

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BÜYÜMEYİ DÜZENLEYİCİ MADDELERİN OKSİDATİF STRES
ÜZERİNE ETKİLERİ

139235

Yük. L. Biyolog Nuran DURMUŞ

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"Doktor"
Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 16.01.2003

Tezin Savunma Tarihi : 10.03.2003

138235

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU *A. Kadioğlu*

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Avni GÜVEN *Avni Güven*

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Osman BEYAZOĞLU *Osman Beyazoglu*

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ertuğrul SESLİ *E. Secli*

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Sema AYAZ *Sema Ayaz*

Enstitü Müdürü: Prof. Dr. Yusuf AYVAZ *Yusuf Ayvaz*

Trabzon 2003

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÖNSÖZ

“Büyümeyi Düzenleyici Maddelerin Oksidatif Stres Üzerine Etkileri” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Bu konunun seçilmesinde, çalışmanın planlanmasında ve değerlendirilmesinde her türlü yardımını gördüğüm sayın hocam Prof. Dr. Asım KADIOĞLU’na en içten şükran ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tezin geliştirilmesine yardımcı olan tez izleme jüri üyelerimden sayın Prof. Dr. Osman BEYAZOĞLU ile Doç. Dr. Ertuğrul SESLİ’ye, tezdeki endojenik bitki büyüme düzenleyicilerinin analizlerini gerçekleştiren sayın Yrd. Doç. Dr. Peyami BATTAL’a ve çalışmalarım boyunca benden destek ve sabırlarını esirgemeyen sevgili aileme çok teşekkür ederim.

Bu çalışma 20.111.004.1 nolu proje ile K.T.Ü Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Bu nedenle K.T.Ü Araştırma Fonu Yönetim Kurulu Başkanı ve üyelerine teşekkür ederim.

Nuran DURMUŞ

Mart, 2003, Trabzon

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	VI
SUMMARY.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Reaktif Oksijen Türleri.....	3
1.2.1. Singlet O ₂ 'nin Oluşumu.....	5
1.2.2. Süperoksit Üretimi.....	6
1.2.3. Hidrojen Peroksit.....	7
1.2.4. Hidroksil Radikali.....	8
1.2.5. ROS'ların Makromoleküllere Etkileri.....	9
1.3. Antioksidant Sistem.....	11
1.3.1. Antioksidant Enzimler.....	12
1.3.1.1. Süperoksit Dismutaz.....	12
1.3.1.2. Katalaz.....	15
1.3.1.3. Peroksidazlar.....	15
1.3.1.4. Glutasyon Redüktaz.....	17
1.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidantlar.....	18
1.3.2.1. Glutasyon.....	18
1.3.2.2. Askorbik Asit.....	20
1.3.2.3. Tokoferol.....	23
1.3.2.4. Karotenoidler.....	24
1.4. Oksidatif Strese Sebep Olan Faktörler.....	25
1.4.1. Kirlilik.....	26
1.4.2. Metaller.....	26

1.4.3. Işığa Duyarlı Toksinler.....	27
1.4.4. Herbisitler.....	27
1.4.4.1. Paraquat.....	28
1.4.4.2. Işığa Duyarlı Herbisitler.....	30
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	31
2.1. Bitkilerin Büyütülmesi.....	31
2.2. Büyüme Düzenleyici Madde ve Herbisit Uygulamaları.....	31
2.3. Nispi Su İçeriği Tayini.....	32
2.4. Klorofil ve Karotenoid Tayini.....	32
2.5. Askorbik Asit Tayini.....	32
2.6. Proteinlerin Analizi.....	33
2.6.1. Çözünabilir Protein Tayini.....	33
2.6.2. Proteinlerin SDS- Poliakrilamid Jel Elektrophorezi.....	34
2.7. SOD Aktivitesi Tayini.....	35
2.7.1. Enzim Ekstraktının Hazırlanması.....	35
2.7.2. Enzim Aktivitesinin Tayini.....	35
2.7.3. Poliakrilamid Jel Elektrophorezi ile SOD İzoenzimlerinin Belirlenmesi.....	35
2.8. Peroksidaz Aktivitesi Tayini.....	36
2.8.1. Enzim Ekstraktının Hazırlanması.....	36
2.8.2. Enzim Aktivitesinin Tayini.....	36
2.8.3. Poliakrilamid Jel Elektrophorezi ile Peroksidaz İzoenzimlerinin Belirlenmesi.....	37
2.9. Glutasyon Redüktaz Aktivitesi Tayini.....	37
2.10. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) ile Bitki Hormon Miktarlarının Belirlenmesi.....	38
2.11. İstatistik Analizler.....	38
3. BULGULAR.....	39
3.1. Morfolojik Bulgular.....	39
3.2. Büyüme Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının Nispi Su İçeriğine Etkileri.....	46
3.3. Büyüme Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının Toplam Klorofil Miktarına Etkileri.....	47
3.4. Büyüme Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının Karotenoid Miktarına Etkileri.....	50
3.5. Büyüme Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının Askorbik Asit Miktarına Etkileri	51

3.6. Büyümeği Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının Çözünebilir Protein Miktarına Etkileri.....	53
3.7. Büyümeği Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının Protein Bantları Üzerine Etkileri.....	55
3.8. Büyümeği Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının SOD Aktivitesine Etkileri.....	59
3.9. Büyümeği Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının SOD İzoenzimlerine Etkileri.....	61
3.10. Büyümeği Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının Peroksidaz Aktivitesine Etkileri.....	64
3.11. Büyümeği Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının Peroksidaz İzoenzimlerine Etkileri.....	67
3.12. Büyümeği Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının GR Aktivitesine Etkileri.....	70
3.13. Büyümeği Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının Endojenik Giberellik Asit (GA) Miktarına Etkileri.....	74
3.14. Büyümeği Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının Endojenik İndol Asetik Asit (IAA) Miktarına Etkileri.....	76
3.15. Büyümeği Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının Endojenik Zeatin Miktarına Etkileri.....	79
3.16. Büyümeği Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının Endojenik Absisik Asit (ABA) Miktarına Etkileri.....	82
4. İRDELEME.....	86
5. SONUÇLAR.....	102
6. ÖNERİLER.....	105
7. KAYNAKLAR.....	106
ÖZGEÇMİŞ.....	128

ÖZET

Bu çalışmada spermin (SPM), putrescin (PUT), benziladenin (BA) ve giberellik asit (GA_3) ile ön muamele yapıldıktan sonra paraquat (PQ) herbisiti uygulanan mısır fidelerindeki nispi su içeriği, toplam klorofil, çözünebilir protein, bazı antioksidant madde (karotenoid ve askorbik asit) ve enzim aktivitelerindeki (süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD) ve glutatyon redüktaz (GR)) değişimler ile bazı endojenik hormon miktarları (GA , indol asetik asit (IAA), zeatin (Z) ve absisik asit (ABA)) belirlenmiştir.

PQ uygulanan fidelerdeki nispi su içeriği, toplam klorofil ve çözünebilir protein miktarlarının istatistiki bakımdan önemli ölçüde azaldığı, büyümeyi düzenleyici maddelerle (BDM) ön muamele yapılan fidelerde ise sözkonusu parametrelerde meydana gelen azalmaların engellendiği tespit edilmiştir. Ayrıca BDM'lerle ön muamele yapılan fidelerde, karotenoid ve askorbik asit gibi antioksidant maddelerin miktarlarında PQ'nin sebep olduğu azalmaların da önemli ölçüde engellendiği bulunmuştur.

Antioksidant enzimlerle ilgili yapılan çalışmalarda, PQ uygulanan fidelerdeki SOD ve POD aktivitelerinin arttığı, GR aktivitesinin başlangıçta arttığı daha sonra ise azaldığı belirlenmiştir. SPM, PUT ve BA ile ön muamele yapılan fidelerde uygulanan konsantrasyona bağlı olarak SOD ve POD aktivitelerinin arttığı, GA_3 uygulanan fidelerde ise SOD ve POD aktivitelerinde meydana gelen değişimlerin istatistiki bakımdan önemli olmadığı bulunmuştur. BDM'lerle ön muamele yapılan fidelerdeki GR aktivitesinin genellikle arttığı tespit edilmiştir.

Ayrıca PQ uygulanan fidelerdeki endojenik GA , IAA ve Z miktarlarının azaldığı, ABA miktarının ise arttığı saptanmıştır. GA , IAA ve Z miktarlarında meydana gelen azalmaların BDM'lerle ön muamele yapılan fidelerde engellendiği, hatta bazılarının miktarlarında önemli artışların olduğu belirlenmiştir. ABA miktarının ise kontrol fidelerine nazaran (0,2 mM SPM ve PUT hariç) istatistiki bakımdan önemli ölçüde değişmediği bulunmuştur.

Elde edilen bulgulara göre, BDM'lerin oksidatif strese sebep olan faktörlere karşı bitkilerin tolerans mekanizmasını olumlu yönde uyarabileceği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Paraquat, Oksidatif Stres, Spermin, Putrescin, Benziladenin, Giberellik Asit, Süperoksit Dismutaz, Peroksidaz.

SUMMARY

The Effects of Plant Growth Regulators on Oxidative Stress

In this study, maize (*Zea mays* L.) seedlings exposed to paraquat (PQ) after pretreated with spermine (SPM), putrescine (PUT), benzyladenine (BA) and gibberellic acid (GA₃) were examined to find out the changes of relative water content, total chlorophyll, soluble protein, some antioxidant substances (carotenoid and ascorbic acid) and enzyme (superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and glutathione reductase (GR)) activities with some endogenous plant growth regulators (GA, indolacetic acid (IAA), zeatin (Z), abscisic acid (ABA)) levels.

Relative water, total chlorophyll and soluble protein contents in maize seedlings treated with PQ decreased significantly, while the decreases in these parameters were determined to prevent in seedlings pretreated with plant growth regulators (PGR). Also, it was found that the decreases caused by PQ in the levels of antioxidant substances such as carotenoid and ascorbic acid were significantly prevented in seedlings pretreated with PGR.

SOD and POD activities were recorded to increase, GR activity increased at first and then decreased in seedlings exposed to PQ. In seedlings pretreated with SPM, PUT and BA, SOD and POD activities were determined to increase depending on the concentrations applied and not to change significantly the activities of these enzymes in GA₃ treatments. Generally, GR activity increased in the seedlings pretreated with PGR.

Also, PQ treatment decreased the levels of endogenous GA, IAA and Z, while increased ABA level. The decreases in the levels of GA, IAA and Z were prevented in the seedlings pretreated with PGR, even the amounts of some endogenous PGR increased significantly. ABA content was not markedly different as compared with control seedlings (except 0.2 mM SPM and PUT).

According to the present results, it can be said that PGR might positively stimulate the tolerance mechanisms of plants against the factors caused oxidative stress.

Key Words: Paraquat, Oxidative Stress, Spermine, Putrescine, Benzyladenine, Gibberellic Acid, Superoxide Dismutase, Peroxidase.

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Tilakoid membranlardaki mehler- peroksidaz reaksiyon dizisi.....	13
Şekil 2. Askorbat- glutatyon siklusu (Asada- Halliwell yolu).....	22
Şekil 3. PQ uygulandıktan 12 saat sonra fidelerin yapraklarında oluşan septomlar.....	39
Şekil 4. PQ uygulandıktan 12 saat sonra fidelerin genel görünümü.....	40
Şekil 5. PQ uygulandıktan 24 saat sonra fidelerin genel görünümü.....	40
Şekil 6. 1 mM SPM ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fideler ile sadece PQ uygulanmış fidelerin 24 saat sonraki genel görünümleri.....	41
Şekil 7. 1 mM PUT ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fideler ile sadece PQ uygulanmış fidelerin 24 saat sonraki genel görünümleri.....	42
Şekil 8. 100 µM BA ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fideler ile sadece PQ uygulanmış fidelerin 12 saat sonraki genel görünümleri.....	42
Şekil 9. 1 µM GA ₃ ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fideler ile sadece PQ uygulanmış fidelerin 12 saat sonraki genel görünümleri.....	43
Şekil 10. 1 µM GA ₃ ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fideler ile sadece PQ uygulanmış fidelerin 24 saat sonraki genel görünümleri.....	43
Şekil 11. 10 µM GA ₃ ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fideler ile sadece PQ uygulanmış fidelerin 12 saat sonraki genel görünümleri.....	44
Şekil 12. 10 µM GA ₃ ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fideler ile sadece PQ uygulanmış fidelerin 24 saat sonraki genel görünümleri.....	44
Şekil 13. 100 µM GA ₃ ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fideler ile sadece PQ uygulanmış fidelerin 12 saat sonraki genel görünümleri.....	45
Şekil 14. 100 µM GA ₃ ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fideler ile sadece PQ uygulanmış fidelerin 24 saat sonraki genel görünümleri.....	45
Şekil 15. Çeşitli konsantrasyonlarda büyümeyi düzenleyici maddelerle ön muamele yapılan mısır yapraklarındaki protein bantları üzerine paraquatın 8 saat sonraki etkileri.....	56
Şekil 16. Çeşitli konsantrasyonlarda büyümeyi düzenleyici maddelerle ön muamele yapılan mısır yapraklarındaki protein bantları üzerine paraquatın 12 saat sonraki etkileri.....	57
Şekil 17. Çeşitli konsantrasyonlarda büyümeyi düzenleyici maddelerle ön muamele yapılan mısır yapraklarındaki protein bantları üzerine paraquatın 24 saat sonraki etkileri.....	58
Şekil 18. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde SOD aktivitesindeki değişiklikler.....	59

Şekil 19. BA ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde SOD aktivitesindeki değişiklikler.....	60
Şekil 20. GA ₃ ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde SOD aktivitesindeki değişiklikler.....	61
Şekil 21. Çeşitli konsantrasyonlarda büyümeyi düzenleyici maddelerle ön muamele yapılan mısır yapraklarındaki SOD izoenzimleri üzerine paraquatın 8 saat sonraki etkileri.....	62
Şekil 22. Çeşitli konsantrasyonlarda büyümeyi düzenleyici maddelerle ön muamele yapılan mısır yapraklarındaki SOD izoenzimleri üzerine paraquatın 12 saat sonraki etkileri.....	63
Şekil 23. Çeşitli konsantrasyonlarda büyümeyi düzenleyici maddelerle ön muamele yapılan mısır yapraklarındaki SOD izoenzimleri üzerine paraquatın 24 saat sonraki etkileri.....	64
Şekil 24. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde peroksidaz aktivitesindeki değişiklikler.....	65
Şekil 25. BA ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde peroksidaz aktivitesindeki değişiklikler.....	66
Şekil 26. GA ₃ ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde peroksidaz aktivitesindeki değişiklikler.....	67
Şekil 27. Çeşitli konsantrasyonlarda büyümeyi düzenleyici maddelerle ön muamele yapılan mısır yapraklarındaki peroksidaz izoenzimleri üzerine paraquatın 8 saat sonraki etkileri.....	68
Şekil 28. Çeşitli konsantrasyonlarda büyümeyi düzenleyici maddelerle ön muamele yapılan mısır yapraklarındaki peroksidaz izoenzimleri üzerine paraquatın 12 saat sonraki etkileri.....	69
Şekil 29. Çeşitli konsantrasyonlarda büyümeyi düzenleyici maddelerle ön muamele yapılan mısır yapraklarındaki peroksidaz izoenzimleri üzerine paraquatın 24 saat sonraki etkileri.....	70
Şekil 30. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde GR aktivitesindeki değişiklikler.....	71
Şekil 31. BA ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde GR aktivitesindeki değişiklikler.....	72
Şekil 32. GA ₃ ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde GR aktivitesindeki değişiklikler.....	73
Şekil 33. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde GA miktarındaki değişiklikler.....	74
Şekil 34. BA ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde GA miktarındaki değişiklikler.....	75
Şekil 35. GA ₃ ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde GA miktarındaki değişiklikler.....	76
Şekil 36. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde IAA miktarındaki değişiklikler.....	77

Şekil 37. BA ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde IAA miktarındaki değişiklikler.....	78
Şekil 38. GA ₃ ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde IAA miktarındaki değişiklikler.....	79
Şekil 39. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde Z miktarındaki değişiklikler.....	80
Şekil 40. BA ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde Z miktarındaki değişiklikler.....	81
Şekil 41. GA ₃ ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde Z miktarındaki değişiklikler.....	82
Şekil 42. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde ABA miktarındaki değişiklikler.....	83
Şekil 43. BA ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde ABA miktarındaki değişiklikler.....	84
Şekil 44. GA ₃ ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde ABA miktarındaki değişiklikler.....	85



TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Dünya bazında yabancı ot ve hastalık etmenlerinin oluşturduğu kayıplar.....	28
Tablo 2. Büyümeıı düzenleyici maddelerle ön muamele yapılmış ve paraquat uygulanmış mısıı fidelerindeki nispi su içeriği.....	46
Tablo 3. Büyümeıı düzenleyici maddelerle ön muamele yapılmış ve paraquat uygulanmış mısıı fidelerindeki toplam klorofil miktarı.....	48
Tablo 4. Büyümeıı düzenleyici maddelerle ön muamele yapılmış ve paraquat uygulanmış mısıı fidelerindeki karotenoid miktarı.....	50
Tablo 5. Büyümeıı düzenleyici maddelerle ön muamele yapılmış ve paraquat uygulanmış mısıı fidelerindeki askorbik asit miktarı.....	52
Tablo 6. Büyümeıı düzenleyici maddelerle ön muamele yapılmış ve paraquat uygulanmış mısıı fidelerindeki çözünebilir protein miktarı.....	54

SEMBOLLER DİZİNİ

ABA	: Absisik asit
ATP	: Adenozin trifosfat
BA	: Benziladenin
BDM	: Büyümeyi düzenleyici madde
DHA	: Dehidroaskorbat
DNA	: Deoksi ribonükleik asit
ETS	: Elektron transport sistemi
GA	: Giberellik asit
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
GSSG	: Oksitlenmiş glutasyon
IAA	: İndol asetik asit
MDHA	: Monodehidroaskorbat
NADP	: Nikotinamid dinükleotid fosfat
NBT	: Nitro blue tetrazolium
$^1\text{O}_2$	: Singlet oksijen
O_2^-	: Süperoksit
O_3	: Ozon
$\text{OH}^\cdot$	: Hidroksil radikali
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
POD	: Peroksidaz
PUT	: Putrescin
PQ	: Paraquat
PS I	: Fotosistem I
PS II	: Fotosistem II
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
SPM	: Spermin

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Oksijen, aerobik hayatın devamı için gerekli olmasına rağmen canlılarda bir çok dejenerasyon ve hastalık oluşumuyla da alakalıdır (Marx, 1985). Çeşitli çalışmalarda oksijenin canlı dokularda meydana getirdiği hasarın serbest oksijen radikalleri olarak adlandırılan süperoksit, peroksit ve hidroksil radikallerinin üretiminden kaynaklandığı kaydedilmiştir. Oksijenden kaynaklanan bu radikaller protein, lipid, karbohidrat ve nükleik asitler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek hücrelerde hasar meydana getirirler (Smirnoff, 1993; Wise, 1995; Bartosz, 1997). Bu durum bitki, insan, hayvan ve aerobik bakteriler olmak üzere bütün canlılarda meydana gelebilir. Oksijenin toksikliği, elektron ve enerjinin oksijen molekülüne transferinden kaynaklanır. Bu olayların her ikisi de toksik oksijen radikallerinin oluşumuna neden olur. Toksik oksijen radikalleri reaktif oksijen türleri (ROS) olarak da adlandırılırlar. Yaşlanma, katarakt, kalp hastalığı ve kanser gibi bir çok hastalığın bu reaktif oksijen türleriyle ilgisi olduğu kaydedilmiştir (Marx, 1985; Cerutti, 1994; Wiseman, Halliwell, 1996; Jacobson, 1996).

Bitkilerde çeşitli stres koşullarında aşırı miktarda üretilen reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu ürün kayıplarının, tarımsal verimlilikteki azalmanın temel kaynağı olduğu düşünülmektedir. Optimum koşullar altında bile birçok metabolik olayda reaktif oksijen türleri üretilmektedir. Bitkilerde bu metabolik reaksiyonların en önemlisi ışığa bağlı olaylardır. Işık enerjisi fotosentez için gerekli olup karbon fiksasyonu ve diğer metabolik olaylar için gerekli olandan daha fazla ışık enerjisi absorblandığında zararlı etkilere sebep olabilir. Çoğu bitkiler ışık yakalayıcı kompleks tarafından absorblanan enerjinin % 50'den fazlasını kullanamazlar. Bu nedenle bitkiler, ROS'ların üretiminden sakınmak için fazla olan enerjinin dağıtılmasını sağlayan mekanizmalara sahiptirler. Enerji harcanması NADPH ve ATP aracılığıyla karbon fiksasyonu ve fotorespirasyon olaylarıyla başarılı. Fotosentetik hücreler bir dizi ışığa duyarlı pigmentler ihtiva ettikleri için oksijen radikalleri üretmeye meyillidirler. Süperoksit ve H_2O_2 gibi ROS'ların kloroplastlardan etkili bir şekilde uzaklaştırılması fotosentezin inhibisyonunu önlemek için oldukça önemlidir. Nitekim, H_2O_2 'nin 10 μM kadar düşük seviyelerinin bile karbon fiksasyonunun % 50'sini

inhibe edebileceği bulunmuştur (Kaiser, 1976, 1979). Ayrıca bir çok çalışmada, çeşitli çevresel stresleri takiben fotosentezde meydana gelen azalmanın büyük sebebinin ROS'lar olduğu ileri sürülmüştür (Bowler vd., 1992; Allen, 1995; Smirnoff, 1995; Alscher vd., 1997). Bununla birlikte süperoksit ve H_2O_2 , hidroksil radikaline oranla daha az bir toksisiteye sahiptir. Hidroksil radikali canlılarda önemli biyolojik hasarlara sebep olmaktadır.

Stresin en genel özelliği elektron transferiyle ilgili metabolizmayı bozmak olduğu için, fotosentetik elektron transport sistemi bitki dokularındaki reaktif oksijen türlerinin üretilebileceği büyük kaynaktır (Asada, 1994). Bitkilerde oksijen aktivasyonunun gerçekleşebileceği bu olaylar sıkı bir şekilde bağlantılı ve kontrol altında olmalarına rağmen, herhangi bir stres durumunda bu kontrol ve bağlantının bozulması sonucu reaktif oksijen türlerinin oluşumu gerçekleşebilir. Bir bitkinin hareketinin minimum olduğu ve çevresini kontrol edemediği düşünüldüğünde, bu durumun bitkilerdeki genel bir olay olması muhtemeldir.

ROS'ların toksikliğinin üstesinden gelmek için aerobik organizmalar hem enzimatik hem de enzimatik olmayan bileşenlerden oluşan antioksidant savunma sistemine sahiptirler. Stressiz koşullar altında antioksidant savunma sistemi reaktif oksijen ve serbest radikallere karşı yeterli korumayı sağlar. Radikal üretimi antioksidant savunma sistemini aşınca metabolizmada bozukluklar meydana gelir ve dokular hasara maruz kalırlar. Bu durum oksidatif stres olarak adlandırılır. Bitkilerde oksidatif strese sebep olan faktörlerin başında hava kirleticileri, yüksek oksijen basıncı, ağır metaller, radyasyon ve herbisitler sayılabilir.

Oksidatif strese karşı bitkileri daha toleranslı hale getirmek veya oksidatif stresin meydana getirdiği olumsuz etkileri minimuma indirebilmek için birtakım çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların bazılarında antioksidant enzimler veya maddeleri fazla miktarda ekspres eden transgenik bitkiler üretilmekte (Bowler vd., 1991; Creissen vd., 1994; Van Camp vd., 1994a), bazılarında ise büyümeyi düzenleyici maddeler gibi birtakım kimyasallar uygulanmaktadır (Mehlhorn, 1990; Chang, Kao, 1997).

Yapılan literatür çalışmalarında büyümeyi düzenleyici maddelerin oksidatif stres üzerine etkisiyle ilgili ayrıntılı çalışmalara rastlanılmamış ve söz konusu maddelerin muhtemel etkilerinin antioksidant sistemin bileşenleriyle bağlantılı olup olmadığı detaylı bir şekilde araştırılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda bazı büyümeyi düzenleyici maddelerin (putrescin, spermin, giberellik asit ve benziladenin) oksidatif strese karşı

bitkileri daha toleranslı hale getirip getirmediikleri araştırılacak ve bu maddelerin etki mekanizmalarının bitkilerdeki antioksidant sistemin bileşenleriyle ilişkili olup olmadığı tespit edilecektir. Bu amaçla çalışmamızda öncelikle bitkiler bazı büyümeyi düzenleyici maddelerle (putrescin, spermin, giberellik asit ve benziladenin) ön muameleye tabii tutulacak ve daha sonra paraquat herbisiti kullanılarak oksidatif stres teşvik edilecektir. Paraquat uygulandıktan sonra oksidatif stresin şiddetine bağlı olarak belirli zaman dilimlerinde bitkilerden alınan örnekler üzerinde antioksidant sistemde fonksiyonu olan bazı parametreler ve enzim aktivitelerindeki değişiklikler tayin edilecektir. Böylece oksidatif stresin olumsuz etkilerini gidermede söz konusu büyümeyi düzenleyici maddelerin katkısı araştırılacak ve hangi mekanizmalarla etki ettikleri hakkında bazı deliller elde edilmeye çalışılacaktır.

1.2. Reaktif Oksijen Türleri

Organizmalar için aşırı derecede toksik olan reaktif oksijen türlerinin üretimi, bütün canlı organizmalarda aerobik metabolizmanın kaçınılmaz bir sonucudur. Temel haldeki atmosferik oksijenin özellikleri diğer gaz elementlerinkinden farklıdır. Çünkü oksijen biradikaldır yani çiftleşmemiş iki elektron ihtiva eder. Bu özellik aktive olmaksızın organik moleküllerle oksijenin reaksiyona girmesini engeller. Ancak bu eşleşmemiş elektronların varlığından dolayı oksijen yüksek bir indirgenme potansiyeline sahip olan çok güçlü bir oksidanttır ve kolaylıkla başka radikallerle reaksiyona girebilir. Oksijendeki iki tane çiftleşmemiş elektronun paralel spinlere sahip olmalarından dolayı, oksijenin aktivasyonu için enerjiye ihtiyaç vardır. Moleküler oksijenin olağan olmayan bu elektron konfigürasyonu ya bir spin değişimiyle singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) ya da bir, iki veya üç elektronun ilavesiyle sırasıyla süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri ($\text{OH}^\cdot$) nin oluşumlarıyla sonuçlanır. Bu reaktif oksijen türlerinin en belirli etkileri *in vivo* makromoleküllerde irreversibl hasar oluşturmalarıdır (Larson, 1995). Normal koşullarda ROS'ların üretimi ve uzaklaştırılması arasında denge vardır (Foyer vd., 1994). Ancak, olumsuz çevre koşullarında bu denge bozulur ve ROS miktarının artması sonucu oksidatif stres meydana gelir (Farr, Kogoma, 1991; Noctor, Foyer, 1998). ROS oluşumunun sonuçları stresin yoğunluğuna ve hücredeki fizikokimyasal koşullara (antioksidant durum, redoks hali ve PH) bağlıdır. Genellikle stres altında üretilen ROS'ların lipid peroksidasyonu, enzim inaktivasyonu, proteinlerde çapraz bağlanmalar, fotosentezde

azalma ve DNA'da mutasyonlara sebep olan zararlı faktörler olduğu kabul edilir (Shewfelt, Purvis, 1995; Alscher vd., 1997).

Kloroplast, mitokondri ve plazma membranlarındaki elektron transportunun kaçınılmaz bir sonucu olarak moleküler oksijene elektronların aktarılmasıyla birlikte ROS'lar üretilir (Alscher vd., 1997). Karanlıkta büyüyen fideler ve kökler gibi fotosentetik olmayan dokularda mitokondri, fotosentetik dokularda ise, fotosentezin yüksek enerjili reaksiyonları ve zengin O₂ kaynağından dolayı kloroplastlar ROS'ların en muhtemel kaynağıdır (Puntarulo vd., 1991). Bu nedenle bitkiler fotosentetik hücre içi oksijen üretiminden dolayı oksidatif stresten etkilenirler (Rabinowitch, Fridovich, 1983). Özellikle fotosentetik hücreler hem oksijen ürettikleri hem de tükettikleri için oksidatif strese meyillidirler. Fotosentetik elektron transport sistemi, bitki dokularındaki reaktif oksijen türlerinin büyük kaynağıdır. Bu elektron transport sistemi singlet oksijen ve süperoksit üretme potansiyeline sahiptir (Foyer, Harbinson, 1994). Bilindiği gibi yüksek ışık yoğunluğu PS I'in aşırı indirgenmesine yol açar ve CO₂ fiksasyonu elektron transport sisteminin bu hızına erişemeyeceği için, NADP⁺ havuzu tamamen indirgenir. Bu durumda ortamda indirgeyecek NADP⁺ olmayınca PS I elektronlarını oksijene vererek ROS oluşumunu sağlar (Mehler reaksiyonu). Düşük sıcaklık ve düşük CO₂ kullanılabilirliği (kapalı stoma) gibi çevresel stres koşulları tarafından CO₂ fiksasyonu kısıtlandığı zaman, orta dereceli ışık yoğunluğunda bile PS I aşırı indirgenir ve ROS üretimi artar (Allen, 1995). Ayrıca soğuk, sıcaklık gibi çevresel stresler, ozon ve sülfür dioksit gibi kirleticiler ve UV radyasyonundaki artışlar CO₂ fiksasyonu ve NADP indirgenmesi arasındaki dengeyi bozarlar ve fotosentezle üretilen indirgeyici enerjinin NADP yerine O₂'ye aktarılmasını sağlarlar (Mehler, 1951; Anderson vd., 1995; Green, Fluhr, 1995). Bu durumda oluşan reaktif oksijen türleri hücresel makromoleküllerle direkt ya da indirekt olarak etkileşime girerek oksidatif stresi meydana getirebilir (Asada, Takahashi, 1987; Foyer vd., 1994).

Son yapılan çalışmalarda bitki-patojen etkileşimlerinde de H₂O₂'nin rol oynadığı ortaya konulmuştur (Mehdy, 1994; Levine vd., 1994). Örneğin, apoplastta H₂O₂ üretimindeki artış patojenlere karşı koruma sağlamıştır (Mehdy, 1994). Ayrıca patojenik mantarlara cevap olarak bitkilerde süperoksit üretildiği tespit edilmiştir (Doke vd., 1991). Görüleceği gibi bazı durumlarda ROS'ların yıkıcı gücü ve sinyal potansiyelleri etkili bir savunma için kullanılabilir. Bitkilerde biyolojik, fiziksel ve kimyasal streslere cevap olarak

süperoksit üreten reaksiyonların aktifleştirdiği ve bir sinyal gibi görev yaptığı düşünülmektedir (Doke vd., 1991).

1.2.1. Singlet O₂'nin Oluşumu

Singlet O₂ (¹O₂), oksijenin daha yüksek enerjili bir halidir. Bu form oksijendeki eşleşmiş iki elektron, aynı orbitalde veya farklı orbitallerde zıt spinler halinde bulunduklarında oluşur. Triplet oksijenin singlet oksijene dönüşmesi için ilave elektrona ihtiyaç yoktur ancak elektronlardan birinin spinini değiştirmesi için enerji gereklidir. Singlet oksijen çok çeşitli yollarla kimyasal veya fotokimyasal olarak üretilebilir ve dumanın bileşenlerinden biri olmasından dolayı atmosferik bir kirleticidir. Bu oksijen formunun kimyasal üretim yollarından birisi lipoksigenaz (LOX, EC 1.13.11.12) aktivitesiyle ilgilidir (Kanofsky, Axelrod, 1986). Bitkilerde ¹O₂'nin üretildiği en iyi bilinen yol fotokimyasal olup, fazla miktarda ışık enerjisi absorblayan klorofilden, oksijene enerji aktarılmasıyla alakalıdır. Yani elektron transport sistemindeki klorofil pigmentleri ¹O₂'nin başlıca kaynağıdır (Foyer vd., 1997). Fotosentezin ışık yakalayıcı sistemlerinde bulunan uyarılmış durumdaki singlet klorofil moleküllü absorbladığı enerjiyi, elektron transport sistemi, floresans veya termal dağıtım yoluyla kaybedemez veya kullanamazsa triplet klorofile dönüşür. Triplet klorofil, temel durumdaki oksijene enerjisini vererek ¹O₂'ni oluşturur ve normal haline geri döner (Foyer vd., 1994; Demming- Adams, Adams, 1996). Bu tip bir singlet oksijen oluşumu, kuraklık sonucunda stomaların kapanmasıyla, membran transport sistemlerinde hasar oluşmasıyla, spesifik besleyicilerin eksikliği ile, kirletici ve herbisit gibi ksenobiotik kimyasalların varlığında meydana gelebilir.

¹O₂ bir çok organik molekülle reaksiyona girdiği için yüksek oranda yıkıcıdır ve canlı organizmalarda hasar oluşturan başlıca oksijen türlerinden birisidir (Cadenas, 1989). Ayrıca singlet oksijen hidroperoksitleri ve endoperoksitleri oluşturmak için en ve dien'lerle birlikte reaksiyonlara girer ve serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatır (Foote, 1979; Krinsky, 1979). Bu oksijen türünün kimyasal reaksiyonlar için tercih ettiği hedefler, doymamış yağ asitleri veya DNA'daki guanin bazları gibi çifte bağlardır.

1.2.2. Süperoksit Üretimi

Süperoksit radikali (O_2^-), oksijene bir elektronun aktarılmasıyla oluşur. Bu reaksiyon enzimatik olarak çeşitli organellerde meydana gelebilir. Mikrobadilerdeki ksantin oksidaz, ürat oksidaz ve NADH oksidaz enzimleri, substratlarının oksidasyonu sırasında süperoksit üretirler. Ksantin oksidaz reaksiyonu süperoksitin bir üretim kaynağı olarak *in vitro* kullanılır ve ksantinin ürik asite dönüşümü boyunca 1 mol süperoksit üretilir (Fridovich, 1970). Plasma membranlarında da süperoksit üreten bir NAD(P)H oksidaz belirlenmiştir (Vionella, Macri, 1991). Bu flavoproteinler belirli kinonlar veya azotlu bileşiklerin redoks siklusuyla süperoksit üretebilirler. Köklerde, NAD(P)H oksidaz Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirger ve böylece onu transport edilebilir bir forma dönüştürür. Bu enzimin yukarıda belirtilen fonksiyonu bozulunca süperoksit üretmeye başlar (Çakmak, Marschner, 1988). Ayrıca enzimatik olmayan reaksiyonlarla süperoksit, kloroplast, mitokondri ve plazma membranındaki elektron transport sisteminin yeterince düşük redoks potansiyeline sahip bileşenleri ve ferrodoksin tarafından üretilir. Kloroplastlarda PS I ve PS II tarafından süperoksitin üretildiği kaydedilmiştir (Robinson, 1988). CO_2 kaynağı kısıtlı olduğu zaman PS I, NADP havuzunu tamamen indirger ve ortamda indirgeyecek başka NADP olmadığı için ihtiva ettiği elektronu moleküler oksijene vererek süperoksiti oluşturur (Asada, Takahashi, 1987). PS II reaksiyon merkezinde de suyun parçalanması sonucu açığa çıkan elektronların moleküler oksijeni indirgeme ihtimali olduğundan burada da süperoksit üretilmesi mümkündür. Ayrıca bazı herbisitler PS II yapısında bulunan D1 proteinine bağlanıp, elektron transportunu keserek süperoksit oluşumuna katkıda bulunabilirler. Fakat genellikle *in vivo* oksijen indirgenmesinin büyük bir çoğunluğu, indirgenmiş ferrodoksin yoluyla PS I'de meydana gelir (Furbank, Badger, 1983). Ayrıca mitokondrilerde de önemli miktarlarda süperoksit üretildiği rapor edilmiştir (Rich, Bonner, 1978). Süperoksitin yanısıra izole edilmiş mitokondrilerde, NADH varlığında H_2O_2 de üretildiği kaydedilmiştir (Loschen vd., 1973, 1974). Mitokondrilerde süperoksitin üretildiği iki bölge tespit edilmiştir (Leprince vd., 1994). Birincisi ETS'de elektronları en son oksijene aktaran sitokrom oksidaz kısmı, diğeri ise ubikinon A bölgesidir. Ubikinonun indirgenmesini artıran koşullar, ETS'de ubikinon A- sitokrom b bölgesinde oksijenin süperoksite indirgenmesini sağlarlar (Rich, Bonner, 1978). ETS'de bulunan Fe-S proteinlerinin çoğunluğu ve NADH dehidrogenaz enzimleri de süperoksit ve H_2O_2 üretme potansiyeline

sahiptirler (Turrens vd., 1982). Ayrıca endoplazmik retikulumda sitokrom P₄₅₀'nin de süperoksit üretimine katıldığı rapor edilmiştir (Winston, Cederbaum, 1983).

Süperoksit radikali oldukça reaktiftir ve lipidlerin yanısıra diğer biyokimyasal bileşenlerin de oksidasyonuna sebep olur. Bu radikalın lipid peroksidasyonu, membran hasarı, hücrel toksisite ve DNA'daki tek zincir kırıklarıyla ilişkisi olduğu belirtilmiştir (Fridovich, 1995). Süperoksitin biyolojik sistemlerde en etkili olduğu yapılar proteinlerin sülfidril grupları ve hücre membranındaki doymamış yağ asitleridir. Ayrıca süperoksit radikali, hidrojen peroksitle reaksiyona girerek çok daha toksik bir molekül olan hidroksil radikalini üretebilir. Haber- Weiss reaksiyonu olarak bilinen bu reaksiyon demir ve bakır gibi metallerin katalizörlüğünde oldukça hızlı gerçekleşir.

1.2.3. Hidrojen Peroksit

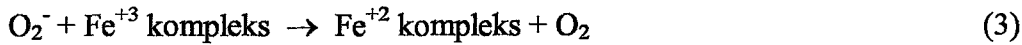
Oksijenin tek elektronla kademeli indirgenmesinde ikinci ürün peroksit anyonu olup (O_2^{-2}), daha ziyade kararlı bir hali olan hidrojen peroksit (H_2O_2) şeklinde bulunur. H_2O_2 esas olarak süperoksitin enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlarla yıkımı sırasında oluşur. Süperoksitin enzimatik olmayan yıkımı nötral ve hafifçe asidik PH'da kendiliğinden, enzimatik yıkımı ise süperoksit dismutaz (SOD) tarafından gerçekleştirilir. Ancak SOD tarafından katalizlenen reaksiyon diğerinden 10.000 kat daha hızlıdır (Bowler vd., 1992). Kısaca süperoksitin olduğu yerlerde önemli miktarlarda H_2O_2 'de üretilir. Bitkilerde H_2O_2 'nin üretildiği başka bir büyük kaynak, fotorespirasyonla glikolatin oksidasyonunun meydana geldiği peroksizomlardır. Glikolat oksidaz, glikolattan oksijene iki elektron transfer ederek H_2O_2 'yi üretir (Lindqvist vd., 1991). Ayrıca peroksit, biyokimyasal olarak oksijenin iki elektronlu indirgenmesinin gerçekleştiği solunum işlemleri sırasında ve genellikle flavoproteinlerle gerçekleştirilen reaksiyonlarla da oluşturulur. H_2O_2 , bitki hücrelerinde üretilen ROS'lar içerisinde en kararlı olan bileşiktir. Membranlardan kolaylıkla geçebilir ve böylece etki edeceği kısma aktarılabilir (Foyer vd., 1997). Ayrıca bu bileşik, DNA, proteinler ve doymamış yağlarda ciddi kimyasal değişikliklere neden olabilir. Diğer taraftan Calvin siklusu enzimlerini ve diğer enzimleri SH bağları oksidasyonu ile inhibe ederek hasarlar oluşturabilir (Kaiser, 1976). Hidrojen peroksit bir radikal olmadığı halde çeşitli radikallerin oluşumunda önemli bir rol oynar ve süperoksit ile reaksiyona girdiğinde serbest oksijen radikalleri içinde en yüksek derecede toksisiteye sahip olan hidroksil radikallerini oluşturur.

1.2.4. Hidroksil Radikali

Hidroksil serbest radikali ($\text{OH}^\cdot$) oksijen ara ürünlerinden en reaktif olanıdır ve bilinen en potansiyel oksidanttır. Bu oksijen radikal türünün hücrelerde mevcut olan tüm organik yapılara saldırabilme yeteneği vardır. Bu nedenle yüksek oranda yıkıcı ve mutajenik potansiyele sahiptir. Hidroksil radikali iyonlaştırıcı radyasyonun etkisiyle oluşturulabilir ve muhtemelen X-ışını ve gama ışınları ile hücrelerin ölmesine sebep olan en temel türlerden birisidir. Bu radikal kimyasal olarak süperoksit ve hidrojen peroksit arasındaki reaksiyonla da üretilebilir. Dolayısıyla süperoksit ve hidrojen peroksitin aynı anda üretildiği canlı sistemlerde hidroksil radikalının biyokimyasal oluşumu mümkündür (1).



Haber- Weiss reaksiyonu olarak adlandırılan bu reaksiyon demir veya bakır gibi metallerin katalizörlüğünde oldukça hızlı gerçekleşir. H_2O_2 'nin Fe^{+2} tuzlarıyla karışımı sonucu hidroksil radikali oluşur ve bu reaksiyon sonucu Fe^{+2} , Fe^{+3} 'e oksitlenir (Fenton reaksiyonu) (2). Oluşan Fe^{+3} , süperoksit radikaliyle yeniden Fe^{+2} 'ye indirgenir ve Fenton reaksiyonu yeniden gerçekleşir (3).



Hidroksil radikallerinin reaktivitesi oldukça yüksek ve yarılanma ömürleri çok kısadır. Canlı sistemlerde oluştukları anda yakınlarında bulunan herhangi bir biyolojik molekülle reaksiyona girebilirler (Baker, Orlandi, 1995). Proteinlerdeki sülfidril grupları ve doymamış yağ asitleri bu radikallerin etkisine maruz kaldıklarında çeşitli reaktiviteye sahip organik radikalleri oluşturabilirler.

1.2.5. ROS'ların Makromoleküllere Etkileri

ROS'lar lipid, protein, karbohidrat ve nükleik asitler gibi hücrelerin temel bileşenleri üzerinde etkili olurlar. ROS'lara en hassas moleküller membranların da yapısını oluşturan lipidlerdir. Özellikle çift bağların bulunduğu doymamış yağ asitlerini içeren lipidler ROS ile kolayca reaksiyona girer ve lipid peroksidasyonu meydana gelir. Membran yapısı ve fonksiyonu üzerinde ROS'ların etkilerinin en çok araştırılanlarından birisi lipid peroksidasyonudur. Bir dizi reaksiyonlar sonucu meydana gelen bu olay, ROS'un etkisiyle doymamış yağ asitinden (RH) bir H atomunun çıkarılmasıyla başlatılır ve bu reaksiyon sonucu organik bir radikal oluşur (4).



Oluşan organik radikal ($R^{\cdot}$) bir tane çiftleşmemiş elektrona sahiptir ve oksijenle reaksiyona girerek bir peroksil radikalinin oluşmasını sağlar (5).



Peroksil radikali ($ROO^{\cdot}$) kolaylıkla başka bir yağ asiti veya organik molekülden H ayırarak, ikinci bir karbon radikalinin oluşumuna yol açar (6) ve oluşan karbon radikali yeniden aynı reaksiyonların gerçekleşmesine olanak sağlar.



Ayrıca bu reaksiyon sonunda oluşan lipid hidroperoksitleri (ROOH), demir veya başka metallerin varlığında kararsız olup parçalandıklarında aldehit ve hidrokarbonları oluştururlar. Bu ürünler ya metabolize edilirler ya da hücrenin diğer bölümlerine difüzlenererek o bölgelerde de peroksidasyonun başlamasını sağlarlar. Böylece ROS'ların bütün hücreye bu olayı yayma yetenekleri vardır. Genellikle üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu malondialdehit oluşur. Malondialdehit membran bileşenlerinin çapraz bağlanmasına ve polimerleşmesine yol açtığından, membranlarda gerçekleşen iyon taşınması, elektron transferi ve enzim aktiviteleri gibi pek çok biyolojik fonksiyonun bozulmasına sebep olur. Ayrıca bu zincir reaksiyonları sırasında

oluşan ara ürünler radikal özelliği taşıdığından sadece membran lipidlerinin yapısını bozmakla kalmaz aynı zamanda membran proteinlerine saldırarak, onlar üzerinde de modifikasyonlara sebep olurlar. Lipid peroksidasyonunun başlamasına sebep olan ROS'lar, bir yangını başlatan kıvılcıma benzetilmektedir. Bu olay, besin maddelerinin bozulmasının yanı sıra kanser, iltihaplı hastalıklar ve yaşlanma gibi durumlara neden olabilen doku hasarından da sorumludur.

Hidroksil radikali ve singlet oksijenin doymamış yağ asitlerinin metil gruplarıyla reaksiyona girip, konjuge dienler, lipid peroksil radikalleri ve hidroperoksitleri oluşturdukları tespit edilmiştir (Smirnoff, 1995). Ayrıca süperoksitin yağ asitleriyle gliserol arasındaki ester bağlarına saldırarak serbest yağ asitlerinin oluşumunu sağladığı görülmüştür. Serbest yağ asitleri ise membranları bozucu deterjanlar olarak fonksiyon yaparlar.

Lipidlere nazaran proteinler ROS'un etkilerine karşı daha az hassastırlar. Özellikle proteinlerin polipeptid zincirlerinde bulunan aminoasitlerin yapısındaki doymamışlık derecesi ve kükürt atomlarının bulunması bu molekülleri radikallere karşı daha hassas yapar. Histidin, fenil alanin, tirozin ve triptofan gibi çift bağ içeren aminoasitler ile metiyonin ve sistein gibi yan zincirlerinde kükürt ihtiva eden aminoasitler radikallere karşı daha duyarlıdırlar. Bu aminoasitlere radikallerin etkisiyle karbon ve kükürt radikallerinin oluşma ihtimali yüksektir. Çok sayıda kükürt köprüsü içeren immunoglobulinler ve albumin gibi proteinlerin böyle bir etki sonucu tersiyer yapıları (üç boyutlu yapı) bozulur ve biyolojik aktiviteleri kaybolur. ROS'un önemli oranda etki ettiği bir başka protein sınıfı ise hem proteinleridir.

Proteinler üzerine oksidatif saldırı sonucu spesifik aminoasit modifikasyonları, peptid zincirin parçalanması, çapraz bağlı reaksiyon ürünlerinin agregasyonu, elektriksel yük değişimi ve proteinin proteolizise duyarlılığının artması meydana gelir. Süperoksit tarafından Fe-S merkezlerinin oksidasyonu sonucu proteinin enzimatik fonksiyonu kaybolur (Gardner, Fridovich, 1991). Proteinlerin oksidatif parçalanması demir gibi metal kofaktörlerin varlığında artar. Böyle bir durumda metal, protein üzerindeki bir divalent katyon bağlama bölgesine bağlanır ve daha sonra H_2O_2 ile etkileşime girerek, Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikalinin oluşumunu sağlar. Oluşan hidroksil radikali hızlı bir şekilde proteinin katyon bağlama bölgesi ve yakınındaki aminoasitleri oksitler (Stadtman, 1986). Neticede bir aminoasitin spesifik değişimi ve katyon bağlama bölgesinin bozulması sonucu enzim inaktif olur. Ayrıca spesifik bir aminoasitin oksidatif modifikasyonu,

proteinleri proteolizise karşı duyarlı yapar (Stadtman, 1986). *E. coli*'de oksitlenmiş proteinleri parçalayan spesifik proteazlar vardır (Farr, Kogoma, 1991) ve benzer bir spesifikliğin bitkilerde de olduğu düşünülmektedir. Nitekim, fotosistem II'nin çeşitli peptid bileşenlerinin, özellikle D1 proteininin yüksek oranda turnoveri görülmüş ve bunun protein üzerindeki spesifik bölgelere oksidatif saldırının olması sonucu meydana geldiği kabul edilmiştir (Barber, Andersson, 1992).

ROS'lar glikoz, mannitol ve bazı sakkarit türevleriyle de reaksiyon verebilirler. Monosakkaritlerin yükseltgenmesiyle oluşan peroksit türevleri, protein ve nükleik asitler gibi diğer makromoleküllerle etkileşerek, bu moleküller üzerinde çapraz bağlar oluşturur ve söz konusu moleküllerin yapılarını bozabilirler.

Ayrıca iyonize radyasyon gibi serbest oksijen radikalleri üreten ajanlar ve aktifleşmiş oksijen, DNA'da delesyonlara, mutasyonlara ve bazı öldürücü genetik etkilere sebep olabilir. DNA'daki hem şeker hem de baz kısımlarının oksidasyona duyarlı olduğu ve neticede baz parçalanması, tek zincir kırıkları ve proteinlere çapraz bağlanmaların meydana geldiği kaydedilmiştir (Imlay, Linn, 1986). Nükleik asitlerdeki tek zincir kırıklarının temel sebebi, hidroksil radikaliyle şeker kısmının oksidasyonudur. Ayrıca proteinlere DNA'nın çapraz bağlanmasının da hidroksil radikalının, DNA veya DNA ile bağlantılı proteinlere saldırısının sonucu olduğu ileri sürülmüştür (Oleinick vd., 1986). İyonize radyasyon ve başka hidroksil radikali üreten ajanlar, DNA ve protein arasında timin-sistein gibi kovalent bağların oluşumuna sebep olurlar. Böyle bir çapraz bağ oluştuğu zaman, DNA'dan proteinin ayrılması çabucak meydana gelmez ve tamir işleminden önce replikasyon ve transkripsiyon meydana gelirse bu durum ölümcül olabilir.

Görüleceği gibi ROS'lar hücre bileşenleriyle etkileşime girerek hasarlar oluşturmakta (Larson, 1995) ve bu hasarlar organizmalarda bir çok dejenere edici durum ve hastalığın oluşumuna sebep olmaktadır (Marx, 1985). Hücreler ROS miktarını kontrol etmek ve olumsuz etkilerinden korunmak için antioksidant savunma sistemine sahiptirler.

1.3. Antioksidant Sistem

ROS miktarını kontrol etmek ve stres koşullarında ROS etkisinden hücreleri korumak için, bitki dokuları ROS'u temizleyen bazı enzimler (süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidazlar) ve düşük moleküler ağırlıklı antioksidantlar (glutasyon, askorbat, tokoferoller, karotenoidler) ihtiva ederler. Ayrıca antioksidantların aktif formlarının

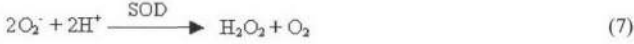
yeniden oluşumu için bazı enzimler (askorbat peroksidaz, dehidroaskorbat redüktaz, glutatyon redüktaz) gereklidir. Antioksidant terimi, zararlı bir forma dönüşmeksizin ROS'ları temizleyebilen bileşikler için kullanılmaktadır. Bitkilerden mayaya kadar, bütün aerobik organizmalarda oksidatif stresten hücrelerin korunması antioksidant sistemle alakalıdır. Antioksidant sistem, doğal ve yapay streslere karşı koruma sağlar. Oksidatif strese karşı türlerin farklı duyarlılık göstermeleri, antioksidant enzimler veya enzimatik olmayan antioksidantların seviyelerindeki farklılıklara bağlıdır. Bu farklılıklar yaş, tür ve gen ekspresyonundaki değişikliklerden kaynaklanır (Foyer vd., 1994). Ayrıca bitkinin antioksidant sistemini aktive edebilme hızı da önemlidir (Madamanchi, Alscher, 1991). Bitkiler apoplastik boşluk dahil bütün hücre alt yapılarında antioksidant sistem ihtiva ederler. Çünkü hücre ve hücre alt yapılarındaki hasarları önlemek için ROS'ların temizlenmesi gerekir (Bowler vd., 1992; Halliwell, Gutteridge, 1989). Süperoksit ve H_2O_2 enzimlerle temizlenirken, hidroksil radikali ve singlet O_2 'nin enzimlerle temizlenmesiyle ilgili bir kayda rastlanmamıştır. Bu ROS'ların yıkımı muhtemelen enzimatik olmayan temizleyiciler tarafından yerine getirilir.

1.3.1. Antioksidant Enzimler

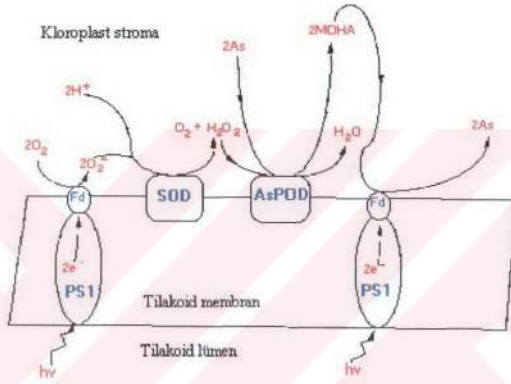
Antioksidant enzimler koordineli bir şekilde ROS'ları temizlerler veya onları daha az toksik olan bileşiklere metabolize ederler. Bu enzimlerin başlıcaları süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidazlar ve glutatyon redüktazdır.

1.3.1.1. Süperoksit Dismutaz

Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) ilk defa Mann ve Keilis (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. Bir metaloprotein olan SOD, süperoksit serbest radikalının hidrojen peroksit ve oksijene dönüşümünü katalizler (7).



Bu reaksiyon sonucu oluşan H_2O_2 , fotosentezin güçlü bir inhibitörüdür ve H_2O_2 'nin yıkımı kloroplast fonksiyonu için hayati bir öneme sahiptir. Kloroplastlardaki süperoksit ve H_2O_2 tilakoid membrana bağlı SOD ve askorbat peroksidaz (AsPOD) tarafından aşağıda belirtilen mekanizmayla temizlenebilir (Şekil 1).



Şekil 1: Tilakoid membranlardaki mehler- peroksidaz reaksiyon dizisi (PS I: Fotosistem I, Fd: Ferrodoksin, As: Askorbik asit, MDHA: Monodehidro askorbat)

SOD, süperoksiti uzaklaştırır ve böylece 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. Canlı organizmalar SOD ile süperoksiti parçalayarak bu radikalin oluşumundan kaçınırlar. SOD, bütün aerobik organizmalarda ve aktifleşmiş oksijen üreten bütün hücre alt yapılarında bulunduğu için oksidatif strese karşı savunmada merkezi bir rolünün olduğu düşünülmektedir (Bowler vd., 1992; Scandalios, 1993). Metal kofaktörlerine bağlı olarak üç farklı tip SOD izoenzimi vardır. Bunlar bakır/çinko (Cu/ZnSOD), mangan (MnSOD) ve demir (FeSOD) izoenzimleridir (Bannister

vd., 1987). SOD izoenzimleri KCN ve H_2O_2 'ye duyarlılıklarına bağılı olarak teşhis edilebilirler. MnSOD her iki inhibitöre dirençli, Cu/ZnSOD her iki inhibitöre duyarlı, FeSOD KCN'ye dirençli H_2O_2 'ye ise duyarlıdır. Bu izoenzimlerin hücre alt yapılarındaki dağılımı da farklıdır. MnSOD, prokaryotik organizmalar ve ökaryotik hücrelerin mitokondrisinde bulunurken, SOD'un en yaygın tipi olan Cu/ZnSOD izoenzimleri, yüksek bitkilerin hem sitoplazmasında hem de kloroplastlarında bulunur (Scandalios, 1993). FeSOD izoenzimleri, prokaryotik organizmalarda ve bazı bitki türlerinin kloroplastlarında Cu/Zn SOD'un yanısıra bulunabilir (Tsang vd., 1991; Bowler vd., 1992). SOD'un bütün formları nukleustan kodlanır ve bir amino uç hedef zinciriyle birlikte ayrı ayrı hücre altı bölümlerine hedeflenirler. Hücrelerde farklı bölgelerde bulunmaları ve farklı metal kofaktörleri ihtiva etmelerine rağmen bütün SOD'ların fonksiyonu aynıdır. SOD izoenzimlerinin her biri bağımsız olarak ayrı hücre altı bölümlerinde görülen oksidatif stresin derecesine göre düzenlenirler. Fakat bunun moleküler seviyede nasıl ifade edildiği bilinmemektedir. Bununla birlikte Bowler vd. (1992) söz konusu moleküler düzenlemenin oksidatif zarar gören bölgeden nukleusa yayılan, her bir organelin kendine has lipid peroksidasyon ürünleri tarafından düzenlendiğini ileri sürmüşler ve bu olayın sonucu olarak SOD genlerinin transkripsiyonunun arttığını kaydetmişlerdir.

SOD genlerinin artan ROS oluşumunun sonucu olarak çevresel streslere duyarlı olduğu gösterilmiştir (Bowler vd., 1992). 7 gün boyunca sel etkisine maruz bırakılan *Zea mays*'ın yapraklarında süperoksit ve H_2O_2 üretiminin önemli ölçüde arttığı görülmüştür (Yan vd., 1996). Sel etkisinin SOD aktivitesini azalttığından dolayı süperoksit birikiminin arttığı ileri sürülmüştür (Yan vd., 1996). Bununla beraber SOD aktivitesinin çeşitli ksenobiotik ve çevresel streslere cevap olarak arttığı ve bu artışların oksidatif strese dirençlilikle bağlantısı olduğu rapor edilmiştir (Foyer vd., 1994; Van Camp vd., 1994a). Bazı çalışmalarda ise tek başına SOD aktivitesindeki artışın oksidantlara karşı yeterli koruma sağlayamayacağı ve oksidatif stresi tek başına engelleyemeyeceği ifade edilmiştir (Tepperman, Dunsmuir, 1990; Pitcher vd., 1991). Nitekim, böcekler grubundan *Drosophila*'da katalaz ve Cu/Zn süperoksit dismutazın fazla ekspresyonunun yaşla alakalı oksidatif hasarı geciktirdiği ve *Drosophila*'daki hayat süresini uzattığı gösterilmiştir (Sohal vd., 1995).

1.3.1.2. Katalaz

Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6), hem ihtiva eden bir enzimdir ve H_2O_2 'nin su ve oksijene dönüşümünü katalizler. Aktif bölgesinde Fe^{+3} atomuyla birlikte hem ihtiva eden her biri 60 kDa moleküler ağırlığında 4 alt ünitelerden oluşur. Bütün aerobik ökaryotlarda bulunur ve özellikle aşağıda belirtilen reaksiyonla (8) peroksizomlarda üretilen H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasında önemlidir.



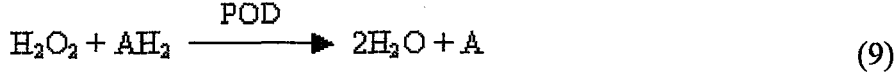
Katalaz kararlı bir enzim değildir. Yüksek ışık yoğunluğu ve stresli bitki hücrelerinde oluşan H_2O_2 'nin yüksek konsantrasyonlarıyla inhibe edilir (Feierabend vd., 1992; Streb vd., 1993). Siyanid, azid, süperoksit ve indirgenmiş glutatyon tarafından da katalaz aktivitesinin inhibe edildiği rapor edilmiştir (Paul, 1963; Kono, Fridovich, 1982). Ayrıca H_2O_2 'ye olan zayıf affinitesi (Scandalios vd., 1972) ve bitkilerde sadece peroksizomlarda bulunması (Asada, 1992; Scandalios, 1992) bu enzimin etkinliğini kısıtlamaktadır (Foyer vd., 1994). Katalazın kloroplastlarda bulunmadığı ve esas olarak fotorespirasyon sırasında oluşan H_2O_2 'nin yıkımı için gerekli olduğu vurgulanmıştır (Foyer vd., 1994).

1.3.1.3. Peroksidazlar

Peroksidazlar (POD, EC 1.11.1.17) bitkilerde yaygın olarak bulunan ve hem grubu ihtiva eden oksidaz grubu enzimlerdir. Bu enzim grubunun yüksek bitkilerdeki yapısı detaylı bir şekilde analiz edilmiştir. Bitki peroksidazları protein kısmına bağlanan ve enzimin kararlılığında etkisi olan oligosakkarit zincirlerinin varlığı ile karakterize edilen glikoproteinlerdir (Hu, Van Huystee, 1989). Stres altındaki bitkilerde peroksidaz aktivitesinin arttığı bilinmektedir (Guida vd., 1992; Asada, 1992).

Peroksidazların bir çok fizyolojik olayla ilişkisi olduğu ve metabolizmada aktif bir rol oynadığı belirlenmiştir. Örneğin, bitki hücrelerindeki çeperin uzama özelliği, lignin biyosentezi ve oksin katabolizması ile ilişkisi olduğu saptanmıştır (Hinman, Lang, 1965; Mader, Füssl, 1982). Bütün bu fonksiyonlarının yanı sıra peroksidazların en önemli özelliklerinden birisi H_2O_2 'yi yok ederek antioksidant savunma sistemine katkı

sağlamalarıdır. Peroksidazlar hidrojen vericisi olarak bir çok organik veya inorganik substratı (AH_2) kullanarak H_2O_2 'yi temizlerler (9) ve H vericisi olarak kullandıkları substrata göre isimlendirilirler.



H_2O_2 'yi parçalarken indirgenmiş glutatyonu (GSH) substrat olarak kullananlar, glutatyon peroksidazlar olarak adlandırılır. Bu enzim grubunun hayvanlardaki H_2O_2 'nin detoksifikasyonunda büyük bir role sahip olduğu, bitkilerde ise bu tip peroksidazların olup olmadığı henüz belirlenememiştir. Substrat olarak askorbatı kullanan askorbat peroksidazların, bitki hücrelerinin sitoplazma ve kloroplastlarındaki H_2O_2 'nin temizlenmesinde etkili oldukları düşünülmektedir (Dalton vd., 1987; Asada, 1992). Bu enzimin kloroplastlarda tilakoid membrana bağlı ve stromada bulunan formları vardır (Chen ve Asada, 1989; Miyake ve Asada, 1992). Bu formlar elektron verici olarak askorbat için spesifik olup, askorbatın yokluğunda aşırı derecede kararsızdırlar (Miyake, Asada, 1996). Sitoplazmada bulunan askorbat peroksidaz, kloroplastakine benzer ancak askorbat yokluğunda daha fazla kararlı olup askorbattan başka elektron vericilerini de kullanabilir (Dalton vd., 1987; Mittler, Zilinkas, 1991). Askorbat peroksidazlar yaygın şekilde çalışılan guaiacol peroksidazlara benzerler. Ancak H verici olarak askorbata olan yüksek spesifikliklerinden dolayı aralarında farklılıklar vardır (Nakano, Asada, 1987). Guaiacol peroksidazlar, guaiacola olan yüksek spesifikliklerine rağmen başka bir çok substratı elektron vericisi olarak kullanabilirler. Ayrıca askorbat peroksidazlar guaiacol peroksidazlar gibi glikoprotein değildirler (Creissen vd., 1994).

Peroksidazların bol miktarda substrat çeşiti ve izoform varlığından dolayı belirli bir hücresel yapı veya dokuyla ilgili izoformlarını belirlemek çok zor olmuştur. H_2O_2 membranlardan geçebildiği için, hücrede bulunan bütün H_2O_2 'yi temizleyen enzimlerin antioksidant savunma sisteminde önemli bir rol oynadığı düşünülür. Yüksek oranda reaktif olan hidroksil radikallerinin oluşumunu önlemek için süperoksit ve H_2O_2 'nin temizlenmesi gereklidir.

1.3.1.4. Glutasyon Redüktaz

Glutasyon redüktaz (GR, EC 1.6.4.2) elektron verici olarak NADPH'ı kullanan oksitlenmiş glutasyonun (GSSG), indirgenmesini (GSH) katalizleyen bir flavoprotein oksidoredüktazdır (Scruton vd., 1990; Creissen vd., 1994) (10).



GSH'nin antioksidant özelliğinden dolayı, glutasyon redüktaz hücrenin antioksidant kapasitesinin devamlılığında önemlidir (Meister, Anderson, 1983; Creissen vd., 1994). Ayrıca bu enzim, bakteri ve bitkilerde glutasyon seviyesinin düzenlenmesiyle de ilgili olup bunun nasıl başarıldığı henüz belirlenememiştir (Broadbent vd., 1995).

GR'nin hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunduğu belirlenmiştir (Creissen vd., 1994). İlk defa eritrositlerde ve mayalarda tespit edilmiştir (Meldrum, Tarr, 1935). En yoğun olarak çalışılan GR, insan eritrositlerindedir ve primer aminoasit dizisi de bilinmektedir (Creissen vd., 1994). Bununla beraber, enzimin yapısı ve özelliklerinin detaylı çalışması ilk defa çimlenmiş bezelyelerde yapılmıştır (Mapson, Isherwood, 1963). Glutasyon redüktaz hem gymnospermiler hem de angiospermilerin dahil olduğu birçok bitkide çalışılmıştır (Creissen vd., 1994).

GR'ler substratlarına karşı çok yüksek spesifiklik göstermelerine rağmen bazı glutasyon konjugatları ve karışık glutasyon disülfidlerini de indirgeyebilirler. Bu nedenle GR'nin *in vivo* GSSG'den başka substratlarla reaksiyona girmesi muhtemeldir. Bazı GR'ler NADPH'dan ziyade NADH'ı kullanarak GSSG'nin indirgenmesini katalizlerler. Yapraklardaki GR'ler köklere nazaran NADPH'a daha yüksek bir spesifiklik gösterirler. GR'lerin çoğunluğunun NADPH için yüksek bir affiniteye sahip olduğu, GSSG için ise GR'lerin affinitesinde önemli varyasyonlar olduğu kaydedilmiştir (Creissen vd., 1994).

Hayvanlarda tek bir GR formu bulunmasına karşın bitkilerde bu enzimin bir çok izoformu vardır. İki boyutlu jel elektroforeziyle, bezelyede 8 izoenzim olduğu belirlenmiştir (Edwards vd., 1990). Hayvan hücrelerindeki en yüksek GR aktivitesi sitoplazmada, bitkilerde ise kloroplastlarda bulunmuştur. Örneğin, Edwards vd. (1990), bezelye yapraklarında yaptıkları çalışmada GR aktivitesinin %77'sinin kloroplastlarda, %3'ünün mitokondride, % 20'sinin ise sitoplazmada bulunduğunu göstermişlerdir.

GR'nin diğer enzimlerle birlikte H_2O_2 'nin temizlenmesine katıldığı da belirlenmiştir. Hayvanlarda substrat olarak GSH'ı kullanan glutatyon peroksidazla birlikte GR, H_2O_2 'nin temizlenmesine katılır (Schirmer vd., 1989). Glutatyon peroksidaz H_2O_2 'yi temizlerken substrat olarak GSH'ı kullanır ve reaksiyon sonucu GSSG oluşur. Oluşan GSSG, GR enzimiyle tekrardan GSH'a indirgenir ve böylece glutatyon peroksidaz enziminin substratı yeniden oluşur. GR'nin benzer bir fonksiyonu bitkilerde de mevcuttur. Oksitlenmiş askorbik asiti (dehidroaskorbat) tekrardan askorbik asite indirgeyen dehidroaskorbat redüktaz enzimi de GSH'ı kullanmakta ve reaksiyon sonucu GSSG oluşmaktadır. Ayrıca GR enzimi GSSG'yi GSH'a indirgerken, NADPH'ı kullanmakta ve böylece CO_2 fiksasyonu azaldığı zamanlarda, NADPH/NADP⁺ oranının ayarlanmasına yardımcı olmaktadır. Bu nedenle GR tarafından GSSG'nin GSH'a indirgenmesi, oksidant temizlenmesinde büyük bir adım olarak kabul edilmekte (Creissen vd., 1996) ve oksidatif strese karşı korunmada GR'nin önemli bir enzim olduğu düşünülmektedir (Aono vd., 1995). Nitekim, yapılan çeşitli çalışmalarda oksidatif stres durumunda bu enzim aktivitesinin arttığı kaydedilmiştir (Mehlhorn vd., 1987; Pastori, Trippi, 1992; Edwards vd., 1994).

1.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidantlar

ROS temizlenmesine, yukarıda açıklanan enzimatik mekanizmaların yanısıra enzimatik olmayan antioksidantların da katkısı vardır.

1.3.2.1. Glutatyon

Glutatyon bütün canlı organizmalarda bulunan düşük moleküler ağırlıklı tiol ihtiva eden büyük bir bileşiktir. Yapraklarda milimolar konsantrasyonlarda bulunan genel bir indirgeyicidir (Rennenberg, Lamourex, 1990). Bir tripeptid olan glutatyonun (Glu- Cys- Gly) metabolizmada ve metabolizmanın düzenlenmesinde önemli rolü olduğu belirlenmiştir. Oksitlenmiş proteinlerin disülfid indirgeyicisi olarak rol oynadığı (Ziegler, 1985), biyotik ve abiyotik streslere cevapta gen ekspresyonunun düzenlenmesine katıldığı kaydedilmiştir (Dronn vd., 1988; Wingate vd., 1988). Glutatyonun özellikle lignin ve fitoaleksinin biyosenteziyle bağlantılı savunucu gen ürünlerinin miktarlarını yükselttiği

belirlenmiştir (Wingate vd., 1988). Glutatyonun bitki ve hayvan hücrelerinde gerekli olduğu ve bazı legümenlerin bir homolog tripeptid olan homoglutatyon (Glu-Cys-Ala) ihtiva ettikleri tespit edilmiştir (Klapheck, 1988).

GSH, bitki yapraklarının hem sitoplazması hem de kloroplastlarında enzimatik olarak sentezlenir (Meister, 1988; Hausladen, Alscher, 1993). GSH seviyesi doku yaşıyla birlikte azalır (Rennenberg, Lamourex; 1990) ve bitkinin büyüme çevresine göre değişir. Örneğin ışıklı ortamdaki bitkilerin glutatyon miktarı karanlıktakinden daha yüksektir. Ayrıca mevsimlere ve türlere göre de GSH içeriğinin değiştiği belirlenmiştir (Schupp vd., 1992). Hücre altı seviyede, GSH konsantrasyonunun en yüksek olduğu organel kloroplastlardır. Burada glutatyon miktarının, ortalama olarak 1 ve 4 mM arasında olduğu kaydedilmiştir (Law vd., 1983). Bununla beraber, sitoplazmada da önemli miktarda GSH'nin bulunduğu belirlenmiştir (Smith vd., 1985). Glutatyon daha çok indirgenmiş formda bulunur.

GSH birçok farklı yolla antioksidant rolünü gerçekleştirir ve GSH'nin antioksidant fonksiyonunda yapısında bulunan sisteinin sülfidril grubu etkilidir. Molekül oksitlendiği zaman sülfidril grubu ikinci bir GSH molekülüyle reaksiyona girer ve glutatyonun oksitlenmiş formu (GSSG) oluşur (Alscher, 1989). GSH, kimyasal olarak singlet oksijen, süperoksit, hidroksil radikalleri ile reaksiyona girer ve böylece direkt olarak serbest radikal temizleyicisi olarak görev yapar (Foyer vd., 1994; Creissen vd., 1996). Lipid peroksidasyon reaksiyonlarıyla oluşan açıl peroksitlerini uzaklaştırarak membran yapısını kararlı kılar (Price vd., 1990). Ayrıca GSH, dehidroaskorbat redüktaz enzimiyle askorbik asidi oksitlenmiş formdan indirgenmiş forma dönüştüren indirgeyici bir ajandır (Loewus, 1988) ve bitkilerdeki askorbik asit havuzunun redoks durumunun devamı için gerekli olduğu düşünülür (Alscher, 1989). Hücrelerdeki $\text{pH} > 7$ olduğunda GSH'nin 1 mM'dan daha yüksek konsantrasyonlarının enzimatik olmayan bir mekanizmayla dehidroaskorbatı askorbik asite indirgediği görülmüştür (Noctor, Foyer, 1998). Bu durum kloroplastlarda önemli bir yol olabilir. Nitekim ışıkta kloroplastların stroma pH'ı yaklaşık 8'dir ve GSH konsantrasyonu 5 mM'a kadar yükselebilir (Foyer, Halliwell, 1976). GSH -340 mV 'luk redoks potansiyeline sahiptir ve bu özellik GSH'nin hem dehidroaskorbatı hem de proteinlerdeki disülfid bağlarını indirgemesinde etkili olabilir (Ziegler, 1985). Bu nedenle GSH'nin miktarı oksidatif hasardan korunmada önemlidir. Nitekim dirençli olan bitkilerde duyarlı olanlara nazaran GSH miktarının arttığı belirlenmiştir (Gossett vd., 1994).

GSH'nin hücre metabolizmasında antioksidant özelliklerinden başka fonksiyonları da vardır. Bunlardan biri indirgenmiş sülfürün depo ve taşınma şekli olarak rol oynamasıdır

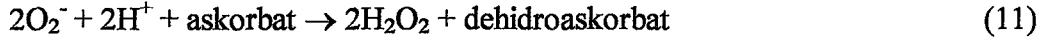
(May vd., 1998; Meister, Anderson, 1983). GSH'nın yapraklardan kök gibi depo organlarına indirgenmiş sülfürün aktarılmasında önemli bir rolü vardır (Rennenberg, 1982). GSH, aynı zamanda hayvan, bitki ve böcek dokularında bulunan glutatyon S- transferaz (GST, EC 2.5.1.18) enziminin substratı olarak ksenobiotiklerin (herbisitler ve gaz kirleticileri) detoksifikasyonuna katılır (Coleman vd., 1997). Ayrıca GSH'nın herbisitlerle kendiliğinden konjugasyona girmesi de muhtemeldir. Triazin herbisitlerine mısırın iyi bir tolerans göstermesine neden olarak, GSH'nın herbisitlerle olan konjugasyonu ileri sürülmüştür (Timmerman, 1989). GSH, bitkilerde toksik ağır metal iyonlarını şelasyonla uzaklaştıran ve vakuolde depolayan fitoşelatinlerin de öncü maddesidir (Rüegsegger vd., 1990; Grill vd., 1989). Önemli metabolik düzenleyici ve antioksidant rollerinin çoğunun sonucunda GSH, GSSG'ye oksitlenir. Bu aşamada GSSG'yi GSH'a dönüştüren GR enzimi fonksiyon yapar.

1.3.2.2. Askorbik Asit

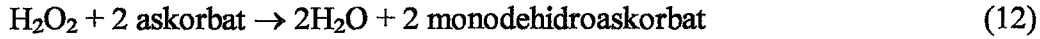
L- Askorbik asit (vitamin C) insan beslenmesinde önemli bir vitamin olup bitki dokularında bol miktarda bulunur. Yeşil yaprakların ihtiva ettiği klorofil miktarı ile askorbik asit miktarı arasında benzerlik vardır. Besleyici öneminden dolayı askorbatın bitkilerdeki dağılımı yaygın olarak ölçülmüş fakat bitkilerdeki fonksiyonunun ne olduğu konusuna nispeten az önem verilmiştir. 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 antioksidant rolünün olduğu bulunmuştur (Conklin, 2001). Süperoksit, singlet oksijen ve H_2O_2 'yi temizleme özelliği vardır (Padh, 1990). Bu nedenle askorbik asit oksidatif strese karşı korunmada önemli bir role sahiptir.

Hem bitki hem de hayvanlarda askorbatın çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlarla ROS'ları temizlediği belirlenmiştir (Nishikimi vd., 1978; Finckh, Kunert, 1985). 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. Hidroksil radikaliyle olan reaksiyonu yalnızca

difüzyonla sınırlandırılır. Süperoksitle olan reaksiyonunda fizyolojik olarak SOD'un rolüne benzer fonksiyonu vardır (11).



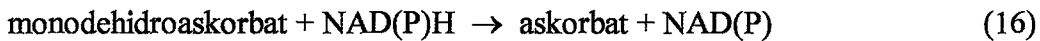
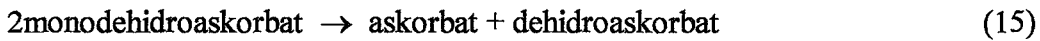
Hidrojen peroksitle olan reaksiyonu askorbat peroksidaz tarafından katalizlenebilir (Asada, 1992) (12,13).



Askorbatın antioksidant olarak indirekt rolü, α -tokoferol ve karotenoid gibi membrana bağlı antioksidantları indirgenmiş formuna dönüştürüp yenilemesidir (Packer vd., 1979; Liebler vd., 1986; Eskling vd., 1997). α -tokoferol, peroksil radikalleri ve singlet oksijeni temizleme özelliğine sahiptir, ancak bu sırada tokoferoksil radikaline dönüşür. Oluşan tokoferoksil radikal, askorbat tarafından tokoferole indirgenir (Beyer, 1994) (14).

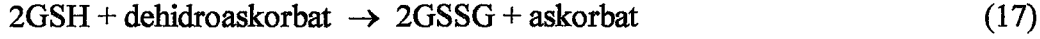


Görüleceği gibi bütün bu reaksiyonlar sonunda askorbat, monodehidroaskorbat ve dehidroaskorbata oksitlenir. ROS temizleme sisteminin fonksiyonunun devamı için askorbatın bu oksitlenmiş formlarının indirgenmesi gerekir. Monodehidroaskorbat (MDHA) ya kendiliğinden ya da NAD(P)H'ı indirgeyici ajan olarak kullanan monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR, EC 1.6.5.4) tarafından askorbata indirgenir (Hossain, Asada, 1984) (15, 16).

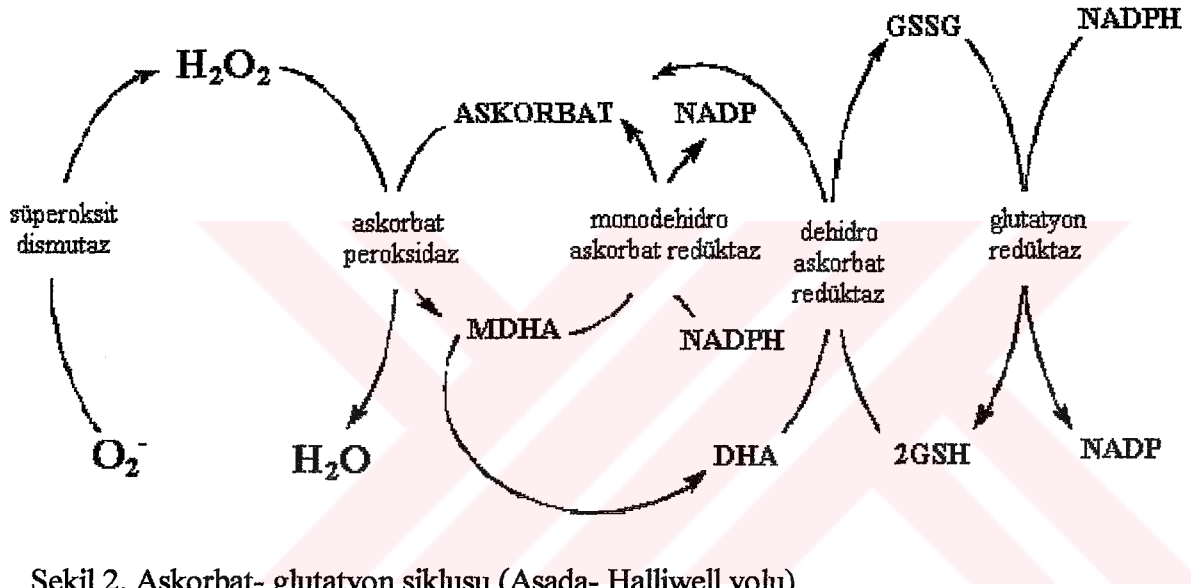


Dehidroaskorbat (DHA), 6'dan büyük pH'larda kararsızdır ve tartarat ile oksalata dönüşebilir. Bu dönüşümü önlemek için dehidroaskorbat, indirgeyici olarak glutatyonu kullanan (GSH) dehidroaskorbat redüktaz (DHAR, EC 1.8.5.1) tarafından askorbata

(Jablonski, Anderson, 1981) ve bu reaksiyon sonucu oluşan GSSG, GR tarafından tekrardan GSH'a indirgenir (Foyer, Halliwell, 1976) (17).



Bu reaksiyonların gerçekleşmesi için gerekli olan bütün enzimler kloroplastlarda bulunmakta olup bu enzimlerle oksitlenmiş askorbat ürünlerinden indirgenmiş askorbat üretilmektedir (Şekil 2).



Şekil 2. Askorbat- glutatyon siklusu (Asada- Halliwell yolu)

Askorbat- glutatyon siklusu veya Asada- Halliwell yolu olarak adlandırılan bu sistemin esas amacı, stromada indirgenmiş askorbatın yüksek seviyede kalmasını sağlamaktır. Böylece askorbat yokluğunda aşırı derecede kararsız olan askorbat peroksidaz enziminin de fonksiyonel olması sağlanır ve enzimatik olarak H_2O_2 temizlenebilir. H_2O_2 'nin askorbat ve indirgenmiş glutatyon (GSH) tarafından enzimatik olmayan reaksiyonlarla da temizlenebildiği ve bunun sonucunda askorbat ve glutatyonun oksitlenmiş formlarının seviyelerinin arttığı kaydedilmiştir (Foyer, Halliwell, 1976; Finckh, Kunert, 1985). Bu nedenle bu sistemin diğer önemli bir özelliği H_2O_2 inaktivasyonundan karbon fiksasyonu enzimlerini korumasıdır. H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasının yanı sıra, bu sistem $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ 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. Görüleceği gibi askorbat- glutatyon yolu enzimatik ve enzimatik olmayan bileşenlerini kullanarak ROS'ların toksikliğine karşı koyar. Bu sistemler oksijenin toksikliğinden bitkilerin korunması için gereklidir. Oksidatif stres altında bu sistemde görevli olan enzimlerin aktivitelerinin arttığı gösterilmiştir (Mishra vd., 1993; Edwards vd., 1994; Foyer vd., 1994). ROS oluşumunu teşvik eden herbisitlere dirençli olan bitkilerde, bu enzimlerden bir veya daha fazlasının seviyelerinin yükseldiği görülmüştür (Gressel, Galum, 1994). Yükselen aktivite artan oksidatif stres toleransı ile bağlantılıdır.

Fotosentetik bitki hücrelerinin ROS'ların üretildiği esas kısımlar oldukları düşünüldüğü için, askorbat- glutatyon yolunun kloroplastlarda esas olarak fonksiyonel olduğu ileri sürülmüştür (Asada, Takahashi, 1987). Daha önceki yıllarda bu sistemin sitoplazmada da bulunduğu belirlenmiştir (Foyer, Halliwell, 1976; Jablonski, Anderson, 1981). H_2O_2 membranlardan kolayca difüze olabildiğinden dolayı, SOD tarafından sitoplazmada üretilen ve fotorespirasyon boyunca peroksizomlardan difüze olan H_2O_2 'nin (Boveris vd., 1972) sitoplazmada askorbat- glutatyon yoluyla temizlenmesi, kloroplastlardaki fotosentez için etkili bir koruma sağlar.

Yukarıda da belirtildiği gibi askorbik asit esas fonksiyonunu antioksidant özelliğinin olmasıyla gösterir. Bununla beraber son zamanlarda yapılan çalışmalar askorbik asitin hücre bölünmesi ve genişlemesine katıldığını da göstermiştir (Conklin, 2001). Ayrıca hidroksiprolince zengin proteinlerin biyosentezinde kofaktör olarak rol oynadığı da belirtilmiştir. Bu proteinlerin hücre siklusunun ilerlemesi (G1'den S fazına) için gerekli olduğu ve hücre duvarının anahtar bileşenleri olduğu tespit edilmiştir (Conklin, 2001).

1.3.2.3. Tokoferol

Tokoferoller (özellikle α - tokoferol, vitamin E) membran kararlılaştırıcısı olarak yoğun şekilde memelilerde çalışılmış ve oksijen serbest radikalleri, lipid peroksil radikalleri ve singlet oksijeni temizleyen çok fonksiyonlu antioksidantlar oldukları kaydedilmiştir (Diplock vd., 1989). Doğal olarak bulunan 8 adet tokoferolden α - tokoferol, antioksidant olarak en aktif olanı ve doğada en yaygın olarak bulunanıdır. Antioksidant fonksiyonu yapısında bulunan benzokinon halkasındaki hidroksil grubu ve indirgenmiş fitil zinciriyle alakalıdır. Hidrofobik doğasından dolayı α -tokoferol, yalnızca hücre membranında

bulunur. Tokoferoller hücre membranlarında eşit olarak dağılmazlar. Daha çok doymamış yağ asitlerinin yoğun olduğu kısımlarda bulunurlar ve böylece lipid peroksidasyonuna karşı yağ asitlerini korurlar. Özellikle tokoferolün lipid peroksidasyonunda oluşan peroksil radikalleriyle reaksiyona girerek (18) organik radikal oluşturan zincir reaksiyonlarını sonlandırdığı görülmüştür (Kamal-Eldin, Appelquist, 1996; Kagan, 1989).



Bu reaksiyon sonucu oluşan tokoferoksil radikal kararlıdır ve yeni bir radikal reaksiyonu üretmez. Oluşan tokoferoksil radikal askorbik asit tarafından yeniden tokoferole indirgenir. Ayrıca tokoferol hidroksil radikaliyle direkt reaksiyona girebilen ve singlet oksijenin temizlenmesinde de etkili olan bir antioksidanttır (Fryer, 1992). Ancak singlet oksijenin temizlenmesinde karotenoidlerden daha az etkilidir.

1.3.2.4. Karotenoidler

Karotenoidler hem fotosentetik hem de fotosentetik olmayan bitki dokularının plastidlerinde bulunan C₄₀ izoprenoidler ve tetraterpenler olup, kloroplastlarda yardımcı pigment olarak rol oynarlar. Muhtemelen daha önemli rolleri aktifleşmiş oksijenin çeşitli formları ve ışık tarafından fotosentetik komplekslerin uyarılması sonucu üretilen triplet klorofili detoksifiye etmeleridir.

Karotenoidlerin en önemlileri karoten ve ksantofillerdir. Karotenler hidrokarbonlardır. Ksantofiller bir veya daha fazla oksijen atomu ihtiva eden karoten türevleridir. Karotenoidler plastidlerdeki isoprenoid yollarından geranilpirofosfattan sentezlenirler. Herbisitlerin bazıları (norflurazon, diflufenican, fluridon, flurtamon gibi) karotenoid biyosentezinin inhibisyonu ile fonksiyon yaparlar (Young, 1991).

Karotenoidler antioksidant özelliklerini fotosistemleri koruyan 4 yolla gösterirler. 1) Singlet oksijeni temizlerler ve enerjiyi ısı şeklinde dağıtırlar (Mathis, Kleo 1973). 2) Singlet oksijen oluşumunu önlemek için triplet veya uyarılmış klorofil molekülleriyle reaksiyona girerler (Zhang, Kirkham, 1996). 3) Ksantofil siklusu aracılığıyla fazla uyarılmış enerjiyi dağıtırlar. 4) Zincir reaksiyonlarını sonlandırmak için lipid peroksidasyon ürünleriyle reaksiyona girerler ve böylece lipid peroksidasyonundan

membranların korunmasına katkı sağlarlar (Burton, Ingold 1984). Ayrıca karotenoidler peroksil radikallerinin temizlenmesinde α -tokoferölü artırabilirler (Burton, Ingold 1984).

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 (Demming- Adams, Adams, 1993). Önemli bir karotenoid olan zeaksantin katıldığı ksantofil siklusu da ışık yakalayıcı kompleksten fazla enerjinin dağıtılmasında büyük bir role sahiptir (Demming-Adams, 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 ışıpta violaksantin zeaksantine dönüşümünü katalizler ve bir epoksidaz enzimi ise karanlıkta veya düşük ışıpta zıt reaksiyonu katalizler. Böylece zeaksantin fotosentetik kapasiteyi aşan ışık yoğunluklarında birikir. Ksantofil siklusunun özellikle PS II pigmentlerindeki fazla enerjinin dağıtılmasında etkili olduğu ileri sürülmüştür (Demming-Adams, Adams, 1996).

1.4. Oksidatif Strese Sebep Olan Faktörler

Bitkiler çevresel streslere maruz kaldıklarında reaktif oksijen türlerinin üretimi artar (Elstner vd., 1988; Foyer, Harbinson 1994). Çevresel faktörler üç şekilde oksidatif stresi artırabilirler: a) Direkt olarak serbest radikal üretimine katılabilirler. b) Antioksidant savunma sistemini inhibe ederler ve böylece indirekt olarak reaktif oksijen miktarını artırabilirler. c) Kloroplastların fazla enerjiyi dağıtmasıyla ilgili biyosentetik yolları bozarak ROS üretimine sebep olabilirler (Salin, 1988).

Bitki hücrelerinde direkt olarak ROS üretimini artıran faktörlerin başında kirlilik, metaller, ışığa duyarlı toksinler ve herbisitler gelmektedir.

1.4.1. Kirlilik

Ozon (O_3) ve kükürt dioksit (SO_2) gibi atmosferik kirleticiler serbest radikal oluşumuna katılırlar (Asada, 1980; Mehlhorn, 1990). Atmosferin üst tabakalarında doğal olarak bulunan ozon, otomobil egsozlarından çıkan azot dioksitlerin (diazot monooksit gibi) güneş ışığının etkisi ile parçalanması sonucu oluşur. Ozonun, stomalar yoluyla bitkiler tarafından alındığı ileri sürülmüştür (Heagle, 1989). Ozon büyük bir fitotoksikliğe sahiptir. Hızlıca suda çözünür ve ROS'ları oluşturur (Grimes vd., 1983; Kanofsky, Sima, 1991). Ozonun bitkilerde oluşturduğu hasarlar, bitki türüne, ozon konsantrasyonuna ve ozona maruz kalma süresine bağlı olarak değişir. Genel olarak bakıldığında, ozonun mezofil hücrelerini beyazlattığı, yapraklarda görülebilir leke ve nekrosisler oluşturduğu ve yüksek konsantrasyonlarda kısmi olarak stomaları kapattığı görülür (Aben vd., 1990). Ayrıca ozon, PS II D1 proteinini parçalar (Lutz vd., 1992) ve Rubisco'nun aktivitesi ve miktarını azaltır (Landry, Pell, 1993). Düşük ozon konsantrasyonlarına sürekli maruz kalan bitkilerde ise görülebilir yaprak hasarları oluşmaz ancak bitkilerin büyümeleri azalır (Heagle, 1989).

SO_2 'ye maruz kalan bitki dokularında hasar meydana gelir ve hem fotosentetik hem de fotosentetik olmayan dokulardan stres etileninin salındığı görülür (Peiser, Yang, 1985). Hücreler SO_2 'ye maruz bırakıldığı zaman, sitoplazmanın ve kloroplastın asidifikasyonu meydana gelir. Çünkü bu gaz sülfürik asidi oluşturmak için suyla reaksiyona girer (Laisk vd., 1988; Veljovic- Jovanovic vd., 1993). Bu durumda SH grubu ihtiva eden ışıktaki aktive olan enzimler inaktif edilir (Shimizaki, Sugahara, 1980; Tanaka vd., 1982) ve oksijen radikal üretimi için enerji akışı meydana gelir. Ayrıca ışık etkisiyle sülfid sülfata dönüştürüldüğü zaman süperoksit oluşumunun da meydana geldiği ileri sürülmüştür (Asada, 1980).

1.4.2. Metaller

Fitotoksik metallerin birikimi endüstri ve tarımsal uygulamalar sonucu meydana gelir. Bakır ve kadmiyum gibi metal iyonları oksidatif strese sebep olurlar. Bakır (Cu^{2+}) iyonlarının ışık varlığında lipid peroksidasyonuna ve pigment kaybına neden olduğu bulunmuştur (Rousos vd., 1986). $CuSO_4$ 'a uzun süre maruz bırakılan çavdarda klorofil ihtiva eden kısımların beyazlaştığı ve katalaz miktarının azaldığı görülmüştür (Streb vd.,

1993). Ayrıca Cu^{2+} iyonları redoks aktiftirler ve hidroksil radikali üreten Fenton tip reaksiyonlarını katalizlerler (Elstner vd., 1988). Lipid peroksitleri de Cu^{2+} varlığında lipoksigenazın indüksiyonundan oluşurlar. Bu enzimin lipid peroksidasyonunu başlattığı bilinir. Kadmiyum ise klorofili ve antioksidatif enzimlerden SOD ve CAT'ı inhibe eder (Somashekaraiah vd., 1992). Böyle bir inhibisyon enzimlerin sülfidril gruplarına sözkonusu metallerin bağlanmasından kaynaklanır ve bu durum metallerin fitotoksik etkilerini hızlandırır (Van Assche, Clijsters, 1980).

1.4.3. Işığa duyarlı toksinler

Bu toksinler bitkileri ışığa daha duyarlı yaparlar ve böylece bitkilerdeki fotooksidatif stresi teşvik ederler. Bu maddeler görülebilir ışığın dalga boylarına bitkileri duyarlı yaparlar ve fitotoksik reaksiyonlara sebep olurlar. Bu toksinlerin bir örneğini mantar toksini olan cercosporin oluşturur (Daub, Ehrenshaft, 1993). *Cercospora* fungusunda bulunan bu ışığa hassas madde mısır, şeker pancarı, tütün, kahve, soya fasulyesi ve muz dahil çok sayıda bitkide verim azalmalarına neden olur. Cercosporin genus içinde birçok tür tarafından üretilen kırmızı, perylenekinon ikincil bir metabolittir. Işığa aktive edildiği zaman singlet oksijeni oluşturmak için oksijenle reaksiyona girer (Daub, Hangartner, 1983). Lipid peroksidasyonuna sebep olan singlet oksijenin üretimini artırır. Sonuçta membran yapısı değişir ve iyon sızıntısı meydana gelir (Daub, Briggs, 1983).

1.4.4. Herbisitler

Herbisitler kültür bitkilerinin büyümesi boyunca çıkan yabancı otları yok etmek için kullanılan kimyasal maddelerdir. Tarımsal mücadele amaçlı kullanılan kimyasallar içerisinde herbisitler önemli bir yer tutmaktadır. Kültür bitkilerinde çeşitli etmenlerin (hastalık, hayvansal zararlılar gibi) meydana getirdiği kayıplar ele alındığında özellikle kurak geçen yıllarda yabancı otların etkisinin en yüksek seviyede olduğu gözlenmektedir. Dünyadaki üretim bazında hububat, meyve, sebze ve bağlarda yabancı otlara bağlı olarak gözlenen ürün kayıpları Tablo 1'de özetlenmiştir. Tablo'dan da görüldüğü gibi bu kayıplar toplam üretimle mukayese edildiğinde oldukça önemli boyutlara ulaşmaktadır. Yabancı otlarla tarımın ilk olarak başladığı neolitik çağdan itibaren mücadele edilmektedir. Yapılan

bu mücadelede başlıca amaç yabancı otların oluşturdıkları olumsuz etkileri ekonomik zarar seviyesinin altında tutmaktır.

Tablo 1. Dünya bazında yabancı ot ve hastalık etmenlerinin oluşturduğu kayıplar (milyon ton)(Özer, 1993)

Ürün Çeşiti	Elde Edilen Ürün	Yabancı Ot Kayıpları	Hastalık Kayıpları
Hububat	433.903	54.349	50.589
Sebze	201.691	23.718	31.137
Meyve	66.567	2.462	12.825
Bağ	50.697	7.909	16.937

Herbisitler genellikle bitkinin yaşamı için gerekli temel metabolik reaksiyonları etkilediklerinden bitkisel metabolizmanın seyrini anlamamıza yardımcı olmak için özel problemler olarak kullanılabilirler. Bu nedenle herbisitlerin etki mekanizmaları üzerindeki çalışmalar bitki fizyolojisi ve biyokimyasma önemli katkılar sağlamaktadır. Birçok tarım ürünleri üzerinde yaygın olarak kullanılan herbisitlerin çoğu, ROS üretilmesiyle etkilerini gösterirler. Bu herbisitler ya direkt olarak radikal üretimiyle ya da bazı biyosentetik reaksiyonların inhibisyonu ile reaktif oksijen türlerini üretirler. Bipiridilium (bipyridylum), difenil eter herbisitler, siklid imidler ve lutidin türevleri bunlardandır. Bitkilerin belirli herbisitlere toleransı bu kimyasallar tarafından üretilen serbest radikalleri temizleme yetenekleriyle alakalıdır.

1.4.4.1. Paraquat

Paraquat seçici olmayan bir bipiridilium (viologen) herbisitidir. Bu herbisite hızlı cevap için hem ışık hem de klorofil gereklidir. Bu nedenle ilk araştırmacılar bu herbisitin fotosentez üzerinde etkili olduğunu düşünmüşlerdir. Karanlıkta ve etiol fidelerdeki septomlar daha yavaş görülür. Mees (1960) adlı araştırmacı ilk defa paraquatın elektron transport zincirinde H_2O_2 'nin oluşumuna sebep olduğunu ileri sürmüştür. Bu fikir, Hill reaksiyonunun bir inhibitörü olan monuronun fitotoksik septomları yavaşlattığı gözlemlerine dayandırılmıştır. Daha sonra Calderbank (1968) hidroksil radikalının bu

reaksiyonlar sonucu üretildiğini kaydetmiştir. Farrington vd., (1973) ise bu reaksiyonların süperoksitle ilişkili olduğunu rapor etmiştir.

Paraquat, -446 mV'luk çok yüksek redoks potansiyeline sahip bir bileşiktir. Bu özellik bir serbest radikal üreticisi olarak paraquatı reaktif yapmaktadır. Yeterli enerjiyle birlikte indirgeyici bir ajan, bipiridilium divalent katyonu olan paraquat⁺²'a bir elektron vererek paraquat⁺¹ serbest radikalini oluşturur. Paraquat⁺¹ radikali tekrar eski haline dönebilmek için oksijene bir elektron verir ve süperoksit radikalini oluşturur (Halliwell, Gutteridge, 1989). Daha sonra süperoksit, hidrojen peroksit ve toksik hidroksil radikallerini üretir (Halliwell, 1984). Ayrıca paraquat radikalinin Fenton reaksiyonuna benzer bir reaksiyonla H₂O₂'yi direkt olarak indirgeyebildiği ve böylece hidroksil radikalini ürettiği ileri sürülmüştür (Winterbourne, 1981). Paraquat⁺² iyonu başka bir siklus için tekrar hazırdır ve böylece herbisit fotosentezi bertaraf ederek O₂'ye elektronları transfer eden ve ROS üreten bir yol oluşturur. Yapraklarda paraquatı indirgeyebilecek yeterli enerjiye sahip olan büyük indirgeyici ajan PS I'deki birincil elektron akseptörü olan ferrodoksindir. Diğer bazı indirgeyici ajanlarda bu indirgenmede etkili olabilir. Paraquat, PS I tarafından üretilen elektronların büyük çoğunluğunu alır. Bu bileşik NADPH için rekabet ettiğinden dolayı fotosentetik elektron transportunda bir düşüşe sebep olur. Ayrıca H₂O₂ birikimi sonucu kloroplast zarı zarar görür ve daha sonra plazma membranının da hasar görmesi sonucu hücre içi ve dışına maddelerin geçişi kontrolsüz gerçekleşir.

Paraquata dirençlilik herbisitinin uzun süreli kullanımından sonra bazı yabancı ot türlerinde (Fuerst, Vaughn, 1990), ıslah ve seleksiyondan sonra *Lolium perenne*'de (Harper, Harvey, 1978), genetik olarak üretilmiş bitkilerde, hayvan hücreleri ve mikropalarda görülmüştür (Gruber vd., 1990; Kelner, Bagnel, 1990; Bowler vd., 1991). *Conyza baraciensis* biotiplerinde (Shaaltiel, Gressel, 1986) ve çok yıllık delice otu *Lolium perenne*'de (Harper, Harvey, 1978) dirençliliğin süperoksit dismutaz ve başka serbest radikal temizleyici enzimlerin aktivitelerinin artmasıyla bağlantılı olabileceği bulunmuştur. Bununla beraber başka dirençli bitkilerde, herbisitinin kloroplastta etkili olduğu bölgeye translokasyonunun azalması söz konusudur (Preston vd., 1992). Bazı bitkilerde ise süperoksit dismutaz aktivitesiyle dirençlilik arasında bağlantı gözlenmemiştir (Vaugh, Fuerst, 1985). Bitkilerin paraquata toleransının bitki gelişimiyle ilgili olabileceği hakkında bazı deliller elde edilmiştir. Örneğin, kışlık buğdayda kesilmiş yapraklar, mezofil protoplastları ve fidelerin, 2 °C'ye fidenin alışmasından sonra paraquata olan toleransları artmıştır (Kendall, McKersie, 1989; Bridger vd., 1994). Bu durumun lipid

peroksidasyonu ile ilgili zararlı zincir reaksiyonlarını azaltan lipidde çözünebilir antioksidantların artan miktarlarıyla bağlantılı olabileceği ileri sürülmüştür (Kendall, McKersie, 1989).

1.4.4.2. Işığa duyarlı herbisitler

Difenil eterler, siklik imidler ve lutidin türevleri bu gruba giren peroksitleyici herbisitlerdir. Bu bileşikler membran lipidlerinin peroksidasyonu ve genel hücre oksidasyonuna sebep olurlar. Bu herbisitlerin etki modu özellikle protoporfirin IX gibi ışığa duyarlı tetrapollerin anormal birikimini teşvik etmeleridir (Witkowski, Halling, 1989). Tetrapoller ışığa bağlı singlet oksijen üretimine sebep olurlar. Bu herbisitler protoporfirinojen oksidaz (protox, EC 1.3.3.4) enzimini de inhibe ederler (Matrinage vd., 1989; Witkowski, Halling, 1989). Protox enzimi hem ve klorofil biyosentezinin sondan bir önceki adımında protoporfirinojenin, protoporfirin IX'a oksidasyonunu katalizler. Bu enzimin inhibe olduğu koşullarda reaksiyon ürünü protoporfirin IX anormal düzeyde birikir. Protoporfirin IX, ışığa duyarlı olduğu için ROS'ların üretimine neden olur.

Diuron gibi fotosentetik elektron transportunu bloklayan herbisitler ve norflurazon gibi karotenoid biyosentezinin inhibitörleri, singlet oksijenin üretilmesiyle fotooksidatif prosesleri başlatırlar. Karotenoid biyosentezini inhibe edenler triplet klorofil ve singlet oksijenin önemli temizleyicilerini yok ederler.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Bitkilerin Büyütülmesi

Trabzon Tarım İl Müdürlüğünden temin edilen mısır (*Zea mays* cv. RX 947) tohumları bir gece saf suda bekletildikten sonra eşit büyüklükteki saksılara dikildi ve 25 °C'de % 80 nispi neme ayarlı bir iklim dolabında (Sanyo) çimlendirmeye bırakıldı. Tohumlar çimlendikten sonra, iklim dolabının ışık yoğunluğu 250 $\mu\text{E}/\text{m}^2$, nemi % 80, sıcaklığı 25 °C ve ışık periyodu 16 saat ışık/ 8 saat karanlığa ayarlandı. Yaklaşık 7 gün sonra standart boya ulaşan sağlıklı mısır fidelerine dört gün boyunca büyüme düzenleyici madde (BDM) uygulamaları yapıldı. Dördüncü günün sonunda ise fidelere herbisit uygulandı.

2.2. Büyüme Düzenleyici Madde ve Herbisit Uygulamaları

Spermin (SPM) ile putrescin (PUT)'in 0,2 ve 1 mM'lık, benzil adenin (BA) ile giberellik asit (GA_3)'in 1, 10 ve 100 μM 'lık çözeltileri hazırlandı. BDM'lerin yaprak yüzeyine iyice nüfuz etmesini sağlamak amacıyla her bir çözeltiliye % 0,05 oranında Tween 20 ilave edildi. Daha sonra BDM çözeltileri, fidelerin yapraklarının alt ve üst yüzeylerine bir atomizer yardımıyla püskürtme tekniği kullanılarak uygulandı. Kontrol bitkilerinin yapraklarına ise % 0,05 oranında Tween 20 ihtiva eden saf su püskürtüldü. BDM uygulamaları dört gün boyunca günde bir kez yapıldı. Dördüncü günün sonunda bitkilere paraquat (PQ) herbisiti uygulandı. PQ, % 0,05'lik Tween 20'de çözülerek 100 μM konsantrasyonunda hazırlandı ve BDM uygulamalarında olduğu gibi bir atomizerle beraber bitkilere püskürtüldü. PQ uygulandıktan 8, 12 ve 24 saat sonra mısır fidelerinin yapraklarından alınan yaş örneklerde nispi su içeriği, klorofil, karotenoid, askorbik asit, protein, enzim ve hormon analizleri yapıldı. PQ çok kısa sürede fidelere etkilediğinden saat periyotları seçildi. Gün olarak yapılan denemelerde fidelere canlılıklarının kaybolduğu görüldü.

2.3. Nispi Su İçeriği Tayini (RWC)

Nispi su içeriği tayini Ekanayake vd. (1993)'e göre yapıldı. Yaprakların taze ağırlıkları tartıldıktan sonra, + 4  C'de 19 saat suda bekletilerek turgid ağırlıkları alındı. Daha sonra yapraklar 80  C'ye ayarlı etüvde 48 saat tutularak kuru ağırlıkları kaydedildi. Elde edilen değerler aşağıdaki formülde yerine koyularak nispi su içerikleri belirlendi.

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

2.4. Klorofil ve Karotenoid Tayini

Klorofil ve karotenoid tayini için 0,1 g yaprak 5 ml % 80'lik asetonda homojenize edildi. Homojenat 3000 rpm'de 5 dk. santrifj edildi ve süpernatantın optik yoğunluğu spektrofotometreyle 663, 645 ve 450 nm'de okundu. Toplam klorofil Arnon (1949)'a, karotenoid miktarı ise Jaspars (1965)'a göre aşağıdaki formüllerle belirlendi.

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

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

2.5. Askorbik Asit Tayini

Askorbik asit tayini, Shieh ve Sweet (1979) tarafından geliştirilen metoda göre yapıldı. Bu metod bakır (II)-2,2'- biquinolin solusyonu ($\text{Cu}(\text{biq})^{2+}$) ile askorbik asit arasındaki redoks reaksiyonuna dayanmaktadır. Bu reaksiyon sonucunda oluşan pembe-gl kuruşu renk 540 nm'de ölçülmektedir.

Bu yöntemle askorbik asit tayini için öncelikle standart askorbik asit çözeltisi hazırlandı. Sırasıyla 10, 20, 40, 80 ve 100  g askorbik asit itiva eden tüplere fosfat – sitrik asit tamponu (0,01 M, pH 3) konuldu ve daha sonra toplam hacim 3 ml olacak şekilde her bir tüpe $\text{Cu}(\text{biq})^{2+}$ çözeltisi (2,4 ml) ilave edildi. ($\text{Cu}(\text{biq})^{2+}$ çözeltisi, 5 ml CuCl_2 zeltisi ile 15 ml 2,2'-biquinolin çözeltisi karıştırılarak 20 ml olacak şekilde taze olarak hazırlandı). Hazırlanan tüpler vorteksle karıştırılarak 540 nm'deki absorbansları belirlendi. Grafiğin yatay eksenine  g askorbik asit, dikey eksenine de absorbanslar yazılarak standart grafik çizildi.

Yapraklardaki askorbik asit tayini için 2 g yaprak 5 katı hacimdeki fosfat- sitrik asit tamponunda homojenize edildi. Homojenat iki katlı tülbent bezinden süzöldükten sonra elde edilen süzöntü 5000 rpm'de 5 dk. santriföj edildi. Süpernatant kısmından 0,1 ml alınarak, 0,5 ml fosfat- sitrik asit tamponu ile 2,4 ml taze hazırlanmış $\text{Cu}(\text{biq})^{2+}$ çözeltisi konulmuş tüpe ilave edildi. Köör olarak 0,6 ml fosfat sitrik asit tamponu ve 2,4 ml $\text{Cu}(\text{biq})^{2+}$ çözeltisi ihtiva eden tüp kullanıldı ve 540 nm'de spektrofotometrede ölçüm yapıldı. Elde edilen absorbands değörlerine karşılık gelen askorbik asit miktarları standart grafik yardımıyla hesaplanarak mg askorbik asit/ g kuru ağırlık olarak ifade edildi.

2.6. Proteinlerin Analizi

2.6.1. Çözünebilir Protein Tayini

Çözünebilir 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 absorbands göstermesi esasına dayanır. Bu yöntemin diğör protein yöntemlerinden üstün tarafı çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin pek söz konusu olmaması, protein boya kompleksinin çözeltiilerde uzun süre kalmasıdır. Ayrıca proteine boyanın bağlanması çok hızlı gerçekleşir (ortalama 2 dak). Bu yöntemin hassasiyeti 1- 100 µg arasındadır.

Protein tayini için şu işlem takip edildi: 100 ml'sinde 0,01 g protein ihtiva eden standart BSA (bovin serum albumin) çözeltisinden tüplere 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6 ml alınarak 0,05 M fosfat tamponu (pH 6) ile tüm tüplerin hacimleri 2 ml'ye tamamlandı. 1,5 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi her bir tüpe ilave edilerek tüpler vorteks ile karıştırıldı. Spektrofotometre 2 ml 0,05 M fosfat tamponu ve 1,5 ml boyadan oluşan çözelti (köör) ile kalibre edildi ve standart BSA ihtiva eden tüplerin absorbandsları 595 nm'de kööre karşı 2 ile 60 dk. arasında okundu. Elde edilen absorbands değörlerine karşılık gelen µg protein değörleri ile standart grafik hazırlandı.

Mısır yapraklarındaki çözünebilir protein tayini için hazırlanan enzim ekstraktından 0,3 ml alınarak üzerine 1,7 ml fosfat tamponu ve 1,5 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi ilave edilerek vortekste karıştırıldı. 2 ile 60 dk. arasında 595 nm'de absorbandsları

ölçüldü. Dört ölçümün ortalama absorbansına karşılık gelen protein miktarları standart grafik yardımıyla hesaplanarak mg protein / g kuru ağırlık olarak ifade edildi.

2.6.2. Proteinlerin SDS- Poliakrilamid Jel Elektroföresi (SDS-PAGE)

Miktarları belirlenmiş yaprak numunelerinden elde edilen ve -30°C 'de saklanan enzim ekstraktları ile standart protein özütünden uygun miktarda (25 μg) alındı. Bu özütlere iki katı kadar muamele tamponu (1 M Tris-HCl pH 6,8; % 4 SDS, % 20 gliserol, % 6 β -merkaptoetanol) ilave edildikten sonra numuneler 90°C 'de 4 dk. bekletildi ve Laemmli (1970) tarafından tanımlanan % 12'lik sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jeline yüklendi. Yığma jeli için % 5'lik, ayırma jeli için % 12'lik akrilamid kullanıldı. Yığma jelinin hazırlanması için 3,4 ml saf su, 0,83 ml % 30'luk akrilamid, 0,63 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,05 ml % 10'luk SDS, 0,05 ml taze hazırlanmış % 10'luk amonyum persülfat ve 0,005 ml TEMED (N, N, N, N-tetrametil etilen diamin) ilave edilerek karıştırıldı. Ayırma jeli için ise 6,6 ml saf su, 8 ml %30'luk akrilamid, 5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,2 ml %10'luk SDS, 0,2 ml % 10'luk taze hazırlanmış amonyum persülfat ve 0,008 ml TEMED kullanıldı.

Elektroföres işlemi için elektroföres camları önce su sonra etil alkol ile yıkandıktan sonra etüvde kurutuldu. Cam plaklar arası 0,75 mm olacak şekilde kısıkaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına yerleştirildi. Taze olarak hazırlanan % 12'lik ayırma jeli enjektör yardımıyla cam plaklar arasına yaklaşık 10 cm oluncaya kadar dolduruldu. Jel yüzeyinin düzgün olmasını sağlamak için saf su ile ince bir tabaka oluşturuldu. Yaklaşık 30 dk. sonra jelin polimerizasyonunu takiben jelin üzerindeki saf su boşatıldı ve % 5'lik yığma jeli plakların arası tamamen doluncaya kadar ilave edildi. Yığma jeli polimerleşmeden önce içersine 0,75 mm'lik 20 dişli tarak dikkatlice yerleştirildi. Yaklaşık 30 dakikalık polimerizasyon süresinin sonunda tarak dikkatlice çıkarıldı ve jelde oluşan oyuklar saf su ve yürütme tamponu ile yıkanarak, plaklar arasındaki jel elektroföres tankına yerleştirildi. Tankın alt ve üst kısmı yürütme tamponu (1000 ml için 14,4 g glisin, 3 g trizma base ve % 10'luk SDS) ile dolduruldu. Numuneler Hamilton marka bir enjektör ile jele yüklendi ve yığma jelini geçinceye kadar 15 mA, ayırma jeline ise 20 mA akımda 3-4 saat boyunca yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel, dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve Coomassie Brilliant Blue (% 0,125 g Coomassie Brilliant Blue R-250, % 50 metanol, %

10 asetik asit) boyası ile 4-8 saat boyandı. Boyadan çıkarılan jel yıkama I (% 50 metanol, % 10 asetik asit) solusyonunda 1 saat kadar tutuldu ve yıkama II (% 7 asetik asit, % 5 metanol) solusyonuna aktarıldı. Daha sonra jelin görüntüsü bilgisayarda çıkarıldı.

2.7. SOD Aktivitesi Tayini

2.7.1. Enzim Ekstraktının Hazırlanması

Mısır yaprakları sıvı azotta toz haline getirildikten sonra 1 g alınarak 10 ml soğuk ekstraksiyon tamponunda (50 mM fosfat tamponu pH 7, 1 mM EDTA, %0,05 Triton, %2 polyvinylpolypyrrolidone ve 1 mM askorbik asit) buz üzerinde homojenize edildi. Homojenat iki katlı tül bent bezinden süzöldükten sonra soğutmalı santrifüjde 20 000Xg'de 20 dk. santrifüj edildi. Süpernatantın bir kısmı çözünabilir protein miktarının belirlenmesi için alındı. Geri kalan kısmı ise enzim denemeleri için kullanıldı.

2.7.2. Enzim Aktivitesinin Tayini

SOD aktivitesi Beauchamp ve Fridovich (1971) 'in metodunun Dhindsa ve Matowe (1981) tarafından geliştirilen yöntemine göre ölçöldü. Bu metotta nitro blue tetrazolium (NBT) bir indikatör molekül olarak kullanıldı ve süperoksit radikalleri ile NBT'nin mavi bir formazona indirgenmesi reaksiyonunun SOD tarafından engellenmesi ölçöldü.

Aktivite tayin için 50 mM fosfat tamponu (pH 7,8), 0,1 mM EDTA, 13 mM Methionin, 75 µM NBT ve 2 µM ribofilavin ihtiva eden karışıma 50 µl enzim ekstraktı ilave edildi. Ribofilavin en son konuldu ve reaksiyon, tüplerin floresans lamba altına yerleştirilmesiyle başlatıldı. 10 dakika sonra ışık kaynağının uzaklaştırılmasıyla reaksiyon sonlandırıldı. Reaksiyon ürünü 560 nm'de ölçöldü ve SOD aktivitesi NBT indirgenmesinin % inhibisyonu olarak ifade edildi.

2.7.3. Poliakrilamid Jel Elektroföresi ile SOD İzoenzimlerinin Belirlenmesi

Enzim kaynağı olarak – 30 °C'de dondurularak saklanan SOD enzim ekstraktı kullanıldı. Beauchamp ve Fridovich (1971) tarafından tanımlanan poliakrilamid jel

elektroforezi ile SOD izoenzimleri belirlendi. Yığma jeli için % 5'lik, ayırma jeli için % 8'lik akrilamid çözeltisi hazırlandı. Yığma jelinin hazırlanması için 3,4 ml saf su, 0,83 ml % 30'luk akrilamid, 0,63 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,05 ml taze hazırlanmış % 10'luk amonyum persülfat ve 0,005 ml TEMED; ayırma jeli için ise 9,3 ml saf su, 5,3 ml % 30'luk akrilamid, 5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,2 ml taze hazırlanmış % 10'luk amonyum persülfat ve 0,012 ml TEMED kullanıldı. SOD izoenzimlerinin poliakrilamid jelinde yürütülmesi proteinlerde olduğu gibi gerçekleştirildi. Ancak elektroforez işleminin yapıldığı ortamın sıcaklığı +4 °C olarak ayarlandı. Jel dikkatli bir şekilde çıkarıldıktan sonra 0,24 mM NBT (nitro blue tetrazolium), 33,2 µM riboflavin, % 0,2 TEMED ve 1 mM EDTA (etilen diamin tetraasetik asit) ihtiva eden 0,05 M potasyum fosfat tamponunda (pH 7,8), 37 °C'ye ayarlı etüvde karanlıkta 30 dk. inkübe edildi. Daha sonra jel, 1 mM EDTA ihtiva eden 0,05 M potasyum fosfat tamponuna (pH 7,8) alındı ve ışıklı bir ortamda izoenzimlerin görülmesi için 10- 30 dk. bekletildi. İzoenzimler belirlendikten sonra jel saf su ile yıkandıktan sonra % 30'luk etil alkolde muhafaza edildi. İzoenzim bantlarının yerleri ölçülüp Rf değerleri hesaplandı ve bilgisayarda jelin görüntüsü çıkarıldı.

2.8. Peroksidaz Aktivitesi Tayini

2.8.1. Enzim Ekstraktının Hazırlanması

Mısır yapraklarından 2 g alınarak 10 ml 0,2 M soğuk sodyum fosfat tamponunda (pH 7) buz üzerinde homojenize edildi. Homojenat iki katlı tülbent bezinden süzüldükten sonra +4 °C'de 20 000Xg'de 20 dk. santrifüj edildi. Süpernatant kısmı enzim aktivitesi tayini için kullanıldı.

2.8.2. Enzim Aktivitesinin Tayini

Peroksidaz aktivitesi spektrofotometrik olarak Rodriguez ve Sanchez (1982)'in tanımladığı gibi van Lelyveld ve Pretorius (1973)'un metodunun biraz değiştirilmesiyle ölçüldü. Substrat olarak 40 mM guaiacol ve 26 mM H₂O₂ çözeltileri kullanıldı.

Aktivite tayini için, içersine 1 ml guaiacol, 0,5 ml H₂O₂ ve 1,4 ml 0,05 M fosfat sitrat tamponu (pH 4,6) koyulan tüp 25 °C'ye ayarlı su banyosunda 15 dk. bekletildi. Tüp

içersindeki tampon - substrat karışımı spektrofotometre küvetine dökülerek üzerine 0,1 ml enzim ekstraktı ilave edildi. 420 nm dalga boyunda meydana gelen absorbans değişimi kaydedildi ve enzim aktivitesi $\Delta A/dk./g$ taze ağırlık cinsinden ifade edildi.

2.8.3. Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Peroksidaz İzoenzimlerinin Belirlenmesi

Elektroforez çalışmalarında enzim kaynağı olarak $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de dondurularak saklanan peroksidaz enzim ekstraktı kullanıldı. Liu (1973) tarafından tanımlanan poliakrilamid jel elektroforezi ile peroksidaz izoenzimleri belirlendi. Yığma ve ayırma jelleri SOD izoenzimlerinde olduğu gibi hazırlandı ve peroksidaz izoenzimlerinin poliakrilamid jelinde yürütülmesi SOD izoenzimlerindeki gibi gerçekleştirildi. Elektroforez sonucu dikkatli bir şekilde çıkarılan jel, benzidin (0,1 g benzidin/ 100 ml 0,2 M sodyum asetat tamponu, pH 5) ve H_2O_2 substratlarıyla hazırlanan çözeltide (2,5 ml % 3'lük H_2O_2 / 100 ml benzidin çözeltisi), $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat bekletildikten sonra % 30'luk etil alkolde muhafaza edildi. İzoenzim bantlarının yerleri ölçülüp Rf değerleri hesaplandı ve bilgisayarda jelin görüntüsü çıkarıldı.

2.9. Glutasyon Redüktaz Aktivitesi Tayini

Glutasyon redüktaz aktivitesi spektrofotometrik olarak Foyer ve Halliwell (1976)'e göre SOD enzimi için hazırlanan ekstrakt kullanılarak tayin edildi. Substrat olarak 0,25 mM NADPH ve 1mM oksitlenmiş glutasyon (GSSG) kullanıldı.

Glutasyon redüktaz tarafından oksitlenmiş glutasyonun indirgenmesi için indirgeyici faktör olarak NADPH kullanıldı. 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 5 dakika boyunca 340 nm'deki azalmanın ölçülmesiyle belirlendi ve GR aktivitesi mU/ml olarak ifade edildi.

2.10. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) ile Bitki Hormon Miktarlarının Belirlenmesi

HPLC için bitki hormonlarının ekstraksiyonu ve saflaştırılması Kuraishi vd. (1991)'nin tanımladığı metodun biraz değiştirilmesiyle yapıldı. 2 g örnek alınarak sıvı azotta toz haline getirildi ve üzerine -40 °C'de bekletilen % 80'lik metanol ilave edilerek 10 dk. ultra doku parçalayıcıda (Ultrasonic Processor, Jenway LTD) homojenize edildi. Homojenat karanlıkta 4 °C'de 24 saat bekletildikten sonra Whatman no. 1 filtre kağıdından süzüldü ve süzüntü kısmı alındıktan sonra kalan parçalar tekrar aynı işleme tabi tutuldu. Elde edilen süzüntüler birleştirilerek 0,45 µm'lik PTFE filtrelerinden geçirildi (Cutting, 1991) ve 35 °C'de evaporatörde kurutuldu. Kurutulan ekstraktlar 100 mol.L⁻¹ KH₂PO₄ tamponunda (pH 8) tekrar çözüldü ve 4 °C'de 10.000g'de 1 saat santrifüj edildi. Süpernatant kısmı alınarak üzerine 1 g polivinilpolipirrolidon (PVPP) ilave edildi ve iyice karıştırıldıktan sonra Sep- Pak C₁₈ (Waters) kartuşlarından geçirildi (Machackova vd., 1993). Kartuşlerde kalan hormonlar % 80'lik metanolde çözülerek küçük viallere alındı ve daha sonra analiz işlemleri için HPLC (Shimadzu, LC-10 AD)'ye enjekte edildi. HPLC analizleri için mobil faz olarak % 11,5'lik asetonitril (pH 5,5) ve 40 mM'lik trietil amonyum asetat (TEAA) tamponu kullanıldı. Akış hızı, basınç ve dalga boyu sırasıyla 2 ml. min⁻¹, 2000 psi ve 265 nm olarak seçildi ve ultraviyole dedektör kullanıldı (Horgan, Kramers, 1979; Taylor vd., 1984).

2.11. İstatistik Analizler

Ekstraksiyonlar ve analizlerin tekrerrüü birbirinden bağımsız üç ayrı yetiştirilmiş bitki grubundan yapılmıştır. Verilerin varyans analizi 'Statistical Package for Social Sciences (SPSS for Windows 9.0)' kullanılarak ortalamalar arasındaki istatistiki önemlilik derecesi Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi'ne göre belirlenmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Morfolojik Bulgular

PQ uygulanan fidelerin morfolojik görünümünde kontrole karşılaştırıldığında önemli değişimler belirlendi. Herbisitin etkisinin zamana bağlı olarak arttığı görüldü. PQ uygulandıktan 8 saat sonra mısır fidelerinin yapraklarında görülmeye başlayan beyaz ve kahverengi nekrotik lekeler, 12 saat sonra iyice belirgin hale geldi (Şekil 3, 4). Ayrıca yaprakların renginde kontrole oranla açılma, aşağıya doğru kıvrılmalar ve yaprak ayasının daralmaya başladığı gözlemlendi. PQ uygulandıktan 24 saat sonra, bu septomların iyice belirginleştiği, görülebilir yaprak hasarlarının oluştuğu ve fidelerin pörsümeye başladığı görüldü (Şekil 5).



Şekil 3. PQ uygulandıktan 12 saat sonra fidelerin yapraklarında oluşan septomlar



Şekil 4. PQ uygulandıktan 12 saat sonra fidelerin genel görünümü



Şekil 5. PQ uygulandıktan 24 saat sonra fidelerin genel görünümü

SPM ve PUT ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fidelerde de sadece PQ uygulanan fidelerde görülen septomların oluştuğu saptandı. Ancak 24 saat sonra sadece PQ uygulanan fidelere nazaran 1 mM SPM ve PUT ile ön muamele yapılan fidelerdeki görülebilir yaprak hasarlarının tedrici olarak azaldığı söylenebilir (Şekil 6, 7). 0,2 mM PUT ve SPM ile ön muamele yapılan fidelerin görünümünün ise, sadece PQ uygulanan fidelerdekinden farklı olmadığı görüldü.

1, 10 ve 100 μM BA ile ön muamele yapılan fidelerin görünümünün, PQ uygulandıktan 24 saat sonra sadece PQ uygulanan fidelerdekiyle hemen hemen aynı olduğu ve konsantrasyonlar arasında önemli bir farklılığın olmadığı belirlendi (Şekil 8).

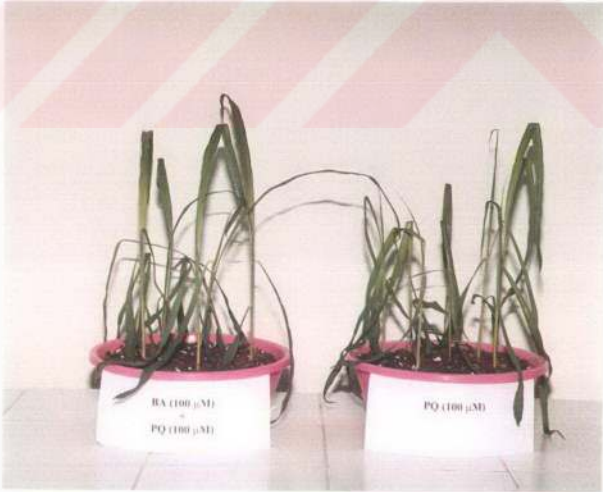
GA_3 ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fidelerin görünümünün 12 ve 24. saatlerde sadece PQ uygulanmış fidelerdekinden daha sağlıklı olduğu gözlemlendi. Konsantrasyonlar arasında çok bariz bir fark görünmemesine rağmen, 10 ve 100 μM GA_3 ile ön muamele yapılan fidelerdeki görülebilir yaprak hasarlarının daha az olduğu saptandı (Şekil 9, 10, 11, 12, 13, 14).



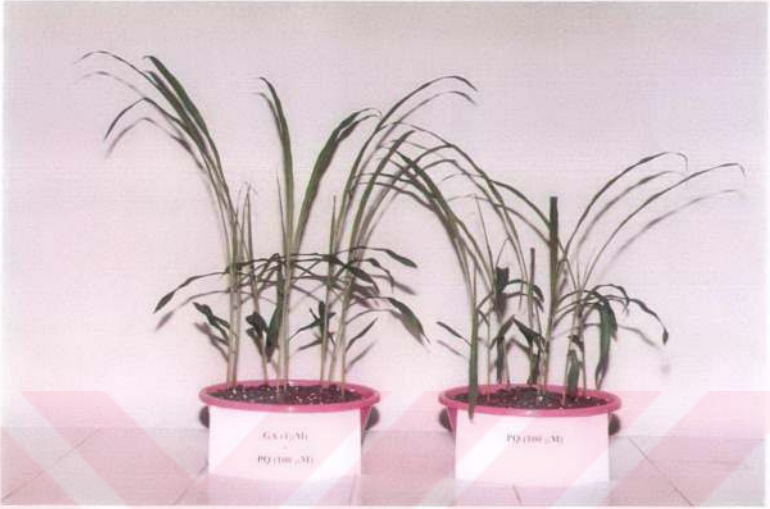
Şekil 6. 1 mM SPM ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fideler ile sadece PQ uygulanmış fidelerin 24 saat sonraki genel görünimleri



Şekil 7. 1 mM PUT ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fideler ile sadece PQ uygulanmış fidelerin 24 saat sonraki genel görünüşleri



Şekil 8. 100 μ M BA ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fideler ile sadece PQ uygulanmış fidelerin 24 saat sonraki genel görünüşleri



Şekil 9. 1 μM GA_3 ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fideler ile sadece PQ uygulanmış fidelerin 12 saat sonraki genel görünüşleri



Şekil 10. 1 μM GA_3 ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fideler ile sadece PQ uygulanmış fidelerin 24 saat sonraki genel görünüşleri



Şekil 11. 10 μM GA_3 ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fideler ile sadece PQ uygulanmış fidelerin 12 saat sonraki genel görünüşleri



Şekil 12. 10 μM GA_3 ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fideler ile sadece PQ uygulanmış fidelerin 24 saat sonraki genel görünüşleri



Şekil 13. 100 µM GA₃ ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fideler ile sadece PQ uygulanmış fidelerin 12 saat sonraki genel görünüşleri



Şekil 14. 100 µM GA₃ ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fideler ile sadece PQ uygulanmış fidelerin 24 saat sonraki genel görünüşleri

3.2. Büyümeyi Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının Nispi Su İçeriğine Etkileri

PQ uygulamasından 8, 12 ve 24 saat sonra fidelerdeki nispi su içeriğinin kontrole göre istatistiki bakımdan önemli ($P=0,05$) ölçüde azaldığı görüldü. 24 saatin sonunda kontrol fidelerinde % 82,9 olan nispi su içeriğinin PQ uygulanan fidelerde % 61 olduğu bulundu (Tablo 2).

Tablo 2. Büyümeyi düzenleyici maddelerle ön muamele yapılmış ve paraquat uygulanmış mısır fidelerindeki nispi su içeriği^a

Uygulamalar	Nispi Su İçeriği (%)		
	8. Saat	12. Saat	24. Saat
Kontrol	90,35 $\pm$ 0,19* b	84,19 $\pm$ 4,80 b	82,91 $\pm$ 3,01 d
Paraquat (PQ)	76,32 $\pm$ 4,84 a	67,11 $\pm$ 7,92 a	61,03 $\pm$ 3,32 a
SPM (0,2 mM) +PQ	82,56 $\pm$ 5,05 ab	78,89 $\pm$ 2,20 b	67,08 $\pm$ 3,69 bc
SPM (1 mM) +PQ	80,38 $\pm$ 2,46 a	79,55 $\pm$ 2,02 b	69,73 $\pm$ 2,27 c
PUT (0,2 mM) +PQ	79,49 $\pm$ 3,28 a	75,12 $\pm$ 4,54 ab	68,50 $\pm$ 2,37 bc
PUT (1 mM) +PQ	81,41 $\pm$ 5,65 ab	76,17 $\pm$ 3,6 ab	67,68 $\pm$ 3,68 bc
BA (1 μ M) +PQ	84,15 $\pm$ 5,93 ab	77,72 $\pm$ 1,02 b	65,05 $\pm$ 5,45 abc
BA (10 μ M) +PQ	82,94 $\pm$ 7,74 ab	78,66 $\pm$ 4,28 b	68,85 $\pm$ 3,05 bc
BA (100 μ M) +PQ	75,40 $\pm$ 2,61 a	74,35 $\pm$ 7,81 ab	62,75 $\pm$ 2,08 ab
GA ₃ (1 μ M) +PQ	84,25 $\pm$ 1,95 ab	75,26 $\pm$ 6,52 ab	68,52 $\pm$ 1,56 bc
GA ₃ (10 μ M) +PQ	80,52 $\pm$ 6,23 a	73,90 $\pm$ 6,20 ab	68,24 $\pm$ 4,65 bc
GA ₃ (100 μ M) +PQ	83,03 $\pm$ 0,69 ab	76,41 $\pm$ 3,39 ab	69,75 $\pm$ 1,41 c

^aDört tekrerrün ortalaması. *Dört tekrerrürlü ortalamaların standart sapması. Aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P=0,05$). Ortalamalar satır olarak değil, her bir sütün kendi içinde karşılaştırılmıştır (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi).

SPM ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanan fidelerdeki nispi su içeriğinin, 8. saatte SPM ile ön muamele yapılmamış fidelere nazaran istatistiki bakımdan önemli ölçüde değişmediği görüldü. 12. ve 24. saatlerde ise 0,2 ve 1 mM SPM ile ön muamele yapılan fidelerde, PQ'nın teşvik ettiği su kaybının istatistiki bakımdan önemli ölçüde engellendiği

tespit edildi. 24 saat sonra 0,2 ve 1 mM SPM ile ön muamele yapılmış fidelerdeki nispi su içeriğinin sadece PQ uygulanan fidelerdekenden, sırasıyla % 9 ve % 12,4 daha fazla olduğu kaydedildi. PUT'un 0,2 ve 1 mM'lık konsantrasyonlarıyla ön muamele yapılan fidelerdeki nispi su içeriğinin, PQ uygulandıktan 8 ve 12 saat sonra sadece PQ uygulanan fidelere nazaran istatistiki bakımdan önemli ölçüde değişmediği, 24. saatte ise PUT ile ön muamele yapılmamış ve PQ uygulanmış fidelerdekine kıyasla daha fazla olduğu belirlendi.

BA ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fidelerdeki nispi su içeriğinin, 8. saatte BA ile ön muamele yapılmamış fidelerdekenden farklı olmadığı, 12. saatte ise 1 ve 10 μ M BA ile ön muamele yapılmış fidelerdeki nispi su içeriğinin sadece PQ uygulanmış fidelerdekenden istatistiki bakımdan önemli ölçüde fazla olduğu belirlendi. 24 saatin sonunda PQ'nin sebep olduğu su kaybını önlemede en etkili olan BA konsantrasyonun 10 μ M olduğu tespit edildi. 100 μ M BA ile ön muamele yapılan fidelerdeki nispi su içeriğinin ise 12. ve 24. saatlerde, sadece PQ uygulanan fidelerdekine nazaran istatistiki bakımdan önemli ölçüde farklı olmadığı gözlemlendi.

1, 10 ve 100 μ M GA₃ ile ön muamele yapılan fidelerdeki nispi su içeriğinin, PQ uygulandıktan 8 ve 12 saat sonra, GA₃ ile ön muamele yapılmamış fidelere nazaran istatistiki bakımdan önemli ölçüde değişmediği, ancak 24. saatte bu üç GA₃ konsantrasyonunun da PQ'nin sebep olduğu su kaybını önlemede etkili olduğu bulundu.

Genel olarak bakıldığında PQ'nin teşvik ettiği su kaybını önlemede en etkili olan uygulamaların 1 mM SPM ve 100 μ M GA₃ olduğu tayin edildi.

3.3. Büyüme Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının Toplam Klorofil Miktarına Etkileri

Kontrolle karşılaştırıldığında PQ uygulanan fidelerdeki toplam klorofil miktarının azaldığı, ancak 12 ve 24. saatlerdeki azalmaların istatistiki bakımdan önemli ($P=0,05$) olduğu belirlendi. PQ uygulandıktan 8 saat sonra toplam klorofil miktarında belirlenen % 16,5'lik azalmanın 12. saatte % 24,9; 24. saatte ise % 41,6 olduğu bulundu (Tablo 3).

1 mM SPM ile ön muamele yapılan fidelere, 8, 12 ve 24. saatlerde PQ'nin teşvik ettiği toplam klorofil miktarındaki azalmaların önemli oranda engellendiği belirlendi. Sadece PQ uygulanan fidelerdekine oranla, 1 mM SPM ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fidelerdeki toplam klorofil miktarının istatistiki bakımdan önemli ölçüde fazla olduğu tespit edildi. 24 saat sonra 1 mM SPM ile ön muamele yapılmış fidelerdeki toplam

klorofil miktarının sadece PQ uygulanmış fidelerdekiden % 24,2 daha fazla olduğu kaydedildi. Kontrolle karşılaştırıldığında ise, 1 mM SPM ile ön muamele yapılmış fidelerdeki toplam klorofil miktarının 8 ve 12. saatlerde önemli ölçüde değişmediği, 24. saatte ise istatistiki bakımdan önemli ölçüde azaldığı görüldü. 0,2 mM SPM ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fidelerdeki toplam klorofil miktarının ise, 24. saatte sadece PQ uygulanan fidelerdekine nazaran daha fazla olduğu, ancak 8 ve 12. saatlerde istatistiki bakımdan önemli bir farklılık olmadığı belirlendi.

Tablo 3. Büyüme düzenleyici maddelerle ön muamele yapılmış ve paraquat uygulanmış mısır fidelerindeki toplam klorofil miktarı^a

Toplam Klorofil Miktarı (mg/ g kuru ağırlık)			
Uygulamalar	8. Saat	12. Saat	24. Saat
Kontrol	26,49 ± 0,48 ab	27,25 ± 0,4* b	25,95 ± 3,64 c
Paraquat (PQ)	22,11 ± 0,54 a	20,45 ± 0,26 a	15,15 ± 1,28 a
SPM (0,2 mM) +PQ	26,81 ± 2,03 ab	24,09 ± 3,06 ab	20,48 ± 0,27 b
SPM (1 mM) +PQ	27,80 ± 0,84 b	26,56 ± 0,59 b	21,56 ± 0,96 b
PUT (0,2 mM) +PQ	28,23 ± 3,71 b	22,28 ± 3,95 ab	18,17 ± 0,91 ab
PUT (1 mM) +PQ	28,00 ± 2,29 b	27,49 ± 4,16 b	20,01 ± 2,42 b
BA (1 µM) +PQ	26,16 ± 0,64 ab	23,63 ± 0,61 ab	18,27 ± 1,10 ab
BA (10 µM) +PQ	27,27 ± 0,85 b	26,03 ± 1,93 ab	18,34 ± 1,24 ab
BA (100 µM) +PQ	28,25 ± 4,30 b	24,34 ± 2,11 ab	20,16 ± 0,47 b
GA ₃ (1 µM) +PQ	28,49 ± 0,48 b	25,05 ± 1,25 ab	17,26 ± 3,01 ab
GA ₃ (10 µM) +PQ	26,92 ± 0,91 ab	23,33 ± 1,17 ab	18,57 ± 4,09 ab
GA ₃ (100 µM) +PQ	25,49 ± 0,19 ab	25,69 ± 1,61 ab	20,90 ± 2,03 b

^aDört tekrerrütün ortalaması. *Dört tekrerrütli ortalamaların standart sapması. Aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir (P= 0,05). Ortalamalar satır olarak değil, her bir sütün kendi içinde karşılaştırılmıştır (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi).

PUT'un 1 mM'lık konsantrasyonu ile ön muamele yapılmış fidelerdeki toplam klorofil miktarının 8, 12 ve 24. saatlerde sadece PQ uygulanan fidelerdekiden daha fazla olduğu, 0,2 mM'lık konsantrasyonunun ise 8. saatte etkili olduğu görüldü. 24 saatin sonunda

toplam klorofil miktarında PQ'nin sebep olduğu % 41,6'lık azalmanın, 1 mM PUT ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fidelerde istatistiki olarak önemli ölçüde azaltıldığı belirlendi.

1 μM BA ile ön muamele yapılan fidelerdeki toplam klorofil miktarının PQ uygulandıktan 8 saat sonra kontrol ve sadece PQ uygulanmış fidelerdekine nazaran önemli ölçüde değişmediği, ancak 10 ve 100 μM BA ile ön muamele yapılan fidelerdeki toplam klorofil miktarının sadece PQ uygulanan fidelerdekinden daha fazla olduğu belirlendi. 12. saatte BA ile ön muamele yapılan fidelerdeki toplam klorofil miktarının hem kontrol hem de PQ uygulanan fidelerdekenden farklı olmadığı, 24. saatte ise 100 μM BA'nın PQ'nin sebep olduğu toplam klorofil miktarındaki azalmayı önlemede etkili olduğu tespit edildi. 24 saat sonra, sadece PQ uygulanan fidelerdekine oranla, 100 μM BA ile ön muamele yapılan fidelerdeki toplam klorofil miktarının % 24,8 daha fazla olduğu ve bu farkın istatistiki bakımdan önemli olduğu belirlendi. Uygulanan BA konsantrasyonları arasında istatistiki bakımdan önemli bir fark bulunmamasına rağmen, 1 ve 10 μM BA ile ön muamele yapılmış fidelerdeki toplam klorofil miktarının sadece PQ uygulanan fidelere oranla istatistiki bakımdan önemli ölçüde değişmediği görüldü.

GA_3 'ün 10 ve 100 μM 'lık konsantrasyonlarıyla ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fidelerdeki toplam klorofil miktarının, 8. saatte hem kontrol hem de GA_3 ile ön muamele yapılmamış ve PQ uygulanmış fidelerdekine kıyasla istatistiki bakımdan önemli ölçüde değişmediği, ancak 1 μM GA_3 ile ön muamele yapılan fidelerdeki toplam klorofil miktarının sadece PQ uygulanan fidelerdekinden daha fazla olduğu belirlendi. 12. saatte ise 8. saate benzer şekilde, GA_3 uygulamalarında, sadece PQ uygulamalarına oranla istatistiki olarak önemli olmasa da genellikle toplam klorofil miktarının daha fazla olduğu görüldü. 24. saatte ise PQ'nin sebep olduğu toplam klorofil miktarındaki azalmayı önlemede en etkili GA_3 konsantrasyonunun 100 μM olduğu tayin edildi. 24 saatin sonunda kontrole oranla sadece PQ uygulanan fidelerde, toplam klorofil miktarının % 58,3'ü kalırken, 100 μM GA_3 ile ön muamele yapılan fidelerde % 80,5'inin kaldığı tespit edildi.

3.4. Büyüme Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının Karotenoid Miktarına Etkileri

PQ uygulanan fidelerdeki karotenoid miktarının 8, 12 ve 24. saatlerde kontrole oranla istatistiki bakımdan önemli ($P=0,05$) ölçüde azaldığı görüldü (Tablo 4).

Tablo 4. Büyüme düzenleyici maddelerle ön muamele yapılmış ve paraquat uygulanmış mısır fidelerindeki karotenoid miktarı^a

Karotenoid Miktarı (mg /g kuru ağırlık)			
Uygulamalar	8. Saat	12. Saat	24. Saat
Kontrol	6,18 ± 0,26* c	6,07 ± 0,02 c	5,79 ± 0,47 d
Paraquat (PQ)	5,01 ± 0,58 a	4,23 ± 0,36 a	3,49 ± 0,17 a
SPM (0,2 mM) +PQ	5,26 ± 0,09 ab	4,71 ± 0,02 ab	4,01 ± 0,40 ab
SPM (1 mM) +PQ	6,10 ± 0,42 bc	5,66 ± 1,14 bc	4,31 ± 0,23 b
PUT (0,2 mM) +PQ	6,07 ± 0,83 bc	5,06 ± 0,08 abc	4,50 ± 0,07 bc
PUT (1 mM) +PQ	6,12 ± 0,09 bc	5,69 ± 0,97 bc	4,94 ± 0,07 c
BA (1 µM) +PQ	5,86 ± 0,51 abc	5,19 ± 0,55 abc	4,06 ± 0,10 ab
BA (10 µM) +PQ	5,90 ± 0,70 bc	5,87 ± 0,04 bc	3,88 ± 0,31 ab
BA (100 µM) +PQ	5,90 ± 0,09 bc	5,18 ± 0,16 abc	4,20 ± 0,46 b
GA ₃ (1 µM) +PQ	5,40 ± 0,03 abc	5,56 ± 0,17 bc	3,99 ± 0,39 ab
GA ₃ (10 µM) +PQ	6,09 ± 0,05 bc	5,82 ± 0,05 bc	4,29 ± 0,34 b
GA ₃ (100 µM) +PQ	5,62 ± 0,09 abc	5,55 ± 0,89 bc	4,17 ± 0,49 b

^aDört tekrerrün ortalaması. *Dört tekrerrülü ortalamaların standart sapması. Aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P=0,05$). Ortalamalar satır olarak değil, her bir sütün kendi içinde karşılaştırılmıştır (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi).

24 saatin sonunda PQ uygulanan fidelerdeki karotenoid miktarının % 39,7 oranında azaldığı belirlendi. PQ'nin sebep olduğu bu azalmanın, 24. saatte SPM'nin 1 mM, PUT'un 0,2 ve 1 mM'lık konsantrasyonlarıyla ön muamele yapılan fidelerde istatistiki bakımdan önemli ölçüde engellendiği tespit edildi. Sadece PQ uygulanan fidelerde karotenoid miktarında görülen % 39,7'lik azalmanın, 1 mM SPM ile ön muamele yapılan fidelerde % 25,5; 0,2 ve 1 mM PUT ile ön muamele yapılan fidelerde ise sırasıyla % 22,2 ve % 14,6 olduğu kaydedildi. Ayrıca 8 ve 12. saatlerde de, 1 mM SPM ve PUT'un karotenoid

miktarındaki azalmayı istatistiki bakımdan önemli ölçüde engelledikleri görüldü. SPM'nin 0,2 mM'lık konsantrasyonunun ise, bütün zaman dilimlerinde sadece PQ uygulanan fidelerdekine oranla istatistiki bakımdan önemli olmasa bile, karotenoid miktarındaki azalmayı tedrici olarak önlediği söylenebilir.

BA'nın 10 ve 100 μ M'lık konsantrasyonlarıyla ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fidelerdeki karotenoid miktarının, 8. saatte sadece PQ uygulanmış fidelerdekenden istatistiki bakımdan önemli ölçüde fazla olduğu belirlendi. 12 ve 24. saatlerde ise her iki BA konsantrasyonu arasında istatistiki olarak bir fark bulunmamasına rağmen, 24 saatin sonunda PQ'nin sebep olduğu karotenoid miktarındaki azalmayı önlemede en etkili BA konsantrasyonunun 100 μ M olduğu tespit edildi. 1 μ M BA ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fidelerdeki karotenoid miktarıyla, sadece PQ uygulanmış fidelerdeki karotenoid miktarı arasında ise istatistiki bakımdan önemli bir farklılık olmadığı görüldü.

1 ve 100 μ M GA_3 ile ön muamele yapılan fidelerdeki karotenoid miktarının, PQ uygulandıktan 8 saat sonra hem kontrol hem de sadece PQ uygulanmış fidelerdekine nazaran istatistiki bakımdan önemli ölçüde değişmediği, ancak 10 μ M GA_3 ile ön muamele yapılan fidelerdeki karotenoid miktarının sadece PQ uygulanan fidelerdekenden daha fazla olduğu belirlendi. 12. saatte, uygulanan bütün GA_3 konsantrasyonlarının PQ'nin sebep olduğu karotenoid miktarındaki azalmayı istatistiki bakımdan önemli ölçüde azalttıkları, 24. saatte ise 10 ve 100 μ M GA_3 'ün etkili olduğu görüldü. 24 saat sonra sadece PQ uygulanan fidelerdekine oranla 10 ve 100 μ M GA_3 ile ön muamele yapılan fidelerdeki karotenoid miktarının, sırasıyla % 18,6 ve % 16,3 daha fazla olduğu belirlendi.

3.5. Büyümeyi Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının Askorbik Asit Miktarına Etkileri

PQ uygulamasından 8, 12 ve 24 saat sonra fidelerdeki askorbik asit miktarının kontrole göre istatistiki bakımdan önemli ($P=0,05$) ölçüde azaldığı belirlendi (Tablo 5). SPM ve PUT ile ön muamele yapılan fidelerde, PQ'nin sebep olduğu askorbik asit miktarındaki azalmanın önemli oranda engellendiği tespit edildi. Uygulanan her iki SPM ve PUT konsantrasyonunun da askorbik asit miktarında PQ'nin sebep olduğu azalmayı önlemede istatistiki bakımdan etkili oldukları bulundu. Özellikle 1 mM SPM ve PUT'un etkilerinin çok daha önemli olduğu kaydedildi. Kontrolle karşılaştırıldığında, PQ

uygulandıktan 24 saat sonra askorbik asit miktarında belirlenen % 69,9'luk azalmanın, 1 mM SPM ve PUT ile ön muamele yapılan fidelerde, sırasıyla % 23,5 ve % 17,7 olduğu kaydedildi.

Tablo 5. Büyüme düzenleyici maddelerle ön muamele yapılmış ve paraquat uygulanmış mısır fidelerindeki askorbik asit miktarı^a

Askorbik Asit Miktarı (mg /g kuru ağırlık)			
Uygulamalar	8. Saat	12. Saat	24. Saat
Kontrol	5,73 ± 0,62* c	4,88 ± 1,76 d	3,99 ± 0,68 f
Paraquat (PQ)	3,01 ± 0,77 a	2,66 ± 0,62 a	1,20 ± 0,27 a
SPM (0,2 mM) +PQ	4,31 ± 0,84 b	3,82 ± 0,67 bcd	2,76 ± 0,41 de
SPM (1 mM) +PQ	4,12 ± 0,26 b	4,03 ± 0,80 cd	3,05 ± 0,30 e
PUT (0,2 mM) +PQ	3,92 ± 0,09 b	3,78 ± 0,06 abcd	2,95 ± 0,27 de
PUT (1 mM) +PQ	4,11 ± 0,16 b	4,07 ± 0,12 cd	3,28 ± 0,50 e
BA (1 µM) +PQ	4,19 ± 0,30 b	3,72 ± 0,16 abc	2,89 ± 0,25 de
BA (10 µM) +PQ	4,80 ± 0,35 b	3,67 ± 0,46 abc	2,34 ± 0,78 cd
BA (100 µM) +PQ	4,24 ± 0,59 b	3,32 ± 0,46 abc	1,95 ± 0,53 bc
GA ₃ (1 µM) +PQ	4,29 ± 0,87 b	3,39 ± 0,30 abc	1,64 ± 0,15 ab
GA ₃ (10 µM) +PQ	3,88 ± 0,76 b	3,86 ± 0,72 bcd	1,95 ± 0,41 bc
GA ₃ (100 µM) +PQ	4,54 ± 0,80 b	2,87 ± 1,00 ab	1,96 ± 0,25 bc

^aDört tekrerrün ortalaması. *Dört tekrerrürlü ortalamaların standart sapması. Aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir (P= 0,05). Ortalamalar satır olarak değil, her bir sütün kendi içinde karşılaştırılmıştır (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi).

BA ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fidelerdeki askorbik asit miktarının, 8. saatte sadece PQ uygulanmış fidelerdekinden istatistiki bakımdan önemli ölçüde fazla olduğu, 12. saatte ise aralarında önemli bir farklılığın olmadığı görüldü. 24 saatin sonunda uygulanan bütün BA konsantrasyonlarının, PQ'nin sebep olduğu askorbik asit miktarındaki azalmayı önlemede istatistiki bakımdan etkili oldukları kaydedildi.

PQ uygulandıktan 8 saat sonra askorbik asit miktarında meydana gelen azalmanın, GA₃ ile ön muamele yapılan fidelerde istatistiki bakımdan önemli ölçüde engellendiği belirlendi. 12. saatte ise 10 µM GA₃'ün etkili olduğu, 1 ve 100 µM GA₃ ile ön muamele

yapılan fidelerdeki askorbik asit miktarının sadece PQ uygulanan fidelerdekinden istatistiki olarak farklı olmadığı tespit edildi. 24. saatte, PQ'nin teşvik ettiği askorbik asit miktarındaki azalmayı önlemede istatistiki olarak etkili olan GA_3 konsantrasyonlarının 10 ve 100 μM olduğu bulundu. 24 saat sonra, askorbik asit miktarında PQ'nin sebep olduğu % 69,9'luk azalmanın, 10 ve 100 μM GA_3 ile ön muamele yapılan fidelerde % 18,8 ve % 19 oranında azaltıldığı belirlendi.

Genel olarak bakıldığında PQ uygulandıktan 24 saat sonra, 1 mM SPM ve PUT ile ön muamele yapılan fidelerdeki askorbik asit miktarının, diğer uygulamalardakinden istatistiki bakımdan önemli ölçüde fazla olduğu belirlendi.

3.6. Büyümeyi Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının Çözünebilir Protein Miktarına Etkileri

Kontrole göre PQ uygulanan fidelerdeki çözünebilir protein miktarının istatistiki bakımdan önemli ölçüde azaldığı görüldü. PQ uygulandıktan 24 saat sonra çözünebilir protein miktarının % 49,1 oranında azaldığı belirlendi. 24. saatte PQ'nin teşvik ettiği bu azalmanın, SPM ile PUT'un 0.2 ve 1 mM'lık konsantrasyonlarıyla ön muamele yapılan fidelerde istatistiki bakımdan önemli ölçüde azaltıldığı tespit edildi. 8 ve 12. saatlerde ise SPM ve PUT ile ön muamele yapılan fidelerdeki çözünebilir protein miktarının, sadece PQ uygulanan fidelerdekine oranla istatistiki olarak önemli olmasa da, daha fazla olduğu bulundu (Tablo 6).

BA ile ön muamele yapılan fidelerdeki çözünebilir protein miktarının, PQ uygulandıktan 8 saat sonra kontrol ve sadece PQ uygulanmış fidelerdekine oranla istatistiki bakımdan önemli ölçüde değişmediği görüldü. 12. saatte, PQ'nin sebep olduğu çözünebilir protein miktarındaki azalmayı önlemede BA'nın 10 ve 100 μM 'lık konsantrasyonlarının istatistiki bakımdan etkili olduğu, 24. saatte ise uygulanan bütün BA konsantrasyonlarının, PQ'nin sebep olduğu çözünebilir protein miktarındaki azalmayı önemli ölçüde engelledikleri tespit edildi. 24 saatin sonunda, sadece PQ uygulanan fidelerdekine oranla, 1, 10 ve 100 μM BA ile ön muamele yapılan fidelerdeki çözünebilir protein miktarının, sırasıyla % 17,8; % 19,1 ve % 22,2 daha fazla olduğu ve bu fazlalıkların istatistiki bakımdan önemli olduğu belirlendi.

Tablo 6. Büyümei düzenleyici maddelerle ön muamele yapılmış ve paraquat uygulanmış mısır fidelerindeki çözünebilir protein miktarı^a

Çözünebilir Protein Miktarı (mg /g kuru ağırlık)			
Uygulamalar	8. Saat	12. Saat	24. Saat
Kontrol	43,81 ± 2,99* b	40,58 ± 2,34 d	43,60 ± 4,57 d
Paraquat (PQ)	36,00 ± 4,53 a	33,60 ± 1,93 a	22,18 ± 2,33 a
SPM (0,2 mM) +PQ	41,98 ± 5,98 ab	34,05 ± 1,50 ab	30,81 ± 4,29 bc
SPM (1 mM) +PQ	41,78 ± 1,58 ab	36,80 ± 0,08abcd	31,56 ± 1,94 bc
PUT (0,2 mM) +PQ	42,55 ± 2,08 ab	36,38 ± 1,52 abc	32,66 ± 4,67 c
PUT (1 mM) +PQ	39,43 ± 2,67 ab	37,10 ± 0,68abcd	31,37 ± 0,1 bc
BA (1 µM) +PQ	41,20 ± 4,78 ab	37,00 ± 2,80abcd	27,01 ± 3,19 b
BA (10 µM) +PQ	41,69 ± 6,07 ab	39,69 ± 2,97 cd	27,45 ± 3,22 b
BA (100 µM) +PQ	38,80 ± 6,76 ab	38,80 ± 0,94 cd	28,56 ± 3,12 bc
GA ₃ (1 µM) +PQ	41,26 ± 4,99 ab	37,50 ± 3,05 bcd	30,00 ± 3,70 bc
GA ₃ (10 µM) +PQ	41,08 ± 4,75 ab	36,10 ± 1,24 abc	28,54 ± 3,43 bc
GA ₃ (100 µM) +PQ	40,40 ± 3,59 ab	37,04 ± 1,17abcd	28,11 ± 4,30 bc

^aDört tekrerrütün ortalaması. *Dört tekrerrütlü ortalamaların standart sapması. Aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir (P= 0,05). Ortalamalar satır olarak değil, her bir sütün kendi içinde karşılaştırılmıştır (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi).

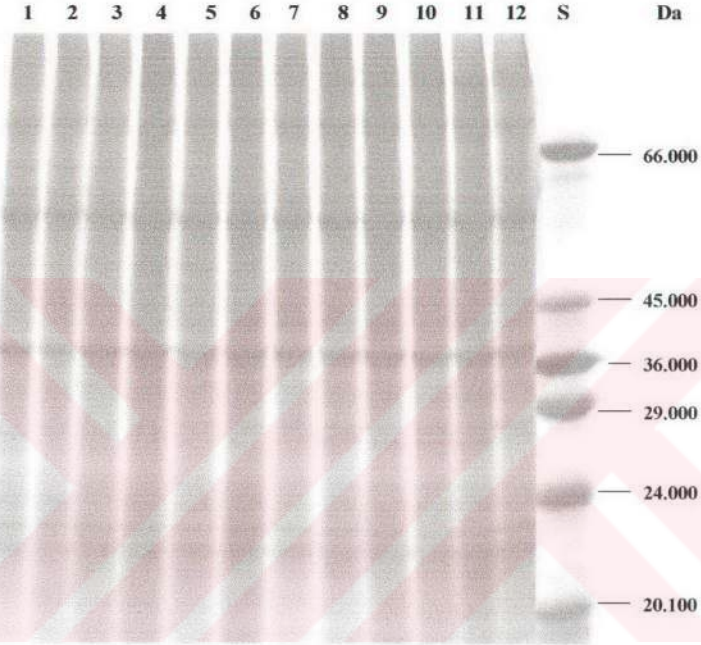
24. saatte, PQ'nin sebep olduğu çözünebilir protein miktarındaki azalmanın, GA₃ ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fidelerde de istatistiki bakımdan önemli ölçüde azaltıldığı tespit edildi. Kontrolle karşılaştırıldığında PQ uygulandıktan 24 saat sonra çözünebilir protein miktarında belirlenen % 49,1'lik azalmanın, 1, 10 ve 100 µM GA₃ ile ön muamele yapılan fidelerde, sırasıyla % 31,1; % 34,5 ve % 35,5 olduğu kaydedildi. Bütün zaman dilimlerinde, uygulanan GA₃ konsantrasyonları arasında istatistiki bakımdan önemli bir farklılık olmadığı ve GA₃ ile ön muamele yapılan fidelerdeki çözünebilir protein miktarının, sadece PQ uygulanan fidelerdekinden daha fazla olduğu tespit edildi.

Genel olarak bakıldığında PQ'nin teşvik ettiği çözünebilir protein miktarındaki azalmayı önlemede, uygulanan bütün BDM konsantrasyonlarının istatistiki olarak etkili oldukları görüldü.

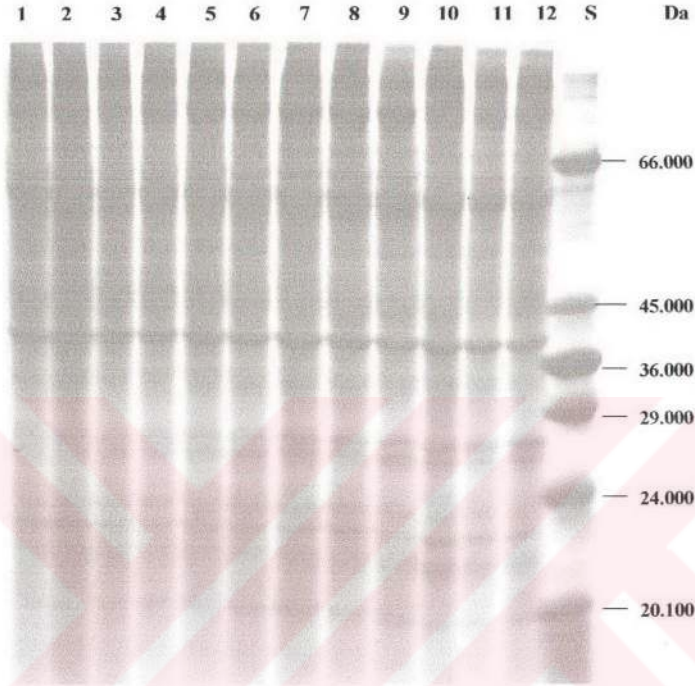
3.7. Büyümeyi Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının Protein Bantları Üzerine Etkileri

PQ uygulandıktan 8 saat sonra elde edilen numunelerden yapılan SDS poliakrilamid jel elektroforezi sonuçlarına göre kontrol ve PQ uygulanan fidelerde protein bantları bakımından önemli bir farkın olmadığı görüldü (Şekil 15). Ancak poliaminlerle ön muamele yapılan fidelerde 66.000 Da'dan büyük ve 66.000 ile 45.000 Da arasında olan bantlarda sadece PQ uygulanan fidelere nazaran daha fazla koyulaşma ve kalınlaşmalar olduğu belirlendi. Özellikle 1 mM PUT ve SPM ile ön muamele yapılan fidelerde bu bantların daha kalın oldukları görüldü. BA ile ön muamele yapılan fidelerde uygulanan konsantrasyona bağlı olarak önemli bir farklılığın olmadığı, ancak protein bantlarının sadece PQ uygulanan fidelere nazaran daha koyu oldukları tespit edildi. GA₃ ile ön muamele yapılan fidelerde ise 100 µM'lık konsantrasyonun diğer konsantrasyonlara nazaran 66.000 Da'dan büyük olan bantlarda zayıflamalara sebep olduğu görüldü. Ancak protein bantlarındaki bu zayıflamaların sadece PQ uygulanan fidelere nazaran fazla olmadıkları belirlendi.

PQ uygulandıktan 12 saat sonra elde edilen numunelerden yapılan SDS poliakrilamid jel elektroforezi sonuçlarına göre kontrolle mukayese edildiğinde PQ uygulanan fidelerdeki protein bantlarında önemli bir farklılık görülmedi (Şekil 16). Poliaminlerle ön muamele yapılan fidelerde PUT'un sadece PQ uygulanan fidelere nazaran molekül ağırlığı 66.000 Da'dan büyük ve 66.000 ile 45.000 Da arasında olan bantların kalınlığını artırdığı belirlendi. SPM ile ön muamele yapılan fidelerde ise önemli bir farklılığın olmadığı görüldü. Büyümeyi düzenleyici maddelerden BA'nın bütün konsantrasyonlarının protein bantlarının kalınlaşması ve koyulaşması üzerine daha etkili olduğu tespit edildi. BA ile ön muamele yapılan fidelerde molekül ağırlığı 66.000 Da'dan büyük ve 66.000 ile 45.000 Da arasında olan protein bantlarında daha fazla koyulaşma ve kalınlaşmalar gözlemlendi. Ayrıca molekül ağırlığı 29.000 ile 24.000 Da arasında olan iki protein bantının da BA uygulanan fidelerde daha kalın oldukları belirlendi. GA₃ ile ön muamele yapılan fidelerde ise uygulanan konsantrasyona bağlı olarak farklılıklar gözlemlendi. GA₃'ün 10 µM'lık konsantrasyonunun molekül ağırlığı 20.100 Da civarında ve 24.000 ile 20.100 Da arasında olan protein bantlarında zayıflamalara yol açtığı belirlendi.



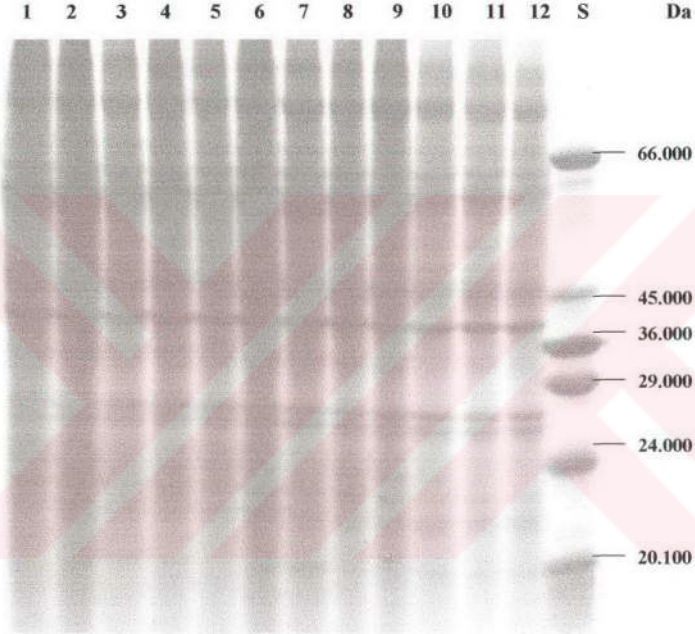
Şekil 15. Çeşitli konsantrasyonlarda büyümeyi düzenleyici maddelerle ön muamele yapılan mısır yapraklarındaki protein bantları üzerine paraquatın 8 saat sonraki etkileri (1:Kontrol, 2: PQ, 3: 0,2 mM SPM+PQ, 4: 1 mM SPM+PQ, 5: 0,2 mM PUT+PQ, 6:1 mM PUT+PQ, 7: 1 μ M BA+PQ, 8: 10 μ M BA+PQ, 9: 100 μ M BA+PQ, 10: 1 μ M GA₃+PQ, 11: 10 μ M GA₃+PQ, 12: 100 μ M GA₃+PQ, S: Standart)



Şekil 16. Çeşitli konsantrasyonlarda büyüme düzenleyici maddelerle ön muamele yapılan mısır yapraklarındaki protein bantları üzerine paraquatın 12 saat sonraki etkileri (1: Kontrol, 2: PQ, 3: 0,2 mM SPM+PQ, 4: 1 mM SPM+PQ, 5: 0,2 mM PUT+PQ, 6: 1 mM PUT+PQ, 7: 1 μ M BA+PQ, 8: 10 μ M BA+PQ, 9: 100 μ M BA+PQ, 10: 1 μ M GA₃+PQ, 11: 10 μ M GA₃+PQ, 12: 100 μ M GA₃+PQ, S: Standart)

PQ uygulandıktan 24 saat sonra elde edilen numunelerin SDS poliakrilamid jel elektroforezi sonuçlarına göre kontrol ve PQ uygulanan fidelerde molekül ağırlığı 66.000 Da'dan büyük olan protein bantlarında önemli bir farklılığın olmadığı ancak PQ uygulanan fidelerde 66.000 ile 29.000 Da arasındaki bantlarda zayıflamaların olduğu gözlemlendi (Şekil 17). PUT veya SPM ile ön muamele yapılan fidelerde uygulanan konsantrasyona bağlı olarak farklılıklar gözlemlendi. 1 mM PUT veya SPM ile ön muamele yapılan fidelerde sadece PQ uygulanan fidelere nazaran molekül ağırlığı 66.000 Da'dan büyük ve 66.000 ile 36.000 Da arasındaki protein bantlarında daha fazla kalınlaşma ve koyulaşma belirlendi. BA ile ön

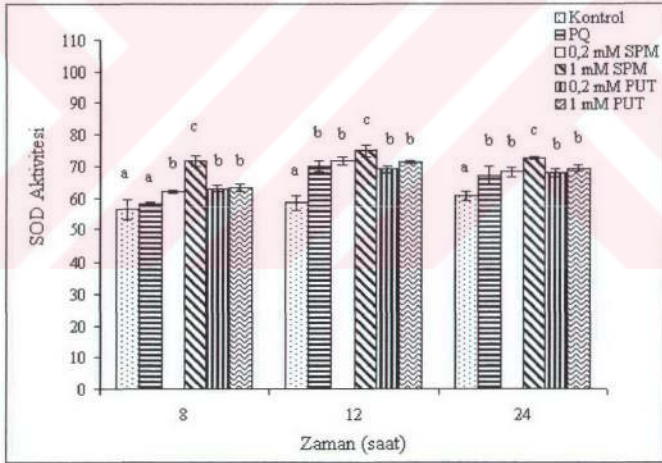
muamele yapılan fidelerdeki protein bantlarının GA_3 ile ön muamele yapılanlara nazaran daha koyu ve kalın oldukları gözlemlendi. Ayrıca GA_3 ile ön muamele yapılan fidelerde molekül ağırlığı 20.100 Da civarında ve 24.000 ile 20.100 Da arasındaki bantlarda zayıflamalar belirlendi.



Şekil 17. Çeşitli konsantrasyonlarda büyüme düzenleyici maddelerle ön muamele yapılan mısır yapraklarındaki protein bantları üzerine paraquatın 24 saat sonraki etkileri (1:Kontrol, 2: PQ, 3: 0,2 mM SPM+PQ, 4: 1 mM SPM+PQ, 5: 0,2 mM PUT+PQ, 6:1 mM PUT+PQ, 7: 1 μ M BA+PQ, 8: 10 μ M BA+PQ, 9: 100 μ M BA+PQ, 10: 1 μ M GA_3 +PQ, 11: 10 μ M GA_3 +PQ, 12: 100 μ M GA_3 +PQ, S: Standart)

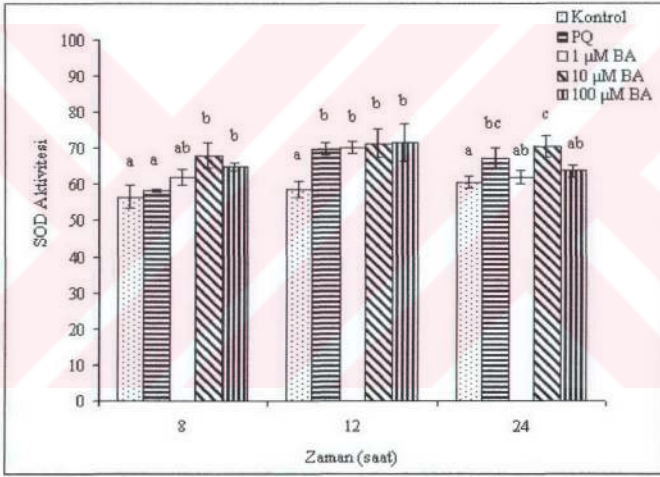
3.8. Büyümeyi Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının SOD Aktivitesine Etkileri

PQ uygulanan fidelerdeki SOD aktivitesinin 12. ve 24. saatlerde kontrole oranla istatistiki ($P=0,05$) bakımdan önemli ölçüde arttığı görüldü (Şekil 18). Poliaminlerle ön muamele yapılan fidelerde PQ uygulamasından 8 saat sonra, uygulanan bütün PUT ve SPM konsantrasyonlarının kontrole ve sadece PQ uygulanan fidelere nazaran istatistiki bakımdan önemli ölçüde SOD aktivitesini artırdığı belirlendi. PQ uygulamasından 12 ve 24 saat sonra ise sadece 1 mM SPM ile ön muamele yapılan fidelerdeki SOD aktivitesinin hem kontrole hem de sadece PQ uygulanan fidelerdekine kıyasla istatistiki bakımdan önemli ölçüde arttığı görüldü. 0,2 mM SPM ve PUT ile ön muamele yapılan fidelerdeki SOD aktivitesinin kontrole nazaran arttığı fakat sadece PQ uygulanan fidelerdeki ile aralarında istatistiksel olarak önemli bir farklılığın olmadığı belirlendi (Şekil 18).



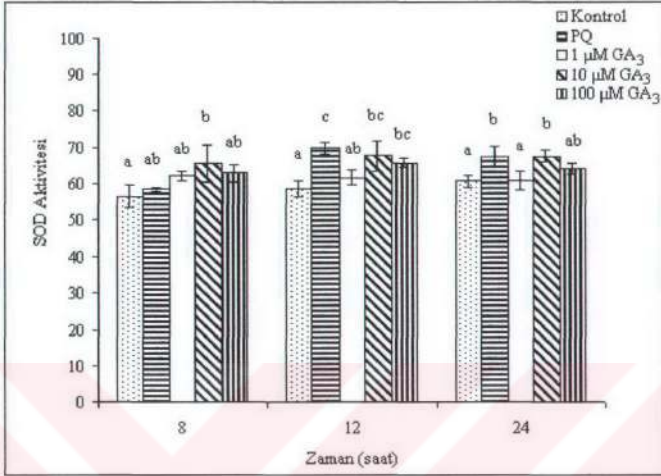
Şekil 18. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde SOD aktivitesindeki değişiklikler (Barlar dört tekerrürlü ölçümlerin standart sapmalarını göstermektedir. Her bir zaman diliminde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

BA'nın bütün konsantrasyonları ile ön muamele yapılan fidelerdeki SOD aktivitesinin PQ uygulandıktan 8 saat sonra arttığı, ancak bunlardan sadece 10 ve 100 μM BA ile ön muamele yapılan fidelerdeki artışın kontrol ve PQ uygulanan fidelere nazaran istatistiki bakımdan önemli olduğu bulundu. 12. saat itibariyle BA ile ön muamele yapılan fidelerdeki SOD aktivitesinin ön muamele yapılmamış fidelere nazaran istatistiki bakımdan önemli ölçüde değişmediği gözlemlendi. 24. saatte ise 10 μM BA ile ön muamele yapılan fidelerdeki SOD aktivitesinin diğer BA konsantrasyonlarına nazaran istatistiki bakımdan önemli ölçüde arttığı ancak bu artışın BA ile ön muamele yapılmamış fidelerle kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edildi (Şekil 19).



Şekil 19. BA ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde SOD aktivitesindeki değişiklikler (Barlar dört tekerrürlü ölçümlerin standart sapmalarını göstermektedir. Her bir zaman diliminde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

10 ve 100 μM GA_3 ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fidelerdeki SOD aktivitesinin GA_3 ile ön muamele yapılmamış fidelere nazaran önemli ölçüde değişmediği ancak 1 μM GA_3 uygulanan fidelerdeki SOD aktivitesinin 12. ve 24. saatlerde istatistiki bakımdan önemli ölçüde azaldığı görüldü (Şekil 20).

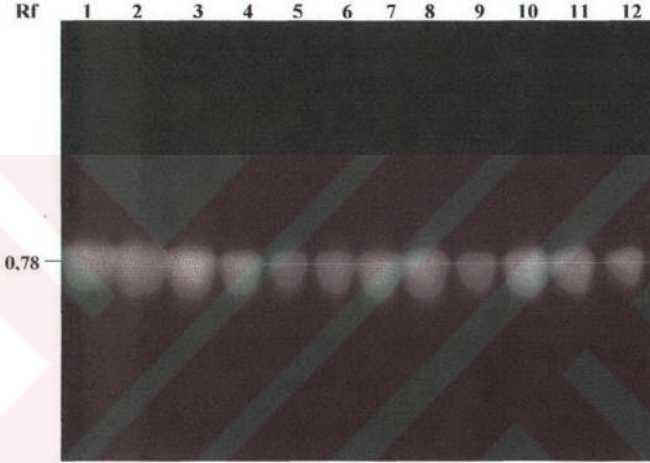


Şekil 20. GA₃ ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde SOD aktivitesindeki değişiklikler (Barlar dört tekerrürlü ölçümlerin standart sapmalarını göstermektedir. Her bir zaman diliminde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 (P>0,05) seviyesinde önemsizdir)

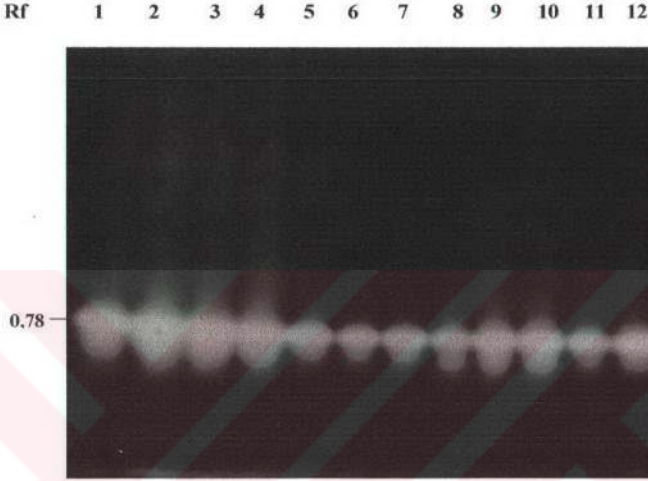
3.9. Büyüme Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının SOD İzoenzimlerine Etkileri

SOD izoenzimleri ile ilgili yapılan poliakrilamid jel elektroforezi sonucuna göre mısır fidelerinde Rf değeri 0,78 olan tek bir SOD izoenzim bandı belirlendi (Şekil 21, 22, 23). Bu izoenzim bandının, uygulamaların yapıldığı bütün fidelerde var olduğu ancak yoğunluğunun farklı olduğu gözlemlendi (Şekil 21, 22, 23). Paraquat uygulandıktan 8 ve 12 saat sonra yapılan jel elektroforezi sonuçlarına göre, paraquat uygulanan fidelerdeki SOD izoenziminin yoğunluğunun kontrole göre arttığı belirlendi (Şekil 21, 22). 24. saatte ise kontrole paraquat uygulanan fidelerdeki SOD izoenzimi arasında önemli bir farklılığın olmadığı gözlemlendi (Şekil 23). Poliaminlerle ön muamele yapılan fidelerde uygulanan poliamin ve konsantrasyona bağlı olarak SOD izoenziminin aktivitesinde farklılıklar gözlemlendi. PQ uygulandıktan 8 ve 12 saat sonra elde edilen numunelerden yapılan elektroforez sonuçlarına göre, SPM ile ön muamele yapılan fidelerdeki SOD izoenziminin

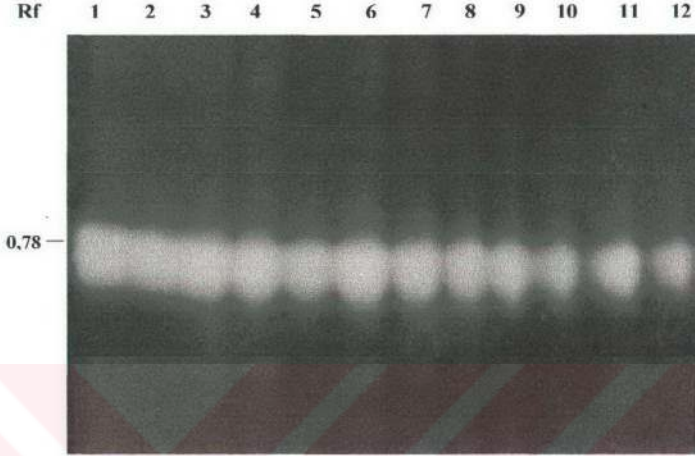
daha yoğun olduğu, 24. saatte ise SPM ve PUT ile ön muamele yapılan fidelerde SOD izoenzimi bakımından önemli bir farklılığın olmadığı belirlendi. BA ve GA₃ ile ön muamele yapılan fidelerde ise uygulanan büyüme düzenleyici madde çeşidine ve konsantrasyonlarına bağlı olarak SOD izoenziminin yoğunluğunda çok bariz bir değişim görülmeydi.



Şekil 21. Çeşitli konsantrasyonlarda büyüme düzenleyici maddelerle ön muamele yapılan mısır yapraklarındaki SOD izoenzimleri üzerine paraquatın 8 saat sonraki etkileri (1: Kontrol, 2: PQ, 3: 0,2 mM SPM+PQ, 4: 1 mM SPM+PQ, 5: 0,2 mM PUT+PQ, 6: 1 mM PUT+PQ, 7: 1 µM BA+PQ, 8: 10 µM BA+PQ, 9: 100 µM BA+PQ, 10: 1 µM GA₃+PQ, 11: 10 µM GA₃+PQ, 12: 100 µM GA₃+PQ)



Şekil 22. Çeşitli konsantrasyonlarda büyüme düzenleyici maddelerle ön muamele yapılan mısır yapraklarındaki SOD izoenzimleri üzerine paraquatın 12 saat sonraki etkileri (1: Kontrol, 2: PQ, 3: 0,2 mM SPM+PQ, 4: 1 mM SPM+PQ, 5: 0,2 mM PUT+PQ, 6: 1 mM PUT+PQ, 7: 1 μ M BA+PQ, 8: 10 μ M BA+PQ, 9: 100 μ M BA+PQ, 10: 1 μ M GA₃+PQ, 11: 10 μ M GA₃+PQ, 12: 100 μ M GA₃+PQ)

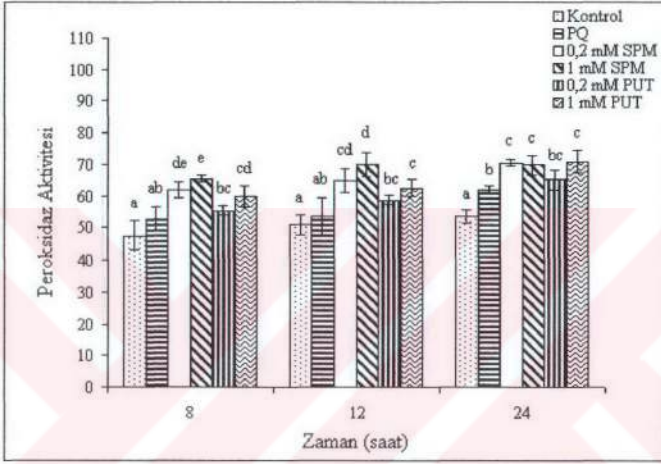


Şekil 23. Çeşitli konsantrasyonlarda büyümeyi düzenleyici maddelerle ön muamele yapılan mısır yapraklarındaki SOD izoenzimleri üzerine paraquatın 24 saat sonraki etkileri (1: Kontrol, 2: PQ, 3: 0,2 mM SPM+PQ, 4: 1 mM SPM+PQ, 5: 0,2 mM PUT+PQ, 6: 1 mM PUT+PQ, 7: 1 μ M BA+PQ, 8: 10 μ M BA+PQ, 9: 100 μ M BA+PQ, 10: 1 μ M GA₃+PQ, 11: 10 μ M GA₃+PQ, 12: 100 μ M GA₃+PQ)

3.10. Büyümeyi Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının Peroksidaz Aktivitesine Etkileri

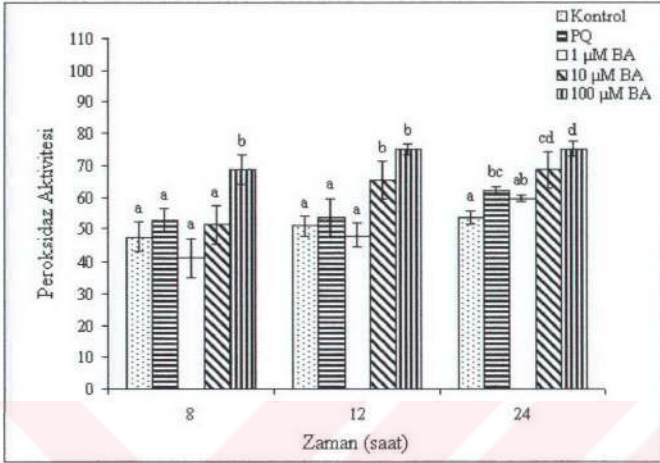
PQ uygulamasından 8, 12 ve 24 saat sonra yapılan ölçümlerde kontrolle mukayese edildiğinde peroksidaz aktivitesinin arttığı ancak sadece 24. saatteki artışın istatistikî (P=0,05) bakımdan önemli olduğu belirlendi (Şekil 24). Farklı konsantrasyonlarda (0,2 ve 1 mM) SPM ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fidelerdeki peroksidaz aktivitesinin SPM ile ön muamele yapılmamış fideler ve kontrole nazaran istatistikî bakımdan önemli ölçüde arttığı görüldü. Konsantrasyonlar arasında önemli bir farklılık olmasa bile 1 mM SPM'nin peroksidaz aktivitesini artırmada daha etkili olduğu tespit edildi. PUT ile ön muamele yapılan fidelerde ise kontrolle mukayese edildiğinde her iki PUT konsantrasyonunun istatistikî bakımdan önemli ölçüde peroksidaz aktivitesini artırdığı görüldü. PUT ile ön muamele yapılmamış PQ uygulanmış fidelerle kıyaslandığında, PUT'un 0,2 ve 1 mM'lık konsantrasyonlarının peroksidaz aktivitesini

artırdığı ancak 1 mM PUT'un etkisinin istatistiki bakımdan önemli olduğu belirlendi. 24. saat itibarıyla PUT ve SPM'nin peroksidaz aktivitesine etkisi bakımından aralarında önemli bir farkın olmadığı ancak 8. ve 12. saatlerde 1 mM SPM'nin PUT'a nazaran peroksidaz aktivitesini önemli ölçüde artırdığı görüldü (Şekil 24).



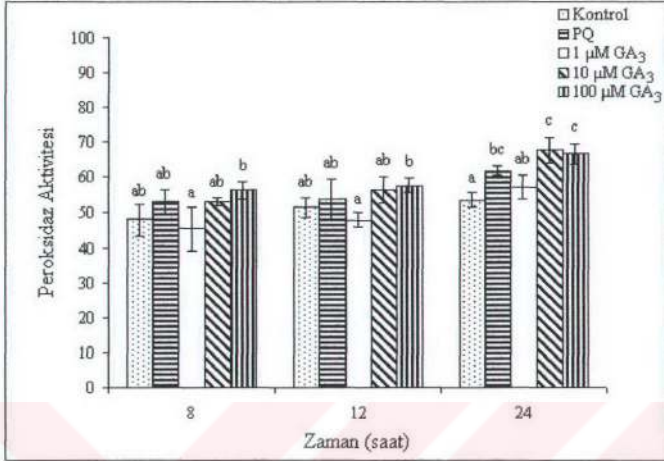
Şekil 24. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde POD aktivitesindeki değişiklikler (Barlar dört tekerrürlü ölçümlerin standart sapmalarını göstermektedir. Her bir zaman diliminde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

Farklı konsantrasyonlarda BA ile ön muamele yapılan fidelerde 100 μ M BA'nın bütün zaman dilimlerinde hem kontrol hem de BA ile ön muamele yapılmamış fidelere nazaran önemli ölçüde peroksidaz aktivitesini artırdığı tespit edildi. 1 μ M BA ile ön muamele yapılan fidelerdeki peroksidaz aktivitesinin kontrol ve sadece PQ uygulanan fidelere göre önemli ölçüde değişmediği görüldü. 10 μ M BA ile ön muamele yapılan fidelerdeki peroksidaz aktivitesinin ise PQ uygulandıktan 12 saat sonra istatistiki bakımdan önemli oranda arttığı, 24. saatte ise kontrole göre önemli olan artışın sadece PQ uygulanan fidelere nazaran istatistiki bakımdan önemli olmadığı belirlendi (Şekil 25).



Şekil 25. BA ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde POD aktivitesindeki değişiklikler (Barlar dört tekerrürlü ölçümlerin standart sapmalarını göstermektedir. Her bir zaman diliminde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

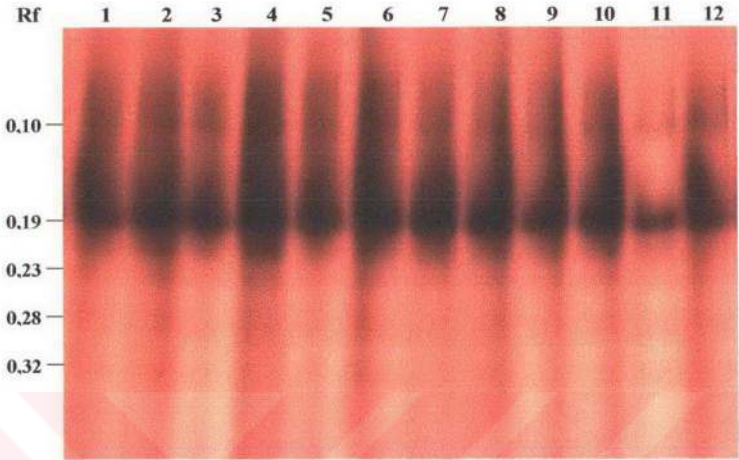
GA_3 ile ön muamele yapılan fidelerdeki peroksidaz aktivitesinin GA_3 ile ön muamele yapılmamış fidelere göre istatistiki bakımdan önemli ölçüde değişmediği bulundu. Ancak 10 ve 100 μM GA_3 uygulanan fidelerdeki peroksidaz aktivitesinin 1 μM GA_3 ile ön muamele yapılanlara nazaran istatistiki bakımdan önemli ölçüde arttığı görüldü (Şekil 26).



Şekil 26. GA₃ ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde POD aktivitesindeki değişiklikler (Barlar dört tekerrürlü ölçümlerin standart sapmalarını göstermektedir. Her bir zaman diliminde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

3.11. Büyüme Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının Peroksidaz İzoenzimlerine Etkileri

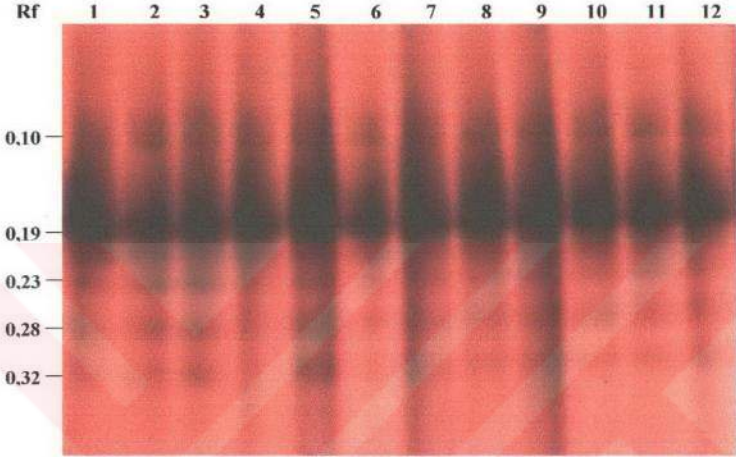
Peroksidaz izoenzimleriyle ilgili yapılan jel elektroforezi sonuçlarına göre mısır yapraklarında Rf değerleri sırasıyla 0,10; 0,19; 0,23; 0,28 ve 0,32 olan 5 tane peroksidaz izoenzim bandının olduğu tespit edildi (Şekil 27, 28, 29). En yoğun izoenzim bantlarının 0,10 ve 0,19 Rf civarında olduğu belirlendi. PQ uygulamasından 8 saat sonra elde edilen numunelerden yapılan elektroforez sonucuna göre Rf değeri 0,10 ve 0,19 olan izoenzim bantlarının çok yoğun diğer bantların ise çok zayıf oldukları görüldü (Şekil 27). Rf değeri 0,19 olan izoenzim en yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlendi. PQ uygulamasından 12 ve 24 saat sonra ise bütün bantların koyuluklarının ve kalınlıklarının gittikçe arttığı belirlendi (Şekil 28, 29). Özellikle 24. saatte izoenzim bantlarında daha fazla kalınlaşma ve koyulaşmanın olduğu tespit edildi.



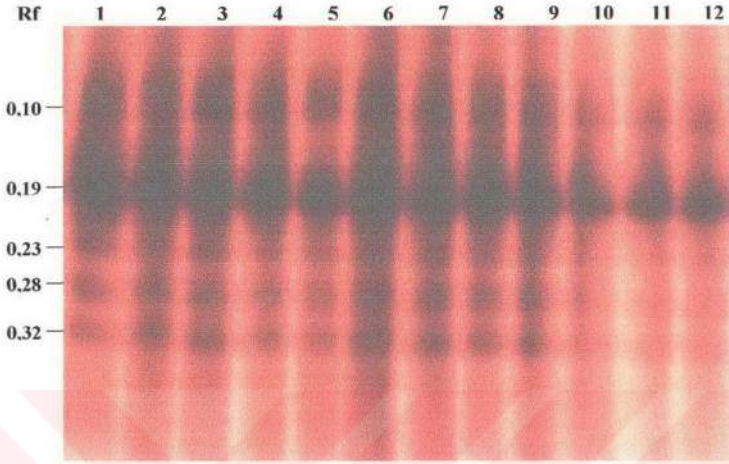
Şekil 27. Çeşitli konsantrasyonlarda büyümeyi düzenleyici maddelerle ön muamele yapılan mısır yapraklarındaki peroksidaz izoenzimleri üzerine paraquatın 8 saat sonraki etkileri (1: Kontrol, 2: PQ, 3: 0,2 mM SPM+PQ, 4: 1 mM SPM+PQ, 5: 0,2 mM PUT+PQ, 6: 1 mM PUT+PQ, 7: 1 μ M BA+PQ, 8: 10 μ M BA+PQ, 9: 100 μ M BA+PQ, 10: 1 μ M GA₃+PQ, 11: 10 μ M GA₃+PQ, 12: 100 μ M GA₃+PQ)

Kontrolle mukayese edildiğinde PQ uygulamasının izoenzim bantlarının sayısında herhangi bir değişikliğe sebep olmadığı yalnızca bantların koyuluk ve kalınlığını etkilediği gözlemlendi. Paraquat uygulanan fidelerdeki peroksidaz izoenzim bantlarının kontrole göre daha koyu oldukları belirlendi. Büyümeyi düzenleyici maddelerle ön muamele yapmanın da izoenzim bantlarının sayısını etkilemediği ancak aktivitelerini etkilediği tespit edildi. SPM ve PUT ile ön muamele yapılan fidelerde uygulanan konsantrasyona bağlı olarak izoenzim bantlarında farklılıklar görüldü. 0,2 mM SPM ile ön muamele yapılan fidelerde PQ uygulamasından 12 ve 24 saat sonra Rf değerleri 0,23; 0,28 ve 0,32 olan izoenzim bantlarının daha aktif oldukları belirlendi. PUT'de ise 12 ve 24. saatlerde farklı sonuçlar kaydedildi. PQ uygulamasından 12 saat sonra 0,2 mM PUT ile ön muamele yapılan fidelerdeki izoenzim bantlarının aktiviteleri daha fazla iken, 24. saatte ise 1mM PUT ile ön muamele yapılan fidelerdeki izoenzim bantlarının aktivitelerinin daha fazla olduğu görüldü.

BA ve GA₃ uygulamalarında ise uygulanan konsantrasyona bağlı olarak önemli farklılıklar görülmedi. Ancak BA ile ön muamele yapılan fidelerdeki izoenzim bantlarının GA₃'e nazaran daha koyu oldukları görüldü.



Şekil 28. Çeşitli konsantrasyonlarda büyüme düzenleyici maddelerle ön muamele yapılan mısır yapraklarındaki peroksidaz izoenzimleri üzerine paraquatın 12 saat sonraki etkileri (1: Kontrol, 2: PQ, 3: 0,2 mM SPM+PQ, 4: 1 mM SPM+PQ, 5: 0,2 mM PUT+PQ, 6: 1 mM PUT+PQ, 7: 1 µM BA+PQ, 8: 10 µM BA+PQ, 9: 100 µM BA+PQ, 10: 1 µM GA₃+PQ, 11: 10 µM GA₃+PQ, 12: 100 µM GA₃+PQ)

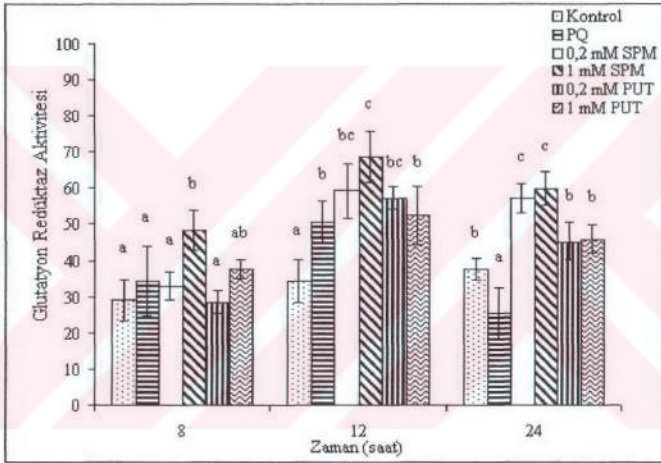


Şekil 29. Çeşitli konsantrasyonlarda büyümeyi düzenleyici maddelerle ön muamele yapılan mısır yapraklarındaki peroksidaz izoenzimleri üzerine paraquatın 24 saat sonraki etkileri (1: Kontrol, 2: PQ, 3: 0,2 mM SPM+PQ, 4: 1 mM SPM+PQ, 5: 0,2 mM PUT+PQ, 6: 1 mM PUT+PQ, 7: 1 μ M BA+PQ, 8: 10 μ M BA+PQ, 9: 100 μ M BA+PQ, 10: 1 μ M GA₃+PQ, 11: 10 μ M GA₃+PQ, 12: 100 μ M GA₃+PQ)

3.12. Büyümeyi Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının GR Aktivitesine Etkileri

Kontrolle karşılaştırıldığında PQ uygulamasından 8 ve 12 saat sonra GR aktivitesinin arttığı ancak sadece 12. saatteki artışın istatistiksel ($P=0,05$) bakımdan önemli olduğu görüldü. PQ uygulamasından 24 saat sonra yapılan ölçümlerde ise GR aktivitesinin istatistiksel bakımdan önemli ölçüde azaldığı tespit edildi (Şekil 30). SPM ile ön muamele yapılan fidelede, PQ uygulamasından 8 ve 12 saat sonra, 1 mM SPM'nin hem kontrol hem de SPM ile ön muamele yapılmamış fidelere nazaran GR aktivitesini istatistiksel bakımdan önemli ölçüde arttırdığı görüldü. 0,2 mM SPM'nin ise PQ uygulamasından 8 saat sonra GR aktivitesi üzerine olan etkisinin hem kontrol hem de sadece PQ uygulanan fidelere kıyasla istatistiksel bakımdan önemli olmadığı ancak 12. saatteki etkisinin kontrole göre önemli olduğu belirlendi. Her iki SPM konsantrasyonu ile ön muamele yapılan fidelelerdeki GR aktivitesinin, PQ uygulamasından 24 saat sonra kontrol ve sadece PQ uygulanmış

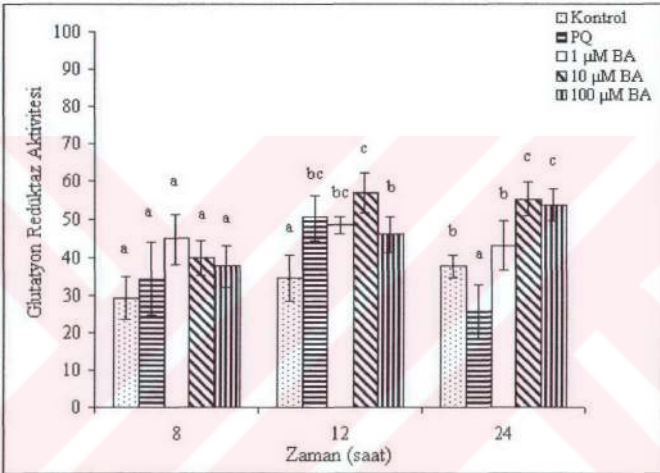
fidelere nazaran önemli ölçüde arttığı kaydedildi. PUT'un 0,2 ve 1 mM'lık konsantrasyonlarıyla ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fidelerdeki GR aktivitesinin 8. saatte kontrol ve PUT ile ön muamele yapılmamış fidelere nazaran istatistiki olarak önemli ölçüde değişmediği, 12. saatte ise kontrole kıyasla önemli olan artışın sadece PQ uygulanan fidelere nazaran önemli olmadığı görüldü. 0,2 ve 1 mM PUT ile ön muamele yapılmış fidelerdeki GR aktivitesinin, PQ uygulandıktan 24 saat sonra, PUT ile ön muamele yapılmamış ve PQ uygulanan fidelerdekine kıyasla istatistiki bakımdan önemli ölçüde arttığı, kontrole göre ise önemli ölçüde değişmediği belirlendi (Şekil 30).



Şekil 30. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde GR aktivitesindeki değişiklikler (Barlar dört tekrürlü ölçümlerin standart sapmalarını göstermektedir. Her bir zaman diliminde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

BA ile ön muamele yapılan fidelerdeki GR aktivitesinin PQ uygulamasından 8 saat sonra kontrol ve sadece PQ uygulanan fidelere nazaran istatistiki bakımdan önemli ölçüde değişmediği tespit edildi. PQ uygulamasından 12 saat sonra yapılan ölçümlere bakıldığında, BA ile ön muamele yapılan fidelerdeki GR aktivitesinin kontrole göre önemli ölçüde arttığı fakat sadece PQ uygulanan fidelerdekine kıyasla bu artışın önemli olmadığı

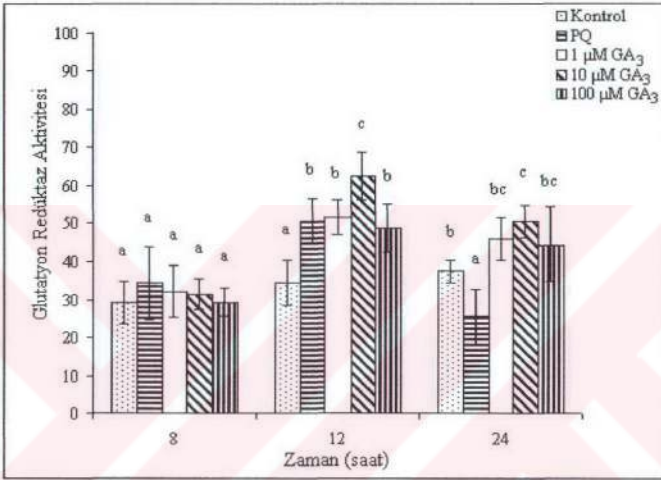
belirlendi. PQ uygulamasından 24 saat sonra yapılan ölçümlerde ise BA'nın 10 ve 100 μM 'lık konsantrasyonlarıyla ön muamele yapılan fidelerdeki GR aktivitesinin hem kontrol hem de sadece PQ uygulanan fidelere nazaran istatistiki bakımdan önemli ölçüde arttığı, 1 μM BA ile ön muamele yapılan fidelerde ise GR aktivitesinde belirlenen artışın sadece PQ uygulanan fidelere nazaran önemli olduğu, kontrole göre ise önemli olmadığı tespit edildi (Şekil 31).



Şekil 31. BA ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde GR aktivitesindeki değişiklikler (Barlar dört tekerrürlü ölçümlerin standart sapmalarını göstermektedir. Her bir zaman diliminde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P > 0,05$) seviyesinde önemsizdir)

Farklı konsantrasyonlarda GA_3 ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fidelerdeki GR aktivitesinin PQ uygulandıktan 8 saat sonra hem kontrol hem de GA_3 ile ön muamele yapılmamış ve PQ uygulanmış fidelerdekine kıyasla istatistiki bakımdan önemli ölçüde değişmediği görüldü. 12. ve 24. saatlerde ise, 10 μM GA_3 ile ön muamele yapılan fidelerdeki GR aktivitesinin kontrol ve sadece PQ uygulanmış fidelerdekine nazaran istatistiki bakımdan önemli oranda arttığı belirlendi. 1 ve 100 μM GA_3 ile ön muamele yapılan fidelerde ise, PQ uygulandıktan 12 saat sonra GR aktivitesinde belirlenen artışın

kontrole göre önemli olduğu fakat sadece PQ uygulanan fidelerdekine kıyasla önemli olmadığı görüldü. 24. saatte ise 1 ve 100 μM GA_3 ile ön muamele yapılan fidelerdeki GR aktivitesinin GA_3 ile ön muamele yapılmamış fidelere nazaran önemli ölçüde arttığı, kontrole göre ise bu artışın istatistiki yönden önemli olmadığı belirlendi (Şekil 32).

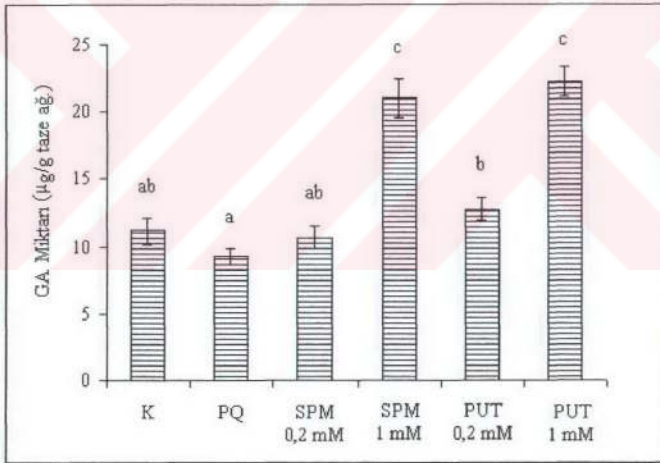


Şekil 32. GA_3 ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde GR aktivitesindeki değişiklikler (Barlar dört tekerrürlü ölçümlerin standart sapmalarını göstermektedir. Her bir zaman diliminde aynı harflerle gösterilen sütunlar arasındaki fark % 5 ($P > 0,05$) seviyesinde önemsizdir)

Genel olarak bakıldığında PQ uygulandıktan 24 saat sonra GR aktivitesinde belirlenen % 32,1'lik azalmanın BDM ile ön muamele yapılan fidelerde engellendiği görülmüştür. BA'nın 10 ve 100 μM , GA_3 'ün 10 μM ve SPM'nin 0,2 ve 1 mM'lık konsantrasyonlarının PQ uygulandıktan 24 saat sonra kontrole göre istatistiki yönden önemli artışlara sebep olduğu belirlenmiştir.

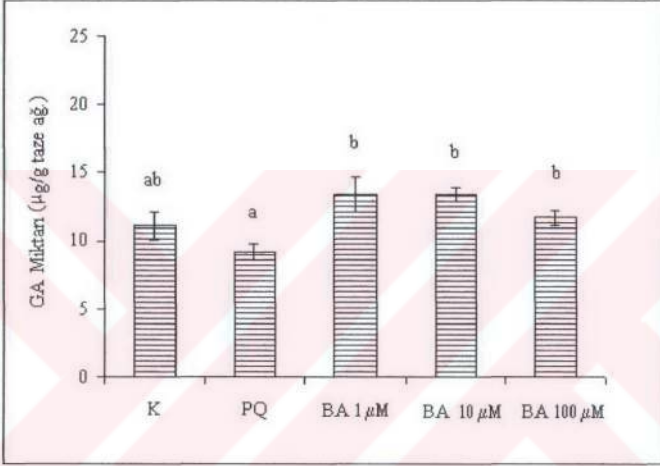
3.13. Büyüme Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının Endojenik Giberellik Asit (GA) Miktarına Etkileri

PQ uygulanmasıyla birlikte fidelerdeki GA miktarının azaldığı görüldü. PQ uygulamasından 24 saat sonra GA içeriğinde % 16,8'lik bir azalma meydana geldi. Kontrolle karşılaştırıldığında, PQ uygulanan fidelerde belirlenen bu azalmanın istatistiki ($P=0,05$) bakımdan önemli olmadığı tespit edildi (Şekil 33). 1 mM SPM ve PUT ile ön muamele yapılan fidelerdeki GA miktarının hem kontrol hem de sadece PQ uygulanan fidelerdekine daha fazla olduğu belirlendi. 0,2 mM SPM ile ön muamele yapılan fidelerdeki GA miktarının kontrol ve sadece PQ uygulanan fidelerdekine oranla istatistiki bakımdan farklı olmadığı, 0,2 mM PUT ile ön muamele yapılan fidelerdeki GA miktarının ise kontrole göre önemli ölçüde değişmediği ancak sadece PQ uygulanan fidelerdekine nazaran daha fazla olduğu görüldü (Şekil 33).



Şekil 33. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde GA miktarındaki değişiklikler (Barlar üç tekerrürlü ölçümlerin standart sapmalarını göstermektedir. Her bir sütunda aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark %5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

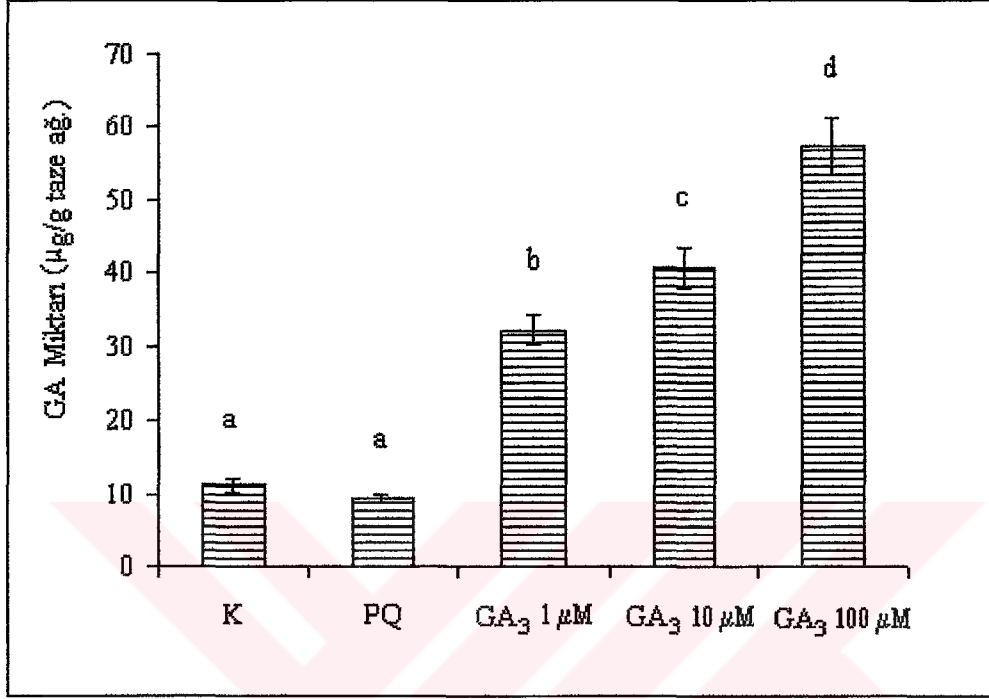
BA ile ön muamele yapılan fidelerdeki GA miktarının, kontrole göre önemli ölçüde değişmediği ancak sadece PQ uygulanan fidelerdekine nazaran daha fazla olduğu belirlendi. 1 ve 10 μM BA ile ön muamele yapılmış fidelerdeki GA miktarının, sadece PQ uygulanan fidelerdekini yaklaşık 1,5 katı olduğu ve bu fazlalığın istatistiki bakımdan önemli olduğu tespit edildi (Şekil 34).



Şekil 34. BA ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde GA miktarındaki değişiklikler (Barlar üç tekerrürlü ölçümlerin standart sapmalarını göstermektedir. Her bir sütunda aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark %5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

GA_3 ile ön muamele yapılan fidelerdeki içsel GA miktarının önemli ölçüde arttığı görüldü. GA miktarındaki artışın uygulanan konsantrasyona bağlı olarak değiştiği belirlendi. Uygulanan GA_3 konsantrasyonu arttıkça yapraklardaki GA miktarının da arttığı görüldü. Kontrol fidelerinde 11,1 $\mu\text{g/g}$ olan GA miktarının, 1, 10 ve 100 μM GA_3 uygulanan fidelerde sırasıyla, 32,1; 40,6 ve 57,2 $\mu\text{g/g}$ olduğu tespit edildi. 1, 10 ve 100 μM GA_3 ile ön muamele yapılan fidelerdeki GA miktarının, hem kontrol hem de sadece PQ

uygulanana fidelerdekine nazaran arttığı ve bu artışın istatistiki bakımdan önemli olduğu belirlendi (Şekil 35).

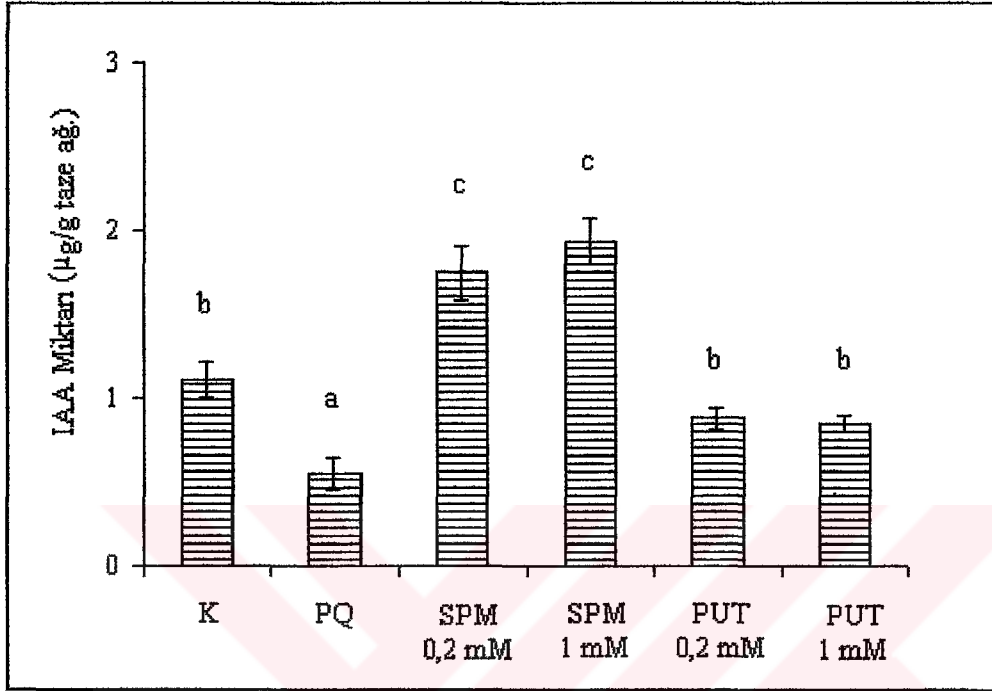


Şekil 35. GA₃ ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde GA miktarındaki değışiklikler (Barlar üç tekerrürlü ölçümlerin standart sapmalarını göstermektedir. Her bir sütunda aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark %5 (P>0,05) seviyesinde önemsizdir)

3.14. Büyüme Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının Endojenik İndol Asetik Asit (IAA) Miktarına Etkileri

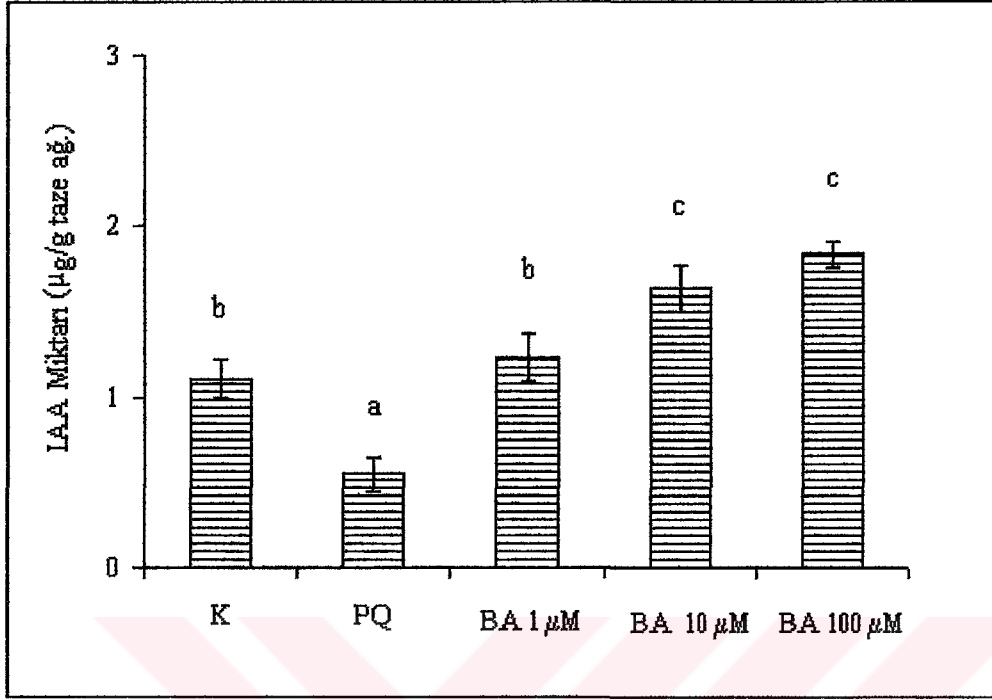
PQ uygulanan fidelerdeki IAA miktarının, kontrole oranla istatistiki (P=0,05) bakımdan önemli ölçüde azaldığı görüldü. Kontrole karşılaştırıldığında, PQ uygulandıktan 24 saat sonra IAA miktarının % 50 oranında azaldığı belirlendi (Şekil 36). SPM'nin 0,2 ve 1 mM'lık konsantrasyonlarıyla ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fidelerdeki IAA miktarının kontrol ve SPM ile ön muamele yapılmamış fidelere nazaran istatistiki bakımdan önemli ölçüde arttığı görüldü. PUT ile ön muamele yapılan fidelerdeki IAA miktarının ise sadece PQ uygulanan fidelerdekinden daha fazla olduğu, kontrole ise aralarında önemli bir farklılığın olmadığı belirlendi. Ayrıca SPM ile ön muamele yapılan

fidelerdeki IAA miktarının, PUT ile ön muamele yapılan fidelerdekine nazaran önemli ölçüde arttığı görüldü (Şekil 36).



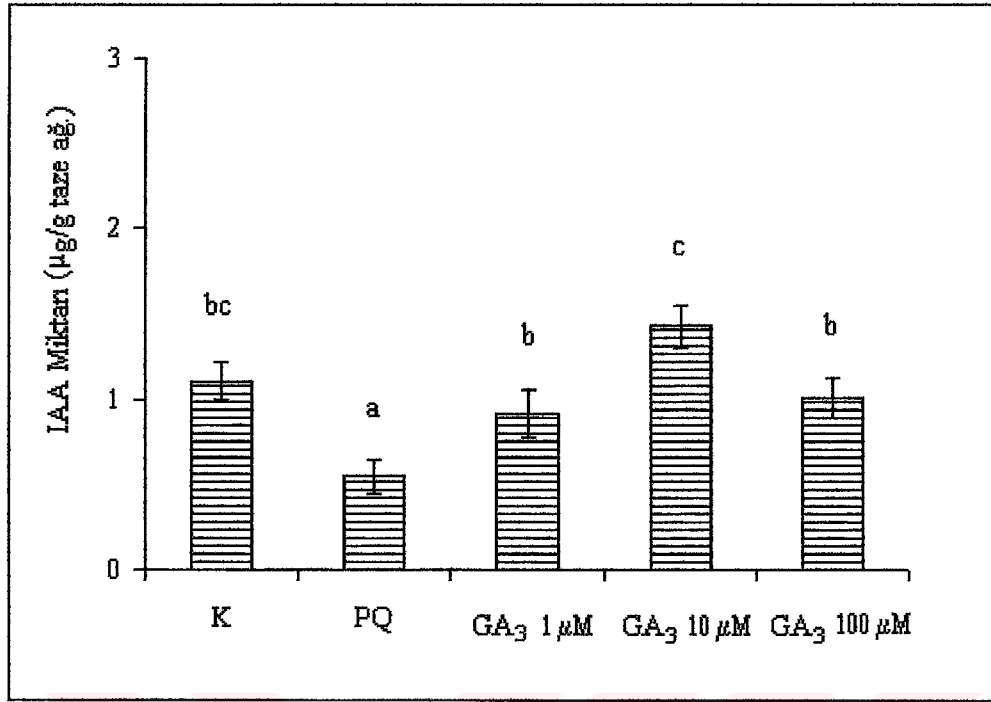
Şekil 36. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde IAA miktarındaki değişiklikler (Barlar üç tekerrürlü ölçümlerin standart sapmalarını göstermektedir. Her bir sütunda aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark %5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

10 ve 100 μM BA ile ön muamele yapılan fidelerdeki IAA miktarının hem kontrol hem de sadece PQ uygulanan fidelere nazaran istatistiki bakımdan önemli oranda arttığı belirlendi. Kontrol fidelerinde 1,1 $\mu\text{g/g}$ olan IAA miktarının 10 ve 100 μM BA ile ön muamele yapılan fidelere sırasıyla 1,6 ve 1,8 $\mu\text{g/g}$ olduğu bulundu. 1 μM BA ile ön muamele yapılan fidelerdeki IAA miktarının ise sadece PQ uygulanan fidelere nazaran arttığı, kontrole göre ise önemli ölçüde değişmediği görüldü (Şekil 37).



Şekil 37. BA ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde IAA miktarındaki değişiklikler (Barlar üç tekerrürlü ölçümlerin standart sapmalarını göstermektedir. Her bir sütunda aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark %5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

Farklı konsantrasyonlarda GA_3 ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fidelerdeki IAA miktarının sadece PQ uygulanmış fidelerdekinden daha fazla olduğu bulundu. GA_3 'ün 10 µM'lık konsantrasyonunun daha etkili olduğu tayin edildi. Kontrolle kıyaslandığında, GA_3 ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fidelerdeki IAA miktarının istatistiki bakımdan önemli ölçüde değişmediği görüldü (Şekil 38).

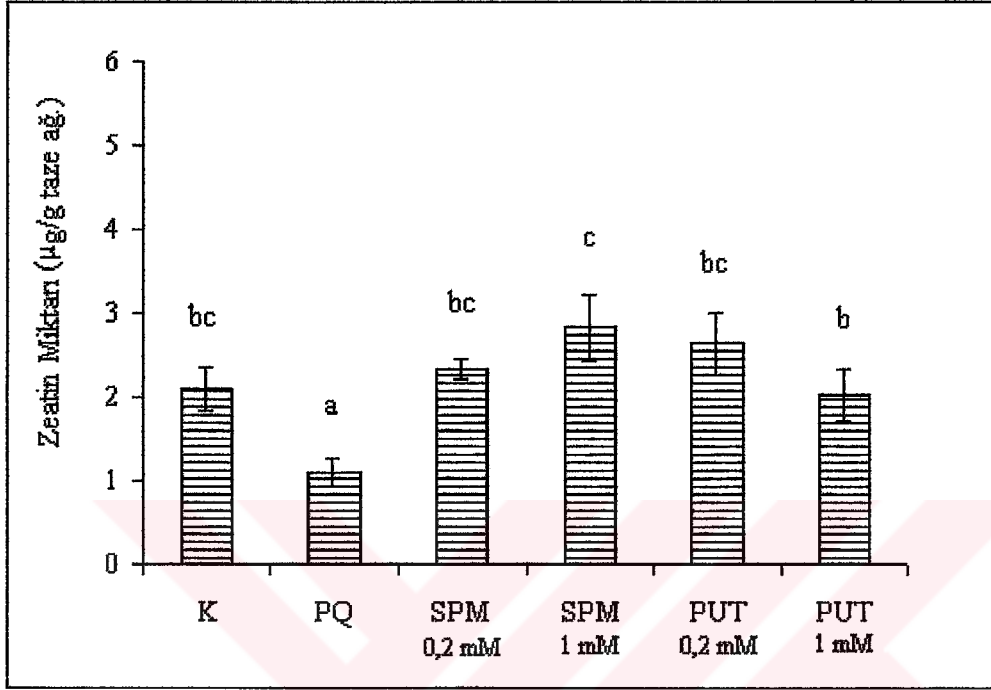


Şekil 38. GA₃ ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde IAA miktarındaki değişiklikler (Barlar üç tekerrürlü ölçümlerin standart sapmalarını göstermektedir. Her bir sütunda aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark %5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

3.15. Büyüme Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının Endojenik Zeatin (Z) Miktarına Etkileri

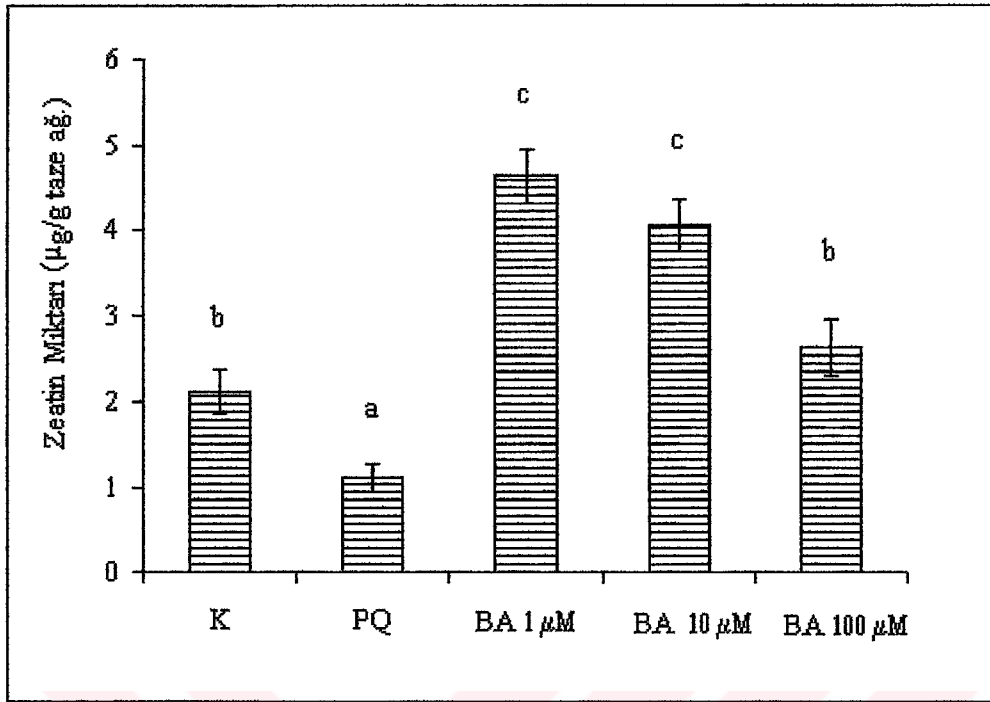
Kontrolle kıyaslandığında PQ uygulanan fidelerdeki Z miktarının azaldığı ve bu azalmanın istatistiki bakımdan önemli olduğu belirlendi. Kontrol fidelerinde 2,1 µg/g olan Z miktarının PQ uygulanan fidelerde 1,1 µg/g olduğu bulundu (Şekil 39). 0,2 ve 1 mM SPM ile ön muamele yapılan fidelerde, Z miktarında PQ'nın sebep olduğu azalmaların engellendiği belirlendi. Sadece PQ uygulanan fidelerdekine oranla, SPM ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fidelerdeki Z miktarının istatistiki bakımdan önemli ölçüde fazla olduğu görüldü. 0,2 mM SPM ile ön muamele yapılmış fidelerdeki Z miktarının sadece PQ uygulanmış fidelerdekine 2,1 katı, 1 mM SPM ile ön muamele yapılmış fidelerde ise 2,5 katı olduğu tespit edildi. Kontrolle karşılaştırıldığında ise SPM ile ön muamele yapılmış fidelerdeki Z miktarının istatistiki bakımdan önemli ölçüde değişmediği görüldü. PUT'un 0,2 ve 1 mM'lık konsantrasyonlarıyla ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fidelerdeki Z miktarının ise, sadece PQ uygulanmış fidelerdekine istatistiki

bakımdan önemli ölçüde fazla olduğu, ancak bu fazlalığın kontrole göre önemli olmadığı belirlendi (Şekil 39).



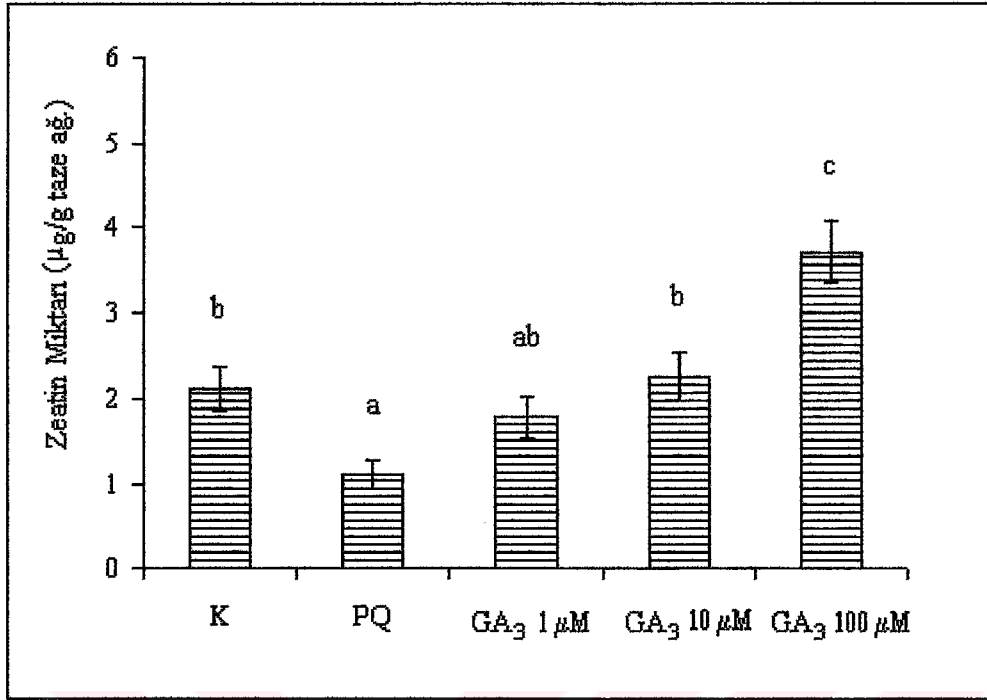
Şekil 39. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde Z miktarındaki değişiklikler (Barlar üç tekerrürlü ölçümlerin standart sapmalarını göstermektedir. Her bir sütunda aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark %5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

1 ve 10 μM BA ile ön muamele yapılan fidelerdeki Z miktarının kontrol ve sadece PQ uygulanmış fidelerdekine nazaran arttığı ve bu artışın istatistiki bakımdan önemli olduğu belirlendi. 100 μM BA ile ön muamele yapılan fidelerdeki Z miktarının ise kontrole göre önemli ölçüde değişmediği ancak sadece PQ uygulanan fidelerdekinden daha fazla olduğu bulundu. Sadece PQ uygulanmış fidelerde 1,1 $\mu\text{g/g}$ olan Z miktarının, 1, 10 ve 100 μM BA ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fidelerde sırasıyla 4,6; 4,0 ve 2,6 $\mu\text{g/g}$ olduğu tespit edildi (Şekil 40).



Şekil 40. BA ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde Z miktarındaki değişiklikler (Barlar üç tekerrürlü ölçümlerin standart sapmalarını göstermektedir. Herbir sütunda aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark %5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

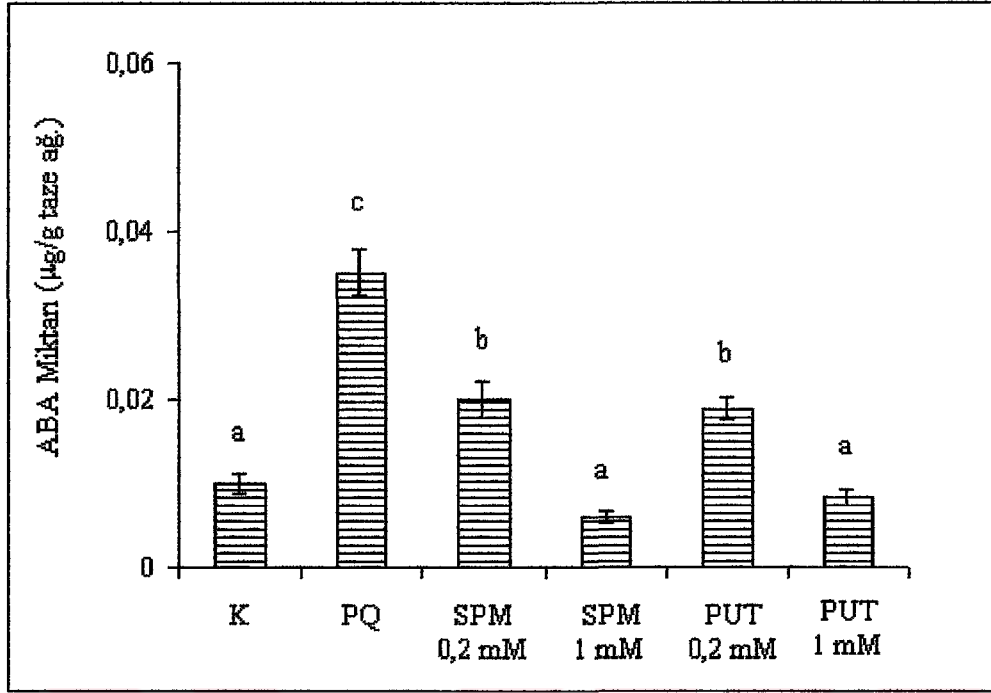
GA₃'ün 1 ve 10 µM'lık konsantrasyonlarıyla ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fidelerdeki Z miktarının, sadece PQ uygulanmış fidelerdekinden daha fazla olduğu bulundu. 100 µM GA₃ ile ön muamele yapılan fidelerdeki Z miktarının ise hem kontrol hem de sadece PQ uygulanan fidelerdekine nazaran arttığı görüldü (Şekil 41).



Şekil 41. GA₃ ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde Z miktarındaki değişiklikler (Barlar üç tekerrürlü ölçümlerin standart sapmalarını göstermektedir. Herbir sütunda aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark %5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

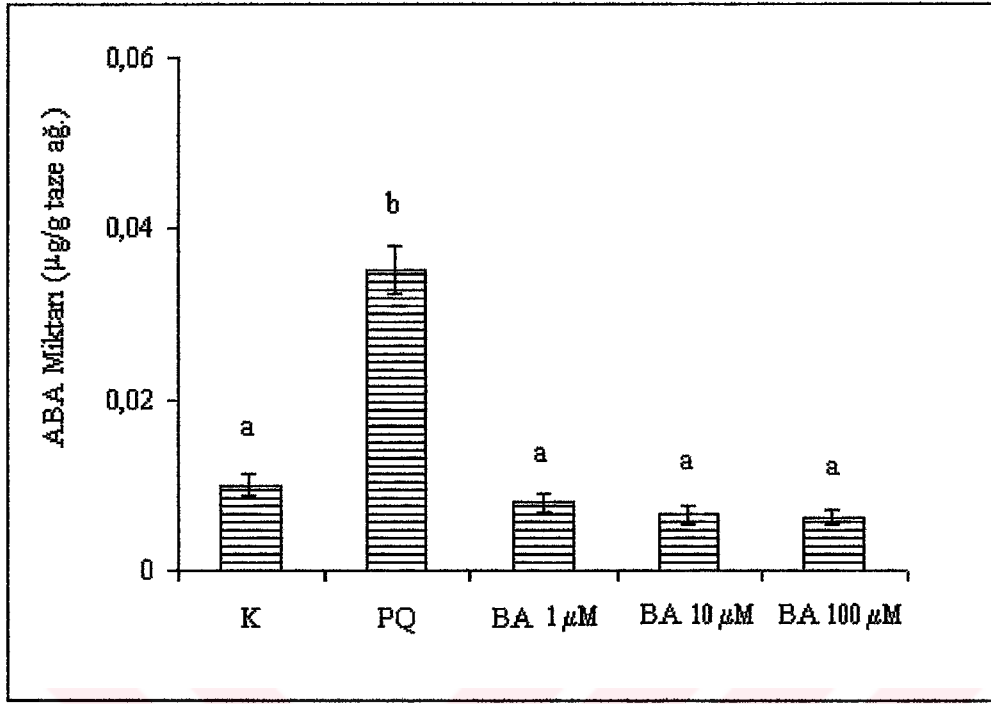
3.16. Büyümeyi Düzenleyici Madde ve Paraquat Uygulamalarının Endojenik Absisik Asit (ABA) Miktarına Etkileri

PQ uygulanan fidelerdeki ABA miktarının kontrole oranla arttığı ve bu artışın istatistiki bakımdan önemli olduğu belirlendi. SPM'nin 1 mM'lık konsantrasyonu ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanan fidelerdeki ABA miktarının kontrole kıyasla önemli ölçüde değişmediği, 0,2 mM SPM ile ön muamele yapılan fidelerdeki ABA miktarının ise kontrole oranla istatistiki bakımdan önemli ölçüde arttığı görüldü. PUT'un 0,2 ve 1 mM'lık konsantrasyonlarıyla ön muamele yapılan fidelerdeki ABA miktarının istatistiki bakımdan farklı olduğu, ancak her iki PUT konsantrasyonu ile ön muamele yapılan fidelerdeki ABA miktarının sadece PQ uygulanan fidelerdekine oranla istatistiki olarak önemli ölçüde azaldığı belirlendi. Kontrolle karşılaştırıldığında ise 1 mM PUT ile ön muamele yapılan fidelerdeki ABA miktarının önemli oranda değişmediği, 0,2 mM PUT ile ön muamele yapılan fidelerdeki ABA miktarının ise arttığı ve bu artışın istatistiki bakımdan önemli olduğu tayin edildi (Şekil 42).



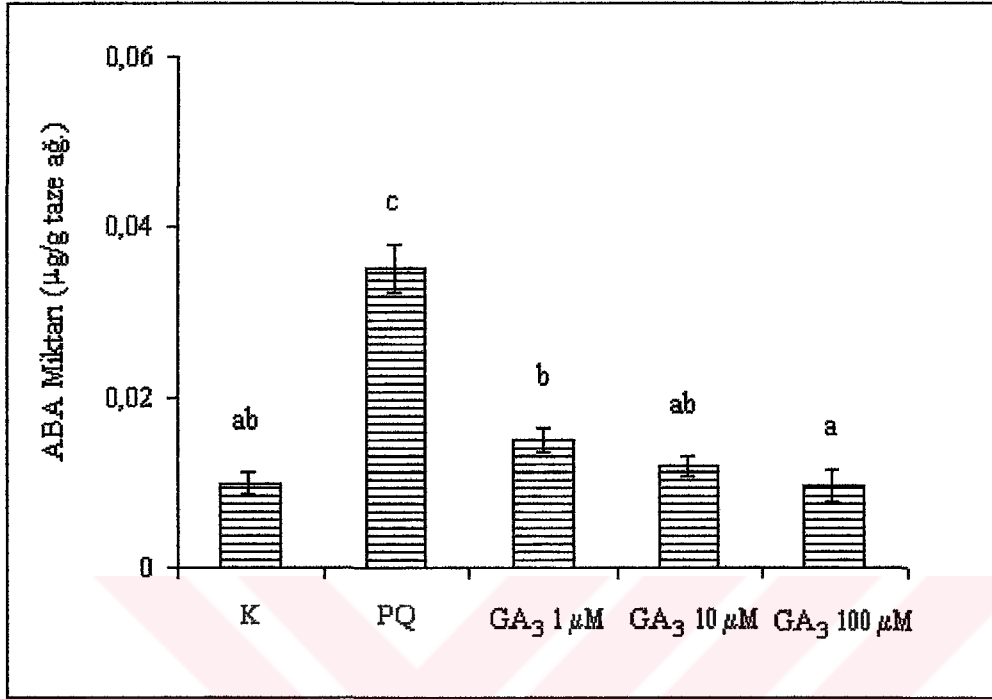
Şekil 42. Poliaminlerle ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde ABA miktarındaki değişiklikler (Barlar üç tekerrürlü ölçümlerin standart sapmalarını göstermektedir. Her bir sütunda aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark %5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

BA ile ön muamele yapılan fidelerdeki ABA miktarının kontroldekinden farklı olmadığı, ancak BA ile ön muamele yapılmamış ve PQ uygulanmış fidelerdekine oranla istatistiki olarak önemli ölçüde azaldığı belirlendi. Uygulanan BA konsantrasyonları arasında istatistiki olarak önemli bir farklılığın olmadığı görüldü (Şekil 43).



Şekil 43. BA ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde ABA miktarındaki değişiklikler (Barlar üç tekerrürlü ölçümlerin standart sapmalarını göstermektedir. Her bir sütunda aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark %5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

1 ve 10 μM GA_3 ile ön muamele yapılmış ve PQ uygulanmış fidelerdeki ABA miktarının, kontrole oranla arttığı ancak bu artışın istatistiki bakımdan önemli olmadığı tespit edildi. 100 μM GA_3 ile ön muamele yapılan fidelerdeki ABA miktarının ise kontroldekinden farklı olmadığı belirlendi (Şekil 44). Sadece PQ uygulanmış fidelerle kıyaslandığında, GA_3 ile ön muamele yapılan fidelerdeki ABA içeriğinin istatistiki olarak önemli ölçüde azaldığı görüldü.



Şekil 44. GA₃ ile ön muamele yapılan ve PQ uygulanan mısır fidelerinde ABA miktarındaki değişiklikler (Barlar üç tekerrürlü ölçümlerin standart sapmalarını göstermektedir. Her bir sütunda aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark %5 ($P>0,05$) seviyesinde önemsizdir)

4. İRDELEME

Paraquat herbisitinin mısır fidelerinin yapraklarındaki nispi su içeriği, toplam klorofil, çözünebilir protein, bazı antioksidant madde ve enzimler üzerindeki etkileri ile çeşitli içsel hormonların (GA, IAA, Z ve ABA) miktarlarında meydana getirdiği değişiklikler incelenmiştir. Ayrıca farklı konsantrasyonlarda BDM (SPM, PUT, GA₃ ve BA) ile ön muamele yapmanın, paraquatın sözkonusu parametreler üzerindeki etkilerine katkı sağlayıp sağlamadığı araştırılmış ve böylece kullanılan BDM'lerin mısır fidelerinin oksidatif strese karşı toleransını geliştirip geliştirmediği belirlenmiştir.

Paraquat gibi bipiridil (bipyridyl) herbisitler redoks aktif bileşiklerdir. Hücre içerisinde indirgenirler ve süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türlerinin üretilmesiyle bitkilere zarar verirler (Dodge, 1971; Elstner vd., 1988). Bu bileşikler esas aktivitelerini ışıpta gösterirler. Çünkü fotosistem I bu bileşiklerin indirgenmesinde etkilidir. Fotosistem I tarafından paraquatın indirgenmesi süresince üretilen reaktif O₂ türleri paraquatın bitkide hasar oluşturmamasını katalizlerler. Yani paraquatın toksikliğinin gelişmesi için ışık ve oksijen gereklidir (Mees, 1960; Chia vd., 1982). Bu nedenle çalışmamızda bitkiler paraquat püskürtüldükten sonra 8, 12 ve 24 saat boyunca iklim dolabında ışıklandırıldılar. Paraquat uygulandıktan 12 saat sonra yaprakların adaksial yüzlerinde beyaz ve kahverengi nekrotik lekeler oluşmuş, 24 saat sonra ise yaprakların solmaya başladıkları görülmüştür. Mısır yapraklarında görülen bu paraquat toksikliğinin bazı hormon veya poliaminlerle ön muameleden sonra azaltılabileceği düşünülmüştür. Nitekim bir stres olayına karşı bitki toleransını artırmak amacıyla yapılan çalışmalarda, denenen bileşikler arasında antisenesens ajanlar, büyüme düzenleyicileri ve antioksidant maddeler vardır (Carnahan vd., 1978; Ormrod, Beckerson, 1986). Bu nedenle bitkiler paraquat püskürtülmeden önce farklı konsantrasyonlarda PUT, SPM, GA₃ ve BA ile ön muameleye tabi tutulmuştur. Böylece bitkilerin PQ gibi reaktif oksijen türleri üreterek bitkilere zarar veren faktörlere karşı daha toleranslı hale getirilebilecekleri düşünülmüştür. Nitekim, PQ'nın süperoksit radikal üretimini hızlandıran etkili bir herbisit olduğu ve oksidatif stresi çalışmak için model olarak kullanılabileceği kaydedilmiştir (Asada, Takahashi, 1987; Bowler vd., 1994; Iturbe-Ormaetxe vd., 1998). Çünkü PQ'nın fotosentetik olarak üretilen süperoksit radikalleri aracılığıyla oksidatif stresi teşvik ettiği

bilinmektedir (Calderbank, 1968). Ayrıca, ozon ve kükürt dioksit gibi kirleticilerin de oksidatif stresi teşvik ettiği kaydedilmiştir (Shaaltiel vd., 1988; Tanaka vd., 1988).

Oksidatif strese sebep olan koşullara cevap olarak bitkilerdeki poliamin konsantrasyonları değişmektedir (Bors vd., 1989; Rowland-Bamford vd., 1989; Reddy vd., 1993). *Betula pendula*'da ozona maruz bırakma süresince poliaminleri kodlayan genlerin hızlıca teşvik edildiği ve artan putrescin miktarının bitkinin ozona toleransıya alakalı olduğu tespit edilmiştir (Tuomainen vd., 1996). Arpa bitkisiyle yapılan bir çalışmada ise poliamin sentezi önleildiğinde bitkilerin ozona duyarlı oldukları görülmüştür (Rowland-Bamford vd., 1989). Benzer şekilde, PQ toksikliğiyle poliamin miktarları arasında bağlantı olabileceği düşünülmektedir. Nitekim, Minton vd. (1990) spermidin (SPD) biyosentezi hatalı olan *E. coli* suşlarında PQ toksikliğinin 10 kat arttığını ve bu suşların SPD ihtiva eden bir ortamda büyütülmeleriyle PQ'a olan duyarlılıklarının yok edildiğini kaydetmişlerdir. Çalışmamızda ise PUT ve SPM ile ön muamele yapılan mısır yapraklarında PQ'nın teşvik ettiği görülebilir yaprak hasarlarının ön muamele yapılmamış olanlara nazaran tedrici olarak azaldığı söylenebilir. Bilindiği gibi paraquat reaktif oksijen türleri üreterek lipid peroksidasyonu ve membran hasarına sebep olmaktadır (Calderbank, 1968). Membran kararlılığındaki azalma, reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu lipid peroksidasyonunun büyüklüğünü göstermektedir (Dhindsa vd., 1981; Dhindsa, 1991). Poliaminlerin lipid peroksidasyonunu inhibe ederek oksidatif hasara karşı hücre savunma mekanizmasına katılmış olmaları muhtemeldir (Tadolini, 1988). Ayrıca poliaminlerin bitkilerdeki etkili antioksidant bileşiklerden olmaları (Benavides vd., 2000) ve direkt olarak serbest radikal temizleme özelliklerinin olması da etkili olmuş olabilir (Drolet vd., 1986; Bors vd., 1989). Nitekim, dışardan uygulanan poliaminlerin domates ve tütün bitkilerinde ozonun sebep olduğu yaprak nekrosislerinin şiddetini azalttığı ve oluşumlarını önlediği tespit edilmiştir (Ormrod, Beckerson, 1986; Bors vd., 1989).

Poliaminlerin yanısıra bitki hormonlarıyla ön muamelenin de paraquat toksikliğini azaltabileceği düşünülebilir. Nitekim, Mehlhorn (1990) etilenle ön muamele yapılmış fasulye yapraklarında PQ'nın oluşturduğu yaprak hasarlarının azaltıldığını göstermiştir. Ayrıca ozona maruz bırakılmış bitkilerde etilen üretiminin arttığı ve etilenle ön muamele yapılmış fasulye yaprakları ozona maruz bırakıldığında görülebilir yaprak hasarlarının oluşmadığı buna karşılık etilenle ön muamele yapılmamış bitkilerde şiddetli yaprak hasarlarının meydana geldiği belirlenmiştir (Mehlhorn, 1990). Çalışmamızda ise mısır fideleri PQ uygulanmadan önce BA ve GA₃ ile ön muamele yapılmış ve GA₃

uygulamasının az da olsa paraquatın oluşturduğu görülebilir yaprak hasarlarını azalttığı gözlenmiştir. Bu morfolojik bulgulardan sonra mısır fidelerinin yapraklarında biyokimyasal analizler yapılmıştır.

Çalışmamızda paraquat uygulanan mısır fidelerinde nispi su içeriğinin zamana bağlı olarak azaldığı ve PQ uygulanmasından 24 saat sonra nispi su içeriğinin % 61 olduğu bulunmuştur. Başka çalışmalarda da PQ uygulanan bitkilerdeki nispi su içeriğinin azaldığı tespit edilmiştir (Iturbe-Ormaetxe vd., 1998; Lorenzini vd., 2002). Bitkilerdeki su eksikliğinin reaktif oksijen türlerinin oluşumunu artırarak oksidatif stresi teşvik edebileceği düşünülmektedir (Price, Hendry, 1991; Smirnoff, 1993; Boo, Jung, 1999). Şöyleki, su eksikliği durumunda yapraklar su kaybını önlemek için stomalarını kapatırlar. Bu durum CO₂ alınımlarını azaltır ve bunun sonucunda CO₂ fiksasyon oranı da azalır. Fotosentetik elektron transport aktivitesi stoma kapanmasından etkilenmediği için, fotosentezin bu iki safhası arasında dengesizlik meydana gelir ve elektron transport sisteminin bileşenleri aşırı derecede indirgenirler. Bu durum fotosistem I'de O₂'nin indirgenmesini kolaylaştırır ve süperoksitin aşırı miktarda üretilmesine sebep olur (Baisak vd., 1994). Paraquatın da stoma kapanmasından dolayı CO₂ alınımlarını inhibe ettiği kaydedilmiştir (Kirtikara, Talbot, 1996; Lorenzini vd., 2002). Dolayısıyla yukarıda açıklanan durumun PQ uygulaması sonucu da meydana gelmesi muhtemeldir. Ayrıca paraquat uygulanan dokularda gösterildiği gibi, reaktif oksijen türlerinin membran lipidlerinin peroksidasyonunu teşvik ederek membranlarda hasarlar oluşturduğu tespit edilmiştir (Chia, vd., 1982; Kirtikara, Talbot, 1996; Chang, Kao, 1997). Bu nedenle çalışmamızda PQ uygulaması sonucu meydana gelen bu membran hasarlarından dolayı yapraklardaki nispi su içeriğinin azalmış olabileceği düşünülmektedir.

Spermin veya putrescinle ön muamele yapılan yapraklardaki nispi su içeriğinin ön muamele yapılmamış olanlara nazaran daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu fazlalığın sperminle ön muamele yapılan yapraklarda 12 ve 24. saatlerde, putrescinle ön muamele yapılanlar da ise 24. saatte istatistiki olarak önemli olduğu tespit edilmiştir. Spermin veya putrescinle ön muamele yapılan yapraklarda paraquatın teşvik ettiği su kaybının geciktirildiği söylenebilir. Poliaminlerin membran bütünlüğüne etki ederek su kaybını önlemiş olabilecekleri düşünülebilir. Nitekim, poliaminlerin paraquatın teşvik ettiği lipid peroksidasyonunu inhibe ederek oksidatif hasara karşı hücre savunma mekanizmasına katılabileceği ve membran bütünlüğünün devamında önemli fonksiyonlarının olabileceği kaydedilmiştir (Slocum vd., 1984; Tadolini, 1988). Ayrıca, düşük lipid peroksidasyonu ve

daha yüksek nispi su içeriği ile membran kararlılığı, mısırın (Pastori, Trippi, 1992) ve buğdayın (Kraus vd., 1995) strese toleranslı genotiplerinde rapor edilmiştir. Putrescin ve diğer poliaminler ya fosfolipidlerin transbilayer hareketini inhibe ederek (Bratton, 1994) ya da tilakoid membranların moleküler komplekslerini stabilize ederek membranlarla etkileşime girebilmektedirler (Popovic vd., 1979; Besford vd., 1993).

BA ve GA₃ ile ön muamele yapılan yapraklarda ise zamana ve konsantrasyona bağlı olarak farklılıklar görülmüştür. GA₃, uygulanan bütün konsantrasyonlarda 24. saatte paraquatın teşvik ettiği su kaybını istatistiki bakımdan önemli ölçüde azaltırken, BA'nın sadece 10 µM'lık konsantrasyonunun 24. saatte istatistiki anlamda su kaybını geciktirdiği, diğer konsantrasyonlarının ise istatistiki bakımdan önemli olmasa da su kaybını azalttıkları belirlenmiştir. Burada uygulanan hormonların membran bütünlüğüne etki ederek su kaybını engellemiş olabilecekleri düşünülmektedir.

Ayrıca paraquat uygulanan fidelerdeki toplam klorofil miktarının da zamanla azaldığı bulunmuştur. Özellikle PQ uygulamasından 12 ve 24 saat sonraki azalmaların istatistiki bakımdan önemli olduğu belirlenmiştir. 24 saatin sonunda PQ uygulanan fidelerdeki toplam klorofil miktarının % 41,6 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Masojidek vd. (1991)'da paraquat uygulaması yapılan *Sorghum* bitkisinde yaprak klorofil içeriğinin kontrol bitkisine göre büyük oranda azaldığını tespit etmişlerdir. Başka çalışmalarda da PQ uygulanan fidelerdeki toplam klorofil miktarının azaldığı kaydedilmiştir (Çakmak, Marschner, 1992; Pastori, Trippi, 1992; 1993; Chang, Kao, 1997; Iturbe-Ormaetxe vd., 1998; Lorenzini vd., 2002). Diğer taraftan PQ'nı uygulandığı dokularda klorofil yıkımını teşvik ettiği rapor edilmiştir (Sanders vd., 1992; Çakmak, Marschner, 1992). PQ'nı teşvik ettiği klorofil yıkımında süperoksit gibi reaktif oksijen türlerinin büyük rol oynadığı düşünülmektedir. Nitekim yapılan bazı çalışmalarda süperoksit ve H₂O₂'nin sebep olduğu oksidatif stresin kloroplast membranlarının organizasyonunu bozduğu ve klorofil yıkımına sebep olduğu belirlenmiştir (Knox, Dodge, 1985; Thompson vd., 1987).

Ayrıca paraquat uygulanan mısır fidelerindeki çözünebilir protein miktarının da azaldığı bulunmuştur. Toplam klorofil miktarındaki azalmanın aksine, çözünebilir protein miktarındaki azalmanın 8. saatten itibaren istatistiki bakımdan önemli olduğu kaydedilmiştir. Nitekim yapılan bazı çalışmalarda proteolizis olayının klorofil parçalanmasından daha önce meydana geldiği rapor edilmiştir (Chang, Kao, 1997). Çalışmamızda PQ uygulanan fidelerdeki çözünebilir protein miktarının % 49,1 oranında azaldığı belirlenmiştir. Peleg vd. (1992)'de *Pisum sativum* bitkisinde paraquatın toplam

protein içeriğinde hızlı bir azalmaya sebep olduğunu rapor etmişlerdir. Başka çalışmalarda da paraquatın çözünebilir protein miktarını azalttığı kaydedilmiştir (Wolff vd., 1986; Pastori, Trippi, 1993; Iturbe-Ormaetxe vd., 1998). Protein miktarındaki bu azalmaların reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu proteinlerin *de novo* sentezinin inhibisyonu ve/veya proteinlerin yıkımından dolayı olabileceği düşünülmektedir (Peleg vd., 1992). Ayrıca stress koşulları altında, polipeptidlerin yıkımına neden olan proteolitik enzimlerin salınımı da meydana gelebilmektedir (Davies, 1982). Nitekim, sınırlı oksidatif değişiklik bile çeşitli proteinleri, enzimatik hidrolize karşı daha duyarlı yapmaktadır (Wolff vd., 1986).

Görüldüğü gibi paraquat, klorofil ve protein miktarlarındaki azalmalarla karakterize edilen yaprak senesensini teşvik etmektedir. Nitekim çeşitli araştırmacılar tarafından oksidatif stres durumunda senesensin hızlandırıldığı kaydedilmiştir (Trippi, De Luca d'Oro, 1985; Thompson vd., 1987; Pastori, Trippi, 1993). Çalışmamızda kullanılan poliaminler, sitokininler ve giberellinlerin ise senesensi geciktirici etkilerinin olduğu bilinmektedir (Fletcher, 1969; Altman, 1982; Cheng, Kao, 1983). Nitekim, yaptığımız bu çalışmada SPM, PUT, BA ve GA₃ ile ön muamele yapılan fidelerde paraquatın teşvik ettiği toplam klorofil ve çözünebilir protein miktarlarındaki azalmaların önemli ölçüde geciktirildiği bulunmuştur. PUT'nin uygulanan iki konsantrasyonunun da toplam klorofil miktarındaki azalmayı geciktirdiği fakat 1 mM PUT'nin etkisinin istatistiki bakımdan önemli olduğu belirlenmiştir. Paraquat uygulandıktan 24 saat sonra toplam klorofil miktarında % 41,6'lık bir azalma meydana gelmesine karşın, 1 mM PUT ile ön muamele yapılan yapraklarda % 22,8'lik bir azalma kaydedilmiştir. SPM'nin ise uygulanan iki konsantrasyonunun da istatistiki bakımdan önemli ölçüde paraquatın teşvik ettiği klorofil miktarındaki azalmayı geciktirdiği tespit edilmiştir. 0,2 mM SPM uygulanan yapraklarda paraquat uygulandıktan 24 saat sonra % 21 'lik bir azalma meydana gelirken 1 mM SPM uygulanan yapraklarda % 16,9'luk bir azalma meydana gelmiştir. Yani PUT veya SPM ile ön muamele yapılan yapraklarda paraquatın teşvik ettiği klorofil kaybı önemli ölçüde geciktirilmiştir. Yulaf yapraklarında yapılan bir çalışmada SPM'nin tilakoid bütünlüğünü en iyi koruyan poliamin olduğu rapor edilmiştir (Tiburcio vd., 1994). Poliaminlerin klorofil kaybını geciktirmedeki etkileri, membran kararlılaştırıcı özelliklerinin olması veya fosfolipidlerin transbilayer hareketlerini inhibe etmeleriyle alakalı olabilir (Besford vd., 1993; Bratton, 1994).

Büyümeyi düzenleyici maddelerden BA'nın bütün konsantrasyonlarının paraquatın teşvik ettiği klorofil kaybını geciktirdiği ve konsantrasyonlar arasında istatistiki bakımdan

önemli bir farklılığın olmadığı belirlenmiştir. Sadece paraquat uygulanan fidelerle karşılaştırıldığında BA'nın 100 μM 'lık konsantrasyonunun istatistiki bakımdan önemli ölçüde klorofil kaybını geciktirdiği görülmüştür. Başka çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Koparılmış pirinç yapraklarıyla yapılan çalışmada BA'nın klorofil parçalanmasını geciktirdiği belirlenmiştir (Kao, 1980). Kraus vd. (1993) ise soya fasülyesinde BA uygulanan disklerdeki klorofil miktarının kontrolden daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca çalışmamızda, GA_3 ile ön muamele yapılan yapraklardaki toplam klorofil miktarının da paraquat uygulanan fidelerden daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Klorofil kaybını önlemede GA_3 'ün 100 μM 'lık konsantrasyonunun diğerlerine nazaran daha etkili olduğu görülmüştür. Büyümeyi düzenleyici maddelerin fotosentetik pigmentlere etkisiyle ilgili yapılan çalışmalarda, söz konusu maddelerin kloroplast gelişiminde rol oynayarak pigment miktarını etkiledikleri veya kloroplast parçalanmasını engelleyerek dolaylı yünden pigment miktarının azalmasını önledikleri kaydedilmiştir (Banerji, Kumar, 1975; Parthier, 1979).

Ayrıca, çalışmamızda büyümeyi düzenleyici maddelerle ön muamelenin paraquatın teşvik ettiği protein miktarındaki azalmayı geciktirdiği belirlenmiştir. Özellikle paraquat uygulamasından 24 saat sonra elde edilen veriler arasında istatistiki bakımdan önemli farklılıklar bulunmuştur. Paraquat uygulandıktan 24 saat sonra çözünebilir protein miktarında meydana gelen % 49,1'lik azalmanın büyümeyi düzenleyici maddelerle ön muamele yapılan yapraklarda daha az olduğu belirlenmiştir. Genel olarak bakıldığında senesensi geciktiren bileşiklerin klorofille birlikte protein yıkımını da geciktirdikleri kabul edilir (Srivastava vd., 1983). Nitekim poliaminlerin protein yıkımını geciktirdikleri ve proteaz aktivitesini inhibe ettikleri kaydedilmiştir (Altman, 1982; Bais, Ravishankar, 2002). Ayrıca dışardan uygulanan poliaminlerin etkilerinin dışardan uygulanan sitokininlere benzer olduğu (Bais, Ravishankar, 2002) ve sitokinin grubu bir hormon olan BA'nın pirinç yapraklarında protein miktarındaki azalmayı önemli ölçüde geciktirdiği tespit edilmiştir (Chen, Kao, 1992). Başka çalışmalarda da sitokinin grubu hormonların proteinlerin parçalanma oranlarını azalttıkları kaydedilmiştir (Brock, Kaufman, 1991; Kraus vd., 1993; Buban, 2000).

Proteinlerin poliakrilamid jel elektroforezi sonuçlarına bakıldığında, paraquat uygulandıktan 24 saat sonra moleküler ağırlığı 66.000 ile 29.000 Da arasında olan protein bantlarında zayıflamaların olduğu gözlenmiştir. Kirtikara ve Talbot (1996) ile Altinkut vd., (1998)'nin elde ettikleri sonuçlar bu bulgumuzu destekler niteliktedir. Ayrıca büyümeyi

düzenleyici maddelerle ön muamele yapılan fidelerin protein bantlarında, sadece paraquat uygulananlara göre belirgin koyulaşmaların meydana geldiği gözlenmiştir. Özellikle poliamin ve BA ile ön muamele yapılan fidelerdeki protein bantlarında daha bariz kalınlaşma ve koyulaşmaların olduğu belirlenmiştir. Nitekim, poliaminlerin protein sentezini translasyon ve transkripsiyon (Cvikrova, 1997), BA'nın translasyon, GA'nın ise transkripsiyon seviyesinde uyardığı kaydedilmiştir (Brock, Kaufman, 1991).

Görüldüğü gibi oksidatif stres, pigment kaybı ve proteolizise sebep olmaktadır. Bitkiler oksidatif strese fizyolojik ve biyokimyasal proseslerinde değişiklikler yaparak cevap verirler. Antioksidant maddeler ve enzimatik olarak katalizlenen reaksiyonlardan oluşan antioksidant savunma sistemi oksidatif strese sebep olan zararlı oksijen türlerinin yok edilmesinde hücrelere yardımcı olurlar. Askorbik asit ve karotenoidler de hücrelerde bulunan önemli düşük moleküler ağırlıklı antioksidant maddelerdendir. Bu moleküller enzimatik olmayan reaksiyonlarla reaktif oksijen türlerini temizlerler ve oksidatif stresi azaltırlar (Buckland vd., 1991; Dalton, 1995). Bu nedenle yaptığımız bu çalışmada paraquat uygulandıktan sonra mısır yapraklarındaki karotenoid ve askorbik asit miktarları tayin edilmiştir. Paraquat uygulanmış yapraklarda söz konusu maddelerin miktarlarında azalmalar meydana gelmiştir. Kontrol bitkileriyle mukayese edildiğinde PQ uygulanan fidelerde karotenoid miktarının % 39,7, askorbik asit miktarının ise % 69,9 oranında azaldığı ve bu azalmaların istatistiki bakımdan önemli olduğu kaydedilmiştir. Nitekim yapılan başka çalışmalarda da paraquatın askorbik asit ve karotenoid miktarlarında azalmalara neden olduğu tespit edilmiştir (Iturbe- Ormaetxe vd., 1998; Li, van Staden, 1998). Reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olan stres koşullarının etkisiyle ilgili yapılan çalışmalarda, askorbik asit ve karotenoidlerin yanısıra hücrelerde bulunan önemli antioksidant moleküllerden olan glutatyon ve tokoferolün miktarlarının da azaldığı kaydedilmiştir (Boo, Jung, 1999; Boo vd., 2000). Paraquat uygulanan bitkilerdeki askorbik asit miktarının 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, Jung, 1999; Boo vd., 2000).

SPM veya PUT ile ön muamele yapılan bitkilerdeki karotenoid ve askorbik asit miktarlarının sadece paraquat uygulanan bitkilere nazaran daha fazla olduğu belirlenmiştir. SPM'nin 1 mM'lık konsantrasyonunun PUT'nin ise uygulanan her iki konsantrasyonunun

da istatistiki bakımdan önemli ölçüde karotenoid kaybını geciktirdiği kaydedilmiştir. Sadece PQ uygulanan fidelerdekine nazaran 1 mM SPM ve 0,2 ile 1 mM PUT ile ön muamele yapılan fidelerdeki karotenoid miktarlarının sırasıyla % 19; % 22,4 ve % 29,3 daha fazla olduğu saptanmıştır. Askorbik asit miktarlarına bakıldığında ise SPM ve PUT'un uygulanan bütün konsantrasyonlarının paraquat uygulandıktan 24 saat sonra askorbik asit miktarında meydana gelen azalmayı istatistiki bakımdan önemli ölçüde engellediği belirlenmiştir. Özellikle SPM ve PUT'un 1 mM'lık konsantrasyonlarının daha etkili olduğu tespit edilmiştir. 1 mM SPM ile ön muamele yapılan fidelerdeki askorbik asit miktarının, sadece PQ uygulanan fidelerdekinden 2,5 kat, 1 mM PUT ile ön muamele yapılan fidelerdeki askorbik asit miktarının ise 2,7 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Poliaminlerin antioksidant özelliklerinden dolayı reaktif oksijen türlerinin etkilerini azalttıkları düşünülmektedir (Benavides vd., 2000). Ayrıca poliaminler direkt olarak serbest radikal temizleyicileri olarak fonksiyon yaptıklarından dolayı paraquatın etkisiyle oluşan reaktif oksijen türlerinin miktarlarını azaltmış olabilirler (Drolet vd., 1986). Böylece antioksidant moleküllerin miktarları fazla azalmayacağı için bitkiler oksidatif strese karşı daha toleranslı olacaklardır. Nitekim yapılan çalışmalarda paraquat stresine karşı toleranslı olan türlerde duyarlı olanlara nazaran daha fazla miktarda askorbik asit ve karotenoid olduğu tayin edilmiştir (Li, van Staden, 1998; Sairam vd., 1998). Ayrıca azot uygulanmış ve *Azotobacter chroococcum* aşılansız şeker pancarı bitkilerinde karotenoid miktarının fazla olduğu ve bitkilerin oksidatif strese toleranslarının arttığı tespit edilmiştir. Karotenoidlerin özellikle triplet klorofil ve singlet oksijen türlerinin etkili temizleyicileri olduğu ve böylece oksidatif stresi azalttıkları düşünülmektedir (Demming- Adams, 1990; Elstner vd., 1994).

Hücrelerdeki oksidatif stresin reaktif oksijen türlerinin üretimi ve antioksidantların temizleme aktivitesi arasındaki dengenin bozulması sonucu meydana geldiği ve bu dengenin bozulmasına reaktif oksijen türlerinin artan oluşumu veya antioksidant savunma kapasitesinin azalmasının yol açtığı ileri sürülmektedir (Spychalla, Desborough, 1990; Boo, Jung, 1999). Karotenoidler ve askorbik asit gibi küçük antioksidant moleküllerin içeriğinde meydana gelen azalmaların oksidantlar ve antioksidantlar arasındaki dengesizliğin etkileri olduğu düşünülmektedir. Miktarları azalan antioksidantlar dışardan bitkilere uygulandığında iyileştirici etkilerinin olduğu görülür. Şöyleki; pirinç fidelerine dışardan uygulanan askorbik asitin kurşun ve civa gibi ağır metallerin olumsuz etkilerini azalttığı ve bitkilerin toleransını artırdığı belirlenmiştir (Mishra, Choudhuri, 1998). Burada

askorbik asitin serbest radikal temizleyicisi olmasının etkili olduğu ve hücrelerin antioksidant savunma mekanizmasını etkilediği düşünölmektedir (Halliwell, 1982; Buckland vd., 1991). Ayrıca, askorbik asitin lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkisinin olduğu ve böylece membran lipid peroksidasyonunu önlediği ileri sürölmektedir (Kunert, Böger, 1984; Shalata, Neumann, 2001). Paraquat gibi reaktif oksijen türleri üreterek bitkilere zarar veren oksidatif stres faktörlerinin etkilerinin askorbik asit gibi antioksidantların artan miktarlarıyla giderilebileceği düşünölmektedir. Nitekim, ıspanak kloroplastlarıyla yapılan çalışmada, askorbik asit gibi radikal temizleyicilerinin ilavesiyle paraquat toksikliği inhibe edilmiştir (Eltner vd., 1980). Ayrıca askorbik asitin artan konsantrasyonlarının paraquatın teşvik ettiği klorofil kaybını etkili bir şekilde inhibe ettiği görölmüştür (Çakmak, Marschner, 1992). Bu sonuçlara göre, çalışmamızda SPM veya PUT ile ön muamele yapılan bitkilerdeki askorbik asit miktarının sadece paraquat uygulanan fidelerdekine nazaran daha fazla olması, bitkileri paraquata karşı daha toleranslı hale getirmesi ile açıklanabilir.

BA ve GA₃ ile ön muamele yapılan fidelerde ise BA'nın 100 µM'lık konsantrasyonunun GA₃'ün ise 10 ve 100 µM'lık konsantrasyonlarının, paraquatın teşvik ettiği karotenoid kaybını istatistiki bakımdan önemli ölçüde geciktirdiği belirlenmiştir. Bir triazol büyüme düzenleyicisi olan paclobutrazol uygulanan fidelerde gösterildiği gibi bu yardımcı pigmentlerin artan miktarları reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu zararı kısıtlama kapasitesini artırabilir (Mahoney vd., 1998). Askorbik asit miktarındaki değişime bakıldığında ise BA'nın bütün konsantrasyonlarının askorbik asit miktarındaki kaybı istatistiki olarak önemli ölçüde geciktirdiği, GA₃'ün ise 10 ve 100 µM'lık konsantrasyonlarının etkili olduğu bulunmuştur. Bitkilerin oksidatif strese karşı dirençliliği reaktif oksijen türlerinin inhibisyonuna veya antioksidant seviyelerindeki artışlara bağlı olabilir (Walker, McKersie, 1993).

Bitkileri reaktif oksijen türlerinin sitotoksik etkilerinden koruyan antioksidant savunma sisteminin önemli bileşenlerinden birisi de antioksidant enzimlerdir. Süperoksit dismutaz, peroksidaz ve glutatyon redüktaz hücrelerde bulunan önemli antioksidant enzimlerdendir. Bu çalışmada paraquat uygulanan fidelerde söz konusu enzimlerin aktivitelerinde meydana gelen değişiklikler belirlenmiştir. Ayrıca büyümeyi düzenleyici maddelerle ön muamele yapmanın bu enzimlerin aktivitelerinde herhangi bir değişikliğe sebep olup olmadığına bakılmıştır. Paraquat uygulandıktan 12 ve 24 saat sonra SOD aktivitesinin istatistiki bakımdan önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. Bu bulgu Matters ve

Scandalios (1986)'un yaptıkları çalışmayı destekler niteliktedir. Matters ve Scandalios (1986), 10 μ M paraquat uyguladıkları mısır yapraklarında SOD aktivitesinin arttığını belirlemişlerdir. Başka çalışmalarda da oksidatif stres durumunda bitkilerdeki SOD aktivitesinin arttığı kaydedilmiştir (Malan vd., 1990; Peleg vd., 1992; Pastori, Trippi, 1992; 1993). Özellikle SOD gibi antioksidant enzimlerin artan aktivitelerinin oksidatif stres toleransı ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Stajner vd., 1995). Çok yıllık delice otu ve *Conyza* biotiplerinde PQ dirençliliğinin SOD aktivitesindeki farklılıklarla alakalı olduğu bulunmuştur (Harper, Harvey, 1978; Youngman, Dodge, 1981). Tanaka vd. (1988)'de yaptıkları çalışmada paraquatı tolere edebilen tütün bitkilerindeki SOD aktivitesinin tolere edemeyen bitkilere nazaran birkaç kat daha fazla olduğunu kaydetmişlerdir. Paraquatı tolere edebilen tütün bitkilerine 250 μ M paraquat püskürtüldüğünde bile yapraklarda hasar görülmediği buna karşın kontrol bitkilerinde ölümcül yıkımların meydana geldiği görülmüştür (Furusawa, Mizuguchi, 1987). Bu nedenle SOD aktivitesindeki artışın paraquatın ürettiği reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu hasarlara karşı bitki toleransını yükselttiği düşünülmektedir. Nitekim, transgenik bitkilerle yapılan çalışmalarda Mn-SOD'u fazla miktarda ekspres eden bitkilerde normal bitkilerle karşılaştırıldığında hücre hasar seviyesinin azaldığı görülmüştür (Bowler vd., 1991). Ayrıca daha yüksek seviyede SOD'u ekspres eden transgenik bitkilerin oksidatif strese olan dirençliliklerinin arttığı belirlenmiştir (Van Camp vd., 1994b; Pitcher, Zilinskas, 1996).

Poliaminlerin antioksidant enzimler vasıtasıyla bitkileri oksidatif strese karşı dirençli hale getirebileceği düşünülmektedir. Nitekim, PUT'un yüksek miktarlarıyla, antioksidant enzimlerin yüksek aktivitelerinin birlikte oksidant dirençliliğinin en yüksek seviyelerini verdiği tespit edilmiştir (Ye vd., 1997). Ayrıca putrescinin SOD gibi antioksidant enzimlere bağlanabileceği ve onların hücre içerisinde oksidatif stresin olduğu bölgelere nüfuz etmelerini sağlayacağı kaydedilmiştir. PUT- SOD kompleksinin tek başına olan SOD'dan 20 kat daha fazla membran geçirgenliği olduğu ve memeli sistemlerinde oksidantlara karşı korumayı kolaylaştırdığı rapor edilmiştir (Poduslo, Curan, 1996). Nagele vd. (1994)'de SOD- PUT kompleksinin memeli hücrelerinde birçok fonksiyonlarının olduğunu, bu kompleksin yüksek bir verimlilikle süperoksit radikallerini yok ettiğini ve peroksidin teşvik ettiği hücre hasarına karşı koruma sağladığını kaydetmişlerdir. Çalışmamızda PUT ve SPM ile ön muamele yapılan fidelerdeki SOD aktivitesinin uygulanan poliamin ve konsantrasyona bağlı olarak değiştiği görülmüştür. SPM ile PUT'un 0,2 ve 1 mM'lık konsantrasyonlarıyla ön muamele yapılan fidelerdeki SOD

aktivitesinin PQ uygulamasından 8 saat sonra istatistiki bakımdan önemli ölçüde arttığı, 12. ve 24. saatlerde ise sadece 1 mM'lık SPM'nin etkili olduğu görülmüştür.

BA ile ön muamele yapılan fidelerde PQ uygulandıktan 8 saat sonra BA'nın 10 ve 100 μ M'lık konsantrasyonlarının istatistiki bakımdan önemli ölçüde SOD aktivitesini artırdığı, 12. ve 24. saatlerde ise istatistiki olarak önemli bir farklılığın olmadığı görülmüştür. GA₃ ile ön muamele yapılan fidelerdeki SOD aktivitesinin ise ön muamele yapılmamış fidelere nazaran istatistiki olarak önemli ölçüde değişmediği belirlenmiştir. Ayrıca çalışmamızda yaptığımız poliakrilamid jel elektroforezi sonucuna göre mısır yapraklarında Rf değeri 0,78 olan tek bir SOD izoenzim bandı tespit edilmiştir. Bu izoenzim bandının uygulamaların yapıldığı bütün fidelerde var olduğu ancak yoğunluğunda birtakım farklılıkların olduğu görülmüştür. Peleg vd. (1992)'de bezelye yapraklarında yaptıkları çalışmada farklı konsantrasyonlarda paraquat uygulamasının SOD izoenzimlerinin sayısını etkilemediğini ancak yoğunluklarını etkilediğini kaydetmişlerdir. Donahue vd. (1997) ise PQ uyguladıkları bezelye yaprakları ile kontrol grubu arasında SOD izoenzimleri bakımından belirlenebilir bir farkın olmadığını rapor etmişlerdir.

SOD reaktif oksijen temizleme sisteminin ilk adımını katalizler ve hem sitosolik hem de kloroplastik SOD, paraquatın varlığında üretilen süperoksitin yıkımıyla alakalıdır. SOD hücreler için toksik olan süperoksit radikalini başka bir toksik molekül olan H₂O₂'ye dönüştürür. Dolayısıyla tek başına SOD aktivitesindeki artışın paraquata dirençlilik sağlayamayacağı, ancak üretilen H₂O₂'nin detoksifikasyonu için yeterli miktarda katalaz veya peroksidazın olması durumunda etkili olabileceği düşünülmektedir (Harper, Harvey, 1978). Nitekim, Bowler vd. (1991) Mn-SOD'u fazla miktarda ekspres eden transgenik bitkilerin kloroplastlarındaki süperoksit miktarının azaldığını, H₂O₂ miktarının ise arttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca peroksidazların oksidatif strese karşı hücrelerin korunmasında süperoksit dismutaz kadar önemli olduğu (Rabinowitch, Fridovich, 1983; Mehlforn, 1990) ve plazma membranlarında oksidatif zararı önleyen peroksit radikal temizleyicisi olarak da görev yaptıkları kaydedilmiştir (Van Assche, Clijsters, 1980). Bu nedenle çalışmamızda peroksidaz aktivitesi ölçülmüş ve paraquat uygulanan fidelerdeki peroksidaz aktivitesinin arttığı görülmüştür. Bu konuyla ilgili yapılan bazı çalışmalarda PQ uygulanan bitkilerdeki peroksidaz aktivitesinin önemli ölçüde değişmediği, bazılarında ise arttığı kaydedilmiştir (Peleg vd., 1992; Guida vd., 1992; Pastori, Trippi, 1992; 1993; Kirtikara, Talbot, 1996; Donahue vd., 1997; Li, Van Staden, 1998).

Çalışmamızda SPM ile ön muamele yapılan fidelerdeki peroksidaz aktivitesinin sadece paraquat uygulanan fidelere nazaran istatistiki bakımdan önemli ölçüde arttığı, PUT'nin ise 1 mM'lık konsantrasyonunun daha etkili olduğu görülmüştür. Başka çalışmalarda da poliaminlerin peroksidaz aktivitesini artırdığı kaydedilmiştir (Srivastava vd., 1983; Chang, Kao, 1997). Peroksidaz aktivitesindeki artışın bitkileri paraquat zararına karşı daha toleranslı hale getirdiği düşünülmektedir. Nitekim, Mehlhorn ve Kunert (1986) kafeik asitle ön muamele yapılan tütün hücrelerinde kafeik asitin teşvik ettiği askorbat peroksidaz aktivitesinin PQ'nin teşvik ettiği lipid peroksidasyonuna karşı hücreleri koruduğunu kaydetmişlerdir. Hidroperoksitlerin etkili uzaklaştırılması hücreler için çok önemlidir. Çünkü hidroperoksitler yüksek oranda reaktif olan singlet oksijen ve hidroksil radikallerinin oluşumunu artırabilirler ve bu radikallerin her ikisinin de lipid peroksidasyonunu teşvik ettiği bilinmektedir (Halliwell, Gutteridge, 1989). Ayrıca etilenin teşvik ettiği askorbat peroksidaz aktivitesinin H_2O_2 , ozon ve paraquata karşı bitkileri koruduğu kaydedilmiştir (Mehlhorn, 1990). Stresli bitkilerde etilen üretimindeki artışın peroksidaz aktivitesini teşvik etmek için meydana geldiği düşünülebilir (Abeles vd., 1988). Böylece oksidatif strese karşı bitkilerin duyarlılığı, artan H_2O_2 detoksifikasyonundan dolayı azaltılabilir. Çalışmamızda GA_3 ile ön muamele yapılan fidelerdeki peroksidaz aktivitesi değişiminin istatistiki bakımdan önemli bulunmadığı, BA'nın 10 ve 100 μM 'lık konsantrasyonlarıyla ön muamele yapılan fidelerdeki peroksidaz aktivitesinin ise hem kontrol hem de BA ile ön muamele yapılmamış fidelere nazaran arttığı ancak 100 μM 'lık BA'nın etkisinin istatistiki bakımdan önemli olduğu bulunmuştur. Ayrıca çalışmamızda yaptığımız poliakrilamid jel elektroforezi sonuçlarına göre mısır yapraklarında R_f değerleri sırasıyla 0,10; 0,19; 0,23; 0,28 ve 0,32 olan beş tane peroksidaz izoenzim bandı belirlenmiştir. Bu izoenzim bantlarından R_f değeri 0,23; 0,28 ve 0,32 olanların PQ uygulandıktan 8 saat sonra pek belirgin olmadığı ancak 12. ve 24. saatlerde koyulaştıkları görülmüştür. R_f değerleri 0,10 ve 0,19 olan izoenzim bantlarının diğerlerine nazaran daha kalın ve koyu bantlar oldukları tespit edilmiştir. BDM ile ön muamele yapmanın izoenzim bantlarının sayılarını değiştirmediği ancak koyuluğunu etkilediği görülmüştür. Genel olarak incelendiğinde PUT, SPM ve BA ile ön muamele yapılan fidelerdeki izoenzim bantlarının daha koyu oldukları belirlenmiştir. Dolayısıyla PUT, SPM ve BA ile ön muamelenin oksidatif strese karşı bitkileri daha toleranslı hale getirebileceği düşünülebilir. Nitekim, peroksidaz enziminin oksidatif strese toleransla önemli bir ilişkisinin olduğu belirlenmiştir (Harper, Harvey 1978; Asada, 1992; Ye, Gressel, 1994). Stajner vd. (1997)

ise azot veya *Azotobacter chroococcum*'la muamele yapılmış şeker pancarı bitkilerinde peroksidaz ile SOD aktivitelerinin arttığını ve bitkilerin oksidatif strese olan toleranslarının geliştiğini kaydetmişlerdir. Peroksidaz ve SOD gibi enzimlerin artan miktarlarının varlığında reaktif oksijen türlerinin fazla birikimi önlenir ve böylece bitkilerin oksidatif strese karşı dirençli olmaları sağlanır. Süperoksit dismutazın artan konsantrasyonlarıyla süperoksitin yıkımı ve peroksidazların yükselen miktarlarıyla H_2O_2 'nin temizlenmesi sonucu paraquata karşı tolerans kazanıldığı düşünülmektedir.

Bir çok bitki türü SOD ve peroksidazın yanısıra önemli bir antioksidant enzim olan GR aktivitesini artırarak çeşitli çevresel streslere cevap verirler (Broadbent vd., 1995). Bu stresler arasında acifluorfen ve PQ gibi herbisitlerin uygulanması (Gillham, Dodge, 1987) ve ozon gibi hava kirleticileri de sayılmaktadır (Mehlhorn vd., 1987; Kangasjarvi vd., 1994). Transgenik bitkiler kullanılarak yapılan çalışmalar oksidatif strese dirençlilikte GR'nin önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Matters, Scandalios, 1986; Shaaltiel vd., 1988; Aono vd., 1995). GR, GSSG'nin GSH'a indirgenmesine aracılık eder ve GSH'ın GSSG'ye oranının yüksek kalmasını sağlayarak oksidatif hasara karşı kloroplastların korunmasında zorunlu bir rol oynar (Pilon- Smits vd., 2000). Dolayısıyla oksidatif stres altında, askorbat- glutasyon yoluna GSH sağlamak ve GSH/ GSSG oranının yüksek tutulması için GR aktivitesinde artış olması bir ihtiyaç olabilir. Çalışmamızda PQ uygulanan mısır fidelerindeki GR aktivitesinin 12. saate kadar istatistiki bakımdan önemli ölçüde arttığı 24. saatte ise azaldığı görülmüştür. PQ uygulandıktan 24 saat sonra GR aktivitesinde belirlenen azalmanın oksidatif stresin şiddetinin artmasından dolayı meydana gelmiş olabileceği düşünülmektedir. Nitekim, bazı çalışmalarda şiddetli stres koşulları altında GR aktivitesinin azaldığı rapor edilmiştir (Pastori, Trippi, 1992; Doulis vd., 1998).

Çalışmamızda 1 mM SPM ile ön muamele yapılan fidelerdeki GR aktivitesinin PQ uygulandıktan 8, 12 ve 24 saat sonra istatistiki bakımdan önemli ölçüde arttığı görülmüştür. 0,2 mM SPM ve PUT'un 0,2 ve 1 mM'lık konsantrasyonlarının ise 24. saatte GR aktivitesini önemli oranda artırdığı belirlenmiştir. GR aktivitesindeki artışın bitkilerin dayanıklılığını artırdığı düşünülmektedir. Nitekim, Donahue vd. (1997) bezelye yapraklarıyla yaptıkları çalışmada, PQ'a cevap olarak dirençli olan yapraklarda GR aktivitesinin arttığını, Barna vd. (1995) ise acifluorfen herbisitinin etkisiyle oluşan oksidatif stresin, PQ'a toleranslı bütün bitkilerinde duyarlı olanlardan çok daha yüksek oranda GR aktivitesinde artış teşvik ettiğini belirlemişlerdir. Ayrıca çalışmamızda GA_3 'ün 10 μM 'lık konsantrasyonunun PQ uygulandıktan 12 saat sonra istatistiki bakımdan önemli

ölçüde GR aktivitesini artırdığı, 24. saatte ise BA'nın 10 ve 100 μ M, GA₃'ün ise 10 μ M'lık konsantrasyonlarının daha etkili olduğu belirlenmiştir. PQ uygulandıktan 24 saat sonra GR aktivitesinde görülen azalmanın BDM'lerle ön muamele yapılmak suretiyle giderilebileceği sonucuna varılmıştır.

Bir çok farklı oksidatif stres toleransının bu antioksidant enzimlerin aktivitelerindeki artışlarla alakalı olduğu düşünülmektedir. Dirençli olan biotiplerde duyarlı olanlara kıyasla daha fazla antioksidant enzim aktivitelerinin olduğu kaydedilmiştir (Gressel, Galum, 1994). Dolayısıyla çalışmamızda antioksidant enzimlerin aktivitelerinde artış teşvik eden BDM konsantrasyonlarının PQ'a karşı mısır bitkilerini daha toleranslı hale getirdiği söylenebilir. Bu enzimlerdeki küçük fakat istatistiki olarak önemli olan artışların PQ dirençliliğindeki büyük artışlardan sorumlu olabileceği ileri sürülebilir (Ye, Gressel, 1994). Bu enzimler doğal olarak bitkilerde bulunurlar ve koruyucu görevleri vardır. Bu görevlerini yerine getirebilmek için miktarları muhtemelen dengededirler. Dolayısıyla bu enzimlerdeki küçük bir artış yeni bir oksidatif stresle başa çıkmak için yeterli olabilir. Bu hipotez söz konusu enzimlerin artan miktarlarını ekspres eden transgenik bitkiler kullanılarak yapılan çalışmalarla desteklenmiştir (Gressel, Galum, 1994; Van Camp vd., 1994b; Greissen vd., 1994).

Ayrıca çalışmamızda fidelerin büyüme düzenleyici madde içeriklerindeki değişiklikler araştırılmış ve PQ uygulanan fidelerdeki GA, IAA ve Z miktarlarının azaldığı, ABA içeriğinin ise arttığı tespit edilmiştir. PQ uygulanan fidelerdeki içsel GA miktarının 1,2; Z miktarının 1,9; IAA miktarının 2 kat azaldığı, ABA miktarının ise 3,5 kat arttığı belirlenmiştir. Stres durumunda bitkilerdeki fitohormon içeriğinin değişmesi şaşırtıcı değildir. Çünkü fitohormonlar kök- sürgün veya sürgün- kök iletişimindeki esas sinyallerdir ve hormonal dengedeki değişiklikler stres durumunda teşvik edilen olaylar dizisinde anahtar rol oynayabilirler. Nitekim stres koşulları altında bitki hormonlarının seviyelerinin değiştiği, sitokinin ve GA miktarının azaldığı, ABA içeriğinin ise arttığı kaydedilmiştir (Mizrahi vd., 1971; Boucaud, Unger, 1976; Itai, 1999). Bu iç hormon seviyelerinin değişmesinden dolayı, stres durumunda su alımı ve membran permeabilitesinin değiştiği ve büyümenin azaldığı ileri sürülmüştür (İlan, 1971; Karmoker, Van Steveninck, 1979). Bu nedenle stres koşullarında bitki büyümesindeki azalmanın, değişen hormon dengesinin sonucu olduğu ve stres koşulları altında büyüme düzenleyici maddelerin dışardan uygulanmasıyla abiyotik stres etkilerinin iyileştirilmesi veya azaltılması mümkün olabilir. Nitekim çalışmamızda oksidatif stres durumunda içsel GA,

IAA ve Z miktarlarında belirlenen azalmaların çeşitli BDM'lerle ön muamele yapılmak suretiyle giderilebileceği tespit edilmiştir. Oksidatif stres altında miktarı azalan GA₃ ile ön muamele yapılan mısır fidelerindeki içsel GA miktarının arttığı ve fidelerin PQ'a olan toleranslarının geliştiği kaydedilmiştir. Ayrıca PUT, SPM ve BA ile ön muamele yapılan fidelerdeki GA miktarının da sadece PQ uygulanan fidelerdekinden daha fazla olduğu belirlenmiştir. Özellikle 1 mM SPM ve PUT ile ön muamele yapılan fidelerdeki GA miktarının sadece PQ uygulanan fidelerdekini 2 katından daha fazla olduğu bulunmuştur. IAA ve Z miktarında da PQ'nin sebep olduğu azalmaların BDM'lerle ön muamele yapılan fidelerde istatistiki bakımdan önemli ölçüde giderildiği tespit edilmiştir. Dışardan uygulanan BDM'lerin endojenik hormonlar üzerine etkileriyle ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamakla birlikte, artan oksin ve sitokinin üretimiyle PQ'a toleransın yükseldiği vurgulanmıştır (Barna vd., 1995).

Çalışmamızda PQ uygulanan fidelerdeki GA, IAA ve Z miktarlarındaki azalmaların aksine ABA miktarının istatistiki bakımdan önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. BDM ile ön muamele yapılan fidelerde ise ABA miktarının sadece PQ uygulanan fidelerdekine nazaran istatistiki bakımdan önemli ölçüde azaldığı, kontrole göre ise değişmediği saptanmıştır. ABA ile ilgili yapılan çalışmalarda stres sırasında ABA miktarının arttığı (Wright, 1969; Ederli vd., 1997) ve bu çalışmaların bazılarında ABA miktarındaki artışın bitkilerin strese toleransında etkili olduğu (Larque-Saavedra, Wain, 1974; 1976) bazılarında ise strese dirençlilikle ABA miktarı arasında zıt bir ilişki olduğu kaydedilmiştir (Beardsell, Cohen, 1975; Quarrie, Jones, 1979; İlahi, Dorffling, 1982). Ayrıca maksimum ABA içeriğiyle kuraklığa dirençlilik arasında negatif bir korelasyon olduğu farklı mısır kultivarları için bulunmuştur (İlahi, Dorffling, 1982).

Sonuç olarak, çalışmamızda elde edilen verilere göre, PQ bitkilerde oksidatif stresi teşvik etmekte ve görülebilir yaprak hasarları oluşturmaktadır. BDM ile ön muamele yapılan fidelerde, PQ toksikliğinin azaltıldığı ve oksidatif strese karşı bitkilerin daha toleranslı hale getirildiği görülmüştür. Elde edilen bulgular, söz konusu maddelerin antioksidant savunma sisteminin bileşenlerini etkileyerek veya bitkinin bileşiminde bulunan parametrelerde PQ'nin teşvik ettiği azalmaları önleyerek, bitkilerin tolerans mekanizmalarını geliştirdiklerini göstermiştir. Poliaminlerin serbest radikal temizleyicisi olmalarının da PQ dirençliliğinde etkili olduğu düşünülmektedir. PQ'ye karşı dirençli olan bitkilerin ozon ve SO₂ gibi O₂'yi aktifleştiren başka stres faktörlerine karşı da daha dirençli olabilmeleri muhtemeldir. Bu nedenle PQ dirençliliğiyle ilgili çalışmalar sadece herbisit

uygulamaları için değil aynı zamanda bitkiler üzerine hava kirleticilerinin etkilerini değerlendirmek için de önemlidir.



5. SONUÇLAR

1) PQ uygulanan mısır fidelerinin yapraklarında başlangıçta beyaz ve kahverengi nekrotik lekeler şeklinde görülen septomların zamanla iyice belirginleştiği ve yaprakların solmaya başladıkları gözlenmiştir. BDM ile ön muamele yapılan fidelerde ise bu septomların tedrici olarak azaldığı, özellikle poliamin ve GA_3 ile ön muamele yapılan fidelerin daha sağlıklı oldukları saptanmıştır.

2) PQ uygulanan mısır fidelerindeki nispi su içeriği, toplam klorofil ve çözünebilir protein miktarlarının istatistiki bakımdan önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. SPM ve PUT ile ön muamele yapılan fidelerde nispi su içeriği ve çözünebilir protein miktarlarında PQ'nin sebep olduğu azalmaların istatistiki bakımdan önemli ölçüde engellendiği, toplam klorofil miktarında ise SPM'nin 0,2 ve 1 mM'lık konsantrasyonlarının, PUT'un ise 1 mM'lık konsantrasyonunun daha etkili olduğu bulunmuştur. BA ile ön muamele yapılan fidelerde ise, PQ'nin sebep olduğu su kaybını önlemede en etkili olan konsantrasyonun 10 μ M BA olduğu, GA_3 'ün ise uygulanan bütün konsantrasyonlarının etkili olduğu saptanmıştır. 100 μ M BA ve GA_3 'ün toplam klorofil miktarındaki azalmayı istatistiki bakımdan önemli ölçüde engellediği, çözünebilir protein miktarında ise BA ve GA_3 'ün kullanılan bütün konsantrasyonlarının istatistiki bakımdan önemli ölçüde etkili olduğu bulunmuştur.

3) Proteinlerin poliakrilamid jel elektroforezi sonuçlarında PQ uygulandıktan 24 saat sonra moleküler ağırlığı 66.000 ile 29.000 Da arasında olan protein bantlarında zayıflamaların olduğu belirlenmiştir. BDM'lerle ön muamele yapılan fidelerin bazı protein bantlarında ise sadece PQ uygulanan fidelere göre belirgin koyulaşmaların olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla BDM'lerle ön muamele yapmanın bazı proteinlerin sentezini teşvik ettiği sonucuna varılmıştır.

4) Bitkilerde bulunan önemli antioksidant maddelerden olan karotenoid ve askorbik asit miktarlarının da PQ uygulanan fidelerde istatistiki bakımdan önemli ölçüde azaldığı, özellikle askorbik asit miktarındaki azalmanın daha fazla olduğu tespit edilmiştir. SPM ve PUT ile ön muamele yapılan fidelerde ise askorbik asit miktarında PQ'nin sebep olduğu azalmanın istatistiki bakımdan önemli ölçüde engellendiği, karotenoid miktarındaki azalmayı önlemede ise PUT'un daha etkili olduğu saptanmıştır. BA'nın uygulanan bütün konsantrasyonlarının askorbik asit miktarındaki azalmayı önlemede istatistiki bakımdan

önemli ölçüde etkili olduğu, karotenoid miktarında ise 100 μM BA'nın daha etkili olduğu bulunmuştur. GA_3 'ün 10 ve 100 μM 'lık konsantrasyonlarının hem karotenoid hemde askorbik asit miktarlarındaki azalmaları istatistiki bakımdan önemli ölçüde engellediği saptanmıştır.

5) PQ uygulanan mısır fidelerindeki SOD aktivitesinin istatistiki bakımdan önemli ölçüde arttığı bulunmuştur. SPM ve PUT ile ön muamele yapılan fidelerdeki SOD aktivitesinin ise PQ uygulamasından kısa süre sonra istatistiki bakımdan önemli ölçüde arttığı, uzun süreli uygulamalarda ise sadece 1 mM SPM'nin etkisinin istatistiki bakımdan önemli olduğu belirlenmiştir. BA'nın 10 ve 100 μM 'lık konsantrasyonlarıyla ön muamele yapılan fidelerde de PQ uygulamasından kısa süre sonra poliaminlere benzer sonuçlar elde edilmiş, uzun süreli uygulamalarda ise BA ile ön muamele yapmanın SOD aktivitesini önemli ölçüde etkilemediği saptanmıştır. GA_3 uygulamasının da SOD aktivitesini önemli ölçüde değiştirmedeği tespit edilmiştir. Poliakrilamid jel elektroforezi sonucunda mısır fidelerinin yapraklarında Rf değeri 0,78 olan tek bir SOD izoenzim bandı belirlenmiştir. Bu izoenzim bandının uygulamaların yapıldığı bütün fidelerde var olduğu ancak yoğunluğunda birtakım farklılıkların olduğu saptanmıştır.

6) PQ uygulanan mısır fidelerindeki peroksidaz aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir. SPM ile ön muamele yapılan fidelerde, uygulanan her iki SPM konsantrasyonunun da istatistiki bakımdan önemli ölçüde peroksidaz aktivitesini artırdığı, PUT'un ise 1 mM'lık konsantrasyonunun daha etkili olduğu bulunmuştur. BA ile ön muamele yapılan fidelerde ise 100 μM BA'nın istatistiki bakımdan önemli ölçüde peroksidaz aktivitesini artırdığı, GA_3 ile ön muamele yapılan fidelerdeki peroksidaz aktivitesi değişiminin ise istatistiki bakımdan önemli olmadığı belirlenmiştir. Poliakrilamid jel elektroforezi sonucunda mısır fidelerinin yapraklarında Rf değerleri sırasıyla 0,10; 0,19; 0,23; 0,28 ve 0,32 olan beş tane peroksidaz izoenzim bandı belirlenmiştir. PQ uygulamasının ve BDM'lerle ön muamele yapmanın bu izoenzim bantlarının sayılarını değiştirmedeği ancak aktivitelerini etkilediği gözlenmiştir.

7) PQ uygulamasına kısa süre maruz bırakılan mısır fidelerindeki GR aktivitesinin arttığı, uzun süreli uygulamalarda ise azaldığı belirlenmiştir. BDM'lerle ön muamele yapılan fidelerdeki GR aktivitesinin, PQ uygulamasından kısa süre sonra uygulanan BDM ve konsantrasyona bağlı olarak değiştiği, PQ'ye uzun süre maruz bırakılan fidelerde ise uygulanan bütün BDM konsantrasyonlarının GR aktivitesini istatistiki bakımdan önemli ölçüde artırdığı bulunmuştur.

8) PQ uygulanan fidelerdeki endojenik GA, IAA ve Z miktarlarının azaldığı bulunmuştur. SPM ve PUT ile ön muamele yapılan fidelerde sözkonusu hormonların miktarlarında meydana gelen azalmaların istatistiki bakımdan önemli ölçüde giderildiği, özellikle SPM'nin 1 mM'lık konsantrasyonunun bu hormonların miktarlarında önemli artışlara sebep olduğu belirlenmiştir. BA ve GA₃ ile ön muamele yapılan fidelerde de endojenik GA, IAA ve Z miktarlarında PQ'nin sebep olduğu azalmaların önemli ölçüde engellendiği hatta bazı BA ve GA₃ konsantrasyonlarının bu hormonların miktarlarında önemli artışlara sebep olduğu saptanmıştır.

9) PQ uygulanan fidelerdeki endojenik ABA miktarının istatistiki bakımdan önemli ölçüde arttığı bulunmuştur. 0,2 mM SPM ve PUT ile ön muamele yapılan fidelerdeki ABA miktarının da kontrole oranla önemli ölçüde arttığı, 1 mM SPM ve PUT ile ön muamele yapılan fidelerdeki ABA miktarının ise kontrolden farklı olmadığı belirlenmiştir. BA ve GA₃ uygulanan fidelerdeki ABA miktarındaki değişimin de kontrole oranla istatistiki bakımdan önemli olmadığı tespit edilmiştir.

10) BDM'lerle ön muamele yapılan fidelerdeki endojenik GA, IAA ve Z miktarlarının sadece PQ uygulanan fidelerdekinden daha fazla olması, karotenoid ve askorbik asit gibi antioksidant maddelerin miktarlarında PQ'nin sebep olduğu azalmaların engellenmesi ve bazı antioksidant enzimlerin aktivitelerindeki artışlar, çalışmamızda kullanılan BDM'lerin mısır fidelerinin PQ'ye karşı olan toleranslarını artırdığını göstermektedir.

11) PQ bitkilerde oksidatif strese sebep olduğu için çalışmamızda kullanılan BDM'lerin, öncelikle poliaminlerin, oksidatif strese neden olan başka faktörlere karşı da bitkilerin tolerans mekanizmalarına katkı sağlayabileceği sonucuna varılmıştır.

6. ÖNERİLER

Bitkiler gelişmelerinin çeşitli safhalarında oksidatif strese sebep olan biyotik veya abiyotik faktörlere maruz kalabilirler. Bitkilerde oksidatif strese sebep olan abiyotik faktörlerden birisi de herbisitlerdir. Bilindiği gibi artan nüfus artışının beslenme ihtiyacını karşılamak amacıyla, kültür bitkilerinde önemli ürün kayıplarına (% 25- 30) sebep olan yabancı otlarla mücadelede herbisitler denilen kimyasal maddeler kullanılmaktadır. Çalışmamızda kullanılan paraquat herbisiti de tarımsal alanlarda yaygın olarak kullanılan seçici olmayan bir herbisit olup bitkilerde oksidatif strese sebep olmaktadır. Oksidatif strese maruz kalan bitkiler antioksidant savunma sistemlerini harekete geçirerek en az hasarla canlılıklarını devam ettirmeye çalışmaktadırlar. Çalışmamızda SPM, PUT, BA ve GA₃'ün oksidatif stres sırasında antioksidant sistemin bazı bileşenleriyle ilişkisi araştırılmış ve elde edilen bulgulardan sözkonusu BDM'lerin oksidatif strese karşı bitkilerin tolerans mekanizmalarına katkı sağladığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca kullanılan BDM'lerin oksidatif stres sırasında bitki metabolizmasında önemli fonksiyonları olan bazı parametreler ve endojenik hormon miktarlarında meydana gelen azalmaları önemli ölçüde engelledikleri için oksidatif strese sebep olan faktörlere karşı fidelerin dayanıklılığını artırdıkları düşünülmektedir. Özellikle çalışmamızda kullanılan poliaminlerin diğer BDM'lerden daha etkili oldukları görülmüştür. Dışardan uygulanan BDM'lerin absorpsiyonu bitkiden bitkiye farklılık gösterebileceği için, bu tip çalışmalarda sözkonusu maddelerin veya antioksidant savunma sisteminin bileşenlerinin sentezinin bitki bünyesinde artırılmasının oksidatif strese sebep olan faktörlere karşı bitkilerin toleranslarını geliştireceği düşünülmektedir. Dolayısıyla bitki metabolizmasının moleküler temelleri araştırılarak bu konuda daha ayrıntılı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Abeles, F.B., Dunn, L.J., Callahan, A., Dinterman, R.E., Schmidt, J., 1988, Induction of A 33-kD and 60-kD Peroxidases during Ethylene- Induced Senescence of Cucumber Cotyledons, Plant Physiol., 87, 609- 615.
- Aben, J.M.M., Jansen- Jurkovicova, M., Adema, E.H., 1990, Effects of Low Level Ozone Exposure under Ambient Conditions on Photosynthesis and Stomatal Control of *Vicia faba* L., Plant Cell Environ., 13, 463- 469.
- Allen, R.D., 1995, Dissection of Oxidative Stress Tolerance Using Transgenic Plants, Plant Physiol., 107, 1049- 1054.
- Alscher, R.G., 1989, Biosynthesis and Antioxidant Function of Glutathione in Plants, Physiol. Plant., 77, 457- 464.
- Alscher, R.G., Donahue, L.J., Cramer, C.L., 1997, Reactive Oxygen Species and Antioxidants: Relationships in Green Cells, Physiol. Plant., 100, 224- 233.
- Altinkut, A., İpekçi, Z., Türet, M., Gözükmızı, N., 1998, Arpa ve Buğdayda Kuraklığa Dirençli Genotiplerin Fizyolojik ve Genetik Parametrelerle Seçilmesi, Bitkilerde Stres Fizyolojisinin Moleküler Temelleri, Bornova, İzmir, 155-168.
- Altman, A., 1982, Retardation of Radish Leaf Senescence by Polyamines, Physiol. Plant., 54, 189-193.
- Anderson, M.D., Prasad, T.K., Stewart, C.R., 1995, Changes in Isozyme Profiles of Catalase, Peroxidase and Glutathione Reductase during Acclimation to Chilling in Mesocotyls of Maize Seedlings, Plant Physiol., 109, 1247-1257.
- Aono, M., Saji, H., Fujiyama, Sugita, M., 1995, Decrease in Activity of Glutathione Reductase Enhances Paraquat Sensitivity in Transgenic *Nicotiana tabacum*, Plant Physiol., 107, 645- 648.
- Arnon, D.I., 1949, Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*, Plant Physiol., 24, 1-15.
- Asada, K., 1980, Formation and Scavenging of Superoxide in Chloroplasts, with Relation to Injury by Sulfur Dioxide in Studies on the Effects of Air Pollutants on Plants and Mechanisms of Phytotoxicity, Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud., 11, 165-179.
- Asada, K., 1992, Ascorbate Peroxidase- Hydrogen Peroxide Scavenging Enzyme in Plants, Physiol. Plant., 85, 235- 241.

- Asada, K., 1994, Production and Action of Active Oxygen Species in Photosynthetic Tissues, In: Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants, Foyer, C.H., Mullineaux, P.M., Eds., CRC Press, Boca Raton, 77-104.
- Asada, K., Takahashi, M., 1987, Production and Scavenging of Active Oxygen in Photosynthesis, In: Photoinhibition, Kyle, D.J., Osmond, C.B., Arntzen, C.J., Eds., Elsevier Publishers, Amsterdam, 227- 287.
- Bais, H.P., 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.
- Baisak, R., Rana, D., Acharya, P.B.B., Kar, M., 1994, Alterations in the Activities of Active Oxygen Scavenging Enzymes of Wheat Leaves Subjected to Water Stress, Plant Cell Physiol., 35, 489- 495.
- Baker, C.J., Orlandi, E.W., 1995, Active Oxygen in Plant Pathogens, Ann. Rev. Phytopathol., 33, 299- 321.
- Banerji, D., Kumar, N., 1975, Partial Inhibition of the Decay of Hill Activity in Isolated Chloroplasts by Kinetin, Biochem. Biophys. Commun., 65, 940- 945.
- Bannister, J.V., Bannister, W.H., Rotils, G., 1987, Aspects of the Structure, Function and Applications of Superoxide Dismutase, CRC Crit. Rev. Biochem., 22, 110-180.
- Barna, B., Adam, A.L., Gullner, G., Kiraly, Z., 1995, Role of Antioxidant Systems and Juvenility in Tolerance of Plants to Diseases and Abiotic Stress, Acta Phytopathol. et Entomologica Hungarica, 30, 2, 39-45.
- Bartosz, G. 1997, Oxidative Stress in Plants, Acta Physiol. Plant., 19, 47- 64.
- Barber, J., Andersson, B., 1992, Too Much of A Good Thing: Light can be Bad for Photosynthesis, Trends Biochem. Sci., 17, 61- 66.
- Beardsell, M.F., Cohen, D., 1975, Relationships between Leaf Water Status, Absciscic Acid Levels and Stomatal Resistance in Maize and *Sorghum*, Plant Physiol., 56, 207-212.
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971, Superoxide Dismutase: Improved Assays and An Assay Applicable to Acrylamide Gels, Anal. Biochem., 44, 276-287.
- Benavides, M.P., Gallego, S.M., Comba, M.E., Tomaro, M.L., 2000, Relationship between Polyamines and Paraquat Toxicity in Sunflower Leaf Discs, Plant Growth Regul., 31, 215-224.
- Besford, R.T., Richardson, C.M., Campos, J.L., Tiburcio, A.F., 1993, Effect of Polyamines on Stabilization of Molecular Complexes of Thylakoid Membranes of Osmotically Stressed Oat Leaves, Planta, 189, 201- 206.

- Beyer R.E., 1994, The Role of Ascorbate in Antioxidant Protection of Biomembranes: Interaction with Vitamin E and Coenzyme Q, J. Bioenerg. Biomemb., 26, 4, 349-358.
- Boo, Y.C., Jung, J., 1999, Water Deficit- Induced Oxidative Stress and Antioxidative Defenses in Rice Plants, Plant Physiol., 155, 255-261.
- Boo, Y.C., Lee, K.P., Jung, J., 2000, Rice Plants with A High Protochlorophyllide Accumulation Show Oxidative Stress in Low Light That Mimics Water Stress, Plant Physiol., 157, 405- 411.
- Bors, W., Langebartels, C., Michel, C., Sandermann J.H., 1989, Polyamines as Radical Scavengers and Protectants against Ozone Damage, Phytochem., 28, 1589-1595.
- Boucaud, J., Unger, I.A., 1976, Hormonal Control of Germination under Saline Conditions of Three Halophyte Taxa in Genus Suaeda, Physiol. Plant., 36, 197-200.
- Boveris, A., Oshino, N., Chance, B., 1972, The Cellular Production of H₂O₂, Biochem. J., 128, 617- 630.
- Bowler, C., Slooten, L., Vandenbranden, S., De Rycke, R., Botterman, J., Sybesma, C., Van Montagu, M., Inze, D., 1991, Manganese Superoxide Dismutase can Reduce Cellular Damage Mediated by Oxygen Radicals in Transgenic Plants, EMBO J., 10, 1723- 1732.
- Bowler, C., Van Montague, M., Inze, D., 1992, Superoxide Dismutase and Stress Tolerance, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 43, 83- 116.
- Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M., Inze, D., 1994, Superoxide Dismutase in Plants, Crit. Rev. Plant. Sci., 13, 199- 218.
- 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.
- Bratton, D.L., 1994, Polyamine Inhibition of Transbilayer Movement of Plasma Membrane Phospholipids in the Erythrocyte Ghost, J. Biol. Chem., 269, 22517-22523.
- Bridger, G.M., Yang, W., Falk, D.E., McKersie, B.D., 1994, Cold Acclimation Increases Tolerance of Activated Oxygen in Winter Cereals, Plant Physiol., 144, 235- 240.
- Broadbent, P., Creissen, G.P., Kular, B., Wellburn, A.R., Mullineaux, P.M., 1995, Oxidative Stress Responses in Transgenic Tobacco Containing Altered Levels of Glutathione Reductase Activity, Plant J., 8, 247-255.
- Brock, T.G., Kaufman, P.B., 1991, Growth Regulators: An Account of Hormones and Growth Regulation, Plant Physiology, Academic Press, London, 300-308.

- Buban, T., 2000, The Use of Benzyladenine in Orchard Fruit Growing: A Mini Review, Plant Growth Regul., 32, 381-390.
- Buckland, S.M., Adam, H.P., George, A.F.H., 1991, The Role of Ascorbate in Drought Treated *Cochlearia atlantica* Poped. and *Armeria maritima* (Mill.) Willd., New Phytol., 119, 155- 160.
- Burton, G.W., Ingold, K.U., 1984, β -Carotene: An Unusual Type of Lipid Antioxidant, Science, 224, 569-573.
- Cadenas, E, 1989, Biochemistry of Oxygen Toxicity, Annu. Rev. Biochem., 58, 79-110.
- Calderbank, A., 1968, The Bipyridylum Herbicides, Adv. Pest Control Res., 8, 127-135.
- Carnahan, J.E., Jenner, E.L., Wat, E.K.W., 1978, Prevention of Ozone Injury to Plants by A New Protectant Chemical, Phytopathologist, 68, 1225-1229.
- Cerutti, P.A., 1994, Oxy- radicals and Cancer, Lancet, 344, 862-863.
- Chang, C.J., Kao, C. H., 1997, Paraquat Toxicity is Reduced by Polyamines in Rice Leaves, Plant Growth Regul., 22, 163-168.
- Cheng, S.H., Kao, C.H., 1983, Localized Effect of Polyamines on Chlorophyll Loss, Plant Cell Physiol., 24, 1463-1467.
- Chen, G.X., Asada, K., 1989, Ascorbate Peroxidase in Tea Leaves: Occurrence of Two Isozymes and Their Differences in Enzymatic and Molecular Properties, Plant Cell Physiol., 30, 987-998.
- Chen, C.T., Kao, C.H., 1992, Senescence of Rice Leaves XXXII, Effects of Absciscic Acid and Benzyladenine on Polyamines and Ethylene Production during Senescence, Plant Physiol., 139, 617-620.
- Chia, L.S., McRae, D.G., Thompson, J.E., 1982, Light Dependence of Paraquat Initiated Membrane Deterioration in Bean Plants, Evidence for the Involvement of Superoxide, Physiol. Plant., 56, 492-499.
- Coleman, J.O.D., Blake-Kalf, M.M.A., Davies, T.G.E., 1997, Detoxification of Xenobiotics by Plants: Chemical Modification and Vacuolar Compartmentation, Trends Plant Sci., 2, 144-151.
- Conklin, P.L., 2001, Recent Advances in the Role and Biosynthesis of Ascorbic Acid in Plants, Plant, Cell Environ., 24, 383-394.
- Creissen, G., Edwards, E.A., Mullineaux, P.M., 1994, Glutathione Reductase and Ascorbate Peroxidase, In: Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants, Foyer, C.H., Mullineaux, P.M., Eds., CRC Press, Boca Raton, 343-364.

- Creissen, G., Broadbent, P., Stevens, R., Wellburn, A.R., Mullineaux, P.M., 1996, Manipulation of Glutathione Metabolism in Transgenic Plants, J. Biochem., 24, 465-472.
- Cutting, J.G.M., 1991, Determination of the Cytokinin Complement in Healthy and Witchesbroom Malformed Protease, Plant Growth Regul., 10, 85-89.
- Cvikrova, M., 1997, Polyamine Protocols, Morgan, D.M.L., Ed., Humana Press, Totowa.
- Çakmak, I., Marschner, H., 1988, Enhanced Superoxide Radical Production in Roots of Zinc Deficient Plants, J. Expt. Bot., 39, 1449-1460.
- Çakmak, I., Marschner, H., 1992, Magnesium Deficiency Enhances Resistance to Paraquat Toxicity in Bean Leaves, Plant, Cell Environ., 15, 955-960.
- Dalton, D.A., Harus, F.J., Russell, S.A., Evans, H.J., 1987, Purification, Properties and Distribution of Ascorbate Peroxidase in Legumen Root Nodules, Plant Physiol., 83, 789-794.
- Dalton, D.A., 1995, Antioxidant Defenses of Plants and Fungi, In: Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology, Ahmad, S., Ed., Chapman Hall, New York, 298-355.
- Daub, M.E., Briggs, S.P., 1983, Changes in Tobacco Cell Membrane Composition and Structure Caused by the Fungal Toxin Cercosporin, Plant Physiol., 71, 763-766.
- Daub, M.E., Ehrenshaft, M., 1993, The Photoactivated Toxin Cercosporin as A Tool in Fungal Photobiology, Physiol. Plant., 89, 227-236.
- Daub, M.E., Hangartner, R.P., 1983, Production of Singlet Oxygen and Superoxide by the Fungal Toxin Cercosporin, Plant Physiol., 73, 855-857.
- 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.
- Demming-Adams, B., 1990, Carotenoids and Photoprotection in Plants: A Role for the Xanthophyll Zeaxanthin, Biochem. Biophys. Acta, 1020, 1-24.
- Demming-Adams, B., Adams, W.W., 1993, The Xanthophyll Cycle, In: Antioxidants in Higher Plants, Alscher, R.G., Hess, J.L., Eds., CRC Press, Boca Raton, 59-90.
- Demming-Adams, B., Adams, W.W., 1996, Xanthophyll Cycle and Light Stress in Nature: Uniform Response to Excess Direct Sunlight among Higher Plant Species, Planta, 198, 460-470.
- Dhindsa, R.S., Matowe, W., 1981, Drought Tolerance in Two Mosses: Correlated with Enzymatic Defense against Lipid Peroxidation, J. Exp. Bot., 32, 79-91.

- Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P., Thorne, T.A., 1981, Leaf Senescence Correlated with Increased Levels of Membrane Permeability and Lipid Peroxidation and Decreased Levels of Superoxide Dismutase and Catalase, J. Exp. Bot., 32, 93-101.
- Dhindsa, R.S., 1991, Drought Stress, Enzymes of Glutathione Metabolism, Oxidation Injury and Protein Synthesis in *Tortula ruralis*, Plant Physiol., 95, 648-651.
- Diplock, A.T., Machlin, L.J., Packer, L., Pryor, W.A., 1989, Vitamin E: Biochemistry and Health Implications, Ann. N.Y. Acad. Sci., 570, 555-560.
- Dodge, A.D., 1971, The Mode of Action of the Bipyridylum Herbicides, Paraquat and Diquat, Endeavour, 30, 130-135.
- Doke, N., Miura, Y., Chai, H.B., Kawakita, K., 1991, Involvement of Active Oxygen in Induction of Plant Defense Response against Infection and Injury, In: Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism, Pell, E.J., Steffen, K.L., Eds., American Soc. Plant Physiol., Rockville, 84-96.
- Donahue, J.L., Okpodu, C.M., Cramer, C.L., Grabau, E.A., Alscher, R.G., 1997, Responses of Antioxidants to Paraquat in Pea Leaves, Plant Physiol., 113, 249-257.
- Doulis, A.G., Donahue, J.L., Alscher, R.G., 1998, Differential Responses to Paraquat Induced Oxidative Injury in A Pea (*Pisum sativum*) Protoplast System, Physiol. Plant., 102, 3, 461-471.
- Drolet, G., Dumbroff, E.B., Legge, R.L., Thompson, J.E., 1986, Radical Scavenging Properties of Polyamines, Phytochem., 25, 367-371.
- Dronn, M., Clouse, S.D., Dixon, R.A., Lawton, M.A., Lamb, C.J., 1988, Glutathione and Fungal Elicitor Regulation of A Plant Defense Gene Promoter in Electroporated Protoplasts, Proc. Natl. Acad. Sci., 85, 3811-3815.
- Ederli, L., Pasqualini, S., Batini, P., Antonielli, M., 1997, Photoinhibition and Oxidative Stress: Effects on Xanthophyll Cycle, Scavenger Enzymes and Absciscic Acid Content in Tobacco Plants, Plant Physiol., 151, 4, 422-428.
- Edwards, E.A., Rawsthorne, S., Mullineaux, P.M., 1990, Subcellular Distribution of Multiple Forms of Glutathione Reductase in Leaves of Pea (*Pisum sativum* L.), Planta, 180, 278- 284.
- Edwards, E.A., Enard, C., Creissen, G.P., Mullineaux, P.M., 1994, Synthesis and Properties of Glutathione Reductase in Stressed Peas, Planta, 192, 137- 143.
- Ekanayake, I.J., De Datta, S.K., Steponkus, P.L., 1993, Effect of Water Deficit Stress on Diffusive Resistance, Transpiration and Spikelet Desiccation of Rice (*Oryza sativa* L.), Annals of Bot., 72, 73-80.

- Elstner, E.F., Lengfelder, E., Kwaitkowski, G., 1980, Paraquat Catalysed Photodestructions in Subchloroplast Particles are Independent of Photosynthetic Electron Transport, Zeitschrift für Naturforschung, 35, 303-307.
- Elstner, E.F., Wagner, G.A., Schultz, W., 1988, Activated Oxygen in Green Plants in Relation to Stress Situations, Curr. Topics Plant Biochem. Physiol., 7, 159-187.
- Elstner, E.E., Schempp, H., Preibisch, G., Hippeli, S., Oswald, W., 1994, Biological Sources of Free Radicals, In: Free Radicals in the Environment, Medicine and Toxicology, Richelieu Press, London, 13-45.
- Eskling, M., Arvidsson, P.O., Akerlund, H.E., 1997, The Xanthophyll Cycle, Its Regulation and Components, Physiol. Plant., 100, 806-816.
- Farr, S.B., Kogoma, T., 1991, Oxidative Stress Responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Microbiol. Rev., 55, 561-585.
- Farrington, J.A., Ebert, H., Lve, E.J., Fletcher, K., 1973, Bipyridylum Quaternary Salts and Related Compounds V, Pulse Radiolysis Studies of the Reaction of Paraquat Radical with Oxygen, Implications for Mode of Action of Bipyridyl Herbicides, Biochem. Biophys. Acta, 314, 372-381.
- Feierabend, J., Schaan, C., Hertwig, 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.
- Fletcher, R.A., 1969, Retardation of Leaf Senescence by Benzyladenine in Intact Bean Plants, Planta, 89, 1-8.
- Finckh, B.F., Kunert, K.J., 1985, Vitamins C and E: An Antioxidative System against Herbicide- Induced Lipid Peroxidation in Higher Plants, J. Agric. Food Chem., 33, 574-577.
- Foote, C.S., 1979, Quenching of Singlet Oxygen, In: Singlet Oxygen, Wasserman, H.H., Murray, R.W., Eds., Academic Press, New York, 129-171.
- Foyer, C.H., 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., 1993, Ascorbic Acid, In: Antioxidants in Higher Plants, Alscher, R.G., Hess, J.L., Eds., CRC Press, Boca Raton, 31-58.
- Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunert, K.J., 1994, Photooxidative Stress in Plants, Physiol. Plant., 92, 696-717.
- Foyer, C.H., Harbinson, J., 1994, Oxygen Metabolism and the Regulation of Photosynthetic Electron Transport, In: Causes of Photooxidative Stress and

Amelioration of Defense Systems in Plants, Foyer, C.H., Mullineaux, P.M., Eds., CRC Press, Boca Raton, 1-42.

Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F., Scott, I.M., 1997, Hydrogen Peroxide and Glutathione Associated Mechanisms of Acclimatory Stress Tolerance and Signalling, Physiol. Plant., 100, 241-254.

Fridovich, I., 1970, Quantitative Aspects of the Production of Superoxide Anion Radical by Milk Xanthine Oxidase, J. Biol. Chem., 245, 4053-4057.

Fridovich, I., 1995, Superoxide Radical and Superoxide Dismutases, Annu. Rev. Biochem., 64, 97-112.

Fryer, M.J., 1992, The Antioxidant Effects of Thylakoid Vitamin E (α -tokoferol), Plant Cell Environ., 15, 381-392.

Fuerst, E.P., Vaughn, K.C., 1990, Mechanisms of Paraquat Resistance, Weed Technol., 4, 150-156.

Furbank, R.T., Badger, M.R., 1983, Oxygen Exchange Associated with Electron Transport and Photophosphorylation in Spinach Thylakoids, Biochem. Biophys. Acta, 723, 400-409.

Furusawa, I., Mizuguchi, A., 1987, Production of Herbicide Resistant Plants Using Cell Culture, Bio. Ind., 4, 11-17.

Gardner, P.R., Fridovich, I., 1991., Superoxide Sensitivity of *Escherichia coli* 6-Phosphogluconate Dehydratase, J. Biol. Chem., 266, 1478-1483.

Gillham, D.J., Dodge, A.D., 1987, Chloroplast Superoxide and Hydrogen Peroxide Scavenging Systems from Pea Leaves, Seasonal Variations, Plant Sci., 50, 105-109.

Gossett, D.R., Millhollon, E.P., Lucas, M.C., 1994, Anti-oxidant Response to NaCl Stress in Salt Tolerant and Salt Sensitive Cultivars of Cotton, Crop Sci., 34, 706-714.

Green, R., Fluhr, R., 1995, UV-B Induced PR-I Accumulation is Mediated by Active Oxygen Species, Plant Cell, 7, 203-206.

Greissen, G., Edwards, A., Mullineaux, P., 1994, Glutathione Reductase and Ascorbate Peroxidase, In: Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants, Foyer, C.H., Mullineaux, P.M., Eds., CRC Press, Boca Raton, 343-364.

Gressel, J., Galum, C., 1994, Genetic Control of Antioxidant Tolerance, In: Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants, Foyer, C.H., Mullineaux, P.M., Eds., CRC Press, Boca Raton, 237-273.

- Grill E., Winnacker, E.L., Zenk, M.H., 1989, Phytochelatins, A Class of Heavy Metal Binding Peptides from Plants are Synthesized from Glutathione by A Specific Glutamylcysteine Dipeptidyl Transpeptidase (Phytochelatase Synthase), Proc. Natl. Acad. Sci., 84, 439-443.
- Grimes, H.D., Perkins, K.K., Boss, W.F., 1983, Ozone Degrades into Hydroxyl Radical under Physiological Conditions A Spin Trapping Study, Plant Physiol., 72, 1016-1020.
- Gruber, M.Y., Glick, B.R., Thompson, J.E., 1990, Cloned Manganese Superoxide Dismutase Reduces Oxidative Stress in *Escherichia coli* and *Anacystis nidulans*, Proc. Natl. Acad. Sci., 87, 2603-2612.
- Guida, G., Zacheo, G., 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., 1982, The Toxic Effects of Oxygen on Plant Tissues, In: Superoxide Dismutase, Oberley, L.W., Ed., Vol I, CRC Press, Boca Raton, 89-123.
- 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.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1989, Free Radicals in Biology and Medicine, Clarendon Press, Oxford.
- Harper, D.B., Harvey, B.M.R., 1978, Mechanism of Paraquat Tolerance in Perennial Ryegrass II, Role of Superoxide Dismutase, Catalase and Peroxidase, Plant Cell Environ., 1, 211-215.
- Hausladen, A., Alscher, R.G., 1993, Glutathione, In: Antioxidants in Higher Plants, Alscher, R.G., Hess, J.L., Eds., CRC Press, Boca Raton, 1-30.
- Heagle, A.S., 1989, Ozone and Crop Yield, Annu. Rev. Phytopathol., 27, 397-423.
- Hinman, R.L., Lang, J., 1965, Peroxidase Catalyzed Oxidation of Indole-3-Acetic Acid, Biochem., 4, 144-158.
- Horgan, R., Kramers, M.R., 1979, High Performance Liquid Chromatography of Cytokinins, J. Chromatog., 173, 263-270.
- Hossain, M.A., Asada, K., 1984, Monodehydroascorbate Reductase in Spinach Chloroplasts and Its Participation in Regeneration of Ascorbate for Scavenging Hydrogen Peroxide, Plant Cell Physiol., 25, 385-395.
- Hu, C., Van Huystee, R.B., 1989, Role of Carbohydrate Moieties in Peanut Peroxidases, Biochem. J., 263, 129-135.

- Imlay, J.A., Linn, S., 1986, DNA Damage and Oxygen Radical Toxicity, Science, 240, 1302-1309.
- Ilahi, I., Dorffling, K., 1982, Changes in Absciscic Acid and Proline Levels in Maize Varieties of Different Drought Resistance, Physiol. Plant., 55, 129-135.
- Ilan, I., 1971, Evidence for Hormonal Regulation of the Selectivity of Ion Uptake by Plant Cells, Physiol. Plant., 25, 230-233.
- Itai, C., 1999, Role of Phytohormones in Plant Responses to Stresses. In: Plant Responses to Environmental Stress, Lerner, H.R., Ed., Marcel Dekker, New York, 287-301.
- Iturbe-Ormaetxe, I., Escuredo, P.R., Arrese-Igor, C., Becana, M., 1998, Oxidative Damage in Pea Plants Exposed to Water Deficit or Paraquat, Plant Physiol., 116, 173-181.
- Jablonski, P.P., Anderson, J.W., 1981, Light Dependent Reduction of Dehydroascorbate by Ruptured Chloroplasts, Plant Physiol., 67, 1239-1242.
- Jacobson, M.D., 1996, Reactive Oxygen Species and Programmed Cell Death, TIBS, 21, 83-86.
- 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.
- Kagan V.E., 1989, Tocopherol Stabilizes Membrane against Phospholipase A, Free Fatty Acids, and Lysophospholipids, Ann. N. Y. Acad. Sci., 570, 121-135.
- Kaiser, W.M., 1976, The Effect of Hydrogen Peroxide on CO₂ Fixation of Isolated Intact Chloroplasts, Biochem. Biophys. Acta, 440, 476-482.
- Kaiser, W.M., 1979, Reversible Inhibition of the Calvin Cycle and Activation of Oxidative Pentose Phosphate Cycle in Isolated Chloroplasts by Hydrogen Peroxide, Planta, 145, 377-382.
- Kamal-Eldin, A., Appelquist, L.A., 1996, The Chemistry and Antioxidant Properties of Tocopherols and Tocotrienols, Lipids, 31, 7, 671-701.
- Kangasjarvi, J., Talvinen, J., Utriainen, M., Karjalainen, R., 1994, Plant Defence Systems Induced by Ozone, Plant Cell Environ., 17, 783-794.
- Kanofsky, J.R., Axelrod, B., 1986, Singlet Oxygen Production by Soybean Lipoxygenase Isozymes, J. Biol. Chem., 261, 1099-1104.
- Kanofsky, J.R., Sima, P., 1991, Singlet Oxygen Production from the Reactions of Ozone with Biological Molecules, J. Biol. Chem., 266, 9039-9042.
- Kao, C.H., 1980, Senescence of Rice Leaves, Influence of Benzyladenine on Chlorophyll Degradation, Plant Cell Physiol., 21, 1255-1262.

- Karmoker, J.L., Van Steveninck, F.M., 1979, The Effect of Absciscic Acid on the Uptake and Distribution of Ions in Intact Seedlings of *Phaseolus vulgaris* cv. Redland Pioneer, Physiol. Plant., 45, 453-459.
- Kelner, M.J., Bagnell, R., 1990, Glutathione Dependent Enzymes Alone can Produce Paraquat Resistance, Free Rad. Biol. Med., 9, 149-153.
- Kendall, E.J., McKersie, B.D., 1989, Free Radical and Freezing Injury to Cell Membranes of Winter Wheat, Physiol. Plant., 76, 86-94.
- Kirtikara, K., Talbot, D., 1996, Alteration in Protein Accumulation, Gene Expression and Ascorbate Glutathione Pathway in Tomato (*Lycopersicon esculentum*) under Paraquat and Ozone Stress, Plant Physiol., 148, 752-760.
- Klapheck, S., 1988, Homoglutathione: Isolation, Quantification and Occurrence in Legumes, Physiol. Plant., 74, 727-732.
- Knox, J.P., Dodge, A.D., 1985, Singlet Oxygen and Plants, Phytochem., 24, 889-896.
- Kono, Y., Fridovich, I., 1982, Superoxide Radical Inhibits Catalase, J. Biol. Chem., 257, 10, 5751-5754.
- Kraus, T.E., McKersie, B.D., Fletcher, R.A., 1995, Paclobutrazol Induced Tolerance of Wheat Leaves to Paraquat may Involve Increased Antioxidant Enzyme Activity, Plant Physiol., 145, 570-576.
- Kraus, T.E., Hofstra, G., Fletcher, R.A., 1993, Regulation of Senescence by Benzylaminopurine and Uniconazole in Intact and Excised Soybean Cotyledons, Plant Physiol. Biochem., 31, 6, 827-834.
- Krinsky, N., 1979, Biological Roles of Singlet Oxygen, In: Singlet Oxygen, Wasserman, H.H., Murray, R.W., Eds., Academic Press, New York, 129-171.
- Kunert, K.J., Böger, P., 1984, The Diphenyl Ether Herbicide Oxyfluorfen, Action of Antioxidants, J. Agr. Food Chem., 32, 725-728.
- Kuraishi, S., Tasaki, K., Sakurai, N., Sadatoku, K., 1991, Changes in Levels of Cytokinin in Etiolated Squash Seedlings after Illumination, Plant Cell Physiol., 32, 585-591.
- Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Heat of Bacteriophage T₄, Nature, 227, 680-685.
- Landry, L.G., Pell, E.J., 1993, Modification of Rubisco and Altered Proteolytic Activity in O₃ Stressed Hybrid Poplar (*Populus maximowizii* + *trichocarpa*), Plant Physiol., 101, 1355-1362.
- Laisk, A., Pfanz, Y., Heber, U., 1988, Sulfur Dioxide Fluxes into Different Cellular Compartments of Leaves Photosynthesizing in A Polluted Atmosphere, II.

- Consequences of SO₂ Uptake as Revealed by Computer Analysis, Planta, 173, 241-252.
- Larque-Saavedra, A., Wain, R.L., 1974, Absciscic Acid Levels in Relation to Drought Tolerance in Varieties of *Zea mays* L., Nature, 251, 716-717.
- Larque-Saavedra, A., Wain, R.L., 1976, Studies on Plant Growth Regulating Substances, XLII. Absciscic Acid as A Genetic Character Related to Drought Tolerance, Ann. Appl. Biol., 83, 291-297.
- Larson, R.A., 1995, Plant Defences against Oxidative Stress, Arc. Insect. Biochem. Physiol., 29, 2, 179-186.
- Law, M.Y., Charles, S.A., Halliwell, B., 1983, Glutathione and Ascorbic Acid in Spinach (*Spinacia oleracea*) Chloroplasts, Biochem. J., 210, 899-903.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C., 1994, H₂O₂ from the Oxidative Burst Orchestrates the Plant Hypersensitive Disease Resistance Response, Cell, 79, 583-593.
- Leprince, O., Atherton, N.M., Deltour, R., Hendry, G.A.F., 1994, The Involvement of Respiration in Free Radical Processes during Loss of Desiccation Tolerance in Germinating *Zea mays* L, An Electron Paramagnetic Resonance Study, Plant Physiol., 104, 1333-1339.
- Li, L., Van Staden, J., 1998, Effects of Plant Growth Regulators on the Antioxidant System in Callus of Two Maize Cultivars Subjected to Water Stress, Plant Growth Regul., 24, 55-66.
- Liebler, D.C., Kling, D.S., Reed, D.J., 1986, Antioxidant Protection of Phospholipid Bilayers by α - Tocopherol, Control of α - Tocopherol Status by Ascorbic Acid and Glutathione, J. Biol. Chem., 261, 12114-12119.
- Lindqvist, Y., Branden, C.L., Mathews, F.S., Lederer, F., 1991, Spinach Glycolate Oxidase and Yeast Flavocytochrome b₂ are Structurally Homologous and Evolutionarily Related Enzymes with Distinctly Different Function and Flavin Mononucleotide Binding, J. Biol. Chem., 266, 3198-3207.
- Liu, E.H., 1973, A Simple Method for Determining the Relative Activities of Individual Peroxidase Isoenzymes in A Tissue Extract, Anal. Biochem., 56, 149-154.
- Lorenzini, G., Stringari, S., Nali, C., 2002, The Absence of Cross Tolerance between Ozone and Paraquat, The Case of *Conyza bonariensis*, Phyton, 42, 89-97.
- Loschen, G., Azzi, A., Floheß, L., 1973, Mitochondrial H₂O₂ Formation: Relationship with Energy Conversion, FEBS Lett., 33, 84-88.
- Loschen, G., Azzi, A., Richter, C., Floheß, L., 1974, Superoxide Radicals as Precursors of Mitochondrial Hydrogen Peroxide, FEBS Lett., 42, 68-72.

- Loewus, F.A., 1988, Ascorbic Acid and Its Metabolic Products, In: The Biochemistry of Plants, Preiss, J., Ed., Academic Press, New York, 14, 85-107.
- Lutz, C., Steiger, A., Godde, D., 1992, Influence of Air Pollutants and Nutrient Deficiency on D1 Protein Content and Photosynthesis in Young Spruce Trees, Physiol. Plant., 85, 611-617.
- Machackova, I., Krekule, J., Seidlova, F., Strand, M., 1993, Cytokinins in Photoperiodic Introduction of Flowering *Chenopodium* Species, Physiol. Plant., 87, 160-166.
- Madamanchi, N.R., Alscher, R.G., 1991, Metabolic Bases for Differences in Sensitivity of Two Pea Cultivars to Sulfur Dioxide, Plant Physiol., 97, 88-93.
- Mader, M., Füssl, R., 1982, Role of Peroxidase in Lignification of Tobacco Cells, Plant Physiol., 70, 1132-1134.
- Mahoney, S.R., Ghosh, S., Peirson, D., Dumbroff, E.B., 1998, Paclobutrazol Affects the Resistance of Black Spruce to High Light and Thermal Stress, Tree Physiol., 18, 121-127.
- Malan, C., Greyling, M.M., Gressel, J., 1990, Correlation between Cu-Zn Superoxide Dismutase and Glutathione Reductase, and Environmental and Xenobiotic Stress Tolerance in Maize Inbreds, Plant Sci., 69, 157-166.
- Mann, T., Kleilis, D., 1938, Homocuprein and Heptacuprein, Copper Protein Compounds of Blood and Liver in Mammals, Proc. R. Soc., 126, 303-315.
- Mapson, L.W., Isherwood, F.A., 1963, Glutathione Reductase from Germinated Peas, Biochem. J., 86, 173-191.
- Marx, J.L., 1985, Oxygen Free Radicals Linked to Many Diseases, Science, 235, 529-531.
- Masojidek, J., Trivedi, S., Halshaw, L., Alexiou, A., Hall, D.O., 1991, The Synergistic Effect of Drought and Light Stresses in *Sorghum* and Pearl Millet, Plant Physiol., 96, 198-207.
- Mathis, P., Kleo, J., 1973, The Triplet State of β -Carotene and Analog Polyenes of Different Length, Photochem. Photobiol., 18, 343-346.
- Matrinage, M., Camadro, J.M., Labbe, P., Scalla, R., 1989, Protoporphyrinogen Oxidase as A Molecular Target for Diphenyl Ether Herbicides, Biochem. J., 260, 231-235.
- Matters, G.L., Scandalios, J.G., 1986, Effect of Free Radical Generating Herbicide Paraquat on the Expression of the Superoxide Dismutase (SOD) Genes in Maize, Biochem. Biophys. Acta, 882, 29-38.

- May, M.J., Vernoux, T., Leaver, C., Van Montagu, M., Inze, D., 1998, Glutathione Homeostasis in Plants: Implications for Environmental Sensing and Plant Development, J. Exp. Bot., 49, 321, 649-667.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969, Superoxide Dismutase, An Enzymatic Function for Erythrocyte, J. Biol. Chem., 244, 6049-6055.
- Mees, G.C., 1960, Experiments on the Herbicidal Action of 1,1'-Ethylene-2,2'-Dipyridylum Dibromide, Ann. Appl. Biol., 48, 601-612.
- Mehdy, M.C., 1994, Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens, Plant Physiol., 105, 467- 472.
- Mehler, A.H., 1951, Studies on Reactions of Illuminated Chloroplasts, Mechanisms of the Reduction of Oxygen and Other Hill Reagents, Arch. Biochem. Biophys., 33, 65-72.
- Mehlhorn, H., Kunert, K.J., 1986, Ascorbic Acid, Phenolic Compounds, and Plant Peroxidases, A Natural Defence System against Peroxidative Stress in Higher Plants, In: Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases, Greppin, H., Penel, C.L., Gaspar, T., Ed., University of Geneva Press, Geneva, 437-440.
- Mehlhorn, H., Cottam, D.A., Lucas, P.W., Wellburn, A.R., 1987, Induction of Ascorbate Peroxidase and Glutathione Reductase Activities by Interactions of Mixtures of Air Pollutants, Free Radical Res. Commun., 3, 193-197.
- Mehlhorn, H., 1990, Ethylene Promoted Ascorbate Peroxidase Activity Protects Plants against Hydrogen Peroxide, Ozone and Paraquat, Plant Cell Environ., 13, 971-976.
- Meister, A., Anderson, M.E., 1983, Glutathione, Annu. Rev. Biochem., 52, 711-760.
- Meister, A., 1988, Glutathione Metabolism and Its Selective Modification, J. Biol. Chem., 263, 17205-17208.
- Meldrum, N.U., Tarr, H.L.A., 1935, The Reduction of Glutathione by the Warburg Christian System, Biochem. J., 29, 108-115.
- Minton, K.W., Tabor, H., Tabor, C.W., 1990, Paraquat Toxicity is Increased in *Escherichia coli* Defective in the Synthesis of Polyamines, Proc. Natl. Acad. Sci., 87, 2851-2855.
- Mishra, N.P., Mishra, R.K., Singhal, G.S., 1993, Changes in the Activities of Antioxidant Enzymes during Exposure of Intact Wheat Leaves to Strong Visible Light at Different Temperatures in the Presence of Protein Synthesis Inhibitors, Plant Physiol., 102, 903-910.
- Mishra, A., Choudhuri, M.A., 1998, Amelioration of Lead and Mercury Effects on Germination and Rice Seedling Growth by Antioxidants, Biologia Plant., 41, 3, 469-473.

- Mittler, R., Zilinkas, B.A., 1991, Purification and Characterization of Pea Cytosolic Ascorbate Peroxidase, Plant Physiol., 97, 962-968.
- Miyake, C., 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., 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.
- Mizrahi, Y., Blumofeld, A., Bittner, S., Richmond, A.E., 1971, Absciscic Acid and Cytokinin Content of Leaves in Relation to Salinity and Relative Humidity, Plant Physiol., 48, 752-755.
- Nakano, Y., 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.
- Nagele, A., Felix, K., Lengfelder, E., 1994, Induction of Oxidative Stress and Protection against Hydrogen Peroxide Mediated Cytotoxicity by the Superoxide Dismutase Mimetic Complex Copper Putrescin Pyridine, Biochem. Pharmacol., 47, 555-562.
- Nishikimi, M., Noguchi, E., Yagi, K., 1978, Occurrence in Yeast of L- Galatolactone Oxidase Which is Similar to A Key Enzyme for Ascorbic Acid Biosynthesis in Animals, L- Gulonolactone Oxidase, Arch. Biochem. Biophys., 191, 479-486.
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998, Ascorbate and Glutathione, Keeping Active Oxygen under Control, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 49, 249-279.
- Oleinick, N.L., Chiu, S., Ramakrishnan, N., 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., Beckerson, D.W., 1986, Polyamines as Antiozonants for Tomato, Hort. Science, 21, 1070-1071.
- Özer, Z., 1993, Niçin Yabancı Ot Bilimi (Herboloji)?, Türkiye I. Herboloji Kongresi, 3-5 Şubat, Adana, 1-7.
- Packer, J.E., Slater, T.F., Wilson, R.L., 1979, Direct Observation of A Free Radical Interaction between Vitamin E and Vitamin C, Nature, 278, 737-738.
- Padh, H., 1990, Cellular Functions of Ascorbic Acid, Biochem. and Cell Biol., 68, 1166-1173.

- Parthier, B., 1979, The Role of Phytohormones (Cytokinins) in Chloroplast Development, Biochem. Physiol. Pflanzen., 174, 173-178.
- Pastori, G.M., Trippi, V.S., 1992, Oxidative Stress Induces High Rate of Glutathione Reductase Synthesis in A Drought Resistant Maize Strain, Plant Cell Physiol., 33, 7, 957-961.
- Pastori, G.M., Trippi, V.S., 1993, Antioxidative Protection in A Drought Resistant Maize Strain during Leaf Senescence, Physiol. Plant., 87, 227-231.
- Paul, K.G., 1963, Peroxidases, In: The Enzymes, Boyer, P.D., Lardy, H., Myrback, K., Eds., Academic Press, New York, 227-274.
- Peiser, G., Yang, S.F., 1985, Biochemical and Physiological Effects of SO₂ on Nonphotosynthetic Processes in Plants, In: Sulfur Dioxide and Vegetation, Winner, W.E., Mooney, H.A., Goldstein, R.A., Eds., Stanford University Press, Stanford, 148-161.
- Peleg, I., Zer, H., Chevion, M., 1992, Paraquat Toxicity in *Pisum sativum*: Effects on Soluble and Membrane Bound Proteins, Physiol. Plant., 86, 131-135.
- Pilon-Smits, E.A.H., Zhu, Y.L., Sears, T., Terry, N., 2000, Overexpression of Glutathione Reductase in *Brassica juncea*: Effects on Cadmium Accumulation and Tolerance, Physiol. Plant., 110, 455-460.
- Pitcher, L.H., Brennan, E., Hurley, A., Dunsmuir, P., Tepperman, J.M., Zilinskas, B.A., 1991, Overproduction of Petunia Copper/Zinc Superoxide Dismutase Does Not Confer Ozone Tolerance in Transgenic Tobacco, Plant Physiol., 97, 452-455.
- Pitcher, L.H., 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.
- Poduslo, J.F., 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 Occurring Polyamine, Putrescine, J. Neurochem., 67, 734-741.
- Popovic, R.B., Kyle, D.J., Cohen, A.S., Zalik, S., 1979, Stabilization of Thylakoid Membranes by Spermine during Stress Induced Senescence of Barley Leaf Discs, Plant Physiol., 64, 721-726.
- Preston, C., Holtum, J.A.M., Powles, S.B., 1992, On the Mechanism of Resistance to Paraquat in *Hordeum glaucum* and *H. leporium*, Plant Physiol., 100, 630-636.
- Price, A., Lucas, P.W., Lea, P.J., 1990, Age Dependent Damage and Glutathione Metabolism in Ozone Fumigated Barley: A Leaf Section Approach., J. Exp. Bot., 40, 1309-1317.

- Price, A.H., Hendry, G.A.F., 1991, Iron Catalyzed Oxygen Radical Formation and Its Possible Contribution to Drought Damage in Nine Grasses and Three Cereals, Plant Cell Environ., 14, 477-484.
- Puntarulo, S., Galleano, M., Sanchez, R.A., Boveris, A., 1991, Superoxide Anion and Hydrogen Peroxide Metabolism in Soybean Embryonic Axes during Germination, Biochem. Biophys. Acta, 1074, 277-283.
- Quarrie, S.A., Jones, H.G., 1979, Genotypic Variation in Leaf Water Potential, Stomatal Conductance and Absciscic Acid Concentration in Spring Wheat Subjected to Artificial Drought Stress, Annals of Bot., 44, 323-332.
- Rabinowitch, H., Fridovich, I., 1983, Superoxide Radicals, Superoxide Dismutases and Oxygen Toxicity in Plants, Photochem. Photobiol., 37, 679-690.
- Reddy, G.N., Arteca, R.N., Dai, Y.R., Flores, H.E., Negm, F.B., Pell, E.J., 1993, Changes in Ethylene and Polyamines in Relation to mRNA Levels of the Large and Small Subunits of Ribulose Biphosphate Carboxylase/Oxygenase in Ozone Stressed Potato Foliage, Plant, Cell Environ., 16, 819-826.
- Rennenberg, H., 1982, Glutathione Metabolism and Possible Biological Roles in Higher Plants, Phytochem., 21, 2771-2781.
- Rennenberg, H., Lamourex, G.L., 1990, Physiological Processes that Modulate the Concentration of Glutathione in Plant Cells, In: Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants, Rennenberg, H., Brunold, C., De Kok, L.J., Stulen, I., Eds., SPB Academic Publ., The Hague, Netherlands, 53-65.
- Rich, P.R., Bonner, W.D., 1978, The Sites of Superoxide Anion Generation in Higher Plant Mitochondria, Arch. Biochem. Biophys., 188, 206-213.
- Robinson, J.M., 1988, Does Oxygen Photoreduction Occur *in vivo*?, Physiol. Plant., 72, 666-680.
- Rodriguez, R., Sanchez, T.R., 1982, Peroxidase and IAA Oxidase in Germinating Seeds of *Cicer arietinum* L., Rev. Esp. Physiol., 38, 183-188.
- Rousos, P.A., Harrison, H.C., Palta, J.P., 1986, Reduction of Chlorophyll in Cabbage Leaf Disks Following Cu^{2+} Exposure, Hort. Science, 21, 499-501.
- Rowland-Bamford, A.J., Borland, A.M., Lea, P.J., Mansfield, T.A., 1989, The Role of Arginine Decarboxylase in Modulating the Sensitivity of Barley to Ozone, Environ. Poll., 61, 95-106.
- Rüegsegger, A., Schmutz, D., Brunold, C., 1990, Regulation of Glutathione Biosynthesis by Cadmium in *Pisum sativum* L., Plant Physiol., 93, 1579-1584.

- Sairam, R.K., Shukla, D.S., Saxena, D.C., 1998, Stress Induced Injury and Antioxidant Enzymes in Relation to Drought Tolerance in Wheat Genotypes, Biologia Plant., 40, 3, 357-364.
- Salin, M.L., 1988, Toxic Oxygen Species and Protective Systems of the Chloroplast, Physiol. Plant., 72, 681-689.
- Sanders, G.E., Colls, J.J., Clark, A.G., 1992, Physiological Changes in *Phaseolus vulgaris* in Response to Long-term Ozone Exposure, Annals of Bot., 69, 123-133.
- Scandalios, J.G., Liu, E.H., Campeau, M.A., 1972, The Effects of Intragenic and Intergenic Complementation Catalase Structure and Function in Maize: A Molecular Approach to Heterosis, Arch. Biochem. Biophys., 153, 695-705.
- 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 Laboratory Press, New York, 117-152.
- Scandalios, J.G., 1993, Oxygen Stress and Superoxide Dismutase, Plant Physiol., 101, 7-12.
- Schirmer, R.H., Krauth-Siegel, R.L., Schulz, G.E., 1989, Glutathione Reductase, In: Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects, Coenzymes and Cofactors, Dolphin, D., Ed., Wiley Publishers, New York, 187- 242.
- Schupp, R., Schatten, T., Willenbrink, J., Rennenberg, H., 1992, Long Distance Transport of Reduced Sulphur in Spruce (*Picea abies* L.), J. Exp. Bot., 43, 1243-1250.
- Scruton, N.S., Berry, A., Perham, R.N., 1990, Redesign of the Coenzyme Specificity of A Dehydrogenase by Protein Engineering, Nature, 343, 38-43.
- Shaaltiel, Y., Gressel, J., 1986, Multienzyme Oxygen Radical Detoxifying System Correlated with Paraquat Resistance in *Conyza bonariensis*, Pestic. Biochem. Physiol., 26, 22-28.
- Shaaltiel, Y., Glazer, A., Bocion, P.F., Gressel, J., 1988, Cross Tolerance to Herbicidal and Environmental Oxidants of Plant Biotypes to Paraquat, Sulfur Dioxide and Ozone, Pestic. Biochem. Physiol., 31, 13-23.
- Shalata, A., Neumann, P.M., 2001, Exogenous Ascorbic Acid (Vitamin C) Increases Resistance to Salt Stress and Reduces Lipid Peroxidation, J. Exp. Bot., 52, 364, 2207-2211.
- Shewfelt, R.L., Purvis, A.C., 1995, Toward A Comprehensive Model for Lipid Peroxidation in Plant Tissue Disorders, Hort. Science, 30, 2, 213-218.
- Shieh, H.H., Sweet, T.R., 1979, Spectrophotometric Determination of Ascorbic Acid, Anal. Biochem., 96, 1-5.

- Shimizaki, K., Sugahara, K., 1980, Inhibition Site of the Electron Transport System in Lettuce Chloroplasts by Fumigation of Leaves with SO₂, Plant Cell Physiol., 21, 125-135.
- Slocum, R., Kaur-Sawhney, R., Galston, A.W., 1984, The Physiology and Biochemistry of Polyamines in Plants, Arch. Biochem. Biophys., 235, 283-303.
- 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: Environment and Plant Metabolism, Smirnoff, N., Ed., BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK, 217-242.
- Smith, I.K., Kendall, A.C., Keys, A.J., Turner, J.C., Lea, P.J., 1985, The Regulation of the Biosynthesis of Glutathione in Leaves of Barley (*Hordeum vulgare* L.), Plant Sci., 41, 11-17.
- Sohal, R.S., Agarwal, A., Orr, W.C., 1995, Simultaneous Overexpression of Copper and Zinc Containing Superoxide Dismutase and Catalase Retards Age Related Oxidative Damage and Increases Metabolic Potential in *Drosophila melanogaster*, J. Biol. Chem., 270, 15671-15673.
- Somashekaraiah, B.V., Padmaja, K., Prasad, A.R.K., 1992, Phytotoxicity of Cadmium Ions on Germinating Seedlings of Mung Bean (*Phaseolus vulgaris*), Involvement of Lipid Peroxides in Chlorophyll Degradation, Physiol. Plant., 85, 85-89.
- Spychalla, J.P., Desborough, S.L., 1990, Superoxide Dismutase, Catalase and α -Tocopherol Content of Stored Potato Tubers, Plant Physiol., 94, 1214-1218.
- Srivastava, S.K., Vashi, D.J., Naik, B.I., 1983, Control of Senescence by Polyamines and Guanidines in Young and Mature Barley Leaves, Phytochem., 22, 10, 2151-2154.
- Stadtman, E.R., 1986, Oxidation of Proteins by Mixed Function Oxidation Systems: Implication in Protein Turnover, Aging and Neutrophil Function, Trends Biochem. Sci., 11, 11-12.
- Stajner, D., Gasic, O., Matkovic, B., Varga, S.I., 1995, Metolachlor Effect on Antioxidants Enzyme Activities and Pigments Content in Seeds and Young Leaves of Wheat (*Triticum aestivum* L.), Agr. Med., 125, 267-273.
- Stajner, D., Kevresan, S., Gasic, O., Mimica-Dukic, N., Zongli, H., 1997, Nitrogen and *Azotobacter chroococcum* Enhance Oxidative Stress Tolerance in Sugar Beet, Biologia Plant., 39, 3, 441- 445.
- Streb, P., Michael-Knauf, A., Feierabend, J., 1993, Preferential Photoinactivation of Catalase and Photoinhibition of Photosystem II are Common Early Symptoms under Various Osmotic and Chemical Stress Conditions, Physiol. Plant., 88, 590-598.

- Tadolini, B., 1988, Polyamine Inhibition of Lipoperoxidation: The Influence of Polyamines on Iron Oxidation in the Presence of Compounds Mimicking Phospholipid Polar Heads, Biochem., 249, 33-36.
- Tanaka, K., Kondo, N., Sugahara, K., 1982, Accumulation of Hydrogen Peroxide in Chloroplasts of SO₂ Fumigated Spinach Leaves, Plant Cell Physiol., 23, 999-1007.
- Tanaka, K., Furusawa, I., Kondo, N., Tanaka, K., 1988, SO₂ Tolerance of Tobacco Plants Regenerated from Paraquat Tolerant Callus, Plant Cell Physiol., 29, 743-746.
- Taylor, J.S., Pharis, R.P., Loveys, B., Notodimedjo, S., Edwards, G.R., 1984, Changes in Endogenous Hormones in Apple During Bud Burst Induced by Defoliation, Plant Growth Regul., 2, 117-134.
- Tepperman, J.M., Dunsmuir, P., 1990, Transformed Plants with Elevated Level of Chloroplastic SOD Are Not More Resistant to Superoxide Toxicity, Plant Mol. Biol., 14, 501-511.
- Thompson, J.E., Ledge, R.L., Barber, R.F., 1987, The Role of Free Radicals in Senescence and Wounding, New Phytol., 105, 317-344.
- Tiburcio, A.F., Besford, R.T., Capell, T., Borrell, A., Testillano, P.S., Risueno, M.C., 1994, Mechanisms of Polyamine Action during Senescence Responses Induced by Osmotic Stress, J. Exp. Bot., 45, 1789-1800.
- Timmerman, K.P., 1989, Molecular Characterization of Corn Glutathione-S-Transferase Isozymes Involved in Herbicide Detoxification, Physiol. Plant., 77, 465-471.
- Trippi, V.S., De Luca d'Oro, G.M., 1985, The Senescence Process in Oat Leaves and Its Regulation by Oxygen Concentration and Light Irradiance, Plant Cell Physiol., 26, 1303-1311.
- Tsang, E.W.T., Bowler, C., Herouart, D., Van Camp, W., Villarroel, R., Gentella, C., Van Montagu, M., Inze, D., 1991, Differential Regulation of Superoxide Dismutase in Plants Exposed to Environmental Stress, Plant Cell, 3, 783-791.
- Tuomainen, J., Pellinen, R., Roy, S., Kiiskinen, M., Eloranta, T., Karjalainen, R., Kangasjarvi, J., 1996, Ozone Affects Birch (*Betula pendula* Roth) Phenylpropanoid, Polyamine and Active Oxygen Detoxifying Pathways at Biochemical and Gene Expression, Plant Physiol., 148, 179-188.
- Turrens, J.F., Freeman, B.A., Crapo, J.D., 1982, Hyperoxia Increases H₂O₂ Release by Lung Mitochondria and Microsomes, Arch. Biochem. Biophys., 217, 411-421.
- Van Assche, F., Clijsters, H., 1980, Effects of Metals on Enzyme Activity in Plants, Plant, Cell Environ., 13, 195-206.

- Van Camp, W., Van Montagu, M., 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.
- Van Camp, W., Willekens, H., Bowler, C., Van Montagu, M., Inze, D., Langebartels, C., Sandermann, H., 1994b, Elevated Levels of Superoxide Dismutase Protect Transgenic Plants against Ozone Damage, Biotechnology, 12, 165-168.
- Van Lelyveld, I.J., Pretorius, W.J., 1973, Assay Method for Determination of α -Amylase, Indole-3- Acetic Acid Oxidase and Ascorbic Acid Oxidation in A Crude Extract from Avocado, Agrochem. Physica., 5, 29-34.
- Vaugh, K.C., Fuerst, E.P., 1985, Structural and Physiological Studies of Paraquat Resistant *Conyza*, Pestic. Biochem. Physiol., 24, 86-94.
- Veljovic-Jovanovic, S., Bilger, W., Heber, U., 1993, Inhibition of Photosynthesis, Stimulation of Zeaxanthin Formation and Acidification in Leaves by SO₂ and Reversal of These Effects, Planta, 191, 365-376.
- Vionello, A., Macri, F., 1991, Generation of Superoxide Anion and Hydrogen Peroxide at Surface of Plant Cells, J. Bioenerg. Biomemb., 23, 409-423.
- Walker, M.A., McKersie, B.D., 1993, Role of Ascorbate Glutathione Antioxidant System in Chilling Resistance in Tomato, Plant Physiol., 141, 234-239.
- Wingate, V.P.M., Lawton, M.A., Lamb, C.J., 1988, Glutathione Causes A Massive and Selective Induction of Plant Defense Genes, Plant Physiol., 87, 206-210.
- Winston, G.W., Cederbaum, A.I., 1983, Oxyradical Production by Purified Components of the Liver Microsomal Mixed-function Oxidase System I: Oxidation of Hydroxyl Radical Scavenging Agents, J. Biol Chem., 258, 1508-1513.
- Winterbourne, C.C., 1981, Production of Hydroxyl Radicals from Paraquat Radicals and H₂O₂, FEBS Lett., 128, 339-342.
- Wise, R.R., 1995, Chilling Enhanced Photooxidation: The Production, Action and Study of Reactive Oxygen Species Produced during Chilling in the Light, Photosyn. Res., 45, 79-97.
- Wisemann, H., Halliwell, B., 1996, Damage to DNA by Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Role in Inflammatory Disease and Progression to Cancer, Biochem. J., 313, 17-29.
- Witkowski, D.A., Halling, B.P., 1989, Inhibition of Plant Protoporphyrinogen Oxidase by the Herbicide Acifluorfen Methyl, Plant Physiol., 90, 1239-1242.
- Wolff, S.P., Garner, A., Dean, T., 1986, Free Radicals, Lipids and Protein Degradation, Trends Biochem. Sci., 11, 27-31.

- Wright, S.T.C., 1969, An Increase in the 'Inhibitor-B' Content of Detached Wheat Leaves Following A Period of Wilting, Planta, 86, 10-20.
- Yan, B., Dai, Q., Liu, X., Huang, S., Wang, Z., 1996, Flooding Induced Membrane Damage, Lipid Oxidation and Activated Oxygen Generation in Corn Leaves, Plant and Soil, 179, 261-268.
- Ye, B., Gressel, J., 1994, Constitutive Variation of Ascorbate Peroxidase Activity during Development Parallels that of Superoxide Dismutase and Glutathione Reductase in Paraquat Resistant *Conyza*, Plant Sci., 102, 147-151.
- Ye, B., Muller, H.H., Zhang, J., Gressel, J., 1997, Constitutively Elevated Levels of Putrescine and Putrescine Generating Enzymes Correlated with Oxidant Stress Resistance in *Conyza bonariensis* and Wheat, Plant Physiol., 115, 1443-1451.
- Young, A.J., 1991, Inhibition of Carotenoid Biosynthesis, In: Herbicides, Baker, N.R., Percival, M.P., Eds., Elsevier Publishers, Amsterdam, 131-171.
- Youngman, R.J., Dodge, A.D., 1981, On the Mechanism of Paraquat Resistance in *Conyza sp.*, In: Photosynthesis and Plant Productivity, Akoyunoğlu, G., Ed., Balaban International Science Services, Philadelphia, 537-543.
- Zhang, J.X., Kirkham, M.B., 1996, Enzymatic Responses of the Ascorbate Glutathione Cycle to Drought in *Sorghum* and Sunflower Plants, Plant Sci., 113, 139-147.
- Ziegler, D.M., 1985, Role of Reversible Oxidation Reduction of Enzyme Thiol Disulphides in Metabolic Regulation, Annu. Rev. Biochem., 54, 305-329.

ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Trabzon'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Trabzon'da tamamladıktan sonra 1989-1990 öğretim yılında K.T.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğretimine başladı. 1993 yılında bu bölümden biyolog ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitime başladı. 1994-1997 yılları arasında K.T.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalıştı. 1997 yılında yüksek lisans eğitimini tamamlayarak aynı yıl enstitüde doktora programına başladı. 1998 yılından itibaren doktora süresi boyunca K.T.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalıştı. Yabancı dili İngilizcedir.

