiation and Protects Them Against UV Induced Peroxidation, Biochem Biophys Res. Commun., 209, 1-5.
- Scandalios, J.G., 1992. Regulation of Antioxidant Defense Genes CAT and SOD of Maize, In: Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems, Scandalios, J.G., Ed., Cold Spring Harbor Labrotory Pres, Newyork, 117-152.
- Scandalios, J.G., 1993. Oxygen Stress and Superoxide Dismutase. Plant Physiol., 101, 7-12.
- Scandalios, J.G., Liu, E.H. and Campeau, M.A., 1972. The Effect of Intragenic and Intraegenic Complementation Catalase Structure and Function of Maize: A Molecular Approach to Heterosis. Arch. Biochem. Bophy. 153, 695-705.
- Schaedlea, M. and Basshamb, J.A., 1977. Chloroplast Glutathione Reductase. Plant Physiol., 59, 1011-1012.
- Shao, N., Beck, C.F., Lemaire, S.D. and Krieger-Liszkay, A., 2008. Photosynthetic Electron Flow Affects H₂O₂ Signaling by Inactivation of Catalase in *Chlamydomonas reinhardtii*. Planta, 228, 1055-1066.
- Shieh, H.H., Sweet, T.R., 1979. Spectrophotometric determination of ascorbic acid. Anal. Biochem., 96, 1-5

- Siripornadulsil, S., Traina, S., Verma, D.P.S. and Sayre, R.T., 2002. Molecular Mechanisms of Proline-mediated Tolerance to Toxic Heavy Metals in Transgenic Microalgae. Plant Cell, 14, 2837-2847.
- Slesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S. and Miszalski, Z., 2007. The Role of Hydrogen Peroxide in Regulation of Plant Metabolism and Cellular Signalling in Response to Environmental Stresses. Acta Biochim. Pol., 54, 39-50.
- Smirnoff, N. and Cumbes, Q., 1989. Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Compatible Solutes. Phytochemistry, 28,4, 1057-1060.
- Smirnoff, N., 1993. The Role of Active Oxygen in the Response of Plants to Water Deficit and Desiccation. New Phytol, 125, 27-58.
- Smirnoff, N., 1995. Antioxidant Systems and Plant Response to the Environment. In: Smirnoff N.(ed.), Environment and Plant Metabolism: Flexibility and Acclimation. Bios Scientific Publishers, Oxford, 217-243.
- Smith, I.K., Kendall, A.C., Keys, A.J., Turner, J.C. and Lea, P.J., 1985. The Regulation of the Biosynthesis of Glutathione in Leaves of Barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Sci., 41, 11-17.
- Smith, M.A., and Davies P. J., 1985. Manipulation of the Polyamine Content and Senescence of Apical Buds of G2 Peas. Plant Growth Regulation 3, 401-417.
- Song, N.H., Yin, X.L., Chen, G.F. and Yang, H., 2007. Biological Responses of Wheat (*Triticum aestivum*) Plants to the Herbicide Chlorotoluron in Soils. Chemosphere, 68, 1779-1787.
- Spiridonov, Y.Y. ve Zhemchuzhin, S.G., 2010. Current Problems in Herbicide Investigation. Agrokhimiya, 7, 73–91.
- Srivastava, S.K., Vashi, D.J., and Naik, B.I., 1983. Control of Senescence by Polyamines and Guanidines in Young and Mature Barley Leaves. Phytochem., 22,10,2151-2154.
- Stajner, D., GaSiC, O., Matkovics, B. ve Varga, S.I., 1995. Metolachlor Effect on Antioxidant Enzyme Activities and Pigment Content in Seeds and Young Leaves of Wheat (*Triticum aestivum* L.). Agr. mediter. 125, 267-273.
- Stajner, D., Kock, M., GaSiC. O. and Schlee, D., 1994. Alachlor Induced Changes of Superoxide Dismutase Activity and Pigment Content in Wheat Seeds and Leaves. J. serb. chem. Soc. 59, 7-12.
- Stajner, D., Popovic, M. and Stajner, M., 2003. Herbicide Induced Oxidative Stress in Lettuce, Beans, Pea Seeds and Leaves. Biologia Plantarum, 47, 575-579.
- Streb, P., Michael-Knauf, A. and Feierabend, J., 1993. Interaction of Chloroplasts with Inhibitors. Physiol. Plant, 88, 590–598.
- Sun, Y. and Oberley, L.W., 1989. The Inhibition of Catalase by Glutathione. Free Radic. Biol.Med., 7, 595-602.

- Tadolini, B., 1988. Polaymine inhibition of lipoperoxidation. The Influence of Polyamines on Iron Oxidation in the Presence of Compounds Mimicking Phospholipids Polar Heads. Biochem. J., 249, 33–36.
- Tadolini, B., Cabrini, L., Landi, L., Varani, E. and Pasquali P., 1984. Polyamine Binding to Phospolipid Vesicles and Inhibition of Lipid Peroxidation. Biochem Biophys Res Com 122, 550–555.
- Tanaka, K., Suda, Y., Kondo, N. and Sugahara, K., 1985. O₃ Tolerance and the Ascorbate-Dependent H₂O₂ Decomposing System in Chloroplasts. Plant Cell Physiol., 26, 1425-1431.
- Tang, C.F., Liu, Y.G., Zeng, G.M., Li, X., Xu, W.H., Li, C.F. and Yuan, X.Z., 2005. Effects of Exogenous Spermidine on Antioxidant System Responses of *Typha latifolia* L. Under Cd⁺² Stress. J.Integer. Plant Boil., 47, 428-434.
- Tausz, M., Šircelj, H. and Grill, D., 2004. The Glutathione System as a Stress Marker in Plant Ecophysiology: is a Stress-response Concept Valid. Journal of Experimental Botany, 55, 1955-1962.
- Teisseire, H. and Vernet, G., 2000. Is the “Diuron Effect” due to Herbicide Strengthening of Antioxidative Defenses of *Lemna minor*, Journal of Experimental Botany 66, 153-160.
- Tekin, F. ve Bozcuk, S., 1998. *Helianthus annuus* L. var. Santafe (Ayçiçeği) Tohumlarının Çimlenmesi ve Erken Büyüme Üzerine Tuz ve Dışsal Putresin’in Etkileri. Tr. J. of Biology, 22, 331-340.
- Tiburcio, A.F., Besford, R.T., Capell, T., Borrell, A., Testillano, P.S. and Risueno, M.C., 1994. Mechanism of Polyamine Action during Senescence Responses Induced by Osmotic Stress. J.Exp. Bot., 45, 1789-1800.
- Tsang, E.W.T., Bowler, C., Herouart, D., Van Camp, W., Villarroel, R., Gentella, C., Van Montagu, M. and Inze, D., 1991. Differential Regulation of Superoxide Dismutase in Plants Exposed to Environmental Stress. Plant Cell, 3, 783-791.
- Unal,D., Tuney, I. and Sukatar, A., 2008. The Role of External Polyamines on Photosynthetic Responses, Lipid Peroxidation, Protein and Chlorophyll A Content under the UV-A (352 nm) stres in *Physcia semipinnata*. J. Photochem. Photobiol.B: Biology, 90, 64-68.
- Urbanek, H., Kuzniak-Gebarowska, E. ve Herka, K., 1991. Elicitation of Defense Responses in Bean Leave By *Botrytis cinerea* Polygalacturanase. Acta Physiol. Plant., 13, 43-50
- URL-1, <http://5e.plantphys.net/article.php?ch=7&id=75>. 10 Temmuz 2011.
- URL-2, <http://www.genetikbilimi.com/genbilim/enzimler.htm>. 10 Temmuz 2011.
- URL-3, <http://www.oksante.com.tr/OS-brosur.pdf>. 2 Şubat 2011.

- Van Camp, W., Van Montagu, M. and Inze, D., 1994a. Superoxide Dismutases, In: Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants. Foyer, C.H., Mullineaux, P.M., Eds., CRC Press, Boca Raton, 317-341.
- Velikova, V., Yordanov, I. and Edreva, A., 2000. Oxidative Stress and Some Antioxidant Systems in Acid Rain-treated Bean Plants, Protective Role of Exogenous Polyamines. Plant Science, 151, 59-66.
- Vendruscolo, E.C.G., Schuster, I., Pileggi, M., Scapim, C.A., Molinari, H.B.C., Marur, C.J. and Vieira, L.G.E., 2007. Stress-induced Synthesis of Proline Confers Tolerance to Water Deficit in Transgenic Wheat. J. Plant Physiology, 164, 10, 1367-1376.
- Verma, S. and Mishra, S.N., 2005. Putrescine Alleviation of Growth in Salt Stressed *Brassica juncea* by Inducing Antioxidative Defense System. J. Plant Physiol., 162, 669-677.
- Vranova, E., Inze, D. and Breusegem, V.F., 2002. Signal Transduction during Oxidative Stress. Journal of Experimental Botany, 53, 1227-1236.
- Walden, R., Cordeiro, A. and Tiburcio A.F., 1997. Polyamines: Small Molecules Triggering Pathways in Plant Growth and Development. Plant Physiol., 113, 1009-1013.
- Wang, X., Shi, G., Xu, Q. and Hu, J., 2007. Exogenous Polyamines Enhance Copper Tolerance of *Nymphoides peltatum*. J. Plant Physiol., 164, 1062-1070.
- Wi, S.J., Kim, W.T. and Park, K.Y., 2006. Overexpression of Carnation S-Adenosylmethionine Decarboxylase Gene Generates A Broad-spectrum Tolerance to Abiotic Stresses in Transgenic Tobacco Plants. Plant Cell Rep., 25, 1111-1121.
- Yan, B., Dai, Q., Liu, X., Huang, S. and Wang, Z., 1996. Flooding Induced Membrane Damage, Lipid Oxidation and Activated Oxygen Generation in Corn Leaves. Plant and Soil, 179, 261-268.
- Yang, S.L., Lan, S. and Gong, M., 2009. Hydrogen Peroxide-induced Proline and Metabolic Pathway of Its Accumulation in Maize Seedlings. J. Plant Physiol., 166, 1694-1699.
- Yang, Y., Zhang, Y., Wei, X., You, J., Wang, W., Lu, J. and Shi, R., 2011. Comparative Antioxidative Responses and Proline Metabolism in Two Wheat Cultivars under Short Term Lead Stress. Ecotoxicol. Environ. 74, 733-740.
- Yin, X.L., Jiang, L., Song, N.H. and Yang, H., 2008. Toxic Reactivity of Wheat (*Triticum aestivum*) Plants to Herbicide Isoproturon. J. Agric. Food. Chem., 56, 4825-4831.
- Yiu, J.C., Liu, C., Fang, D.Y. and Lai, Y., 2009. Waterlogging tolerance of Welsh Onion (*Allium fistulosum* L.) Enhanced by Exogenous Spermidine and Spermine. Plant Physiology and Biochemistry, 47, 710-716.

- Yoshiba, Y., Kiyosue T, Kataqiri T, Ueda, H., Mizoguchi, T., Yamauchi-Shirozaki, K., Wada, K., Harada, Y. and Shinozaki, K., 1995. Correlation between the Induction of a Gene for Delta 1-Pyrroline-5-carboxylate Synthase and Accumulation of Proline in *Arabidopsis thaliana* Under Osmotic Stres. Plant J. 7, 751-760.
- Yoshimura, K., Miyao, K., Gaber, A., Takeda, T., Kanaboshi, H., Miyasaka, H. and Shigeoka, S., 2004. Enhancement of Stress Tolerance in Transgenic Tobacco Plants Overexpressing Chlamydomonas Glutathione Peroxidase in Chloroplasts or Cytosol. The Plant Journal, 37, 21–33.
- Zhang, W., Jiang, B., Li, W., Song, H., Yu, Y. and Chen, J., 2009. Polyamines Enhance Chilling Tolerance of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Through Modulating Antioxidative System. Scientia Hort., 122, 200-208.
- Zhao, H. and Yang, H., 2008. Exogenous Polyamines Alleviate the Lipid Peroxidation Induced by Cadmium Chloride Stres in *Malus hupehensis* Rehd. Scientia Horticulturae, 116, 422-447.
- Zheleva, D., Tsonev, T., Segiev, I. and Karanov, E., 1994. Protective Effect of Exogenous Polyamines Against Atrazine in Pea Leaves. J.Plant Growth Regul., 13, 203-211.
- Zhou, Q.X., 2003. Interaction Between Heavy Metals and Nitrogen Fertilizers Applied in Soil-vegetable Systems. Bull Environ. Contam. Toxicol., 171, 338-344.
- Zulfugarov, I.S., Tovuu, A., Kim, J. and Lee, C., 2011. Detection of Reactive Oxygen Species in Higher Plants. J. Plant Biol., 54, 351-357.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Trabzon'da doğdu. İlkokulu Yüzüncü Yıl İlköğretim Okulunda, lise öğrenimini Trabzon Lisesinde tamamladıktan sonra 2004–2005 öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde Lisans öğrenimine başladı. 2009 yılında Biyolog unvanı ile mezun oldu. 2009-2010 öğretim yılında Rize Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı olarak Biyoloji Bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı.